

Tatiana Takahashi Higa

***ESTUDO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DOS
FATORES DE TRANSCRIÇÃO NO PROMOTOR
DA GLOBINA GAMA NA PERSISTÊNCIA
HEREDITÁRIA DA HEMOGLOBINA FETAL
TIPO BRASILEIRA***

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de Clínica Médica, da Médica TATIANA TAKAHASHI HIGA.



*Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Orientador*

Campinas
2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tatiana Takahashi Higa

**ESTUDO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DOS
FATORES DE TRANSCRIÇÃO NO PROMOTOR DA
GLOBINA GAMA NA PERSISTÊNCIA
HEREDITÁRIA DA HEMOGLOBINA FETAL
TIPO BRASILEIRA**

Tese de doutorado apresentada à Pós Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor
em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Campinas
2004

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	H533e
V	EX
TOMBO BC/	59225
PROC.	16-117-04
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/07/04
Nº CPD	

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

CM00198451-7

5113 15 317966

H533e

Higa, Tatiana Takahashi

Estudo funcional e caracterização dos fatores de transcrição no promotor da globina gama na persistência hereditária da hemoglobina fetal tipo brasileira / Tatiana Takahashi Higa. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Fernando Ferreira Costa

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Expressão gênica. 2. Eletroforese em gel. I. Fernando Ferreira Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

Membros:

1. Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro
 2. Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo
 3. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonatti
 4. Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
-

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14/01/2004

DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese
à família na qual eu cresci
e à família que começo a construir...*

*aos meus pais Jiro e Fujiko,
às minhas irmãs Liana e Juliana,
ao meu marido Márcio,
e ao meu filhinho André
(que fez questão de nascer antes
da defesa dessa tese!).*

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as contribuições durante a realização deste trabalho, as quais presto meus agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa pela confiança em mim depositada na realização deste trabalho e pelo seu exemplo como professor e pesquisador,

À Lena, Tereza, Tiago, Adriana, Paulo, Ângela, Dilmara, Dulcinéia, Heloísa e Anderson que ajudaram na realização da parte experimental e mais do que colegas se tornaram amigos,

Às amigas Átermis, Nicola, Flávia, Patrícia e Natasha pelo sorriso e alegria que tornaram meus dias no laboratório mais agradáveis,

A Patrícia e Raquel pelas muitas ajudas e amizade,

A todos os colegas e amigos do Laboratório que me acolheram e dividiram as lutas do dia a dia,

Ao Roberto Schreiber pelas informações passadas no início desse trabalho,

Ao Roberto Zulli pela contribuição na realização da análise estatística,

Ao CNPq e FAPESP que viabilizaram o desenvolvimento dessa tese,

Ao meu marido que esteve ao meu lado durante toda a realização dessa tese, sempre com uma palavra de ânimo e incentivo quando nada parecia funcionar,

Aos meus pais pela educação que me deram,

À Deus, de quem procede toda a vida.

*Sobre tudo o que se deve guardar, guarda o coração,
porque dele procedem as fontes da vida.
(Provérbios 4:23)*

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
I – INTRODUÇÃO.....	18
1. Hemoglobina.....	19
2. Hemoglobina fetal.....	21
3. Regulação dos genes da globina.....	21
3.1. Região promotora.....	22
3.2. Regiões potencializadoras da transcrição gênica “ <i>Enhancers</i> ”.....	24
3.3. Expressão dos genes da globina.....	26
3.3.1. Expressão gene ϵ	26
3.3.2. Expressão gene γ	27
3.3.3. Expressão gene β	27
4. Hemoglobinopatias	28
5. Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal.....	29
5.1. PHHF secundárias a deleções gênicas	30
5.2. PHHF secundárias a mutações de ponto.....	31
II – OBJETIVOS.....	36
III – RESUMO DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	38
IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
1. Construção do vetor de expressão contendo a região promotora γ	42
1.1. Extração de DNA genômico.....	42
1.2. Amplificação da região promotora.....	43
1.2.1. Reação em cadeia da polimerase.....	43

1.2.2. Mutagênese sítio dirigida.....	44
1.3. Clonagem do fragmento amplificado no vetor PCR® 2.1-TOPO.....	47
1.3.1. Reação de ligação.....	47
1.3.2. Transformação.....	48
1.3.3. Extração do DNA plasmidial.....	48
1.4. Sequenciamento.....	49
1.5. Clonagem no vetor de Expressão.....	49
2. Construção dos vetores de expressão contendo a região promotora γ^A e o HS2-LCR.....	52
2.1. Amplificação do fragmento HS2-LCR.....	52
2.2. Clonagem do fragmento HS2-LCR no vetor de expressão.....	53
3. Análise de expressão gênica.....	54
3.1. Cultura de célula.....	55
3.2. Transfecção.....	55
3.2.1. Transfecção por eletroporação.....	55
3.2.2. Transfecção por lipofecção.....	55
3.3. Análise da atividade de luciferase.....	56
3.3.1. Lise das células K562 e HEL.....	56
3.3.2. Lise da célula 293.....	56
3.3.3. Leitura da luminescência.....	57
4. Análise da interação DNA-proteína.....	59
4.1. Construção de sondas de regiões promotoras e normais.....	59
4.2. Marcação da sonda com isótopo radioativo.....	60
4.3. Extrato Nuclear.....	60
4.4. Reação de ligação.....	61
4.5. Análise da interação DNA-proteína em gel de acrilamida.....	63
V – RESULTADOS.....	64
1. Construção do vetor de expressão.....	65
1.1. Reações de PCR.....	65
1.1.1. PCR da região promotora globina gama A.....	65

1.1.2. Primeiro e segundo estágios da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida – 175.....	66
1.1.3. Terceiro estágio da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida –175	67
1.1.4. PCR do HS2 do LCR.....	68
1.2. Construções.....	69
1.3. Sequenciamento	69
1.3.1. Sequenciamento da região promotora.....	69
1.3.2. Sequenciamento da região HS2 do LCR.....	71
2. Análise da expressão do promotor globina gama A.....	71
3. Análise da interação DNA-proteína.....	76
3.1. Análise do retardamento em gel das regiões promotoras globina gama A com extrato nuclear K562, HEL e proteína purificada Sp1.....	76
3.2. Análise do retardamento em gel do oligonucleotídeo contendo a região CACCC box com as regiões promotoras globina gama A com extrato nuclear de célula K562	79
VI – DISCUSSÃO.....	81
VII – CONCLUSÕES.....	92
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
X – ANEXO I – <i>Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type (Aγ-195 C $\rightarrow$G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin.....</i>	109

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Bovine serum albumin (soro albumina bovina)
CAT	<i>chloramphenicol acetyltransferase</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase I	desoxirribonuclease I
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GV	glóbulos vermelhos
Hb	hemoglobina
HbA	hemoglobina A
HbA ₂	hemoglobina A ₂
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	hemoglobina corpuscular média
HS	<i>hypersensitivity site</i>
HS2-LCR	<i>hypersensitivity site 2 Locus Region Control</i>
Ht	hematócrito
Kb	kilobase
LCR	<i>Locus Control Region</i>
MEL	<i>murine erythroleukemia cell</i>
mim.	minutos
NH ₄ Cl	cloreto de amônia
NH ₄ HCO ₃	bicarbonato de amônia
pb	pares de base
PBS	Phosfato buffered saline
PCR	Reação de cadeia da polimerase
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PLB	Passive lysis buffer (tampão de lise celular do Kit Dual-Luciferase - Promega)

PMSF	<i>phenyl methyl sulfonyl fluoride</i>
r.p.m.	rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS	duodecil sulfato de sódio
Seg.	segundos
VCM	volume corpuscular médio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Organização dos genes da globina nos cromossomos 11 e 16.....	19
Figura 1.2 –Produção das hemoglobinas e de cadeias globínicas nos diferentes estágios do desenvolvimento.....	20
Figura 1.3 – Fatores de transcrição das regiões promotoras ϵ , γ e β	23
Figura 1.4 – Esquema de interação LCR com os genes da globina nos diferentes estágios do desenvolvimento.....	25
Figura 1.5 – PHHF deletoriais.....	31
Figura 1.6 – Fatores de transcrição na região promotora de gene γ	33
Figura 4.1 - Esquema da técnica de PCR mutagênese	46
Figura 4.2 – Vetor de expressão da luciferase: pGL2-basic.....	50
Figura 4.3 – Esquema da clonagem do promotor gama no vetor da luciferase.....	51
Figura 4.4– Vetores de expressão promotor gama e luciferase.....	52
Figura 4.5 – Esquema da clonagem do fragmento HS2 nas construções promotor gama e luciferase.....	53
Figura 4.6 - Vetores de expressão HS2-promotor gama-luciferase.....	54
Figura 4.7 – Esquema do vetor pRL-TK.....	57
Figura 4.8 - Esquema dos vetores pGL2-Basic e pGL2-Control.....	58
Figura 5.1 – Foto do PCR da região promotora gama A	65
Figura 5.2 – Foto do PCR do primeiro e segundo estágios da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida-175	66

Figura 5.3 – Foto do PCR do terceiro estágio da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida –175.....	67
Figura 5.4 - Foto do PCR do fragmento HS2 do LCR.....	68
Figura 5.5 - Esquema dos vetores construídos para os experimentos de transfecção.....	69
Figura 5.6 - Eletroesferograma do sequenciamento automático da região promotora γ globina.....	70
Figura 5.7 - Eletroesferograma do sequenciamento automático da região HS2 – LCR	71
Figura 5.8 - Gráficos de expressão da luciferase nas células K562, HEL e 293	73
Figura 5.9 – Análise do retardamento em gel das regiões promotoras gama A com extrato nuclear K562 e proteína purificada Sp1.....	77
Figura 5.10 – Análise do retardamento em gel das regiões promotoras gama A com extrato nuclear de célula HEL.....	78
Figura 5.11– Análise do retardamento em gel do oligonucleotídeo contendo a região CACCC box com as regiões promotoras gama A com extrato nuclear de célula K562.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – PHHF por mutações de ponto.....	32
Tabela 4.1 - Dados hematológicos do paciente portador da mutação PHHF tipo Brasileira usado como molde para a reação de PCR.....	42
Tabela 4.2 – Primers utilizados no PCR da região promotora.....	44
Tabela 4.3 – Primers utilizados na técnica de PCR mutagênese.....	47
Tabela 4.4 – Primers utilizados no PCR da região HS2-LCR.....	52
Tabela 4.5 – Sequências das sondas utilizadas no <i>gel shift</i>	60
Tabela 4.6 – Reações de ligação com extrato nuclear de célula K562 e Proteína Sp1 purificada.....	61
Tabela 4.7 – Reações de ligação com extrato nuclear de célula HEL.....	62
Tabela 4.8 – Reações de competição com a sonda CACCC box.....	62

RESUMO

O termo Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) é usado para descrever um grupo heterogêneo de doenças hereditárias, caracterizadas por níveis aumentados de HbF na vida adulta, sem outros distúrbios hematológicos significativos. Do ponto de vista das alterações moleculares podem ser caracterizadas por deleções gênicas ou por mutações de ponto. As PHHF causadas por mutações de ponto, são caracterizadas pela substituição de um nucleotídeo em locais específicos da região promotora dos genes γ e foram descritas tanto nos promotores dos genes γ^A quanto de γ^G . Estas mutações estão associadas ao aumento na expressão dos genes da globina *in vivo*, sugerindo que estas regiões são importantes na regulação da expressão dos genes γ . Além da região promotora, outro elemento importante para a transcrição dos genes da globina é o "Locus Region Control" (LCR), localizado à montante (upstream) do gene ϵ , consistindo de cinco sítios hipersensíveis à desoxirribonuclease I (DNase I), e em conjunto com o promotor, é essencial para conferir altos níveis de expressão aos genes das globinas. Porém, o mecanismo exato da interação LCR/promotor ainda não está completamente elucidado.

O mecanismo molecular responsável pelo aumento de expressão das cadeias γ nas PHHFs e como é feita a interação entre o LCR e os promotores dos genes da globina, é de grande importância não só do ponto de vista acadêmico, como também para o possível desenvolvimento de novas opções terapêuticas nas hemoglobinopatias. O objetivo desse estudo é contribuir para o esclarecimento destes mecanismos.

Tendo em vista a detecção de indivíduos portadores da PHHF tipo Brasileira (mutação $-195\text{ C} \rightarrow \text{G}$), cujo aumento de expressão *in vitro* ainda não havia sido comprovado, experimentos de expressão gênica e interação DNA-proteína foram realizados em nosso laboratório.

Para demonstrar que o promotor contendo a mutação $-195\text{ C} \rightarrow \text{G}$, aumenta a força do promotor da globina γ^A , foram construídos vetores de expressão do gene repórter da luciferase com os promotores: normal e com as mutações -195 e -175 , associadas ao sítio hiperssensível 2 (HS2) do LCR e suas expressões analisadas em 3 linhagens celulares: K562, HEL e 293. Deste modo, foi verificado aumento de expressão significativo do vetor contendo a mutação -195 nas 3 linhagens quando comparado ao promotor normal.

Para analisar quais proteínas estão envolvidas na regulação da transcrição na presença da mutação, análises da interação DNA-proteína foram realizadas pela técnica de retardamento do complexo DNA-proteína em gel e os experimentos demonstraram que, diferentemente do que ocorre com a mutação -198 T→C que aumenta a afinidade de ligação com a proteína Sp1 e cria um novo sítio de ligação CACCC box, a mutação -195 diminui a afinidade de interação com a proteína Sp1.

Esses resultados demonstram que a mutação é provavelmente a responsável pelo aumento de expressão de cadeias γ na PHHF, porém o mecanismo pelo qual esse aumento ocorre não está completamente elucidado. Os resultados deste trabalho indicaram que esse mecanismo difere do encontrado na mutação -198 e que deve haver portanto, outras proteínas, que não a Sp1, envolvidas nesse mecanismo.

Palavras chaves: Persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF), mutação-195 C→G, expressão gênica, Sp1 e análise interação DNA-proteína.

SUMMARY

We report an *in vitro* expression study of the γ -globin gene promoter containing the γ -195 C→G mutation that causes the Brazilian Type of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH). To demonstrate that this mutation results in increased promoter strength, we evaluated the mutant promoter linked to the Hypersensitive Site-2 (HS2) of the Locus Control Region (LCR) with the luciferase reporter gene system and examined protein interactions by electrophoretic mobility shift assay. The transient expression was studied in three cell lines; K562, HEL and 293, and indicated increased promoter activity of the promoter containing the Brazilian mutation in all cell lines. The protein-DNA interaction showed that, in contrast to the γ -198 T→C mutation which has increased affinity for the Sp1 protein and creates a motif that behaves like a novel CACCC box in the γ promoter, the Brazilian HPFH mutation decreases the affinity at the Sp1 protein and does not act as a CACCC motif. These results suggest that this mutation may act to increase the γ -globin chain production. In addition, the mechanism by which this increased production occurs is different to that of the -198 mutation. Other proteins may be involved in the overexpression of the γ -globin chain and/or may be dependent upon the DNA structure.

Key words: Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH), -195 C→G gamma globin mutation, gene expression, Sp1 and electrophoretic mobility shift assay.

Introdução

I-INTRODUÇÃO

1. Hemoglobina

As hemoglobinas humanas são tetrâmeros formados pela combinação de 2 cadeias polipeptídicas do “tipo α ” (α ou ζ) com 2 cadeias do “tipo β ” (β , δ , γ^G , γ^A e ϵ). Cada cadeia contém um grupo prostético heme, que se liga reversivelmente à molécula de oxigênio, cumprindo assim a função primária da hemoglobina, que é o transporte de oxigênio para os tecidos.

A síntese das cadeias globínicas está sob controle de genes distintos, separados em 2 agrupamentos (*clusters*); os genes que codificam as cadeias α e ζ estão no braço curto do cromossomo 16 (*cluster α*) e compreendem uma região de 30Kb, enquanto que aqueles que codificam as cadeias β , δ , γ , e ϵ estão no braço curto do cromossomo 11 (*cluster β*) numa região de 60Kb (Figura 1.1). Todos os genes são compostos de 3 éxons e 2 íntrons e têm uma estrutura similar pois, derivam de duplicações e mutações de um mesmo gene ao longo do processo evolutivo. Tanto os genes das cadeias α quanto os das cadeias γ são duplicados, os genes α_1 e α_2 são similares (não diferem nas suas regiões codificantes), enquanto que os genes γ^G e γ^A diferem entre si pela codificação de apenas um aminoácido diferente na posição 136, glicina para o gene γ^G e alanina para o γ^A (Bunn & Forget, 1986).

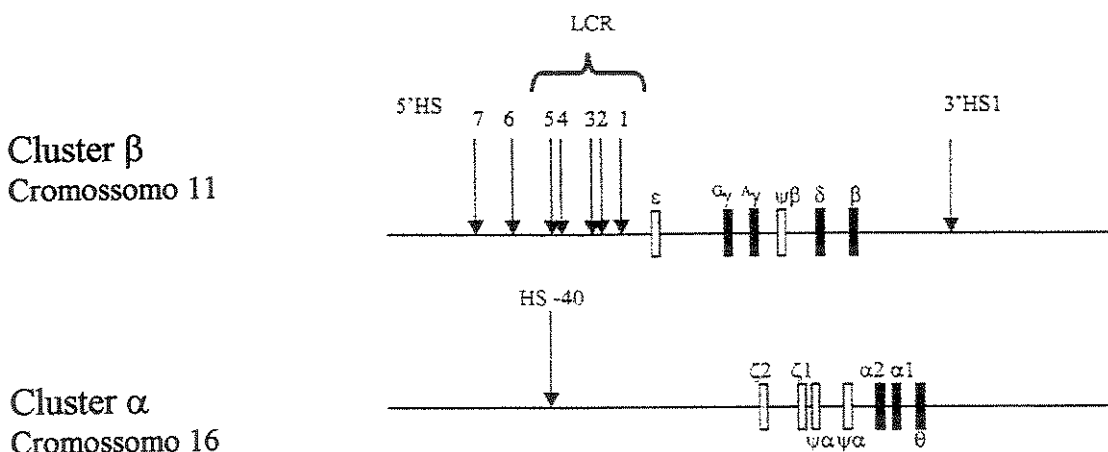


Figura 1.1 – Organização dos genes da globina nos cromossomos 11 e 16 (Beutler *et al*, 2001).

Para que o tetrâmero funcional possa ser formado, é preciso que a expressão dos diferentes genes do cluster α e β se dê de forma balanceada, nos diferentes estágios do desenvolvimento. Assim, no estágio embrionário, são produzidas as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$); no período fetal, estas são substituídas pela hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha_2\gamma_2$) que por sua vez, dá lugar às hemoglobinas A ($\alpha_2\beta_2$) e A₂ ($\alpha_2\delta_2$) no adulto (Figura 1.2).

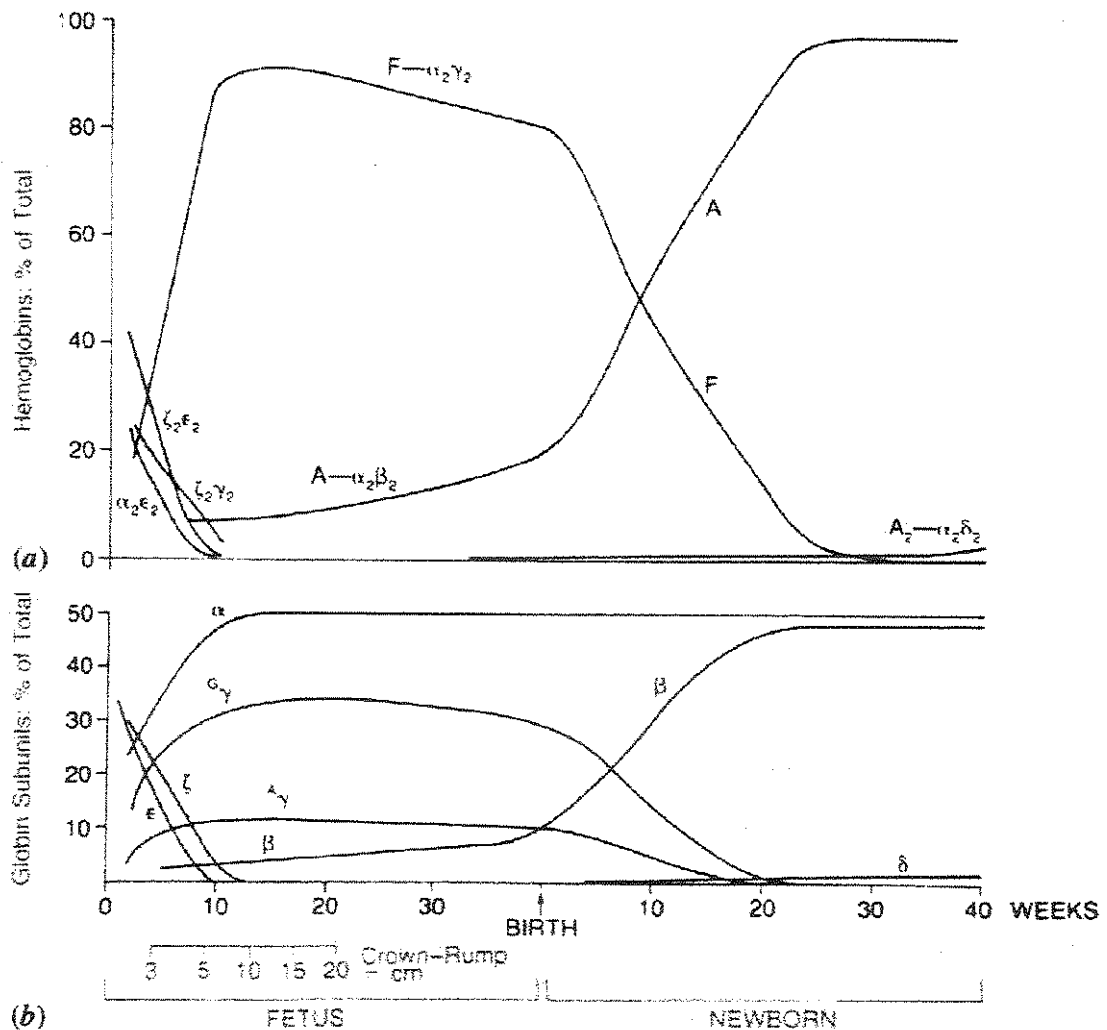


Figura 1. 2 – O gráfico (a) mostra a produção das hemoglobinas e o (b) a produção de cadeias globínicas nos diferentes estágios do desenvolvimento (Beutler *et al*, 2001).

Em indivíduos normais, a HbA é predominante, compondo mais de 95% do total da hemoglobina celular, enquanto a HbA₂ se mantém em níveis entre 2-3% e a HbF entre 0-2%. Interessante notar que os genes estão localizados no cromossomo, na mesma ordem em que são ativados durante o desenvolvimento ontogenético normal (Figura 1.1).

2. Hemoglobina Fetal

A HbF é produzida durante o período fetal na proporção de 75% de cadeias γ^G e 25% de γ^A . Após o nascimento ocorre diminuição progressiva da produção de HbF com aumento da produção de HbA. No adulto temos a manutenção de 0-2% de produção de HbF pelas células denominadas F, sendo 40% de γ^G e 60% de γ^A (Bunn & Forget, 1986).

Persistência de maiores níveis de HbF no adulto pode ser encontrada em situações de hiperplasia eritróide reacional, como na Anemia falciforme e β -Talassemia, em algumas eritroleucemias ou na regeneração medular pós quimioterapia (Sheridan, *et al*, 1976, Olivieri & Weatherall, 1998 e Weatherall & Clegg, 2001); portanto as células hematopoiéticas têm a capacidade de reativação parcial da síntese de cadeias γ mesmo fora do período fetal.

Outra situação em que temos aumento de HbF no adulto é denominada Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF). Nesse caso o aumento de HbF é associado a uma alteração genética hereditária sem outro distúrbio hematológico significativo (Bunn & Forget, 1986).

3. Regulação dos genes da globina

A regulação dos genes da globina depende da interação de fatores de transcrição (proteínas regulatórias) com seqüências gênicas específicas que podem estar adjacentes ao gene ou mesmo a vários kilobases de distância. A organização dos genes no cromossomo, localizados na mesma ordem em que são ativados durante o desenvolvimento ontogenético normal, levou à suposição de que as seqüências regulatórias estariam presentes nas regiões intergênicas as quais programariam o controle de expressão consecutiva de cada gene do grupo, durante o período embrionário, fetal e adulto (Bunn & Forget, 1986). Desta maneira

foram sendo descobertas várias regiões importantes para regulação gênica, dentre elas as mais importantes são a região promotora e as regiões potenciadoras (“*enhancers*”).

3.1. Região promotora

A região promotora fica a montante (5') do sítio de iniciação da transcrição do gene e é de fundamental importância para sua transcrição. Estudos de interação entre DNA e proteína, sugerem a presença de vários sítios de ligação na região proximal dos promotores com inúmeras proteínas eritróides específicas (por exemplo, GATA-1) ou não (por exemplo Sp1) (Figura 1. 3) (Gumucio *et al*, 1988 e 1991; Mantovani *et al*, 1988; Superti-Furga *et al*, 1988; Catala *et al*, 1989), que são necessárias para a correta transcrição do gene e da sua intensidade.

Os promotores dos genes ϵ , γ , δ e β diferem entre si, com presença de diferentes sítios de ligação para as proteínas regulatórias, o que certamente está relacionado com a diferença de expressão desses genes nos diferentes estágios do desenvolvimento (Figura 1.3).

Estudos realizados modificando a sequência de bases da região promotora, uma de cada vez, constataram que algumas sequências têm maior influência na transcrição do gene, entre elas destacamos as sequências TATA, CACCC, regiões rica em CG e CCAAT, sendo que o CACCC é encontrado predominantemente em promotores eritróides específicos. Os promotores dos genes da globina apresentam algumas semelhanças e diferenças entre si e as diferenças são, em parte, responsáveis pela diferença de força de expressão de cada gene nos diversos estágios do desenvolvimento. Todos os genes do cluster β apresentam um sítio CCAAT com a exceção do gene δ e os genes γ o têm em duplicata. O sítio CACCC também está presente em todos os genes, mas no gene δ há uma modificação para CCAAC (Figura 1.3).

Mutações na região promotora podem alterar a afinidade de ligação de fatores de transcrição e conseqüentemente alterar a expressão do gene (Cunningham & Jane, 1996, Weatherall & Clegg, 2001). Experimentos anteriores demonstraram, por exemplo, que deleção do sítio CACCC no promotor γ , reprime sua expressão no estágio adulto em camundongos transgênicos. Porém, uma vez introduzida a mutação -198 C→T (relacionada

a PHHF) nessa construção (sem o sítio CACCC), a expressão do gene γ no adulto é reestabelecida (Li *et al*, 2001). Portanto a mutação -198 cria um sítio de ligação que substitui a função do CACCC box no promotor gama.

A figura 1.3 representa as regiões promotoras dos genes ϵ , γ e β e seus fatores de transcrição.

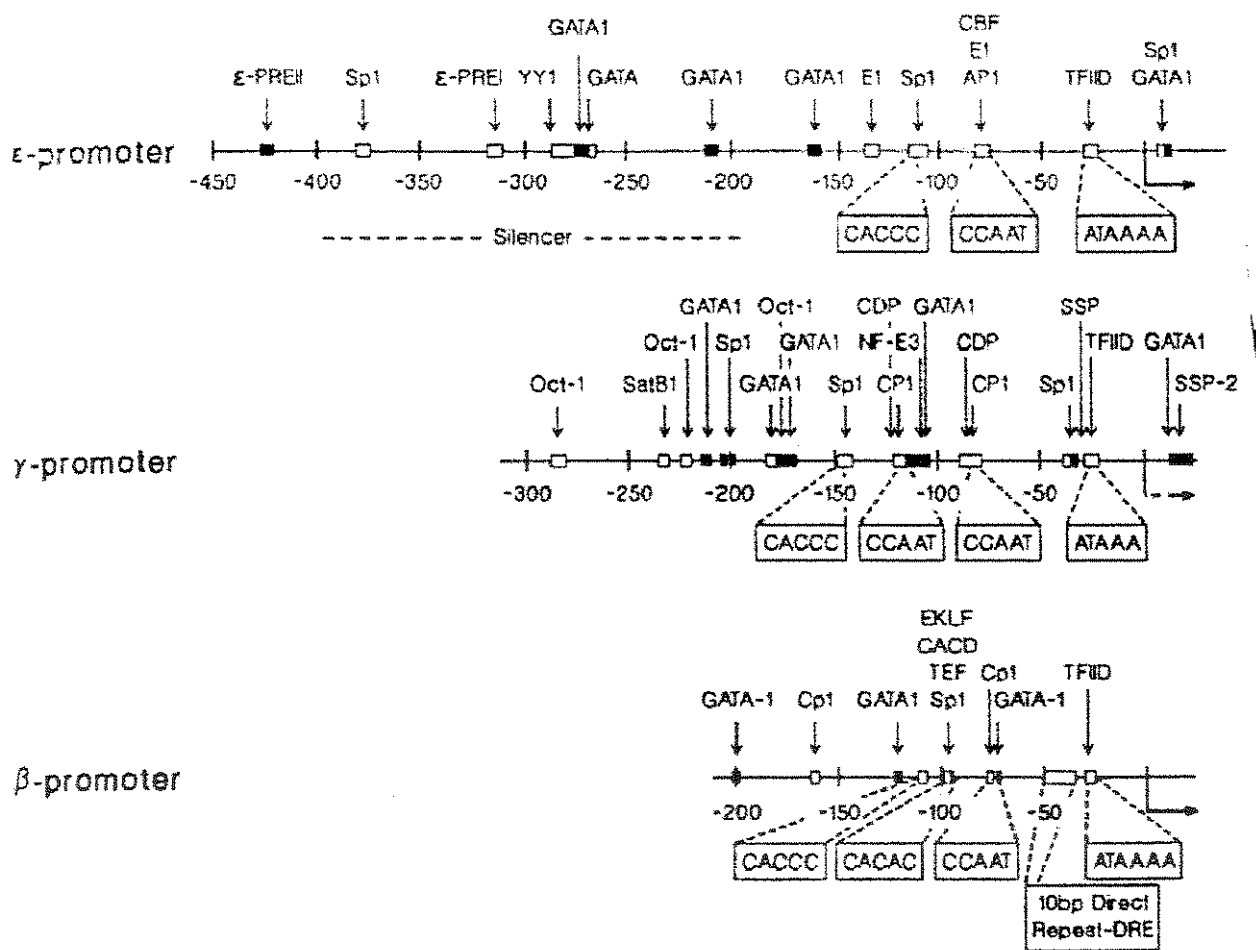


Figura 1. 3 – Fatores de transcrição das regiões promotoras ϵ , γ e β (Cunningham & Jane, 1996).

3.2. Regiões potenciadoras da transcrição gênica (“*enhancers*”)

Os “*enhancers*” são regiões que conferem altos níveis de transcrição dependente do número de cópias, de maneira tecido específica, em qualquer sítio de integração do gene em experimentos com animais transgênicos, independente da sua orientação, posição e distância em relação ao gene. Estão presentes nos *clusters* dos genes α (região HS-40) e β (no LCR) (Weatherall & Clegg, 2001).

O *Locus Control Region* (LCR), foi descoberto através dos estudos de pacientes com $\gamma\delta\beta$ -Talassemia secundárias as deleções gênicas distantes do gene β (Driscoll & Dobkin, 1989). Ele está localizado entre 6 e 22Kb à montante (*upstream*) do gene ϵ e consiste de cinco sítios hipersensíveis à desoxirribonuclease I (DNase I), denominados 5’HS1-5 e um elemento à justante (*downstream*) do gene da β globina (3’HS1).

Numerosos estudos vêm sendo realizados para caracterizar o funcionamento do LCR e identificar de que maneira ele confere altos níveis de expressão à genes que se encontram a grande distância. Estes dados implicam em caracterizar as seqüências em “cis” e os fatores de trans-ativação responsáveis pelo controle temporal dos genes da globina. A ordem e a distância do LCR em relação aos outros genes parece ser importante para a correta regulação dos genes da globina. Acredita-se que o LCR cria um domínio cromatínico aberto mais acessível aos fatores de trans-ativação e formaria uma alça (*loop*) que interagiria diretamente com o promotor através dos fatores de transcrição, juntamente com elementos silenciadores (Figura 1.4), mas como é feita a interação LCR/promotor ainda não está completamente elucidada (Grosveld *et al*, 1987, 1993 e 1998, Li *et al*, 1999 e Bulger & Groudine, 2000).

A figura 1.4 representa um modelo da interação entre o LCR e os genes da β globina nos diferentes estágios do desenvolvimento.

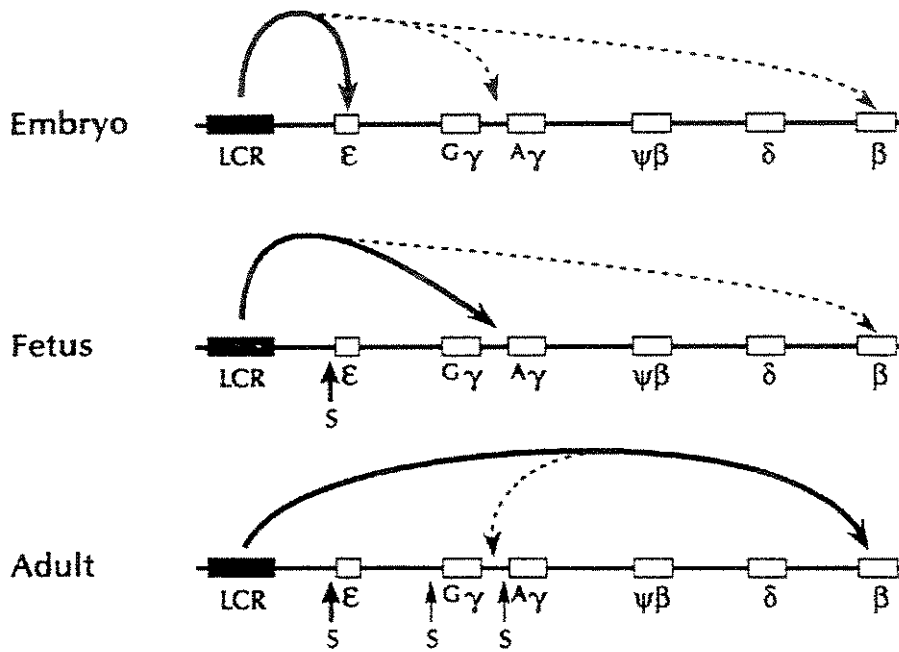


Figura 1. 4 – Esquema de interação LCR com os genes da globina nos diferentes estágios do desenvolvimento. As setas contínuas representam a interação preferencial do LCR em cada estágio e a pontilhada onde não haveria interação. O símbolo S representa elementos silenciadores (Stamatoyannopoulos *et al*, 2001).

A grande extensão do LCR dificulta sua utilização tanto para experimentos *in vitro* como na terapia gênica em ligação com retrovírus. Deste modo, o estudo da função de cada um dos seus elementos se faz necessário para o desenvolvimento de um "micro-LCR" (μ LCR), que viabilizaria seu emprego em experimentos *in vivo* e *in vitro* (Walsh *et al*, 1993).

Atualmente, sabe-se que cada sítio hiperssensível (HS) apresenta uma região de 200 a 300pb mais ativa onde se ligam diversos fatores de transcrição e que esses elementos individualmente podem conferir, altos níveis de expressão, independente da sua posição, quando ligados aos genes da globina, com efeitos aditivos após diferentes combinações destes elementos (Li *et al*, 1999).

O HS2 parece ser o "enhancer" clássico e sua atividade pode ser detectada em experimentos de transfecção transitória (Bungert *et al*, 1999), enquanto que a atividade dos sítios HS3 e HS4, podem ser detectadas apenas quando integrada a cromatina (Hardison *et*

al, 1997 e Fraser *et al*, 1990). O HS1 não parece ter atividade significativa em estudos de transfecção, mas possui papel importante, pois a expressão em camundongos transgênicos só é completa na sua presença (Pasceri *et al*, 1998). Desta maneira, novos estudos vêm sendo realizados usando pequenas regiões do LCR, principalmente a região HS2 em experimentos *in vitro* para testar eficácia de promotores e mutações neles presentes (Langdon & Kaufman, 1998).

3.3. Expressão dos genes da globina

No ser humano ocorrem 2 fenômenos de *switching* (inativação de um gene simultaneamente à ativação de outro): do período embrionário para o fetal e do fetal para adulto. No primeiro *switching*, parece haver uma troca de linhagem celular programada para produzir cadeias embrionárias (no saco embrionário), para outra apta a produzir cadeias fetais (no fígado e medula óssea) (Figura 1.2) (Wood *et al*, 1985).

No caso da troca da hemoglobina fetal para adulta, ela ocorre na mesma linhagem celular, ou seja, a mesma célula expressa as duas cadeias. Experimentos demonstraram que transplantes de células fetais para a medula óssea de um adulto, resultam em produção inicialmente de HbF, porém posteriormente de HbA e o tempo decorrido até a troca, não depende do tempo do transplante, mas sim da idade gestacional das células fetais transplantadas. Essa constatação levou à hipótese de que o ambiente no qual a célula está inserida não é tão importante para o tipo de cadeia produzida, mas sim que haveria uma programação celular responsável por essa troca (Wood *et al*, 1985 e Honing *et al* 1995).

3.3.1 Expressão do gene ϵ

Experimentos transgênicos demonstraram que o gene ϵ ligado ao LCR tem sua expressão presente no período embrionário e posteriormente silenciado nos períodos fetal e adulto, independente da presença de outros genes subsequentes a ele, indicando que sua regulação é autônoma (Shih *et al*, 1990 e Raich *et al*, 1990). Deleção da região -467 a -182 relativo ao sítio de iniciação da transcrição (*cap site*) (Figura 1.3) previne a inibição da expressão do gene, resultando em sua continua expressão até a vida adulta em baixos

níveis, indicando que esta região possui elementos silenciadores e é responsável pela inativação do gene (Raich *et al*, 1992 e 1995).

3.3.2 Expressão do gene γ

Animais transgênicos que contém apenas o gene γ ligado ao LCR mantém sua expressão em altos níveis até o estágio adulto, porém, quando seguido dos genes δ e β , ocorre diminuição da sua expressão. Primeiramente pensou-se que a presença do gene β seria importante para inativação do gene, provavelmente por competição pelo LCR (Enver *et al*, 1990). Porém, outros estudos mostraram que se extendermos o gene γ de +1950 a +4308 relativo ao *cap site* em animais transgênicos, haveria diminuição de expressão do gene γ no adulto (Dillon & Grosveld, 1991), sugerindo que esta região é que silenciaria o gene γ e não a presença dos genes δ e β . Stamatoyannopoulos *et al* em 1993, através de experimentos com deleções sucessivas no promotor do gene γ , constataram ainda que a deleção da região entre -382 e -730bp relativo ao *cap site* leva a um aumento de expressão do gene e, portanto também seria uma região silenciadora.

3.3.3 Expressão do gene β

Construções que apresentam apenas o gene β ligado ao LCR, quando introduzidas em animais transgênicos, têm sua expressão desde o estágio embrionário até o adulto, porém se colocado o gene γ ou outro gene (por exemplo, o α) entre ele e o LCR, o gene β é silenciado (Hanscombe *et al*, 1991 e Anderson *et al*, 1993). Portanto no desenvolvimento ontogenético normal parece ser necessário o gene γ para manter o gene β silenciado no período fetal, ou seja, parece haver uma competição entre os genes β e γ pela ativação pelo LCR. No período fetal haveria uma maior afinidade do LCR pelo gene γ e no adulto pelo β (Behringer *et al*, 1990, Enver *et al*, 1990 e Peterson & Stamatoyannopoulos, 1993).

Algumas proteínas regulatórias são estágio específicas, ou seja, podemos ter uma proteína que é produzida em determinado estágio do desenvolvimento para se ligar ao promotor facilitando ou inibindo a sua interação com o LCR, ativando ou reprimindo sua ativação. No caso do gene β , verificou-se que camundongos com ausência do gene que

codifica a proteína EKLF em homozigose apresentam grave déficit de produção de cadeias β e morte do embrião com 15 dias, e em heterozigose diminuição drástica da produção de cadeias β , sem prejuízo da produção de cadeias γ . Portanto acredita-se que a proteína EKLF ative especificamente o gene β facilitando sua interação com o LCR (Perkins *et al*, 1995 e 1996, Nuez *et al*, 1995 e Gregory *et al*, 1996).

4. Hemoglobinopatias

Defeitos estruturais e de síntese da hemoglobina podem levar a doenças hereditárias de alta morbidade como a Anemia Falciforme e as Talassemias.

A Anemia falciforme é uma doença hereditária e apresenta uma frequência entre 5 a 10% de heterozigotos no Brasil. Ela é causada pela substituição de uma única base no códon 6 do gene da β globina (adenina por timina) que resulta na substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina. Essa substituição leva a formação de uma hemoglobina com características distintas, a HbS ($\alpha_2\beta^S_2$), que quando em concentração elevada (em indivíduos com a mutação presente em homozigose) e na forma desoxigenada torna-se relativamente insolúvel e se agrega em polímeros. A formação destes polímeros deforma o eritrócito originando as clássicas formas de hemácias falcizadas. O processo inicialmente é reversível, porém após sucessivas polimerizações, há lesão da membrana celular e a célula se torna irreversivelmente falcizada (Dean & Schechter, 1978). A polimerização intracelular de HbS desoxigenada corresponde, em essência, ao processo fisiopatológico básico de oclusão vascular e lesão tecidual, subjacente às manifestações orgânicas da anemia falciforme (Finch, 1972).

As síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias resultantes da redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias globínicas. Na β Talassemia, há diminuição ou ausência de produção da cadeia β , que leva à hemoglobinizacão deficiente e conseqüentemente, microcitose e hipocromia. Além disso, o excesso de cadeias α , forma agregados nas hemácias, que causam lesões na membrana e interferem no metabolismo celular. Conseqüentemente, teremos destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea, caracterizando eritropoese ineficaz e reduzida sobrevida das hemácias na circulação, determinando o quadro hemolítico.

Estima-se que a frequência das β Talassemias na América Latina seja entre 1-2%. Elas podem ser classificadas em β^+ -Talassemia, caracterizada pela supressão parcial na produção de cadeias β , ou em β^0 -Talassemia, em que há ausência total de síntese de globina β . O estado homozigótico da maioria das variantes genéticas da β Talassemia produzem o quadro clínico de talassemia maior, cujo paciente apresenta anemia grave com necessidade de transfusões regulares para sobreviverem. Os heterozigotos apresentam apenas discreta anemia que não condiciona manifestações clínicas relevantes. Entre esses 2 limites, existem algumas formas de combinação genética que levam a um quadro de β Talassemia intermediária com quadro clínico não tão grave quanto da talassemia maior (Cividalli *et al*, 1980).

Várias alterações moleculares podem levar a um quadro de Talassemia, desde a deleção de um único nucleotídeo, grandes deleções, até inserções, ou mutações de ponto nas diferentes regiões do gene (Bank, 1978).

Desde 1972, estudos clínicos já demonstravam que o aumento do nível de HbF tem relação inversa com a gravidade da doença (Perrine *et al*, 1972, Powars *et al*, 1984 e Olivieri & Weatherall, 1998). Desde então o mecanismo pelo qual a HbF interfere na fisiopatogenia da doença vem sendo estudado. No caso da Anemia Falciforme, a HbF além de diminuir a porcentagem de HbS na hemácia, inibe a polimerização diminuindo o fenômeno de falcização. Na β Talassemia com aumento de expressão do gene γ , há diminuição do excesso de cadeias α e conseqüentemente menor formação de agregados na hemácia (Rodgers, 1997 e Zago *et al*, 2001).

5. Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

As PHHFs compõe um grupo heterogêneo de indivíduos com aumento de HbF na vida adulta, sem outro distúrbio hematológico associado. Os níveis de HbF em heterozigotos é de 3-20% e a sua distribuição entre os eritrócitos é, em geral, uniforme. Do ponto de vista molecular, elas são caracterizadas por deleções gênicas ou por mutações de ponto e o estudo das alterações moleculares que levam à PHHF é de suma importância para o conhecimento de regiões fundamentais para a manutenção da expressão das cadeias γ no adulto.

5.1. PHHF secundárias a deleções gênicas

As formas delecionais da PHHF são caracterizadas por grandes deficiências no grupo dos genes β , em geral, com preservação dos genes γ^A e γ^G (Figura 1.5). Nelas ocorre geralmente aumento nas duas cadeias γ^A e γ^G (Kutlar *et al*, 1984, Henthorn *et al*, 1986, Sanglio *et al*, 1986, Collins *et al*, 1987, Camaschella *et al*, 1990 e Kosteas *et al*, 1997).

Interessante notar que deleções no cluster β podem resultar em um quadro clínico benigno como o da PHHF, ou em doenças como a $(\delta\beta)^0$ – Talassemia (Figura 1.5), portanto o estudo dos diferentes pontos de quebra entre os portadores da PHHF e a $(\delta\beta)^0$ – Talassemia é de suma importância para o reconhecimento de seqüências regulatórias da expressão do gene γ .

Existem 3 hipóteses para explicar o mecanismo responsável pelo aumento de HbF nas PHHFs delecionais: por competição, ou seja, que a ausência dos genes δ e β favoreceria a expressão do gene γ (Peterson & Stamatoyannopoulos, 1993 e Weatherall *et al*, 2001), por perda de elementos inibitórios da expressão das cadeias γ (Ottolenghi *et al*, 1982, Vitale *et al*, 1994 e Stamatoyannopoulos *et al*, 1997) ou por justaposição de elementos potencializadores (*enhancer*) presentes a 3' do *cluster*, nas proximidades dos genes γ (Tuan *et al*, 1983 e Arcasoy *et al*, 1997).

A figura 1.5 representa as regiões deletadas no cluster β que resultam nas PHHFs tipo 1 a 6 e $(\delta\beta)^0$ – Talassemias.

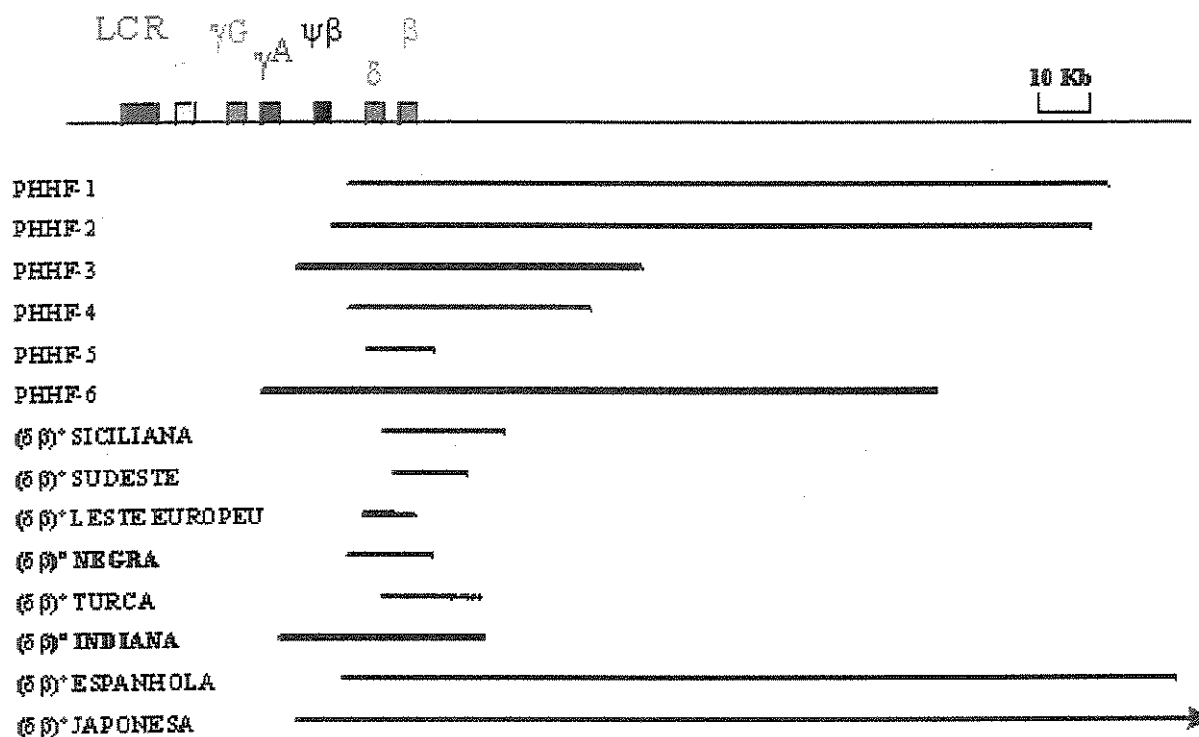


Figura 1.5. – PHHF deletoriais. Na parte superior temos a representação dos genes do *cluster* β , e inferior a ele, as regiões que são deletadas nas PHHFs e nas ($\delta\beta$)⁰-Talassemias (Andrade, 2003).

5.2. PHHF secundárias a mutação de ponto

As PHHFs decorrentes de mutação de ponto são caracterizadas pela substituição de um nucleotídeo na região promotora tanto nos promotores dos genes γ^A quanto de γ^G (Tabela 1.1). Inúmeras mutações foram descritas associadas ao aumento na expressão dos genes da globina *in vivo*, sugerindo que estas regiões são importantes na regulação da expressão dos genes γ (Gumucio *et al*, 1988 e 1991, Mantovani *et al*, 1988, Catala *et al*, 1989, Ulrich *et al*, 1990 e Steimberg, 1995).

Na tabela 1.1 estão as mutações encontradas nas regiões promotoras dos genes γ^A e γ^G relacionadas com a PHHF e a porcentagem de HbF presente em heterozigotos.

	Tipo	Substituição	%HbF heterozigoto	Referência
γ^A	Black	-202 (C→T)	2-4	Gilman <i>et al</i> , 1988a
	British	-198 (T→C)	3-10	Tate <i>et al</i> , 1986
	Italian	-196 (C→T)	12-21	Gioglioni <i>et al</i> , 1984; Gelinas <i>et al</i> , 1986
	Brazilian	-195 (C→G)	5-7	Costa <i>et al</i> , 1990
	Black	-175 (T→C)	37-39	Stoming <i>et al</i> , 1989
	Greek /Black	-117 (G→A)	10-20	Gelinas <i>et al</i> , 1985; Collins <i>et al</i> , 1985
	Black	13bp deletion -114 a -102	30-32	Gilman <i>et al</i> 1988b
	Georgia	-114 (C→T)	3-5	Öner <i>et al</i> , 1991
γ^G	Black	-202 (C→G)	15-25	Collins <i>et al</i> , 1984
	Black/Sardinian	-175 (T→C)	17-30	Ottolenghi <i>et al</i> , 1988; Surrey <i>et al</i> , 1988
	Australian	-114 (C→G)	11-14	Motum <i>et al</i> , 1994
	Japanese	-114 (C→T)	8	Fucharoen <i>et al</i> , 1990
	Algerian	-114 (C→A)	3,5	Zertal-Zidani <i>et al</i> , 1999
	Swiss	-100 (A→C)	3	Indrak <i>et al</i> , 1991

Tabela 1.1. – PHHFs decorrentes de mutações de ponto (adaptado de Weatherall & Clegg, 2001).

No caso das PHHFs secundárias à mutações de ponto, acredita-se que a presença da mutação interfira com a ligação de proteínas de transcrição na região promotora (Figura 1.6), seja diminuindo a ligação de elementos supressores seja facilitando a ligação de ativadores da transcrição (Forget, 1998).

Vários estudos já demonstraram alteração de ligação de proteínas regulatórias no promotor γ : a mutação -117 (G→A) aumenta a interação das proteínas CP-1 e CDP e diminui a interação com GATA-1 e NF-E3 (Superti-Furga *et al*, 1988 e Mantovani *et al*,

1988), a mutação -175 T→A abole com a ligação da proteína OCT-1 e altera ligação com a proteína GATA-1 (Mantovani *et al*, 1988 e Gumucio *et al*, 1988) e a mutação -202 C→T reduz a ligação com a proteína Sp1 (Sykes & Kaufman, 1990). Uma alteração cujo mecanismo de aumento de cadeia γ já está bem caracterizada é a mutação -198 T→C. Estudos demonstraram que ela cria um novo sítio CACCC box que tem alta afinidade pela proteína Sp1, o que aumenta a força do promotor γ mantendo a sua expressão na fase adulta (Li *et al*, 2001).

A figura 1.6 representa um esquema da região promotora γ , com as regiões em que se ligam os fatores de transcrição e as posições em que se encontram as mutações de ponto relacionadas à PHHF.

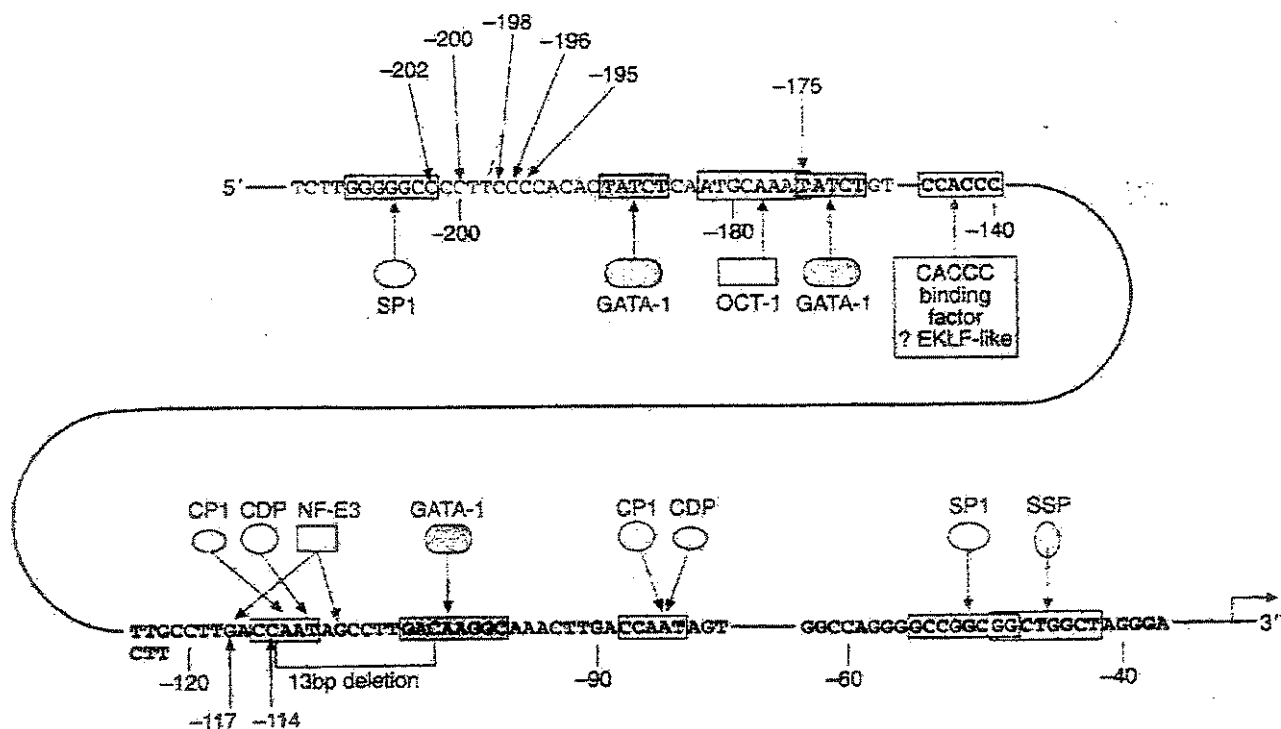


Figura 1.6. – Fatores de transcrição na região promotora do gene γ . Os números representam as posições das diversas mutações relacionadas a PHHF em relação ao *cap site* e também esquematizado as proteínas que se ligam em regiões próximas a essas mutações (Weatherall & Clegg, 2001).

Para provar que determinada mutação é responsável pelo aumento de expressão do gene γ , é necessário não somente a constatação da relação entre a presença dessa mutação com a elevação dos níveis de HbF (estudo familiar mostrando que somente os portadores da mutação apresentam aumento de HbF), mas também de experimentos *in vitro* ou *in vivo* demonstrando esse aumento de expressão.

Ao longo das últimas décadas, experimentos *in vitro* para análise de expressão gênica vêm sendo realizados utilizando o sistema de gene repórter. Nesses sistemas, seqüências promotoras ou *enhancers* a serem estudados são ligados a vetores de expressão e transfectados em uma célula. Os vetores de expressão contêm um gene codificador para uma proteína cuja expressão é determinada, em geral, através de um ensaio enzimático. Sua atividade corresponderá a transcrição do gene e conseqüentemente a força do promotor e/ou enhancer. Dessa maneira, várias mutações de ponto relacionadas à PHHF foram testadas; a -198 T $\rightarrow$ C e -196 C $\rightarrow$ T por Ronchi *et al*, 1989 e Fischer & Nowock, 1990, a -175 T $\rightarrow$ C por Nicolis *et al*, 1989, Lloyd *et al*, 1989, Gumucio *et al*, 1990 e Motum *et al*, 1993, a -202 C $\rightarrow$ G, -196 C $\rightarrow$ T e -117 G $\rightarrow$ A por Ulrich & Ley, 1990, e a -195 C $\rightarrow$ G por Schreiber *et al*, em 2001.

Os primeiros experimentos realizados continham apenas a região promotora sem a presença de elementos do LCR. Ronchi *et al*, em 1989 e Fischer & Nowock, 1990, demonstraram em experimentos de expressão usando o gene repórter CAT (*chloramphenicol acetyltransferase*), aumento de expressão do promotor entre 4 a 5 e 2 a 3,9 vezes respectivamente, com a mutação -198 em comparação com o promotor normal, porém os dois autores não constatarem aumento de expressão para a mutação -196. Também com gene repórter CAT, Nicolis *et al*, 1989, Lloyd *et al*, 1989 e Gumucio *et al*, 1990 mostraram aumento de 3 a 9, 2 a 3 e 3,7 vezes, respectivamente, para a mutação 175 T $\rightarrow$ C. Utilizando um outro gene repórter, o hGH, Motum *et al*, em 1993 também constatarem um aumento de expressão para as mutações -175 e -198 de 5,8 e 2,5 vezes respectivamente.

A mutação -195 C $\rightarrow$ G foi descoberta por Costa *et al* em 1990 através do estudo de um paciente caucasóide portador de esferocitose hereditária e esplenectomizado que apresentava 7% de HbF sendo 86,1% de γ^A e 13,9% de γ^G . Dois dos seus quatro irmãos também apresentavam aumento de HbF (4,5 e 4,7%), com predomínio de cadeia γ^A , mas

não eram portadores de esferocitose. A região promotora γ^A foi sequenciada e detectada a substituição do nucleotídeo C para G na posição -195 relativo ao sítio de início da transcrição em heterozigose. A região onde foi encontrada a mutação apresenta outras substituições relacionadas a casos de PHHF e, portanto parece ser importante para a regulação do gene da globina γ .

Em 1998 Bordin *et al* estudou mais 3 indivíduos de diferentes famílias e 3 membros de uma mesma família identificados através de um programa de triagem para hemoglobinopatias do Hemocentro da UNICAMP, com aumento de HbF (entre 5,5 e 8,5%) e níveis de cadeia γ^A entre 73 a 100%, e todos apresentavam a mesma mutação da PHHF tipo Brasileira. O estudo dos familiares demonstrou que os indivíduos com níveis normais de HbF não apresentavam a mutação.

Para comprovar que a mutação -195 C→G era realmente a responsável pelo aumento de expressão de cadeia γ^A , alguns experimentos preliminares *in vitro* foram levados a efeito por Schreiber *et al* em 2001, e ao contrário do que é verificado nos indivíduos portadores da mutação, o promotor mutante não mostrou aumento da atividade *in vitro*. Uma das hipóteses aventadas como responsável por esse fato foi a ausência de seqüências necessárias para ativação do promotor, como por exemplo o LCR (Schreiber *et al*, 2001).

Tendo em vista a estreita relação entre o aumento dos níveis de HbF e a mutação -195 C→G, este trabalho, testa a atividade do promotor mutante através do estudo da expressão gênica em associação com elementos do LCR e sua interação com a proteína Sp1, contribuindo assim para um maior conhecimento das várias funções da região promotora e do modo como atuam na regulação de promotores normais ou com mutações associadas à PHHF.

Objetivos

II – OBJETIVOS

1. Analisar a expressão do promotor da globina gama A contendo a mutação PHHF tipo Brasileira *in vitro* na presença do HS2 – LCR, comparando-a com o promotor normal e o promotor com a mutação –175 através da metodologia do gene repórter da luciferase nas linhagens celulares 293, HEL e K562.

2. Caracterizar as interações DNA-proteína entre as regiões do promotor de globina γ^A onde se encontram a mutação da PHHF tipo Brasileira, com proteínas de extrato celular de células eritróides e da proteína Sp1, na tentativa de identificar o(s) fator(es) de transcrição envolvidos nesse controle.

Resumo das etapas experimentais

III – RESUMO DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS

Para atender o objetivo 1:

1. Construção do vetor de expressão contendo a região promotora γ .
 - 1.1. Extração de DNA genômico de indivíduo heterozigoto para a mutação -195 C $\rightarrow$ G e indivíduo com região promotora normal.
 - 1.2. Amplificação da região promotora através da técnica PCR ou através da técnica de mutagênese sítio dirigida para a mutação -175 T $\rightarrow$ C.
 - 1.3. Clonagem do fragmento amplificado no vetor PCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen-Life Technologies).
 - 1.4. Sequenciamento do vetor para identificar a presença do promotor normal ou com a mutação.
 - 1.5. Clonagem da região promotora normal e mutada no plasmídeo de expressão.
2. Construção do vetor de expressão contendo a região promotora γ e o HS2-LCR.
 - 2.1. Amplificar os elementos do HS2-LCR através da técnica de PCR de DNA genômico e sequenciamento para confirmar a sequência desta região.
 - 2.2. Clonagem desse fragmento nos plasmídeos contendo os promotores de globina γ normais e mutados (construídos no item 1).
3. Análise de expressão gênica.
 - 3.1. Cultura das células K562, HEL e 293.
 - 3.2. Transfecção das construções (item 2) nas células K562, HEL e 293.
 - 3.3. Análise da expressão do vetor através da atividade da luciferase nas três linhagens transfectadas.

Para atender o objetivo 2:

4. Análise da interação DNA-proteína.

- 4.1. Construção de sondas do promotor γ normal e mutados.
- 4.2. Marcação da sonda com isótopo radioativo.
- 4.3. Extração de proteínas nucleares das células K562, HEL e 293.
- 4.4. Ligação das sondas com proteína purificada Sp1 e extrato nuclear, na presença ou ausência de competidor.
- 4.5. Análise da ligação DNA-proteína em gel de poliacrilamida.

Materiais e Métodos

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

Descoberta em 1990 por Costa *et al*, a mutação -195 C→G foi detectada em alguns indivíduos no Laboratório de Terapia Gênica do Hemocentro de Campinas (Bordin *et al*, 1998). O DNA de um desses pacientes foi extraído a partir de uma amostra de sangue, e utilizado como molde para a obtenção da região promotora com a mutação para os experimentos de expressão gênica. Da mesma maneira, o DNA de um indivíduo sem alteração na eletroforese de hemoglobina (HbA, HbA₂ e HbF em níveis normais) e região promotora com sequenciamento normal foi utilizado de molde para o promotor normal.

A tabela 4.1 mostra os dados hematológicos do portador da PHHF do tipo Brasileira, cujo DNA foi utilizado para construção do vetor de expressão.

GV (10 ⁶ mm ³)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF (%)	HbA ₂	Eletroforese de cadeias
4,22	13,1	37,9	89,7	31,1	8,16	2,24	A gama

Tabela 4.1 - Dados hematológicos do portador da mutação PHHF tipo Brasileira.

1. Construção do vetor de expressão contendo a região promotora γ .

1.1. Extração de DNA genômico

Foi coletado 10ml de sangue com EDTA e centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 min. para separação e retirada do plasma. As hemácias foram em seguida lisadas pela adição de 40ml de solução de NH₄Cl 0,144M e NH₄HCO₃ 0,01M (proporção 10:1) e centrifugadas por 15 min., para decantação dos leucócitos, por 2 vezes para se obter uma massa de leucócitos livre de hemácias.

O conglomerado de leucócitos foi dissolvido em 10ml de solução contendo NaCl 0,3M, EDTA 10mM, Tris/HCl pH7,5 10mM, Uréia 7M, SDS 0,5% e incubado a 37°C por aproximadamente 16hs.

Após incubação, adicionou-se 10ml de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e centrifugado à 3000r.p.m. por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com cuidado para não levar a interfase composta de proteínas. Repetiu-se o procedimento mais duas vezes sendo que a última vez foi realizada somente a adição de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1. Ao sobrenadante, foi adicionado 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado com 10% de acetato de sódio 3M para precipitação do DNA.

O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% para eliminar resíduos de fenol e sal e deixado em temperatura ambiente para secar. Uma vez seco, o DNA foi diluído em água deionizada estéril e guardado a -20°C até ser utilizado.

1.2. Amplificação da região promotora

1.2.1. Reação em cadeia da polimerase

Para construção do vetor de expressão, 670pb da região promotora da globina gama A (Genebank HUMHBB nucleotide 38792-39462) foi amplificada através de DNA genômico, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em ciclador térmico automático (Erllich, 1989). Cerca de 1 μl de DNA foi amplificado em 5 μl de tampão; 1 μl de dNTP 10mM; 2 μl de MgCl_2 50mM; 10 μM do primer P1 e P2 (Tabela 4.2), 1 unidade de Taq DNA polimerase e água deionizada estéril suficiente para 50 μl de volume final (todos reagentes fornecidos pela Gibco-BRL). Colocado em ciclador térmico automático por 7 min. a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 1 min. a 94°C para desnaturação, 1 min. a 53°C para anelamento e 1 min. e 30 seg. a 72°C para extensão, o programa finaliza com 7 min. de extensão final.

Os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com brometo de etídio (5 $\mu\text{g}/\text{dl}$), sob luz ultravioleta com amplificação de fragmentos de 670pb.

Para direcionar a clonagem do promotor no vetor de expressão, a amplificação dos fragmentos normais e mutados (mutação da PHHF tipo brasileira $-195\text{C}\rightarrow\text{G}$) do promotor do gene globina γ foi realizada com primers contendo em sua porção 5', uma cauda para

enzima de restrição; o primer sense P1 com sítio para enzima *XhoI* e o antisense P2 para *HindIII* descritos na Tabela 4.2.

Nome	Sequência
P1	<i>XhoI</i> 5' ATC <i>TCG AGT</i> GAA ACT GTG GTC TTT ATG A 3'
P2	<i>HindIII</i> 5' CTA <i>AGC TTT</i> CTG GAC TAG GAG CTT ATT G 3'

Tabela 4.2 – Primers utilizados no PCR da região promotora. Em itálico a sequência adicionada com o sítio de restrição para as enzimas *XhoI* e *HindIII*.

1.2.2. Mutagênese sítio dirigida por PCR

A mutação -175 T→C foi produzida pela técnica de mutagênese sítio dirigida como descrito por Motum *et al* (1993). Essa técnica foi desenvolvida em 3 estágios:

1º estágio - Consistiu em duas reações de PCR em separado, usando DNA de indivíduo com a região promotora normal como molde. Na primeira reação foi utilizado o primer sense P3 (Tabela 4.3) e como primer antisense, um oligonucleotídeo que contém a região da mutação -175, com o nucleotídeo C na local do T na posição -175 (P175as Tabela 4.3) com amplificação de um fragmento de 164pb (Genebank HUMHBB nucleotide 39092-39239). Na segunda reação foi utilizado como primer sense, um oligonucleotídeo complementar ao P175as, contendo a mesma mutação (P175s Tabela 4.3) e como antisense o primer P2 (Tabela 4.3) com amplificação de um fragmento de 243pb (Genebank HUMHBB nucleotide 39239-39462). Desta forma os dois produtos do PCR obtidos têm a troca da base C no local da T na posição -175.

2º estágio - Os produtos das reações de PCR obtidos no primeiro estágio, foram misturados e submetidos a 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, utilizando a Taq DNA polimerase, sem a necessidade de utilização de primers, pois os primers P175s e P175as são complementares e conseqüentemente os produtos do PCR 1 e 2 do primeiro estágio irão se complementar e servirão de primer um para o outro.

3º estágio - Cerca de 1 µl do produto de PCR obtido no segundo estágio foi utilizado em uma nova amplificação para se obter uma quantidade maior do produto de PCR contendo a mutação. Foram utilizados os primers P3 e P2 que contém sítio para enzima de restrição *XhoI* e *HindIII* respectivamente para facilitar a clonagem no plasmídeo de expressão.

A figura 4.1 representa um esquema da técnica do PCR mutagênese sítio dirigida para obtenção do promotor com a mutação -175.

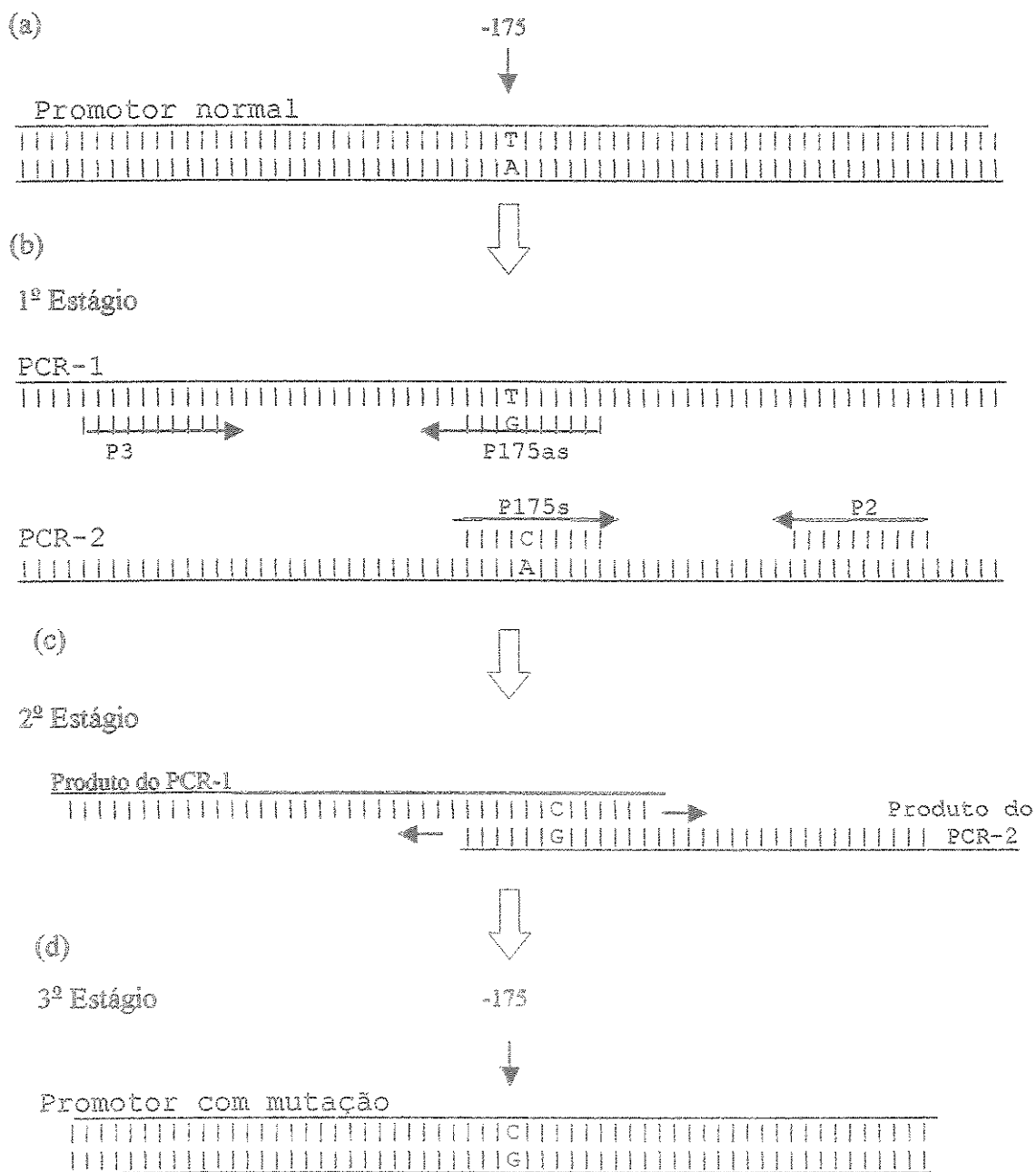


Figura 4.1 - Esquema da técnica de PCR mutagênese. (a) mostra o promotor normal com o nucleotídeo T na posição -175. (b) 1º Estágio com o PCR 1 e 2 utilizando os primers P175s e 175as que contém a alteração do nucleotídeo na posição 175. (c) 2º Estágio - PCR utilizando os produtos obtidos no PCR 1 e 2. (d) 3º Estágio - Amplificação do fragmento obtido no 2º estágio, apresentando nucleotídeo C na posição -175.

P2	<i>HindIII</i> 5' CTA <i>AGC TTT</i> CTG GAC TAG GAG CTT ATT G 3'
P3	<i>XhoI</i> 5' ATC <i>TCG AGC</i> TAT GAT GGG AGA AGG AAA C 3'
P175s	5' CTC AAT GCA AAC ATC TGT CTG 3'
P175as	5' CAG ACA GAT GTT TGC ATT GAG 3'

Tabela 4.3 – Primers utilizados na técnica de PCR mutagênese. Em itálico as seqüências adicionadas com sítio de restrição para as enzimas *HindIII* e *XhoI*. Em negrito o nucleotídeo trocado (T→C) para se obter a seqüência com a mutação.

Todas as reações de PCR foram realizadas como descrito no item 1.2.1, porém com temperatura de anelamento de 55°C e extensão final de 1 minuto. O fragmento final obtido possui 386pb (Genebank HUMHBB nucleotide 39092-39462).

1.3. Clonagem do fragmento amplificado no vetor PCR[®]2.1-TOPO.

1.3.1. Reação de Ligação

Os fragmentos do promotor da globina γ^A (normal, com a mutação -195 e -175) amplificados por PCR apresentados no item anterior, foram então clonados no vetor PCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen-Life Technologies) para selecionar clones com o promotor mutante (uma vez que a mutação -195 foi encontrada em heterozigose) e serem seqüenciados.

A enzima *Taq polimerase*, usada para a reação de PCR, adiciona uma deoxiadenosina na terminação 3' do produto final do PCR. O vetor PCR[®]2.1-TOPO apresenta um resíduo deoxitimidina na porção 3' o que permite maior eficiência de ligação do produto do PCR no vetor.

A ligação consiste em misturar 1 a 4 µl do produto do PCR com 1 µl de solução de NaCl 1,2M e MgCl₂ 0,06M, 1 µl do vetor PCR®2.1-TOPO e água deionizada suficiente para um volume final de 6 µl e incubar a reação por 5 minutos a temperatura ambiente.

1.3.2. Transformação

A transformação em bactéria competente *Escherichia coli* (DH5α) foi realizada por choque térmico que consiste em incubar 2 µl da reação de ligação (item 1.3.1.), com 50 µl de bactéria competente por 30 min. em gelo, seguida de 45 seg. a 42°C, e novamente no gelo por 2 minutos.

Em seguida, adicionou-se 950 µl de meio de cultura SOC (Tryptone 2%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM e glicose 20mM) e incubou-se a 37°C, sob agitação por 60 min. Após esse período, o meio foi centrifugado a 10.000 r.p.m. por 30 seg. e 900 µl do sobrenadante retirado e o precipitado de bactérias ressuspensão nos 100 µl restantes do meio e espalhado em placa Petri, contendo meio LB sólido (Tryptone 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 10mM, ágar 15g/L), ampicilina (50mg/ml-Sigma) e solução de X-Gal 40mg/ml e IPTG 100mM para seleção de colônias que contenham o inserto (fragmento de PCR), pois quando introduzido no vetor, o inserto inativa o gene lacZ o que permite a identificação dos clones recombinantes pela cor branca da colônia em contraste com a cor azul dos clones que não possuem o inserto. A placa de Petri foi incubada por 14 a 16 horas em estufa a 37°C.

1.3.3. Extração do DNA plasmidial

Foram selecionadas as colônias brancas da placa de Petri (item 1.3.2.), e transferidas para 3ml de meio LB (Tryptone 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 10mM) com ampicilina 50mg/ml e deixado sob agitação por 16hs a 37°C. A cultura foi em seguida centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos, com a finalidade de se recolher o precipitado bacteriano.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit de Extração de DNA plasmidial Life-Concert (Gibco-BRL) segundo as instruções do fabricante. A técnica consiste em lise

alcalina da bactéria, ligação do DNA plasmidial a uma coluna de resina aniônica e remoção do RNA, proteínas e outras impurezas através de sucessivas lavagens em meio com média concentração de sal. O DNA plasmidial foi eluído com tampão rico em sal e precipitado com isopropanol. A concentração e a qualidade do DNA foi determinada em espectrofotômetro a 260 e 280nm, em luz ultravioleta e/ou gel de agarose a 1%.

1.4. Sequenciamento

O sequenciamento automático foi realizado no sequenciador ABI prism 377 DNA sequencer. O princípio do sequenciamento se baseia no método de Sanger *et al* (1977), porém ao invés de marcador radioativo é usado o *bigdye* que é um marcador de fluorescência.

Para a reação de sequenciamento misturou-se 2,5µM do primer P1 (Tabela 4.2), 1µl de *bigdye*, 25 a 100ng de DNA e água estéril para 10µl de volume final, e a reação foi submetida à 2 min. a 94°C para desnaturação inicial e depois 35 ciclos de 30 seg. a 94°C para desnaturação, 30 seg. a 53°C para anelamento e 4 min. a 60°C para extensão.

Os fragmentos amplificados foram aplicados em um gel de acrilamida e submetidos a um campo elétrico, onde são separados por tamanho. Quando passam pela região de leitura, o laser excita o corante fluorescente que emite luz em um comprimento de onda específico para cada base. Esses dados são analisados em computador que emite os resultados em forma de um gráfico (eletroesferograma) onde cada cor representa um nucleotídeo: G, A, T ou C. A sequência encontrada foi comparada com banco de dados do *Genebank* para se localizar a sequência de base no gene da globina (Genes da globina humana = GI 455025) utilizando o programa *Blast 2 sequence* disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80> e identificados clones normais e com as mutações -195 e -175.

1.5. Clonagem no vetor de expressão

Uma vez identificados os clones normais e os contendo a mutação, os mesmos foram clonados no vetor da luciferase pGL2basic – Promega (Figura 4.2) que contém o gene da Firefly luciferase (vetor de expressão). Foram construídos vetores contendo o promotor da

globina gama A normal (Promotor γ^A normal), com a mutação $-195C \rightarrow G$ (Promotor mutação -195) e a mutação $175 T \rightarrow C$ (Promotor mutação -175).

Aproximadamente 6 μ l de cada plasmídeo contendo os promotores γ^A obtidos no item 1.3.3. foram então digeridos com as enzimas *XhoI* e *Hind III* (1 μ l de cada) para separar o inserto do vetor. A digestão foi visualizada em gel de agarose para se selecionar a banda do inserto que, posteriormente foi extraída do gel e purificada com a utilização do kit de extração de DNA do gel da Concert-Life, segundo as instruções do fabricante. Da mesma maneira o vetor da luciferase pGL2basic, foi digeridos com as mesmas enzimas *XhoI* e *Hind III*, cujo sítio de restrição está presente em seu *polilinker*, região onde o promotor do gene da globina γ^A foi inserido de maneira direcionada para expressão do gene (Figura 4.3).

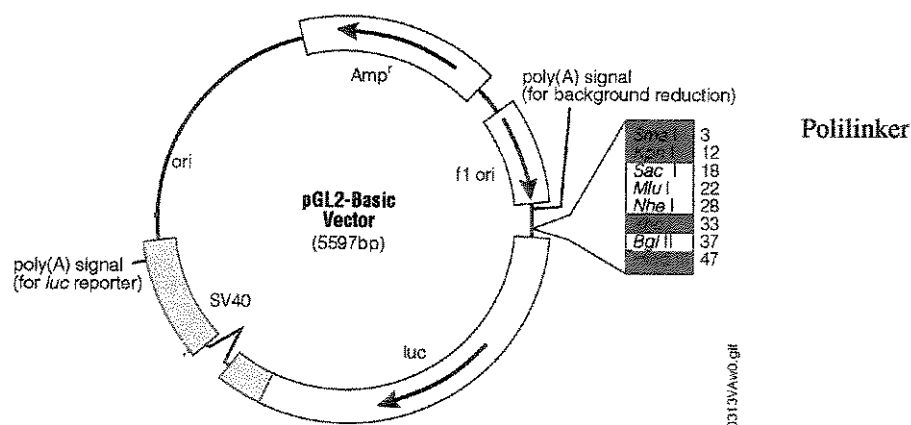


Figura 4.2 – Vetor de expressão da luciferase: pGL2-basic. Em amarelo o gene da luciferase (luc) e em azul e vermelho os sítios das enzimas utilizadas na clonagem do HS2 e região promotora, respectivamente.

A ligação foi feita com a utilização de 0,5 μ l da enzima T4 ligase (Gibco-BRL), tampão da enzima e aproximadamente 30ng do vetor (PGL-2-basic) para 10ng do inserto (promotor gama A) (Figura 4.3). A reação foi incubada 14°C por aproximadamente 16hs e transformada como citada no item 1.3.2. Realizada extração do DNA plasmidial (como no item 1.3.3.) e sequenciamento para confirmar a presença ou ausência das mutações.

A Figura 4.3 representa um esquema do experimento de clonagem do fragmento de PCR do promotor γ no vetor de expressão luciferase.

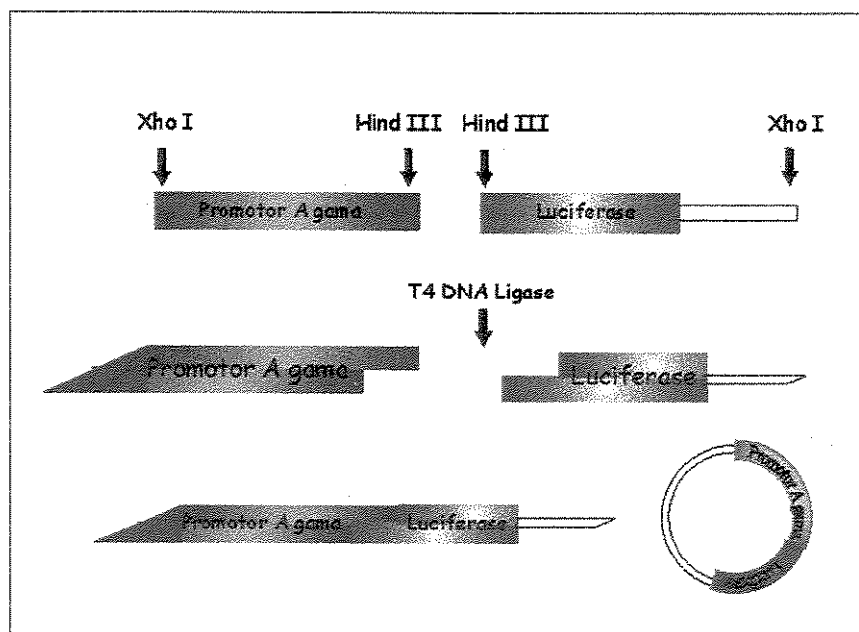


Figura 4.3 – Esquema da clonagem do promotor gama no vetor da luciferase.

Uma vez confirmada a sequência, para se obter uma maior quantidade de DNA plasmidial para os experimentos de transfecção, a bactéria contendo o DNA plasmidial foi cultivada em 500ml de meio LB e o DNA plasmidial extraído pela técnica de maxipreparação (Qiagen). A técnica tem o mesmo princípio descrito no item 1.3.3, porém utilizando uma coluna com maior capacidade de retenção do DNA plasmidial.

Ao final desse processo temos 3 construções compostas pelo vetor da luciferase pGL2basic ligados a região promotora γ^A normal, com a mutação -195 ou -175, denominados Promotor gama A normal, Promotor mutação -195 e Promotor mutação -175 respectivamente, representados na Figura 4.4.

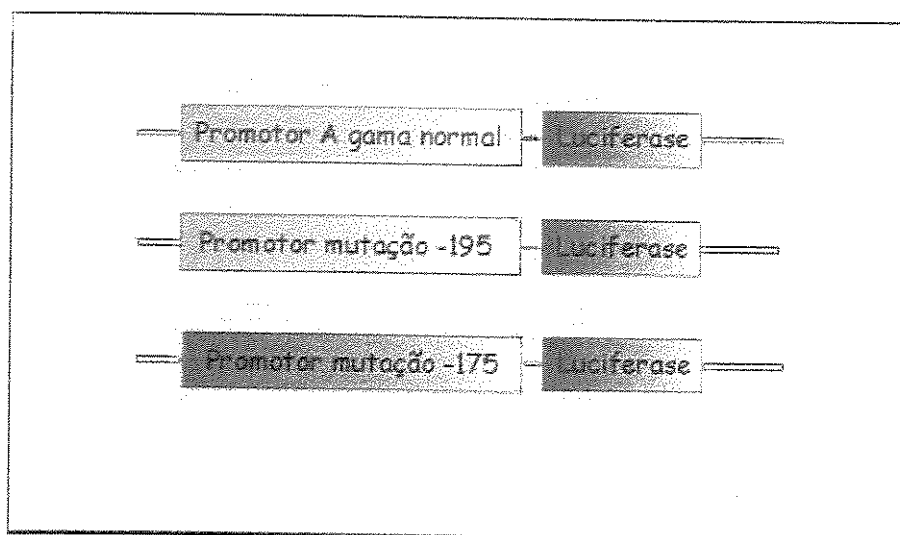


Figura 4.4 – Vetores de expressão promotor gama e luciferase.

2. Construção dos vetores de expressão contendo a região promotora γ^A e o HS2-LCR

2.1. Amplificação do fragmento HS2-LCR

A região de 756pb do HS2-LCR foi amplificada através da técnica de PCR (Genebank HUMHBB nucleotide 8485-9224) da mesma maneira descrita no item 1.2.1., porém com temperatura de anelamento de 57°C e utilizados os primers PHS2s e PHS2as (Tabela 4.4), nos quais foi acrescentado na suas extremidades 5', sítio para enzima de restrição *SmaI* e *KpnI* utilizados para facilitar a clonagem.

PHS2s	<i>SmaI</i> 5' ATC <i>CCG GGT AAG CTT CAG TTT TTC</i> 3'
PHS2as	<i>KpnI</i> 5' CTG <i>GTA CCC AGA TC TGA CCC CGT A</i> 3'

Tabela 4.4 – Primers utilizados no PCR da região HS2-LCR. Em itálico a sequência adicionada com sítio de restrição para as enzimas *SmaI* e *KpnI*.

2.2. Clonagem do fragmento HS2-LCR no vetor de expressão

Uma vez amplificado, o fragmento obtido no item 2.1. foi digerido com as enzimas *SmaI* e *KpnI*, e inserido nas construções do vetor de expressão da luciferase com os diferentes promotores γ^A (obtidos no item 1.5.) nos sítios de restrição *SmaI* e *KpnI* do *polilinker* (Figura 4.2). As técnicas utilizadas foram as mesmas descritas na clonagem anterior (item 1.5.).

A figura 4.5 representa um esquema do experimento de clonagem do fragmento de PCR contendo o sítio hiperssensível 2 do LCR (HS2-LCR) nas construções obtida no item 1.5 (Figura 4.4) contendo o vetor de expressão luciferase e o promotor γ .

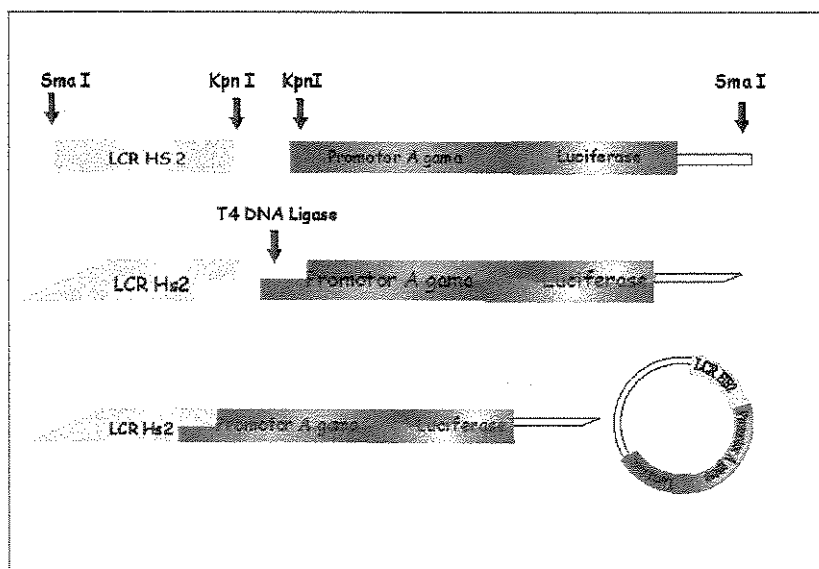


Figura 4.5 – Esquema da clonagem do fragmento HS2-LCR nas construções contendo o promotor gama e o vetor da luciferase.

Desta maneira teremos ao final desse passo, 3 construções compostas pelo vetor da luciferase pGL2-basic, ligado ao HS2 e a região promotora γ^A normal, com a mutação -195 ou -175, denominados HS2 - Promotor gama A normal, HS2 - Promotor mutação -195 e HS2 - Promotor mutação -175, respectivamente, representadas na Figura 4.6.

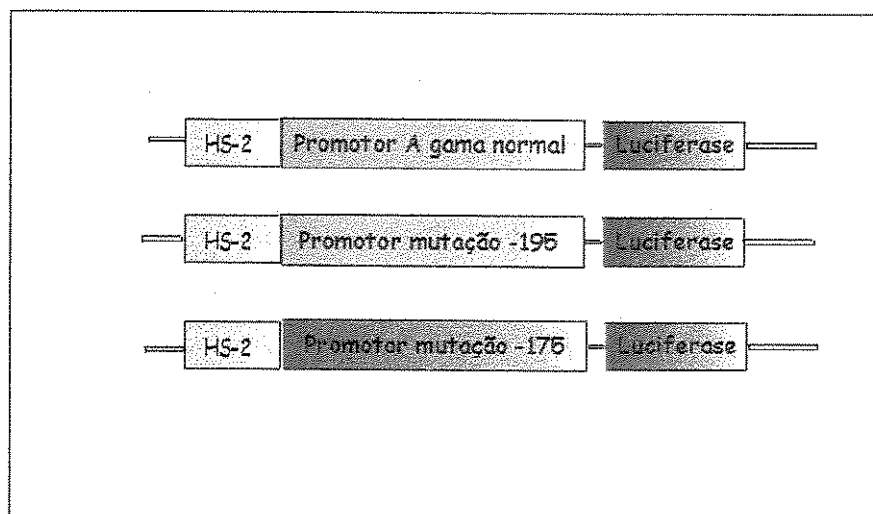


Figura 4.6 - Vetores de expressão HS2-promotor gama-luciferase.

Novamente a presença da região HS2 e do promotor foi confirmada por sequenciamento e realizado extração do DNA plasmidial pela técnica de maxipreparação (Qiagen) para se obter uma maior quantidade de DNA para os experimentos de transfecção.

3. Análise de expressão gênica

Para o estudo de expressão *in vitro*, os plasmídeos obtidos no item 2.2. foram introduzidos em 3 tipos celulares; K562, HEL (human erythroleukemia) e 293.

3.1. Cultura de célula

As células K562 e HEL são células que crescem em suspensão e foram cultivadas respectivamente em meio DMEM e RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal a 37°C com 80% de umidade e 5% de CO₂.

A célula 293 cresce aderida a garrafa e foi cultivada em DMEM com 10% de soro bovino fetal com 10% SBF em estufa à 37°C com 80% de umidade e 5% de CO₂.

3.2. Transfecção

Foram utilizadas 2 metodologias conforme o tipo celular.

3.2.1. Transfecção por eletroporação

Para as células K562 e HEL que se desenvolvem em suspensão, utilizamos o método de eletroporação (Pahl *et al*, 1991). Nesse método as células são expostas a um pulso elétrico breve (voltagem de 0,25kV e capacitância de 975µF, por 17mseg), que produz poros temporários na membrana celular, permitindo a entrada do DNA plasmidial exógeno. A eletroporação foi realizada em BioRad gene pulser II, com cubeta de eletroporação de 0,4 cm.

O método consistiu em lavar as células 2 vezes com PBS, ressuspendê-las em meio RPMI - 1640, para uma concentração final de 10⁶ células por cubeta (0,5 ml). Adicionou-se 20µg DNA plasmidial a ser testado e 1µg de plasmídeo controle pRL-TK (Promega) e incubado por 10 min. no gelo. Realizou-se o processo de eletroporação (choque elétrico) e novamente submetidas ao gelo por 10 a 15 min. Em seguida, as células foram transferidas para placa com 10ml de meio RPMI - 1640 com 10% de SBF, e incubadas por 24 horas a 37°C com 80% de umidade e 5% de CO₂ antes de serem analisadas.

3.2.2. Transfecção por lipofecção

Para as células 293 que crescem aderidas à garrafa de cultura, a transfecção foi realizada através da lipofecção. Dois dias antes do experimento, 10⁴ células/5ml foram

colocadas em cada placa, para que no dia do experimento estivessem aderidas à placa com 70 a 90% de confluência. Nessa técnica o reagente Lipofectamine (Gibco), composto por lipídeos catiônicos, foi misturado à 3 μ g de plasmídeo a ser testado e 0,15 μ g de plasmídeo controle pRL-TK (Promega). O lipídeo catiônico, cuja superfície é positiva, atrai e engloba a molécula de DNA, formando um complexo lipossômico. Uma vez em contato com as células, este complexo tem afinidade pela membrana celular (composta por lipídeos) sendo introduzido dentro da célula.

As células foram expostas ao complexo DNA-lipofectamine por 2 horas, trocado o meio e cultivadas por mais 20hs, para expressão do gene antes da lise das células e leitura da luminescência.

3.3. Análise da atividade de luciferase

A análise da atividade de luciferase foi realizada utilizando o kit Dual Luciferase (Promega) seguindo as instruções do fabricante descrita a seguir.

3.3.1. Lise das células K562 e HEL

As células K562 e HEL, que crescem em suspensão, foram lavadas com PBS por 2 vezes, descartado o sobrenadante e adicionado 400 μ l tampão de lise PLB (Passive lysis buffer - Promega). Após 10 min sob agitação, as células foram centrifugadas e 20 μ l do sobrenadante usado para leitura da luminescência.

3.3.2. Lise das células 293

Para as células 293 que crescem aderidas à placa, a técnica consiste em descartar o meio de cultura, lavar as células em tampão PBS, por 2 vezes, e lisar as células transfectadas com 500 μ l de tampão de lise PLB sob agitação por 15 min. As células foram transferidas para novo tubo, centrifugadas e uma alíquota de 20 μ l do lisado celular usado para leitura da luminescência.

3.3.3. Leitura da luminescência

Ao lisado obtido nos itens 3.3.1. e 3.3.2. foi adicionado 100 µl do reagente de análise de luciferase LAR (Promega) que resulta em emissão de luz integrada em um luminômetro, para leitura da Firefly luciferase. Essa primeira medida expressa a atividade dos promotores da globina gama a serem testado (pois estão ligados ao vetor da luciferase pGL2basic que contém o gene da Firefly luciferase). Em seguida adicionado 100µl do reagente Stop and Glo (Promega) que bloqueia a primeira reação e inicia a leitura da Renilla luciferase, que expressa a luminescência produzida pelo vetor controle pRL-TK (Promega), representado na figura 4.7. Este vetor já possui um promotor ligado ao gene da Renilla luciferase para que esse gene seja expresso, sua utilização é necessária, pois juntamente com o vetor a ser estudado um segundo vetor é co-transfectado, para controle interno do experimento. O vetor pRL-TK foi escolhido pela boa sensibilidade e facilidade na realização das reações como previamente relatado por Skarpidi *et al.*, 2000. Os resultados serão expressos em unidade relativa de luz (URL).

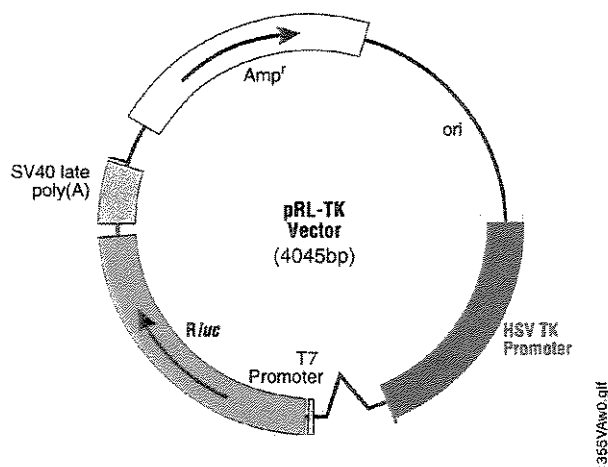


Figura 4.7 – Esquema do vetor pRL-TK utilizado como controle interno das transfecções. Em verde o gene da Renilla luciferase (Rluc) e em vermelho a região promotora.

Os experimentos foram repetidos por 3 vezes e realizadas 2 a 4 eletroporações de cada vetor por experimento, além dos vetores pGL2-Basic (Promega) (Figura 4.8a) que contém apenas o gene da luciferase sem promotor ou “*enhancer*” e pGL2-Control (Promega) (Figura 4.8b) que já possui um promotor e um “*enhancer*”, que foram usados respectivamente com controle negativo e positivo da expressão da luciferase. Esses vetores estão representados na figura 4.8

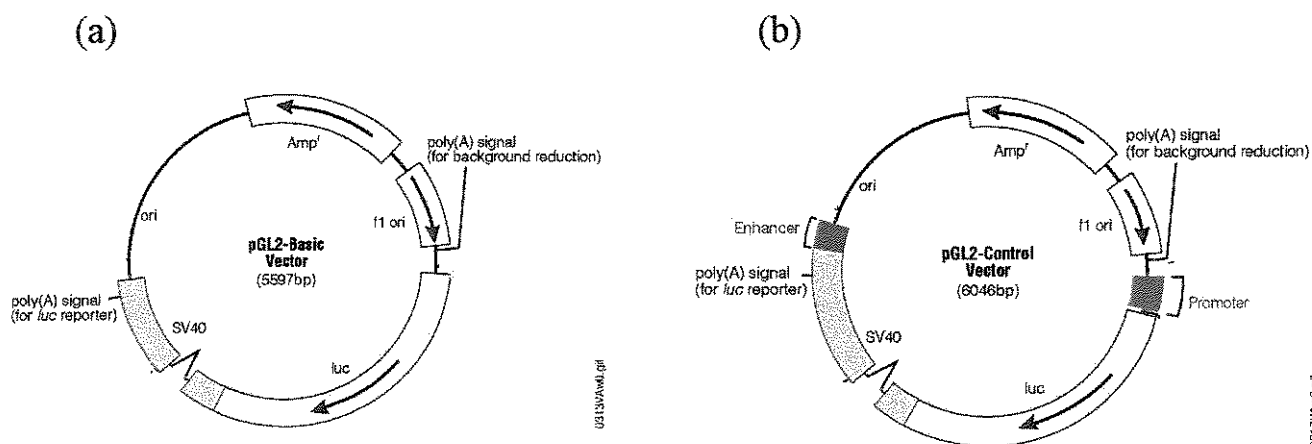


Figura 4.8 – Esquema dos vetores utilizados como controle negativo e positivo das reações: (a) - pGL2-Basic; vetor de expressão da luciferase sem promotor ou *enhancer*. (b) - pGL2-Control; vetor de expressão da luciferase que já vem com uma região promotora e *enhancer*. Em amarelo o gene da luciferase (*luc*), em vermelho o *enhancer* e azul a região promotora.

Os valores obtidos com a leitura dos vetores ligados à Firefly luciferase foram corrigidos pelos valores obtidos pela Renilla luciferase que foi o controle interno da transfecção. A construção contendo promotor gama A normal ligada ao HS2-LCR foi considerada como tendo atividade de 1 (100%) e o resultado final é expresso pela atividade dos promotores mutados comparados a ela.

4. Análise da interação DNA-proteína

A análise de retardamento do DNA em gel foi utilizada para investigar a presença de fatores de transcrição capazes de se ligar às regiões previamente identificadas como relacionadas à regulação dos promotores de globina γ . Desta forma, seqüências específicas da região promotora foram marcadas com fósforo radioativo P^{32} e incubadas com extratos nucleares ou proteína purificada. Essa mistura é aplicada a um gel de poliacrilamida e submetido a um campo elétrico que resultará na migração do DNA através do gel. Se houver interação do DNA com a proteína, ele ficará mais pesado e migrará mais lentamente no gel que o DNA sozinho e como é marcado radioativamente, uma vez exposto em um filme de RX, poderá ser evidenciada uma banda referente ao complexo DNA- proteína. O DNA não marcado migra mais rapidamente e como o tempo de corrida é longo, ele sai do gel e não aparece no gel ou aparece na sua porção inferior (Gumucio *et al*, 1988 e Rosenthal *et al*, 1995).

4.1. Construção de sondas de regiões promotoras e normais

Foram feitos 5 oligonucleotídeos complementares, 3 de 26pb da região promotora da globina γ^A entre as posições -210 e -184 relativo ao *cap site*: um contendo a seqüência normal, e outros dois com as mutações -195 C→G (PHHF do tipo Brasileira) e -198 T→C. Um oligonucleotídeo com a seqüência específica para ligação da proteína Sp1 e um oligonucleotídeo da região CACCC box. As seqüências estão descritas na tabela 4.5.

Nome	Abreviação	Seqüência
Promotor normal	Normal	5' AGT ATC CTC TTG GGG GCC CCT TCC CCA CAC 3' 3' TCA TAG GAG AAC CCC CGG GGA AGG GGT GTG 5'
Promotor com mutação -195 C→G	195	5' AGT ATC CTC TTG GGG GCC CCT TCC g CA CAC 3' 3' TCA TAG GAG AAC CCC CGG GGA AGG c GT GTG 5' -195
Promotor com mutação -198 T→C	198	5' AGT ATC CTC TTG GGG GCC CCT c CC CCA CAC 3' 3' TCA TAG GAG AAC CCC CGG GGA g GG GGT GTG 5' -198
Proteína Sp1	Sp1	5' ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C 3' 3' TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G 5'
CACCC box	CACCC	5' TGG CTA AAC TCC ACC CAT GGG TTG 3' 3' ACC GAT TTG AGG <i>TGG GTA</i> CCC AAC 5'

Tabela 4.5 – Seqüências das sondas utilizadas no *gel shift*. Em letra minúscula estão as regiões onde se encontram a mutação -195 C→G e -198 T→C. Em negrito está o sítio de ligação para a proteína Sp1 e em itálico o sítio CACCC box.

Foi anelado 10ug de cada oligonucleotideo com sua fita complementar em TrisHCl 10mM, MgCl 10mM , NaCl 50mM e DTT 1mM, por 15 minutos a 65°C.

4.2. Marcação da sonda com isótopo radioativo

Foi marcada 0,1ug de cada sonda anelada com γ -P³² com a enzima T4 poliquinase (Gibco-BRL) e purificado em coluna sephadex G-25 (Amersham Pharmacia Bitoech) para retirada do isótopo não incorporado.

4.3. Extrato nuclear

Para o estudo de interação DNA–proteína, as células K562 e HEL foram cultivadas em RPMI com 10% de soro bovino fetal conforme descrito no item 3.1, para extração de proteínas nucleares utilizadas no experimento.

Foram lavadas $1,0 \times 10^8$ células em PBS e a membrana celular lisada em HEPES KOH 10mM, MgCl 1,5mM, KCl 10mM, DTT 0,5mM e PMSF 0,2mM. As células são então centrifugadas e o sobrenadante composto de elementos citoplasmáticos retirado, o pellet resultante, composto pelo núcleo é lisado em HEPES KOH 20mM, glicerol 25%, MgCl 1.5mM, NaCl 420mM, EDTA 0,2mM, DTT 0,5mM e PMSF 0,2mM e o extrato nuclear congelado em gelo seco com álcool e conservado a -80°C até ser usado (Li *et al*, 2001). A concentração da proteína foi determinada utilizando o kit de quantificação de proteína da Bio-rad.

4.4. Reação de ligação

O extrato nuclear (5 μg) obtido no item anterior foi incubado com 50.000cpm da sonda marcada em um tampão de ligação (40mM Tris-HCl pH 7.9, 100mM NaCl, 20% glicerol, 0,2mM DTT), juntamente com 1,6 μg poli dI-dC por 15 min. em temperatura ambiente (Li *et al*, 2001). Em algumas reações, foi acrescentada uma sonda não marcada em altas concentrações (50X, 100X ou 200X mais que a sonda marcada) usada como competidor para testar a especificidade da ligação. Também foram realizadas ligações utilizando 1 μg da proteína purificada Sp1 (*Recombinant Human Sp1* - Promega) na presença de 200mg/ml de BSA (*bovine serum albumin* - Sigma). As ligações realizadas estão esquematizadas nas Tabelas 4.6, 4.7 e 4.8.

Reação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Proteína	<i>Extrato nuclear de K562</i>							<i>Proteína Sp1 purificada</i>			
Sonda marcada	Normal	Normal	195	195	198	198	Sp1	Normal	195	198	Sp1
Sonda não marcada	-	Sp1 100X	-	Sp1 100X	-	Sp1 100X	-	-	-	-	-

Tabela 4.6 – Reações de ligação com extrato nuclear de célula K562 (1 a 7) e Proteína Sp1 purificada (8 a 11), com as sondas Normal (promotor normal), 195 (promotor com a mutação $-195 \text{ C} \rightarrow \text{G}$), 198 (promotor com a mutação $-198 \text{ T} \rightarrow \text{C}$) e Sp1 (sítio

de ligação para proteína Sp1). A sonda Sp1 usada como competidor não marcada foi usada em uma concentração 100X maior que a sonda marcada.

Reação	1	2	3	4	5	6	7
Proteína	<i>Extrato nuclear de HEL</i>						
Sonda marcada	Normal	Normal	195	195	198	198	Sp1
Sonda não marcada	-	Sp1 100X	-	Sp1 100X	-	Sp1 100X	-

Tabela 4.7 – Reações de ligação com extrato nuclear de célula HEL, com as sondas Normal (promotor normal), 195 (promotor com a mutação –195 C→G) , 198 (promotor com a mutação –198 T→C) e Sp1 (sítio de ligação para proteína Sp1). A sonda Sp1 usada como competidor não marcada foi usada em uma concentração 100X maior que a sonda marcada.

Reação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Proteína	<i>Extrato nuclear de K562</i>											
Sonda marcada	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC	CACCC
Sonda não marcada	-	CACCC 50X	CACCC 100X	Normal 50X	Normal 100X	Normal 200X	195 50X	195 100X	195 200X	198 50X	198 100X	198 200X

Tabela 4.8 – Reações de competição com a sonda CACCC box. Ligação da sonda CACCC box marcada com extrato nuclear de célula K562, com as sondas Normal (promotor normal), 195 (promotor com a mutação –195 C→G) , 198 (promotor com a mutação –198 T→C) e a própria sonda CACCC box em concentrações de 50, 100 ou 200X maior que a sonda marcada usadas como competidor.

4.5. Análise da interação DNA-proteína em gel de poliacrilamida

A leitura da interação DNA-proteína foi feita através da corrida da reação em gel de poliacrilamida a 4%, 250V por 1 hora. Após a corrida, o gel foi colocado em papel filtro e exposto ao filme de RX com intensificador por 24 horas. Quando ocorre a interação do DNA com a proteína e retardamento da mobilidade do DNA no gel, há formação de uma banda visualizada na película de RX (Gumucio *et al*, 1988).

Resultados

V – RESULTADOS

1. Construção do vetor de expressão

Para a análise de expressão da PHHF tipo Brasileira *in vitro*, foram construídos vetores de expressão contendo a região promotora com a mutação -195, -175 e com o promotor normal, associados ou não ao HS2 do LCR.

1.1. Reações de PCR

1.1.1. PCR da região promotora globina gama A.

Para obtenção dos fragmentos contendo a região promotora normal e com a mutação -195, foram realizadas reações de PCR utilizando os primers P1 e P2 (Tabela 4.2) com amplificação de um fragmento de 670pb. O resultado está demonstrado na Figura 5.1.

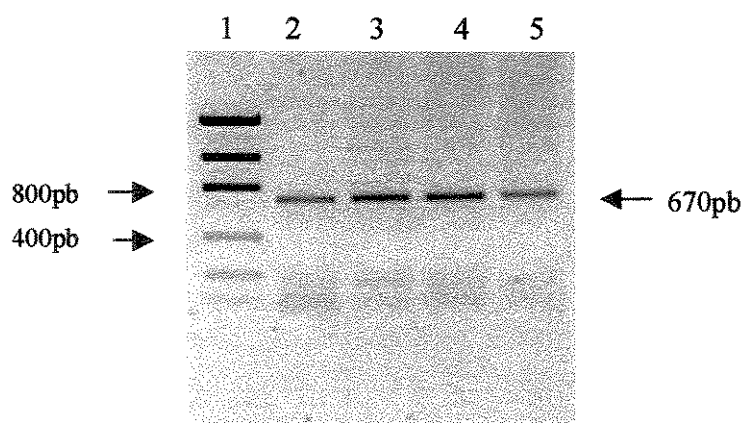


Figura 5.1 - Gel de agarose 1%. Linha 1 - marcador low mass. Linhas 2 a 5 - fragmento de 670pb correspondente ao PCR da região promotora da globina gama A com primers P1 e P2, linhas 2 e 3 do promotor normal e 4 e 5 do promotor com a mutação -195.

1.1.2. Primeiro e segundo estágios da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida -175.

Para obtenção do fragmento contendo a região promotora com a mutação -175, foram realizadas reações de PCR utilizando a técnica de PCR mutagênese sítio dirigida. Os resultados das reações do primeiro e segundo estágios estão demonstrados na Figura 5.2. As linhas 1 a 4 correspondem ao primeiro estágio da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida e as linhas 6 e 7 ao segundo estágio. O fragmento amplificado no segundo estágio está presente em baixa concentração, sendo, portanto necessário o terceiro estágio para obtenção de uma maior quantidade de DNA para clonagem.

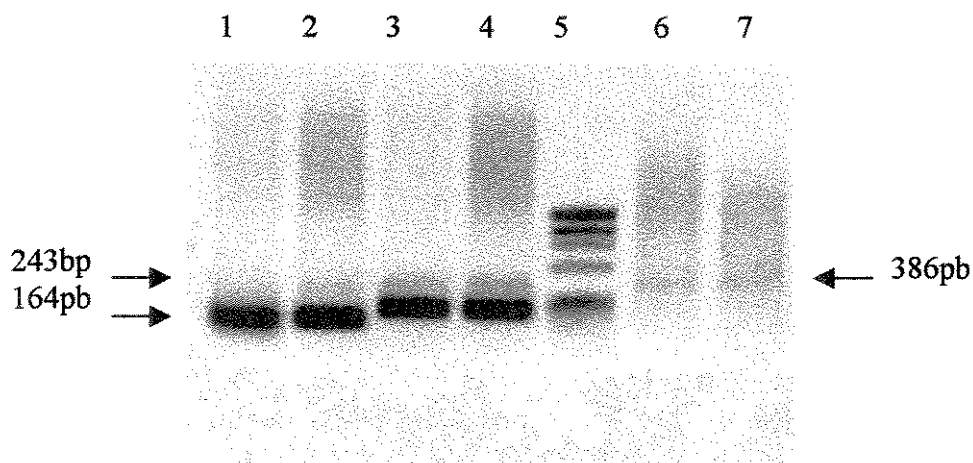


Figura 5.2 - Gel de agarose 1,5%. Linhas 1 e 2 - fragmento de 164pb correspondente ao PCR com primers P3 e P175as; Linhas 3 e 4 - fragmento de 243pb correspondente ao PCR com primers P175s e P2; Linha 5 - marcador ϕ X174 RF DNA/HaeIII e Linhas 6 e 7 fragmento de 386pb correspondente ao segundo estágio da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida.

1.1.3. Terceiro estágio da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida -175.

Para obtenção de uma maior quantidade do fragmento contendo a região promotora com a mutação -175, foi realizada reação de PCR utilizando os primers P2 e P3. O resultado da reação do terceiro estágio da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida está demonstrado na Figura 5.3.

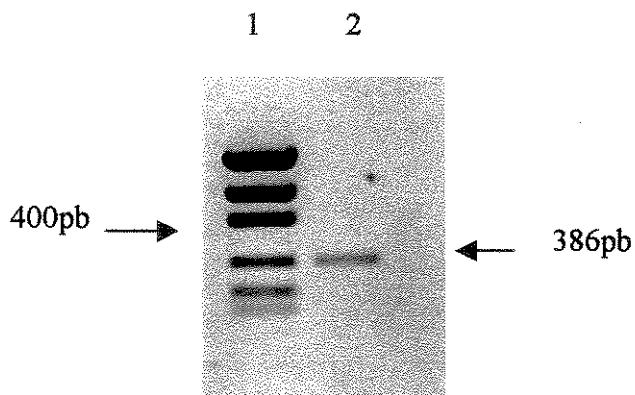


Figura 5.3 - Gel de agarose 1,5%. Linha 1 – marcador low mass e Linha 2 - fragmento de 386pb correspondente ao PCR do 3º estágio da técnica de PCR mutagênese sítio dirigida com primers P3 e P2.

1.1.4. PCR do HS2 do LCR

Para obtenção do fragmento contendo a região do sítio hiperssensível 2 do LCR (HS2-LCR), foram realizadas reações de PCR utilizando os primers PHS2s e PHS2as (Tabela 4.4) com amplificação de um fragmento de 756pb. O resultado está demonstrado na Figura 5.4.

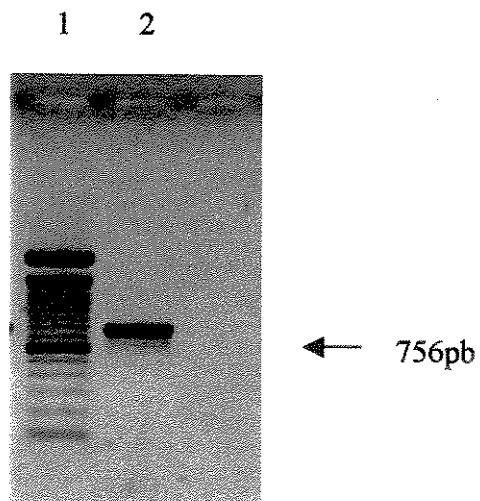


Figura 5.4 – Gel de agarose 1%. Linha 1 - marcador 100pb DNA ladder. Linha 2 - fragmento de 756pb correspondente ao PCR da região HS2 do LCR amplificado com primers PHS2s e PHS2as.

1.2. Construções

Os fragmentos obtidos pela técnica de PCR foram clonados no vetor de expressão da luciferase para se obter 6 construções representadas na Figura 5.5.

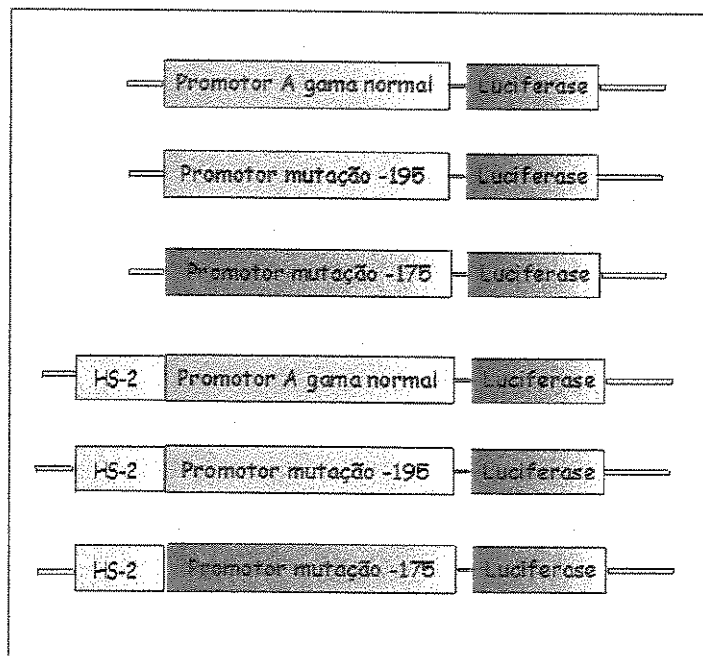


Figura 5.5 – Esquema dos vetores construídos para os experimentos de transfecção.

1.3. Sequenciamento

1.3.1. Sequenciamento da região promotora.

Para verificação das construções gênicas, foram realizadas reações de sequenciamento automático. A Figura 5.6 representa o eletroesferograma da região que contém a mutação. Observe que as mutações -195 e -175 são claramente visíveis.

à mutação -195 C→G e (C) à mutação -175 T→C. As setas vermelhas e azuis indicam as posições -195 e -175, respectivamente onde aparecem as mutações.

1.3.2. Sequenciamento da região HS2 do LCR.

Para verificação das construções gênicas, foram realizadas reações de sequenciamento automático. A Figura 5.7 representa o eletroesferograma de uma região do HS2 -LCR.

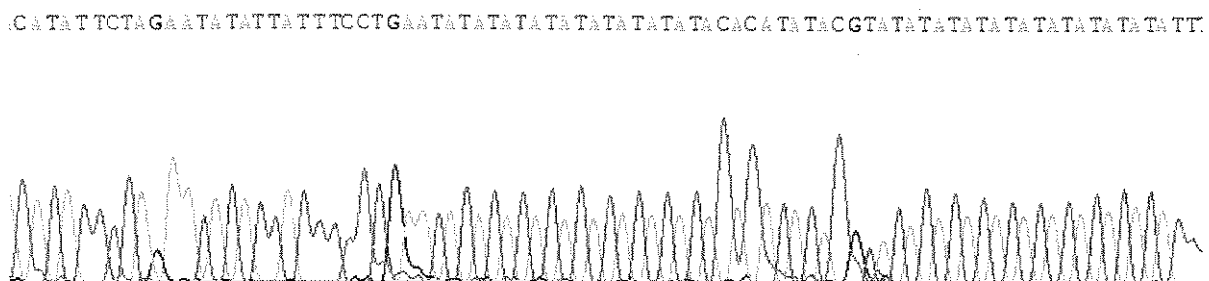


Figura 5.7 – Eletroesferograma do sequenciamento automático da região HS2 – LCR (8855-8936 Genbank GI 455025).

2. Análise da expressão do promotor globina gama A

Uma vez confirmada as seqüências das construções, foi realizada transfecção nas linhagens celulares.

Nas células K562 e HEL, foi realizada transfecção por eletroporação com 20µg de plasmídeo a ser testado e 1µg de plasmídeo controle (pRL-TK). A célula 293 foi transfectada através da lipofecção usando 3µg de plasmídeo a ser testado, 0,15µg de plasmídeo controle (pRL-TK) e 10ul de lipofectamine.

O vetor de expressão utilizado nos experimentos, pGL2-Basic (Promega) (Figura 4.2), contém uma região codificadora da enzima Firefly luciferase, sem a presença de elementos reguladores da transcrição. Quando associado a um promotor e *enhancer*, no caso, o promotor da globina gama na presença ou não do HS2 do LCR, é capaz de produzir luciferase. O lisado celular, que contém luciferase, quando misturado ao substrato da reação

(LAR – Promega) que contém luciferina e ATP, produz luminescência, que será medida através do luminômetro. A medida de luz produzida, corresponderá à quantidade de luciferase produzida e, portanto à atividade do promotor presente em tal construção. Deste modo podemos comparar a atividade do promotor normal com os promotores contendo a mutação.

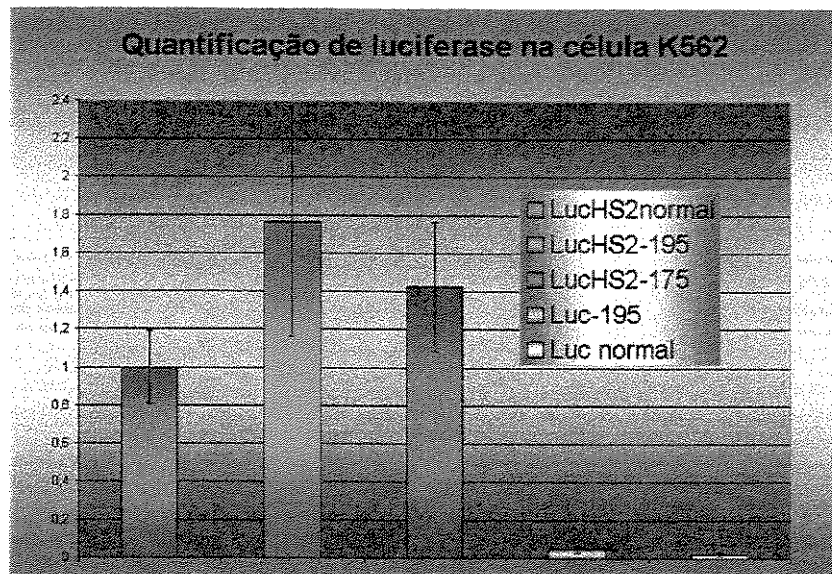
O plasmídeo controle pRL-TK (Promega) (Figura 4.7) foi utilizado para controle interno da transfecção. Ele normaliza os experimentos realizados conforme a eficiência da transfecção. Esse vetor expressa a enzima Renilla luciferase, que também é uma enzima que cataliza reação de quimioluminescência produzindo luz quando em contato com substrato específico (Stop & Glo – Promega). A utilização desse vetor facilita a realização dos experimentos porque utiliza o mesmo lisado celular e o mesmo equipamento de leitura (luminômetro).

Foram feitas 2 a 4 eletroporações de cada vetor, além dos vetores pGL2-Basic e pGL2-Control (Figura 4.8) usados respectivamente com controle negativo e positivo da expressão da luciferase e realizadas 2 a 3 leituras de luminescência de cada uma delas.

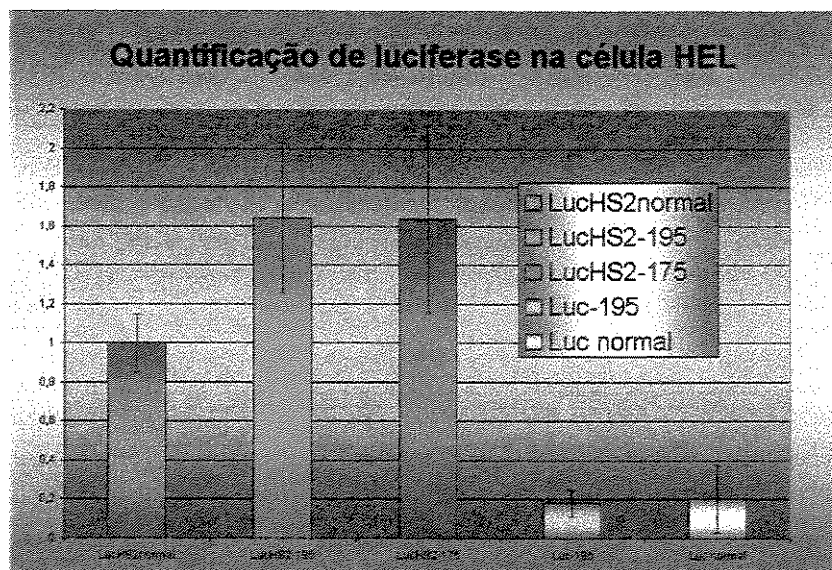
Após a transfecção, as células foram cultivadas por 24hs para expressar o gene, depois são recolhidas, lisadas, e o extrato celular usado para se fazer a leitura da expressão gênica através da medida da luminescência. Os resultados foram normalizados pelo controle interno e comparados ao promotor normal associado ao HS2-LCR que foi considerando como tendo 100% de atividade.

Os resultados estão apresentados nos gráficos abaixo:

(a)



(b)



(c)

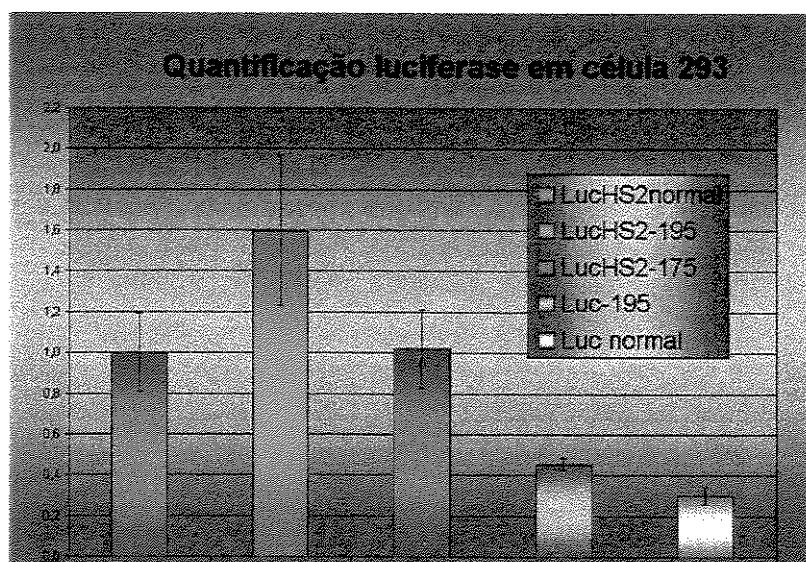


Figura 5.8 - Gráficos de expressão da luciferase nas células K562, HEL e 293 respectivamente figuras: (a), (b) e (c). Cada coluna representa um vetor de expressão da luciferase ligado a um promotor com ou sem o HS2. LucHS2normal – promotor da globina gama A normal associado ao HS2. LucHS2-195 - promotor da globina gama A com a mutação –195 C→G associado ao HS2. LucHS2-175 - promotor da globina gama A com a mutação –175 T→C associado ao HS2. Luc-195 - promotor da globina gama A com a mutação –195 C→G sem HS2. Luc-175 - promotor da globina gama A com a mutação –175 T→C sem o HS2.

Na presença do HS2-LCR, o promotor contendo o gene globina gama A normal aumentou a expressão gênica em $52,6 \pm 0,1$; $4,9 \pm 0,1$ e $3,3 \pm 0,1$ vezes nas células K562, HEL e 293, respectivamente, quando comparado com o promotor sem o HS2. O promotor contendo a mutação –195 associado ao HS2, apresentou aumento da expressão de $1,7 \pm 0,6$; $1,6 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 0,3$ vezes nas células K562, HEL e 293 respectivamente, quando comparados com o promotor normal também associado ao HS2, esse aumento foi significativo (p-value 0,0041, 0,0001 e 0,0022 respectivamente pelo teste estatístico de

Wilcoxon) nas 3 linhagens celulares. O promotor contendo a mutação -175 não mostrou aumento quando comparado ao promotor normal na célula 293 e apresentou aumento significativo de $1,4 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 0,4$ vezes nas células K562 e HEL respectivamente (p-value 0,014 e 0,0002 respectivamente pelo teste estatístico de Wilcoxon).

3. Análise da interação DNA-proteína

3.1. Análise do retardamento em gel das regiões promotoras globina gama A com extrato nuclear de K562, HEL e proteína purificada Sp1.

Para verificar se a mutação -195 C→G afeta a ligação com proteínas nucleares, oligonucleotídeos contendo a sequência promotora normal e com as mutações -198 T→C e -195 C→G (descritos na Tabela 4.5) foram marcados com fósforo radioativo, incubados com extrato nuclear de células eritróides ou proteína Sp1 purificada e submetidos à análise de retardamento em gel de acrilamida.

As Figuras 5.9 e 5.10 demonstram que quando a sonda Sp1 é incubada com extrato nuclear de K562 ou HEL ou proteína purificada Sp1, produz uma banda, correspondente a sua ligação com a proteína Sp1 (Figura 5.9: linha 7 e 11; Figura 5.10: linha 7-8). Quando o promotor normal é incubado com a proteína purificada Sp1 produz uma banda fraca que migra simultaneamente à banda produzida pela sonda Sp1 (Figura 5.9: linha 8). Já a sonda -198 T→C produz uma banda de forte intensidade (Figura 5.9: linha 10), enquanto que, a sonda com a mutação -195 C→G não produz nenhuma banda (Figura 5.9: linha 9).

Da mesma maneira que a descrita na literatura (Gumucio *et al*, 1991) quando analisamos a ligação do promotor -198 com extrato nuclear de K562 e HEL (Figura 5.9: linha 5 e Figura 5.10: linha 5, respectivamente), vemos a formação de uma banda semelhante a observada na ligação com a sonda Sp1 e de maior intensidade quando comparada com a ligação com o promotor normal (Figura 5.9: linha 1 e Figura 5.10: linha 1).

Quando analisamos a ligação do promotor -195 com extrato nuclear de K562, notamos que a banda correspondente à ligação com a proteína Sp1 desaparece (Figura 5.9: linha 3), mas uma segunda banda mantém-se, apesar de mais fraca que a banda do promotor normal. Na ligação com extrato nuclear da célula HEL, não há formação de banda nem com o promotor normal, nem com o promotor -195, na posição referente a ligação da proteína Sp1 (Figura 5.10: linhas 1 e 3 respectivamente), e sim de um complexo um pouco abaixo que é mais forte no promotor normal e aparece também em menor intensidade nas sondas contendo as mutações -195, -198 e Sp1. Esses dados também foram observados em

experimentos realizados com outras mutações como a -196 e -202 (Ronchi *et al*, 1989, Sykes & Kaufman, 1990 e Gumucio *et al*, 1991). Experimentos com competidor mostraram que essas bandas secundárias correspondem a uma ligação DNA-proteína específica, uma vez que a adição da sonda Sp1 não marcada à reação, leva ao desaparecimento dos complexos formados.

Outras bandas observadas abaixo do complexo Sp1, também foram descritas em outros estudos (Ronchi *et al*, 1989 e Gumucio *et al*, 1991) e parecem ser secundárias a proteólise ou alterações pós-tradução da proteína Sp1.

A Figura 5.9 representa a foto obtida na reação de interação de DNA-proteína das regiões promotoras com extrato nuclear de K562 e proteína purificada Sp1.

Proteína Sonda Competidor	Extrato K562						Proteína Sp1			
	NL	-195	-198	Sp1			NL/-195/-198/Sp1			
	Sp1		Sp1		Sp1					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

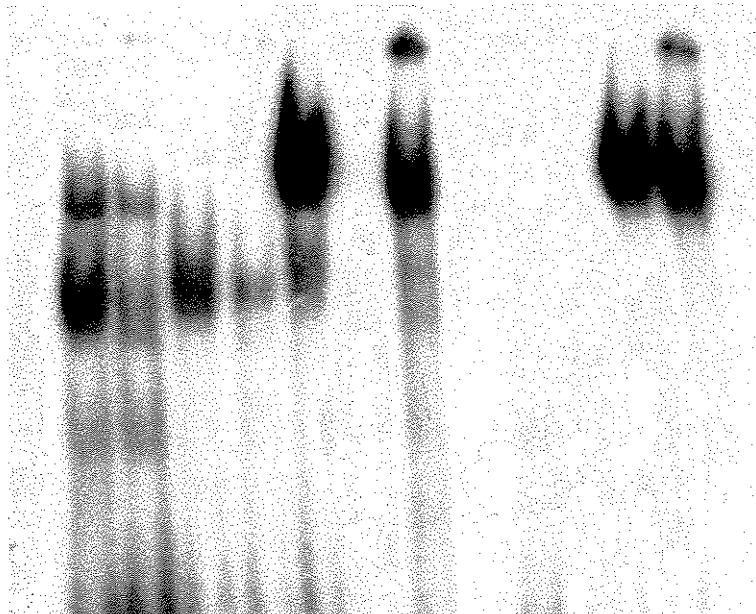


Figura 5.9 – Análise de retardamento em gel das ligações das sondas das regiões promotoras com extrato nuclear de K562 (linhas 1-7) ou proteína purificada Sp1 (linhas 8-11). Linhas 1, 2 e 8; sonda do promotor normal; linhas 3, 4 e 9, sonda do promotor com mutação -195 C→G; linhas 5, 6 e 10, sonda do promotor com mutação -198

T→C e linhas 7 e 11, sonda Sp1. As linhas 2, 4 e 6 contêm sonda Sp1 não marcada como competidor. (experimento realizado conforme Tabela 4.6).

A Figura 5.10 representa a foto obtida na reação de interação de DNA-proteína das regiões promotoras com extrato nuclear de HEL e proteína purificada Sp1.

Proteína Sonda	Extrato HEL						Proteína Sp1	
	NL	-195	-198				Sp1	
Competidor	Sp1	Sp1	Sp1					
	1	2	3	4	5	6	7	8

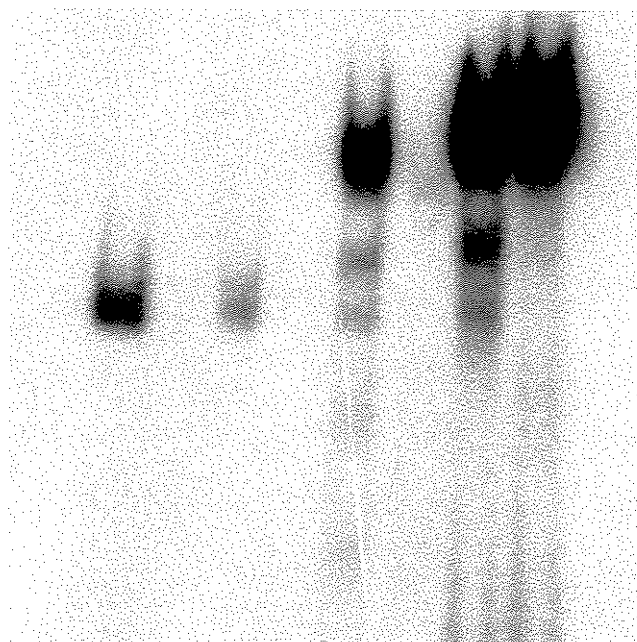


Figura 5.10 - Análise de retardamento em gel das ligações das sondas das regiões promotoras com extrato nuclear de HEL (linhas 1-7) ou proteína purificada Sp1 (linhas 8). Linhas 1 e 2, sonda do promotor normal; linhas 3 e 4, sonda do promotor com mutação -195 C→G; linhas 5 e 6, sonda do promotor com mutação -198 T→C e linhas 7 e 8, sonda Sp1. As linhas 2, 4 e 6 contêm sonda Sp1 não marcada como competidor. (experimento realizado conforme Tabela 4.7).

3.2. – Análise do retardamento em gel do oligonucleotídeo contendo a região CACCC box com as regiões promotoras globina gama A com extrato nuclear de célula K562.

Experimentos anteriores demonstraram que a mutação -198 C→T cria um sítio de ligação CACCC box no promotor gama (Li *et al*, 2001). Para determinar se a região alterada pela mutação -195 compete com proteínas que se ligam ao CACCC box, um oligonucleotídeo correspondente a essa região foi marcado radioativamente e incubado com quantidades crescentes de sondas -195 e -198 não marcadas e extrato nuclear de K562.

Quando a sonda CACCC box foi incubada com extrato nuclear de K562, 2 bandas puderam ser visualizadas no gel (Figura 5.11: linha 1). Como esperado, quando se acrescenta a sonda CACCC box não marcada radioativamente, as bandas desapareceram pois a sonda não marcada está em uma concentração 50 a 100X maior (Figura 5.11; linhas 2 e 3). Da mesma maneira, a ligação dos 2 complexos foi inibida com adição da sonda -198 não marcada (Figura 5.11; linhas 10 a 12) sugerindo que as proteínas que se ligam ao sítio CACCC box também se ligam a sonda -198. Porém quando analisadas as ligações com as sondas com promotor normal e -195, notamos que não há diferença quando a sonda normal (Figura 5.11: linhas 4 a 6) ou -195 (Figura 5.11: linhas 7 a 9) não marcadas foram acrescentadas. Como ocorre com a sonda normal, as proteínas que se ligam a região CACCC box não se ligam com a sonda -195, portanto essa mutação não compete com CACCC box, como observado na mutação -198.

O resultado obtido está ilustrado na Figura 5.11.

Proteína	Extrato K562											
Sonda	CACCC											
Competidor	CACCC			NL			195			198		
	50	100	50	100	200	50	100	200	50	100	200	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

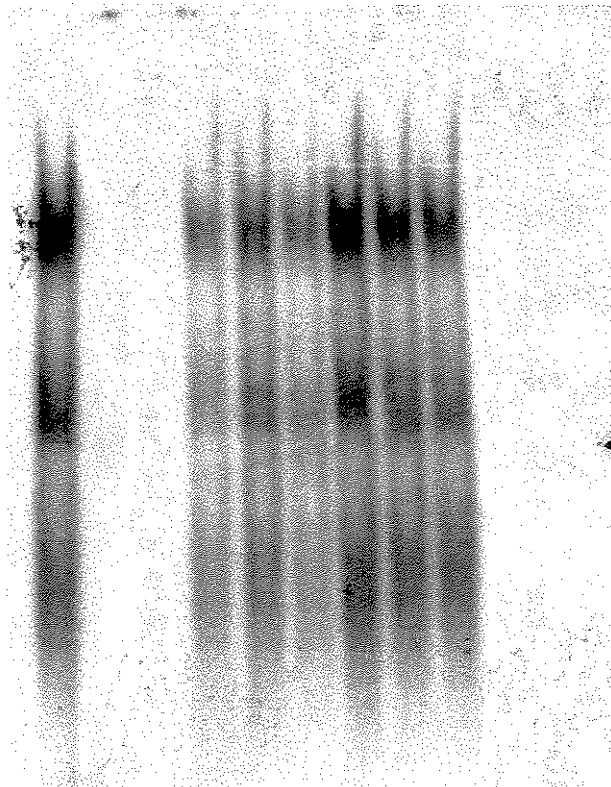


Figura 5.11 - Análise de retardamento em gel das ligações das sondas CACCC box com extrato nuclear de K562. Linhas 1: representa a ligação da sonda CACCC box marcada com o extrato nuclear K562. As linhas 2 a 12 contém além da sonda CACCC box marcada, uma sonda não marcada radioativamente como competidor; as linhas 2 e 3 tem a sonda CACCC box não marcada, as linhas 4 – 6 a sonda do promotor normal, as linhas 7–9 a sonda do promotor com a mutação -195 C→G e as linhas 10 a 12 a sonda do promotor com a mutação -198 T→C. Foi utilizado 50, 100 ou 200 vezes mais sonda não marcada nos experimentos de competição (experimento realizado conforme Tabela 4.8).

Discussão

VI – DISCUSSÃO

Evidências clínicas de que o aumento dos níveis de HbF, em pacientes com Anemia Falciforme e β -Talassemia, estaria associado com uma menor gravidade da doença (Perrine *et al*, 1972), levaram ao estudo dos mecanismos de regulação gênica da expressão do gene γ , com o intuito de desenvolver novas possibilidades terapêuticas para essas patologias, ainda hoje sem cura e com uma baixa qualidade de vida.

A HbF, composta pelas cadeias α e γ ($\alpha_2\gamma_2$), é a principal hemoglobina expressa no período fetal. Depois do nascimento, ela tem sua produção diminuída progressivamente, com o aumento simultâneo da produção da HbA ($\alpha_2\beta_2$), até que com aproximadamente 6 meses de vida, já temos o predomínio de produção de HbA e apenas uma pequena produção de HbF (entre 0-2%) (Figura 1.2). Deste modo, vemos que após o nascimento, ocorre uma troca de produção de cadeia γ por β , ou seja, por um mecanismo ainda não totalmente elucidado, a expressão do gene γ é inativada enquanto o β é ativado (Bunn & Forget, 1986).

Primeiramente foi levantada a hipótese de que a troca de produção de cadeia γ por β , seria induzida pelo ambiente, ou seja, ao nascer, sem mais a necessidade de captação do oxigênio pela placenta, o indivíduo passaria a produzir HbA ao invés de HbF. Para testar essa hipótese, Wood *et al* (1985) transplantaram células hematopoiéticas fetais de carneiros de diferentes idades gestacionais, para a medula óssea de um animal adulto. Inicialmente, houve produção de HbF e posteriormente troca para a produção de HbA, porém o tempo decorrido para ocorrer essa troca não dependeu do tempo do transplante, mas sim da idade gestacional das células fetais transplantadas. Essa constatação levou a conclusão de que o ambiente no qual a célula está inserida não é tão importante para o tipo de cadeia produzida, mas sim que haveria uma programação celular para a ocorrência dessa troca. Em 1995, Honing *et al*, tiveram a mesma constatação ao transplantarem células de sangue de cordão umbilical em pacientes com Anemia de Fanconi.

Existem situações, em que a produção do gene γ volta a ser estimulada, como na recuperação hematológica pós-quimioterapia, pós-hemólise ou pós-sangramento agudo (Sheridan, B.L., 1976, Olivieri. & Weatherall, 1998 e Weatherall & Clegg, 2001), e casos em que ela não é totalmente inativada, como nas PHHFs. As PHHFs, compreendem um

grupo de indivíduos, com aumento dos níveis de HbF na fase adulta sem outro distúrbio hematológico. Essas situações nos mostram que, o gene γ , apesar de estar “inativo”, ainda é capaz de ser produzido pelas células hematopoiéticas no adulto, mesmo fora do período fetal e portanto a reativação da produção do gene γ é um tratamento possível para os pacientes portadores da hemoglobinopatias hereditárias.

Por ser uma alteração hereditária, o estudo das alterações genéticas nos portadores de PHHF, se tornou importante para a descoberta de elementos gênicos que estão associados com a expressão dos genes da globina e que estariam associados à programação celular para ativação ou inativação desses genes. Portanto, estudos de portadores de PHHF, visam descobrir seqüências gênicas alteradas e posteriormente, como elas influenciam na expressão dos genes, através de ensaios de expressão gênica *in vitro*, interação DNA-proteína e produção de animais transgênicos. Estas descobertas ajudam a elucidar os mecanismos de interação entre os elementos regulatórios responsáveis pela expressão dos genes da globina e com isso auxiliam no desenvolvimento de novas terapêuticas e descoberta de drogas que estimulariam a expressão da cadeia γ .

Várias mutações de ponto na região promotora foram descritas associadas a um aumento de HbF (Tabela 1.1). Como vimos anteriormente, a região promotora precede a região codificadora do gene, não é transcrita mas é de suma importância, pois possui seqüências gênicas específicas para ligação de diversas proteínas regulatórias da transcrição. Essas proteínas formam um complexo, que recruta a enzima RNA polimerase para iniciar a transcrição. Portanto uma alteração nessa seqüência pode alterar a ligação de uma dessas proteínas e alterar a transcrição do gene.

1. Análise da expressão do promotor globina gama A

Descoberta por Costa *et al*, em 1990, a mutação –195 está associada a um aumento de hemoglobina fetal na fase adulta, porém a relação entre essa mutação e o aumento de expressão do gene γ , ainda não havia sido comprovada em experimentos *in vitro*. Schreiber *et al* em 2001, utilizando o sistema de gene repórter da luciferase, não encontrou aumento significativo de expressão do promotor contendo a mutação –195 quando comparado com o promotor normal. Como não houve aumento de expressão no vetor contendo a mutação, foi

avaliada a hipótese de que a presença de elementos do LCR seriam necessários para adequada expressão do gene.

Para testar a veracidade dessa hipótese, associamos o HS2 do LCR ao promotor da globina γ^A normal e comparamos sua expressão com os promotores contendo as mutações -195 e -175 utilizando o gene repórter da luciferase utilizando 3 linhagens celulares: K562, HEL e 293.

A mutação -175 também foi estudada porque experimentos anteriores já haviam demonstrado que ela aumenta a expressão gênica quando comparada com o promotor normal, em experimentos de expressão gênica (Nicolis *et al*, 1989, Lloyd *et al*, 1989 e Gumucio *et al*, 1990) e pela facilidade de se obter a mutação pela técnica de mutagenese sítio dirigida, uma vez que a mutação -198 que também poderia ser usada (pois também apresenta aumento de expressão *in vitro*) fica em uma região rica em nucleotídeos CG, o que dificulta sua execução.

As células K562 e HEL são células eritroleucêmicas que expressam globinas embrionárias e fetais e a 293 é uma célula embrionária renal que também produz cadeias globínicas. A linhagem celular K562 foi utilizada em vários estudos na literatura com objetivos semelhantes e é capaz de transcrever os genes da globina, exceto o da globina β (Donovan-Peluso *et al*, 1984). As células HEL, também são eritroleucêmicas fetais que produzem apenas cadeias γ (Martin & Papayannopoulou, 1982). As células 293 são células embrionárias renais humanas transformadas com DNA do adenovírus do tipo 5, e são capazes de transcrever os genes de globina humana (Treisman *et al*, 1983).

Os resultados da atividade dos promotores da globina γ^A *in vitro* indicaram um aumento significativo de expressão dos vetores contendo o LCR (aumento de expressão de $52,6 \pm 0,1$; $4,9 \pm 0,1$ e $3,3 \pm 0,1$ vezes nas células K562, HEL e 293, respectivamente) mostrando que a sua presença é necessária para aumento da expressão dos vetores *in vitro* e portanto para efetiva ação das regiões promotoras.

A importância do LCR em experimentos *in vitro*, já havia sido constatada por Langdon & Kaufman, 1998 e Sargent *et al*, 1999, entre outros. Em animais transgênicos geralmente os genes da globina são ligados a um μ LCR (cerca de 2,5Kb) para que haja sua correta expressão (Walsh *et al*, 1993), porém ele é mais trabalhoso de ser obtido uma vez que é composto da região central de cada um dos 4 sítios hipersensíveis (região que

apresenta maior atividade). Langdon & Kaufman, 1998 realizaram experimentos com promotor gama na presença e ausência do HS2 do LCR e demonstraram que na sua presença haveria uma expressão entre 13 a 28 vezes maior. Como o HS2 é o enhancer clássico e sua atividade parece ser suficiente para correta expressão do gene em experimentos de transfecção transitória (Bungert *et al*, 1999), ele foi escolhido para ser usado em nossos experimentos.

O promotor γ^A contendo a mutação -195 associado ao HS2-LCR teve um aumento significativo da expressão nas 3 linhagens celulares (aumento da expressão de $1,7 \pm 0,6$; $1,6 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 0,3$ vezes nas células K562, HEL e 293 respectivamente), já o promotor contendo a mutação -175 não mostrou aumento quando comparado ao promotor normal na célula 293 mas apresentou aumento significativo de $1,4 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 0,4$ vezes nas células K562 e HEL respectivamente. Este resultado pode ser justificado pela diferença de expressão de proteínas nucleares presentes nos diversos tipos celulares e que estão associados a expressão do gene. As células 293, apesar da capacidade de expressar cadeias globínicas, são células embrionárias renais (Treisman *et al*, 1983) e não eritróides. A ausência de aumento de expressão também foi observado por Lloyd *et al*, em 1989.

O aumento de expressão do promotor γ^A contendo a mutação -195 associado ao HS2-LCR foi menor do que o observado em seres humanos com a mutação (HbF entre 5-7% em heterozigotos). Resultados semelhantes foram observados em outros estudos (Lloyd *et al*, 1989 e Gumucio *et al*, 1990, entre outros já citados) e refletem as limitações da técnica usada que serão discutidas mais adiante.

Dentre os diversos tipos de genes repórter, escolhemos o gene repórter da luciferase, pois apresenta as vantagens de ser um método simples, rápido e bastante sensível. A enzima produzida é a luciferase que cataliza uma reação de quimioluminescência produzindo luz que é medida através de um luminômetro. Ela é uma proteína de 62kDa, estruturalmente simples (sem grupos prostéticos ou ligação com metais) que não requer nenhuma modificação pós-transcrição, podendo ser expressa na grande maioria das células. Como os organismos geralmente não têm luminescência endógena, não há interferência de sinal, portanto a medida da luz produzida, refletirá a quantidade de luciferase produzida e consequentemente a força do promotor. Esse sistema pode detectar menos que 10^{-20} moles

de luciferase o que representa uma sensibilidade cerca de 100 vezes maior que a utilização de vetores de expressão como o CAT (William *et al*, 1989).

Outra vantagem do sistema utilizado nesse estudo é a possibilidade de se usar o mesmo lisado celular e equipamentos para se testar 2 vetores simultaneamente. Há 2 tipos de luciferases, a Firefly e a Renilla, a primeira é derivada do organismo *Photinus pyralis* e a segunda do *Renilla reniformis*, sendo enzimas diferentes e utilizando substratos diferentes, podendo portanto ser usadas em conjunto, sem interferência no resultado uma da outra.

Uma vez obtido o lisado celular, adiciona-se primeiramente um reagente para leitura de expressão da enzima Firefly e em seguida adição de um segundo reagente que bloqueia a primeira reação e reage com a Renilla. Os 2 genes codificadores podem estar no mesmo vetor, ligados a promotores diferentes ou em vetores diferentes transfectados na mesma célula e usados como controle interno do experimento.

Os experimentos aqui realizados de transfecção transitória sofrem maiores interferências que os de transfecção estável. Nesse último, através da utilização de um vetor que confere resistência a determinado antibiótico, as células são cultivadas na presença do antibiótico e somente as células que tiverem o gene da resistência, ligado ao vetor a ser estudado, sobreviverá. Desta maneira, selecionamos as células onde houve integração do vetor a ser estudado e maior fidelidade de resultados. A transfecção estável é um método que nos dá resultados mais precisos mas demanda maior tempo (semanas a meses para selecionar a linhagem celular com o inserto) e trabalho, principalmente quando utilizamos células em suspensão pela dificuldade de se selecionar as linhagens resistentes.

Há também a necessidade de realização de experimentos usando células que mimetizem um ambiente eritróide adulto. Esta constatação foi feita por Langdon & Kaufman, 1998 que demonstraram aumento de expressão nas mutações -202 e -198 somente na célula MEL (*Murine erythroleukemia cell*) e não na K562. A MEL é uma célula leucêmica eritróide de camundongo infectada com *Friend leukemia virus*, que tem a capacidade de expressar cadeias globínicas α e β presentes na fase adulta (Marks e Rifkind, 1978). Acredita-se que ela apresente fatores de transcrição diferentes dos presentes na K562 e HEL, necessários para expressão adequada de cada gene, ou seja, fatores estimuladores da produção de cadeias β e/ou ausência de estimuladores ou presença de

inibidores da produção de cadeias γ . Experimentos com célula eritróide adulta não foram realizados pois não tínhamos a linhagem celular em nosso laboratório.

Os experimentos de transfecção *in vitro* são importantes na detecção de elementos reguladores da transcrição e pela sua facilidade, devem ser usados para o reconhecimento dessas regiões, porém os experimentos em animais transgênicos representam um modelo muito mais adequado para representar o que ocorre no ser humano. Com ele, podemos analisar não somente a expressão dos genes individualmente e em conjunto mas também da troca que ocorre entre eles em cada um dos períodos do desenvolvimento (como ocorre a ativação ou inativação dos genes).

Nos animais transgênicos a presença de todos os elementos do LCR é fundamental para a expressão dos genes, pois na sua ausência não temos níveis detectáveis de cadeias globínicas em nenhum dos estágios do desenvolvimento (Starck *et al*, 1994 e Peterson, 2003), mas o seu tamanho (cerca de 16kb) dificultava seu uso. Com o estudo mais detalhado da função de cada elemento do LCR, tornou-se possível a construção de um “micro”-LCR (μ LCR), que contém apenas as regiões fundamentais de cada sítio hiperssensível para seu funcionamento (Walsh *et al*, 1993), facilitando sua clonagem aos genes da globina.

O μ LCR mostrou-se suficiente para a correta expressão dos genes (Enver *et al*, 1989) e experimentos vem demonstrando o aumento de expressão de cadeia γ no adulto, em camundongo transgênicos, onde foram inseridos vetores com mutações relacionadas a PHHF, como na mutação -202 (Tanaka *et al*, 1990), -198 e -117 (Li *et al*, 2001). O próximo passo indicado pelos resultados aqui descritos, seria portanto a construção de um vetor contendo os genes da globina ligados ao μ LCR contendo a mutação -195 no promotor gama e estudar a sua expressão nos diferentes estágios de desenvolvimento, para constatar o aumento de expressão da cadeia γ no estágio adulto.

2. Análise da interação DNA-proteína

2.1. Interação da região promotora γ^A com extrato nuclear de K562 e HEL e proteína Sp1.

Uma vez verificado que a mutação $-195\text{ C} \rightarrow \text{G}$ aumenta a expressão do gene em experimentos *in vitro*, é necessário elucidar o mecanismo pelo qual esse aumento ocorre. A região proximal do promotor da globina γ^A possui pelo menos 13 sítios de ligação para proteínas nucleares (figura 1.6) e vários estudos vêm demonstrando que essas mutações de ponto interferem com a ligação dessas proteínas. A mutação $-117\text{ G} \rightarrow \text{A}$ resulta em aumento da interação com as proteínas CP-1 e CDP, enquanto diminui a interação com GATA-1 e NF-E3 (Superti-Furga *et al*, 1988 e Mantovani *et al*, 1988). Já a mutação $-175\text{ T} \rightarrow \text{A}$ interfere com a ligação da proteína OCT-1 (Mantovani *et al*, 1988 e Gumucio *et al*, 1988) e a $-202\text{ C} \rightarrow \text{T}$ reduz a ligação com a proteína Sp1 (Sykes & Kaufman, 1990), porém nesses dois casos, essa alteração não parece ser o único mecanismo envolvido no aumento de expressão do gene γ . Uma alteração cujo mecanismo de aumento de cadeia γ já está bem caracterizada é a mutação $-198\text{ T} \rightarrow \text{C}$. Estudos demonstraram que ela cria um novo sítio CACCC box que tem alta afinidade pela proteína Sp1, o que aumenta a força do promotor γ mantendo a sua expressão no adulto (Li *et al*, 2001).

Para avaliar se a mutação -195 acarreta alguma alteração na ligação com proteínas reguladoras da transcrição, experimentos de interação DNA-proteína foram realizados através da técnica de retardamento do complexo DNA-proteína em gel (*Gel Shift*). A técnica consiste em marcar a sequência de DNA a ser estudada com fósforo radioativo e ligá-lo a um extrato nuclear ou proteína purificada. Em seguida, a ligação é submetida à análise de retardamento em gel de acrilamida e se a sequência de DNA possuir sítio de ligação para a proteína, o complexo ficará mais pesado e migrará mais lentamente pelo gel. Após 1 – 2 horas de corrida, o gel é exposto a um filme de RX e como o DNA está marcado radioativamente, se houver ligação, iremos visualizar uma banda.

As sequências de DNA utilizadas, contém a região do promotor da globina γ^A com a sequência normal, e com as mutações $-195\text{ C} \rightarrow \text{G}$ e $-198\text{ T} \rightarrow \text{C}$ (Tabela 4.5). Os oligonucleotídeos com promotor normal e com a mutação $-198\text{ T} \rightarrow \text{C}$ foram usados para se

comparar a intensidade da banda produzida com a mutação -195 C→G. Elas foram ligadas com extrato nuclear das células eritróides K562 e HEL e a proteína purificada Sp1, devido a constatação, em experimentos anteriores, de uma fraca interação da proteína Sp1 na região -200 relativa ao cap site no promotor normal e aumento dessa afinidade na mutação -198 (Ronchi *et al*, 1989, Sykes & Kaufman, 1990 e Gumucio *et al*, 1991).

A proteína Sp1 é uma proteína reguladora da expressão gênica e participa da regulação de diversos genes eritróides ou não. Ela se liga a região rica em nucleotídeos CG e pode agir como ativador ou inibidor da transcrição dependendo em que promotor está presente e com quais proteínas interage (Kaczynski *et al*, 2003). A sonda Sp1 contém a sequência consenso para a ligação da proteína Sp1 e foi usada como controle positivo do experimento, pois quando incubada com extrato nuclear de K562 ou HEL ou proteína purificada Sp1, necessariamente produzirá uma banda, correspondente a sua ligação com a proteína Sp1 (Figura 5.9: linhas 7 e 11; Figura 5.10: linhas 7-8).

Confirmando o que é descrito na literatura (Ronchi *et al*, 1989, Sykes & Kaufman, 1990 e Gumucio *et al*, 1991), quando o promotor normal é incubado com a proteína purificada Sp1, produz uma banda de fraca intensidade que migra simultaneamente a banda produzida pela sonda Sp1 (Figura 5.9: linha 8 e 11 respectivamente) enquanto a sonda -198 T→C produz uma banda de forte intensidade na mesma posição (Figura 5.9: linha 10). Porém ao estudarmos a sonda com a mutação -195 C→G, verificamos que não há formação de nenhuma banda (Figura 5.9: linha 9).

Quando analisamos a ligação do promotor -195 com extrato nuclear de K562, notamos que a banda correspondente à ligação com a proteína Sp1 desaparece, mas uma segunda banda mantém-se, apesar de mais fraca do que a banda que aparece no promotor normal (Figura 5.9: linhas 3 e 1 respectivamente). Na ligação com extrato nuclear da célula HEL, não há formação de banda nem com o promotor normal nem com o promotor -195 na posição referente a ligação da proteína Sp1 (Figura 5.10: linhas 1 e 3 respectivamente), e sim de um complexo um pouco abaixo que é mais forte no promotor normal e aparece também em menor intensidade nas sondas contendo as mutações -195, -198 e Sp1 (Figura 5.10: linhas 3, 5 e 7 respectivamente). Semelhantes resultados também foram observados em experimentos realizados com outras mutações como a -196 e -202 (Ronchi *et al*, 1989, Sykes & Kaufman, 1990 e Gumucio *et al*, 1991).

A presença de mais de uma banda em ligações com extrato nuclear também foram relatadas em outros estudos (Ronchi *et al*, 1989 e Gumucio *et al*, 1991), podem corresponder a ligação de outras proteínas, uma vez que só ocorrem em ligações com extrato nuclear, porém experimentos com competidor, mostraram que essas bandas secundárias, correspondem a uma ligação DNA-proteína específica, uma vez que a adição da sonda Sp1 não marcada à reação, leva ao desaparecimento ou redução de intensidade dos complexos formados. Portanto esses complexos parecem ser secundários a proteólise ou alterações pós tradução da proteína Sp1.

2.1. Competição de ligação do promotor γ^A com a região CACCC box.

O sítio CACCC box é encontrado predominantemente em promotores eritróides específicos e está presente em todos os promotores dos genes da β globina. Sua importância para a expressão do gene γ foi demonstrada em estudos em animais transgênicos com fenótipo de PHHF (que expressam cadeia γ no estágio adulto) em que o sítio CACCC foi deletado do promotor γ , reprimindo sua expressão no estágio adulto (Li *et al*, 2001). O mesmo estudo também demonstrou que uma vez introduzida a mutação -198 C $\rightarrow$ T nessa construção (sem o sítio CACCC), a expressão do gene γ no adulto é reestabelecida pois na região da mutação -198, se ligam às mesmas proteínas que se ligariam a região CACCC. Portanto a mutação -198 cria um sítio de ligação que substitui a função do CACCC box no promotor γ .

Para determinar se a região alterada pela mutação -195 compete com proteínas que se ligam ao CACCC box, um oligonucleotídeo correspondente a essa região foi marcado radioativamente e incubado com quantidades crescentes de sondas -195 e -198 não marcadas e extrato nuclear de K562.

O resultado, apresentado na Figura 5.11, nos mostra que quando a sonda CACCC box foi incubada com extrato nuclear de K562, 2 bandas puderam ser vistas no gel (Figura 5.11: linha 1). Como esperado, as bandas desapareceram quando incubamos a reação com quantidades maiores de sonda CACCC box não marcada radioativamente (Figura 5.11: linhas 2 e 3). Como já foi constatado em experimentos anteriores (Li *et al*, 2001), a adição da sonda -198 (Figura 5.11: linhas 10 a 12) inibe a formação destes complexos, pois cria

um sítio semelhante ao CACCC box competindo com ele. Quando analisamos a reação de competição com a sonda -195 (Figura 5.11: linhas 7 a 9) e com a sonda normal (Figura 5.11: linhas 4 a 6), notamos que os complexos formados não desaparecem, portanto deduzimos que elas não apresentam sítio de ligação semelhante ao CACCC box, e portanto não competem com ele na interação com as proteínas. Acredita-se que a proteína que interage com essa nova região CACCC box é a proteína Sp1, uma vez que a mutação -198 aumenta sua afinidade por ela.

Os experimentos aqui demonstrados de interação DNA-proteína são os primeiros realizados com a mutação -195 e os resultados nos mostram que o mecanismo de elevação da hemoglobina fetal nas mutações -195 e -198 é diferente. Há relatos na literatura de outras mutações, como a -196 C→T e 202 C→G, que também não aumentam a interação com a proteína Sp1 e cujo mecanismo de elevação de Hb F ainda não foi elucidado (Ronchi *et al*, 1989, Sykes & Kaufman, 1990 e Gumucio *et al*, 1991) sendo necessário novos estudos com outras proteínas.

Conclusões

VII – CONCLUSÕES

Os estudos de expressão gênica nos mostram que a mutação -195 C→G é a provável responsável pelo aumento de expressão do gene gama na PHHF do tipo Brasileira e que a presença do LCR é necessária para efetiva ação das regiões promotoras, sendo o elemento HS2 do LCR suficiente para essa função.

Através dos experimentos de interação DNA-proteína, verificamos que o mecanismo de elevação da HbF na mutação -195 não é mediado pela proteína Sp1 e ela não cria um novo sítio CACCC box na região promotora γ , portanto ela ocorre por um mecanismo diferente ao encontrado na mutação -198.

O mecanismo de elevação de HbF na PHHF do tipo Brasileira ainda não foi completamente elucidado, sendo necessários novos experimentos utilizando outras proteínas e sondas e em animais transgênicos, para maior compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenia dessa alteração, mas esse estudo demonstra um aumento de expressão do promotor relacionado a mutação -195 e representa o primeiro ensaio de interação DNA-proteína realizados com essa mutação.

Referências Bibliográficas

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K. P.; Lloyd, J. A.; Ponce, E.; Crable, S. C.; Neumann, J. C.; Lingrel, J. B.
Regulated expression of the human beta globin gene in transgenic mice requires an
upstream globin or nonglobin promoter. **Mol Biol Cell**, Oct;4(10):1077-85, 1993.
- ANDRADE, T. G. **Análise molecular de deficiências gênicas associadas a persistência
hereditária de hemoglobina fetal e delta beta talassemias**. Campinas, 2002.
Dissertação - Mestrado - UNICAMP.
- ARCASOY, M.; O., Romana, M.; Fabry, M. E.; Skarpidi, E.; Nagel, R. L.; Forget, B. G.
High levels of human g-globin gene expression in adult mice carrying a transgene of
deletion-type hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Mol Cell Biol**, 17: 2076-
89, 1997.
- BANK A. The thalassemia syndromes. **Blood**. Mar;51(3):369-84, 1978.
- BEHRINGER, R. R.; Ryan, T. M.; Palmiter, R. D.; Brinster, R. L.; Townes, T. M. Human
gamma- to beta-globin gene switching in transgenic mice. **Genes Dev**, Mar; 4(3):
380-9, 1990.
- BEUTLER, E.; Lichtman, M. A.; Coller, B. S.; Kipps, T. J.; Seligsohn, U. **Williams
Hematology**. The McGraw-Hill Companies, 6th Edition, 2001.
- BORDIN, S.; Martins, J. T.; Gonçalves, M. S.; Melo, M. B.; Saad, S. T. O.; Costa, F. F.
Haplotype analysis and γ gene polymorphism associated with the brazilian type of
hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Am.J.Hem.**, 58: 49-54, 1998.
- BULGER, M.; GROUDINE, M. Looping versus linking: toward a model for long distance
gene activation. **Genes & Development**, 13:2465-77: 2000.

- BUNGERT, J.; Tanimoto, K.; Patel, S.; Liu, Q.; Fear, M.; Engel, J.D. Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human β -globin locus control region to stimulate globin gene transcription. **Mol Cel Biol**, 19(4): 3062-72, 1999.
- BUNN, H.; FORGET, B. C. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1ª edição, 1986.
- CAMASCHELLA, C.; Serra, A.; Gottardi, E.; Alfarano, A.; Revello, D.; Mazza, U.; Saglio, G. A new hereditary persistence of fetal hemoglobin deletion has the breakpoint within the 3' beta-globin gene enhancer. **Blood**, Feb 15;75(4):1000-5, 1990.
- CATALA, F.; deBoer, E.; Grosveld, F. Nuclear protein factors and erythroid transcription of the human A γ -globin gene. **Nucleic Acids Res**, 17(10): 3811-27, 1989.
- CIVIDALLI, G.; Kerem, H.; Rachmilewitz, E. A. Globin synthesis in severe and intermediate homozygous beta thalassemia in Israel. **Ann N Y Acad Sci**, 344:132-40, 1980.
- COLLINS, F.S.; Stoeckert, C. J. Jr.; Sergeant, G.R.; Forget, B.G.; Wessman, S. M. G_γ^+ hereditary persistence of fetal hemoglobin: cosmid cloning and identification of a specific mutation 5' to the G_γ gene. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, 81: 4894-8, 1984.
- COLLINS, F. S.; Metherall, J. E.; Yamakawa, M.; Pan, J.; Wessman, S. M.; Forget, B. G. A point mutation in the A_γ -globin gene reporter in Greek hereditary persistence of fetal haemoglobin. **Nature**, 313: 325-6, 1985.
- COLLINS, F. S.; Cole, J. L.; Lockwood, W. K.; Iannuzzi, M. C. The deletion in both common types of hereditary persistence of fetal hemoglobin is approximately 105 kilobases. **Blood**, Dec;70(6):1797-803, 1987.

- COSTA, F. F.; Zago, M. A.; Cheng, G.; Necthtman, J. F.; Stoming, T. A.; Huisman, T. H. J. The brazilian type of nondeletional $\Lambda\gamma$ - fetal haemoglobin has a C→G substitution at nucleotide -195 of the $\Lambda\gamma$ -globin gene. **Blood**, 76: 1896-7, 1990.
- CUNNINGHAM, J. M.; JANE, S. M. Hemoglobin switching and fetal hemoglobin reactivation. **Seminars in Hematology**, 33:9-23, 1996.
- DEAN, J.; SCHECHTER, A. N. Sickle-cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. **N Engl J Med**. Oct 5;299(14):752-63, 1978.
- DILLON, N.; GROSVELD, F. Human gamma-globin genes silenced independently of other genes in the beta-globin locus. **Nature**, Mar 21;350(6315):252-4, 1991.
- DONOVAN-PELUSO, M.; Young, K.; Dobkin, C.; Bank, A. Erythro-leukemia (K562) cells contain a functional β -globin gene. **Mol Cel Biol**, 4: 2553-7, 1984.
- DRISCOLL, M. C.; DOBKIN, C. S. Alter BP. Gamma delta beta-thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' beta-globin gene activation-region hypersensitive sites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Oct;86(19):7470-4, 1989.
- ENVER T.; Ebens, A. J.; Forrester, W. C.; Stamatoyannopoulos, G. The human beta-globin locus activation region alters the developmental fate of a human fetal globin gene in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1989 Sep;86(18):7033-7.
- ENVER, T.; Raich, N.; Ebens, A. J.; Papayannopoulou, T.; Costantini, F.; Stamatoyannopoulos, G. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. **Nature**, Mar 22;344(6264):309-13, 1990.
- ERLICH, H. A. - **PCR Tecnology - Principles and applications for DNA amplification**. Stockton press, New York, 1989.

FINCH, C. A. Pathophysiologic aspects of sickle cell anemia. **Am J Med.** Jul;53(1):1-6, 1972.

FISCHER, K.; NOWOCK, J. The T → C substitution at -198 of the A gamma globin gene associated with the British form of HPFH generates overlapping recognition sites for two DNA binding proteins. **Nucleic Acids Res.**, 18 (19): 5685-93, 1990.

FORGET, B. G. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, 850: 39-45, 1998.

FRASER, P.; Hurst, J.; Collis, P.; Grosveld, F. DNaseI hypersensitive sites 1, 2 and 3 of the human beta-globin dominant control region direct position-independent expression. **Nucleic Acids Res.** Jun 25;18(12):3503-8, 1990.

FUCHAROEN, S.; Shimizu, K.; Fukumaki, Y. A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the G gamma-globin gene in the Japanese HPFH: implication of factor binding in elevated fetal globin expression. **Nucleic Acids Res.**, Sep 11;18(17):5245-53, 1990.

GELINAS, R.; Endilisch, B.; Pfeiffer, C.; Yagi, M.; Stamatoyannopoulos, G. G to A substitution in the distal CCAAT box of the A gamma-globin gene in Greek hereditary persistence of fetal haemoglobin. **Nature**, 313: 323-5, 1985.

GELINAS, R.; Bender, M.; Lotshaw, C.; Waber, P.; Kazazian, Jr H.; Stamatoyannopoulos, G. Chinese $A\gamma$ fetal haemoglobin: C to T substitution at position -196 of the $A\gamma$ gene promotor. **Blood**, 67(6): 1777-9, 1986.

GIGLIONI, B.; Casini, C.; Mantovani, R.; Merli, S.; Comi, P.; Ottolenghi, S.; Saglio, G.; Camaschella, C.; Mazza, U. A molecular study of a family with greek hereditary persistence of fetal haemoglobin and β -thalassemia. **EMBO J.**, 3: 2641-5, 1984.

- GILMAN, J. G.; Mishina, N.; Wen, X. J. Upstream promotor mutation associated with modest elevation of fetal haemoglobin expression in human adults. **Blood**, 72: 78-81, 1988(a).
- GILMAN, J. G.; Mishima, N.; Wen, X. J.; Stoming, T. A.; Lobel, J.; Huisman, T. H. Distal CCAAT box deletion in the A gamma globin gene of two black adolescents with elevated fetal A gamma globin. **Nucleic Acids Res.**, Nov 25;16(22):10635-42, 1988(b).
- GREGORY, R. C.; Taxman, D. J.; Seshasayee, D.; Kensinger, M. H.; Bieker, J. J.; Wojchowski, D. M. Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. **Blood**, Mar 1;87(5):1793-801, 1996.
- GROSVELD, F.; Blom Van Asseldelft, G.; Greaves, D. R.; Kollias, G. Position-independent, high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. **Cell**, 51: 975-85, 1987.
- GROSVELD, F.; Antoniou, M.; Berry, M.; De Boer, E.; Dillon, N.; Ellis, J.; Fraser, P.; Hanscombe, O.; Hurst, J.; Imam, A.; *et al.* The regulation of human globin gene switching. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, Feb 27;339(1288):183-91, 1993.
- GROSVELD, F.; Boer, E.; Dillon, N.; Gribnau, J.; Milot, E.; Trimborn, T.; Wijgerde, M.; Fraser, P. The dynamics of globin gene expression and gene therapy vectors. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, 850: 19-27, 1998.
- GUMUCIO, D. L.; Rood, K. L.; Gray, T. A.; Riordan, M. F.; Sartor, C. I.; Collins, F. S. Nuclear proteins that bind the human γ -globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal haemoglobin. **Mol Cel Biol**, 8(12): 5310-22, 1988.
- GUMUCIO, D. L.; Lockwood, W. K.; Weber, J. L.; Saulino, A. M.; Delgrosso, K.; Surrey, S.; Schwartz, E.; Goodman, M.; Collins, F. S. The -175T $\rightarrow$ C mutation increases

- promoter strength in erythroid cells: correlation with evolutionary conservation of binding sites for two trans-acting factors. **Blood**. Feb 1;75(3):756-61. 1990.
- GUMUCIO, D. L.; Rood, K. L.; Blanchard-McQuate, D. R.; Gray, T. A.; Saulino, A.; Collins, F. S. Interaction of Sp1 with the human γ globin promoter: binding and transactivation of normal and mutant promoters. **Blood**, 78(7): 1853-63, 1991.
- HANSCOMBE, O.; Whyatt, D.; Fraser, P.; Yannoutsos, N.; Greaves, D.; Dillon, N.; Grosveld F. Importance of globin gene order for correct developmental expression. **Genes Dev.**, Aug;5(8):1387-94, 1991.
- HARDISON, R.; Slightom, J. L.; Gumucio, D. L.; Goodman, M.; Stojanovic, N.; Miller, W. Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. **Gene**, Dec 31;205(1-2):73-94, 1997.
- HENTHORN, P. S.; Mager, D. L.; Huisman, T. H.; Smithies, O. A gene deletion ending within a complex array of repeated sequences 3' to the human beta-globin gene cluster. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Jul;83(14):5194-8, 1986.
- HONIG, G. R.; Vida, L. N.; Hoganson, G. E. Jr.; Schultz, J. C.; Shahidi, N. T. Fetal hemoglobin expression in transplant recipients of placental blood hematopoietic progenitor cells. **Pediatr Res.**, Apr;37(4 Pt 1):432-6, 1995.
- INDRAK, K.; Indrakova, J.; Kutlar, F.; Pospisilova, D.; Sulovska, I.; Baysal, E.; Huisman, T. H. Compound heterozygosity for a beta zero-thalassemia (frameshift codons 38/39; -C) and a nondeletional Swiss type of HPFH (A $\rightarrow$ C at NT -110, G gamma) in a Czechoslovakian family. **Ann Hematol**, Aug;63(2):111-5, 1991.
- KACZYNSKI, J., Cook, T., Urrutia, R. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. **Genome Biol**. 2003;4(2):206, 2003.

- KOSTEAS, T.; Palena, A.; Anagnou, N. P. Molecular cloning of the breakpoints of the hereditary persistence of fetal hemoglobin type-6 (HPFH-6) deletion and sequence analysis of the novel juxtaposed region from the 3' end of the beta-globin gene cluster. **Hum Genet**, Sep;100(3-4):441-5, 1997.
- KUTLAR, A.; Gardiner, M. B.; Headlee, M. G.; Reese, A. L.; Cleek, M. P.; Nagle, S.; Sukumaran, P. K.; Huisman TH. Heterogeneity in the molecular basis of three types of hereditary persistence of fetal hemoglobin and the relative synthesis of the G gamma and A gamma types of gamma chain. **Biochem Genet.**, Feb;22(1-2):21-35, 1984.
- LANGDON, S. D.; KAUFMAN, R. E. Gamma-globin gene promoter elements required for interaction with globin enhancers. **Blood**, 91(1): 309-318, 1998.
- LI, Q.; Harju, S.; Peterson, K. R. Locus region control: coming of age at a decade plus. **Trends in Genetics**, 15 (10): 403-8, 1999.
- LI, Q.; Duan, Z.; Stamatoyannopoulos, G. Analysis of the mechanism of action of non-deletion hereditary persistence of fetal hemoglobin mutants in transgenic mice. **EMBO J.**, 20:157-64, 2001.
- LLOYD, J. A.; Lee, R. F.; Lingrel, J. B. Mutations in two regions upstream of the A γ globin gene canonical promoter affect gene expression. **Nucleic Acids Res.**, 17 (11), 4339-52, 1989.
- LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive philadelphia chromosome. **Blood**, 45: 321, 1975.
- MANTOVANI, R.; Margaretti, N.; Nicolis, S.; Ronchi, A.; Ottolenghi, S. The effects of HPFH mutations in the human γ -globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid specific nuclear factors. **Nucleic Acids Res.**, 16(16): 7783-93, 1988.

- MARKS, P. A.; RIFKIND, R. A. Erythroleukemic differentiation. **Annu Rev Biochem.**;47:419-48, 1978.
- MARTIN, P.; PAPAYANNOPOULOU, T. HEL cells: A new Human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. **Science**, 216(11), 1982.
- MOTUM, P. I.; Lindeman, R.; Harvey, M. P.; Trent, R. J. Comparative studies of nondeletional HPFH γ -globin gene promoters. **Exp. Hematology**, 21: 852-8, 1993.
- MOTUM, P. I.; Deng, Z. M.; Huong, L.; Trent, R. J. The Australian type of nondeletional G gamma-HPFH has a C $\rightarrow$ G substitution at nucleotide -114 of the G gamma gene. **Br J Haematol**, Jan;86(1):219-21, 1994.
- NICOLIS, S.; Ronchi, A.; Malgaretti, N.; Mantovani, R.; Giglioni, B.; Ottolenghi, S. Increased erythroid-specific expression of a mutated HPFH gamma-globin promoter requires the erythroid factor NFE-1. **Nucleic Acids Res.**, Jul 25;17(14):5509-16, 1989.
- NUEZ, B.; Michalovich, D.; Bygrave, A.; Ploemacher, R.; Grosveld F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. **Nature**, May 25;375(6529):316-8, 1995.
- OLIVIERI, N. F. ; WEATHERALL, D. J. The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. **Hum Mol Genetics**, 7:1655-8, 1998.
- ÖNER, R.; Kutlar, F.; Gu. L. H.; Huisman, T. H. J. The Georgia type of nondeletional hereditary persistence of fetal haemoglobin has a C $\rightarrow$ T mutation at nucleotide -114 of the γ -globin gene. **Blood**, 77: 1124-5, 1991.
- OTTOLENGHI, S.; Giglioni, B.; Taramelli, R.; Comi, P.; Mazza, U.; Saglio, G.; *et al.* Molecular comparison of delta beta-thalassemia and hereditary persistence of fetal

- hemoglobin DNAs: evidence of a regulatory area? **Proc Natl Acad Sci U S A.** Apr;79(7):2347-51, 1982.
- OTTOLENGHI, S.; Nicolis, S.; Taramelli, R.; Malgaretti, N.; Mantovani, R.; Comi, P.; Giglioni, B.; *et al.* Sardinian γ -HPFH: a T→C substitution in a conserved “octamer” sequence in the γ -promoter. **Blood**, 71: 815-7, 1988.
- PASCERI, P.; Pannell, D.; Wu, X.; Ellis, J. Full activity from human β -globin locus region control transgenes requires 5'HS1, distal β -globin promoter, and 3' β -globin sequences. **Blood**, 92(2): 653-63, 1998.
- PERRINE, R. P.; Brown, M. J.; Clegg, J. B.; Weatherall, D. J.; May, A. Benign sickle-cell anaemia. **Lancet**, Dec 2;2(7788):1163-7, 1972.
- PERKINS, A. C.; Sharpe, A. H.; Orkin, S. H. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. **Nature**, May 25;375(6529):318-22, 1995.
- PERKINS, A. C.; Gaensler, K. M.; Orkin, S. H. Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult beta-globin gene activator protein EKLF. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Oct 29;93(22):12267-71, 1996.
- PETERSON, K. R.; STAMATOYANNOPOULOS G. Role of gene order in developmental control of human gamma- and beta-globin gene expression. **Mol Cell Biol.**, Aug;13(8):4836-43, 1993.
- PETERSON, K. R. Hemoglobin switching: new insights. **Current Opinion in Hematology**, 10: 123-9, 2003.
- POWARS, D. R.; Weiss, J. N.; Chan, L. S.; Schroeder, W. A. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? **Blood**. Apr;63(4):921-6, 1984.

- RAICH, N.; Enver, T.; Nakamoto, B.; Josephson, B.; Papayannopoulou, T.; Stamatoyannopoulos, G. Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. **Science**, Nov 23;250(4984):1147-9, 1990.
- RAICH, N.; Papayannopoulou, T.; Stamatoyannopoulos, G.; Enver, T. Demonstration of a human epsilon-globin gene silencer with studies in transgenic mice. **Blood**, Feb 15;79(4):861-4, 1992.
- RAICH, N.; Clegg, C. H.; Grofti, J.; Romeo, P. H.; Stamatoyannopoulos, G. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. **EMBO J.**, Feb 15;14(4):801-9, 1995.
- RODGERS, G. P. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. **Semin Hematol.**, Jul;34(3 Suppl 3):2-7, 1997.
- RONCHI, A.; Nicolis, S.; Santoro, C.; Ottolenghi, S. Increased Sp1 binding mediates erythroid-specific overexpression of a mutated (HPFH) gamma-globulin promoter. **Nucleic Acids Res.**, Dec 25;17(24):10231-41, 1989.
- ROSENTHAL, N. Molecular medicine. Recognizing DNA. **N Engl J Med.**, Oct 5;333(14):925-7, 1995.
- SABATINO, D. E.; Cline, A. P.; Gallagher, P. G.; Garrett, L. J.; Stamatoyannopoulos, G.; Forget, B. G.; Bodine, D. M. Substitution of the human beta-spectrin promoter for the human Agamma-globin promoter prevents silencing of a linked human beta-globin gene in transgenic mice. **Mol Cell Biol.** Nov;18(11):6634-40, 1998.
- SAGLIO, G.; Camaschella, C.; Serra, A.; Bertero, T.; Rege Cambrin, G.; Guerrasio, A.; Mazza, U.; Izzo, P.; Terragni, F.; Giglioni, B. Italian type of deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Blood**, Sep;68(3):646-51, 1986.

SANGER, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 74: 618-9, 1977.

SARGENT, T. G.; DuBois, C. C.; Buller, A. M.; Lloyd, J. A. The roles of 5'-HS2, 5'-HS3, and the gamma-globin TATA, CACCC, and stage selector elements in suppression of beta-globin expression in early development. **J Biol Chem.** Apr 16;274(16):11229-36, 1999.

SCHREIBER, R.; Gonçalves, M. S.; Junqueira, M. L.; Saad, S. T. O.; Krieger, J. E.; Costa, F. F. The γ -195 (C→G) mutation in hereditary persistence of fetal hemoglobin is not associated with activation of a reporter gene in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 489-92, 2001.

SHERIDAN, B. L.; Weatherall, D. J.; Clegg, J. B.; Pritchard, J.; Wood, W. G.; Callender, S. T.; Durrant, I. J.; McWhirter, W. R.; Ali, M.; Partridge, J. W.; Thompson, E. N. The patterns of fetal haemoglobin production in leukaemia. **Br J Haematol.**, Apr;32(4):487-506, 1976.

SHIH, D. M.; Wall, R. J.; Shapiro, S. G. Developmentally regulated and erythroid-specific expression of the human embryonic beta-globin gene in transgenic mice. **Nucleic Acids Res.**, Sep 25;18(18):5465-72, 1990.

SKARPIDI, E.; Vassilopoulos, G.; Li, Q.; Stamatoyannopoulos, G. Novel in vitro assay for detection of pharmacologic inducers of fetal hemoglobin. **Blood**, Jul 96(1): 321-6, 2000.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; Josephson, B.; Zhang, J.W.; Li, Q. Developmental regulation of human gamma-globin genes in transgenic mice. **Mol Cell Biol.**, 13(12): 7636-44, 1993.

- STAMATOYANNOPOULOS, G.; Clegg, C. H.; Li, Q. Sheltering of γ -globin expression from position effects requires both an upstream locus control region and a regulatory element 3' to the A γ -globin gene. **Mol.Cel.Biol.**, 17(1):240-7, 1997.
- STAMATOYANNOPOULOS, G. **The molecular basis of blood disease**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001.
- STARCK, J.; Sarkar, R.; Romana, M.; Bhargava, A.; Scarpa, A. L.; Tanaka, M.; Chamberlain, J. W.; Weissman, S. M.; Forget, B. G. Developmental regulation of human gamma- and beta-globin genes in the absence of the locus control region. **Blood**. Sep 1;84(5):1656-65, 1994.
- STEIMBERG, M.H. Minireview - Genetic modulation of sickle cell anemia. **Proc Soc Exp Biol Med**, 209: 1-13, 1995.
- STOMING, T.A.; Stoming, G.S.; Lanclos, K.D.; Fei, Y.J.; Altay, C.; Kutlar, F.; Huisman, T.H.J. A γ type of nondeletional hereditary persistence of fetal haemoglobin with a T $\rightarrow$ C mutation at position -175 to the cap site of the γ -globin gene. **Blood**, 73: 329-33, 1989.
- SUPERTI-FURGA, G.; Barberis, A.; Schaffner, G.; Buslinger, M. The 117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CAAT region of the γ globin gene. **EMBO J.**, 7: 3099-107, 1988.
- SYKES, K.; KAUFMAN, R. A naturally occurring gamma globin gene mutation enhances SP1 binding activity. **Mol Cel Biol.**, 10 (1) : 95-102,1990.
- SURREY, S.; Delgrosso, K.; Malladi, P.; Schwartz, E. A single base change position -175 in the 5'flanking region of the γ - β^+ HPFH. **Blood**, 71: 807-10, 1988.
- TANAKA, M.; Nolan, J. A.; Bhargava, A. K.; Rood, K.; Collins, F. S.; Weissman, S. M.; Forget, B. G.; Chamberlain, J. W. Expression of human globin genes in transgenic

- mice carrying the beta-globin gene cluster with a mutation causing G gamma beta + hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann N Y Acad Sci**;612:167-78, 1990.
- TATE, V. E.; Wood, W. G.; Weatherall, D. J. The british form of hereditary persistence of fetal haemoglobin results from a single base substitution adjacent to an S 1 hypersensitive site 5' to the γ globin gene. **Blood**, 68: 1389-93, 1986.
- TREISMAN, R.; Grenn, M. R.; Maniatis, T. Cis and trans activation of globin gene transcription in transient says. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 80: 7428 - 32, 1983.
- TUAN, D.; Feingold, E.; Newman, M.; Weissman, S. M.; Forget BG. Different 3' end points of deletions causing delta beta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin: implications for the control of gamma-globin gene expression in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Nov;80(22):6937-41, 1983.
- ULRICH, M. J.; LEY, T. J. Function of normal and mutated γ -globin gene promoters in electroporated K562 erythroleukemia cells. **Blood**, 75(4), 990-9, 1990.
- VITALE, M.; Di Marzo, R.; Calzolari, R.; Acuto, S.; O'Neill, D.; Bank, A. ; Maggio, A. Evidence for a globin promoter-specific silencer element located upstream of the human delta-globin gene. **Biochem Biophys Res Commun.**, Oct 14;204(1):413-8, 1994.
- WILLIAMS, T. M.; Burlein, J. E.; Ogden, S.; Kricka, L. J.; Kant, J. A. Advantages of firefly luciferase as a reporter gene: application to the interleukin-2 gene promoter. **Anal Biochem.**, Jan;176(1):28-32, 1989.
- ZAGO, M.A.; Falcão, R.P.; Pasquini, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo, Ed Atheneu, 2001.
- ZERTAL-ZIDANI, S.; Merghoub, T.; Ducrocq, R.; Gerard, N.; Satta, D.; Krishnamoorthy, R. A novel C→A transversion within the distal CCAAT motif of the Ggamma-

globin gene in the Algerian G γ ammabeta $^{+}$ -hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Hemoglobin**, May;23(2):159-69, 1999.

WALSH, C. E.; Liu, J. M.; Miller, J. L.; Nienhuis, A. W.; Samulski, R. J. Gene therapy for human hemoglobinopathies. **Proc Soc Exp Biol Med**, Dec;204(3):289-300, 1993.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. - **The thalassemia syndromes**. Oxford, Blackwell, 4^a Edição, 2001.

WOOD, W. G.; Bunch, C.; Kelly, S.; Gunn, Y.; Breckon G. - Control of haemoglobin switching by a developmental clock? **Nature**, 313(6000):320-3, 1 985.

Anexo I

Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type (γ -195 C $\rightarrow$ G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin

Takahashi T, Schreiber R, Krieger JE, Saad STO, Costa FF. Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type (γ -195 C $\rightarrow$ G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin.

Eur J Haematol 2003; 71: 418–424. © Blackwell Munksgaard 2003.

Abstract: We report an *in vitro* expression study of the γ -globin gene promoter containing the γ -195 C $\rightarrow$ G mutation that causes the Brazilian type of hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH). To demonstrate that this mutation results in increased promoter strength, we evaluated the mutant promoter linked to the hypersensitive site-2 of the locus control region with the luciferase reporter gene system and examined protein interactions by electrophoretic mobility shift assay. The transient expression was studied in three cell lines: K562, HEL and 293, and indicated increased promoter activity of the promoter containing the Brazilian mutation in all cell lines. The protein–DNA interaction showed that, in contrast to the γ -198 T $\rightarrow$ C mutation which has increased affinity for the Sp1 protein and creates a motif that behaves like a novel CACCC box in the γ promoter, the Brazilian HPFH mutation decreases the affinity at the Sp1 protein and does not act as a CACCC motif. These results suggest that this mutation may act to increase the γ -globin chain production. In addition, the mechanism by which this increased production occurs is different to that of the -198 mutation. Other proteins may be involved in the overexpression of the γ -globin chain and/or may be dependent upon the DNA structure.

**T. Takahashi¹, R. Schreiber²,
J. E. Krieger³, S. T. O. Saad¹,
F. F. Costa¹**

¹Molecular and Cellular Biology Laboratory, Hemocentro and ²Laboratório de Lipídeos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Key words: hereditary persistence of fetal hemoglobin; -195 C $\rightarrow$ G gamma globin mutation; gene expression; Sp1; electrophoretic mobility shift assay

Correspondence: Fernando Ferreira Costa, Hemocentro-UNICAMP, Rua Carlos Chagas, 480, 13083-970 Campinas, SP, Brazil
Tel: 55 19 3788 8734
Fax: 55 19 3289 1089
e-mail: ferreira@unicamp.br

Accepted for publication 14 August 2003

The term hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH), describes a hereditary benign disease, characterized by the increase of fetal hemoglobin (HbF) during adult life. Non-deletional forms of HPFH are characterized by single-base mutations in the promoter region (most of them between -114 and -202 from the cap site) of either the γ or γ -globin gene, resulting in an increase of HbF ranging from 3 to 20% in heterozygotes. Many point mutations in this region have been described, including the Greek type (γ -117 G $\rightarrow$ A) (1), Black type (γ -175 T $\rightarrow$ A) (2), Brazilian type (γ -195 C $\rightarrow$ G) (3), Chinese type (γ -196 C $\rightarrow$ T) (4), British type (γ -198 T $\rightarrow$ C) (5) and Black type (γ -202 C $\rightarrow$ T) (6) HPFHs. It is believed that this mutation may modify the binding of trans-acting factors to critical regions of the promoters, resulting in their continuous expression during adult life (1, 5, 7–10). The mechanism by

which the increase in expression of the gamma chains in HPFH occurs and by which proteins are involved in this process, however, are not completely understood.

In an effort to elucidate these mechanisms, several point mutations were studied herein. The British HPFH type has been reported to create a novel CACCC box (11). In contrast, the Greek type mutation results in increased CP-1 and CDP binding, whilst it decreases GATA-1 and NF-E3 binding, increasing the γ gene promoter strength (12, 13). The Black HPFH type (-175 T $\rightarrow$ A) interferes with OCT-1 binding, although this is not the only mechanism involved in this mutation (13, 14). The Black HPFH type (-202 C $\rightarrow$ T) mutation reduces Sp-1 binding, but like the -175 T $\rightarrow$ A mutation, this is probably not the principal cause of the increase of γ gene production (15).

Sp1 is a ubiquitous protein that binds to the GC-rich motifs found in many gene promoters. This transcription factor acts by regulating the expression of a large number of genes and functions as an activator or repressor, depending on which promoter it binds to and the other proteins with which it interacts (16, 17). Some researchers had studied the binding sites of the Sp1 protein in the wild type and mutant γ globin promoters (15, 18). The Brazilian HPFH mutation, which is located in a CG-rich region, has not been investigated with regard to the possible mechanism involved in the high production of the γ gene, nor the involvement of the Sp1 protein in this process. In order to clarify this issue, we carried out an *in vitro* gene expression study, employing luciferase gene reporter methodology and evaluated protein interaction by an electrophoretic mobility shift assay.

Material and methods

Plasmid constructs

The hypersensitive site-2 (HS2)- γ globin promoter-luciferase reporter gene plasmid was constructed in two steps. A γ promoter (673 bp Genebank HUMHBB nucleotide 38792-39465) was first cloned into a PGL2-basic Promega vector (which contains the firefly luciferase reporter gene without promoter). Subsequently, the HS2-locus control region (LCR) (739 bp Genebank HUMHBB nucleotide 8485-9224) was inserted into the γ promoter-luciferase vector. Two constructs were made: one with the normal promoter and another with a mutant promoter containing the -195 C $\rightarrow$ G.

The γ promoter was prepared by polymerase chain reaction (PCR) amplification from a control and a patient with the C $\rightarrow$ G mutation at position -195 using genomic DNA with the primers P133 and P134 (Table 1). The PCR product was digested (*Xho*I-*Hind*III), purified by extraction from agarose gel and cloned upstream of a luciferase coding sequence with a PGL2-basic vector (19). In the same manner, the HS2 fragment was amplified by PCR (primers HS2s and HS2as, Table 1) before cloning into the *Sma*I-*Kpn*I site of the γ -promoter-luciferase vector (upstream of the γ -promoter). All primers were engineered to contain restriction sites at their 5' ends, to be used in cloning assays.

Plasmid DNA was grown in DH5 α bacteria and was purified by the Concert life miniprep kit (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). The correct insertion and sequences of the constructs were confirmed by sequencing.

Table 1. Primers and probes used in this study

Primer P133	5'-ATC TCG AGT GAA ACT GTG GTC TTT ATG A-3'
Primer P134	5'-CTA AGC TTT TCT GGA CTA GGA GCT TAT TG-3'
Primer HS2s	5'-TAA GCT TCA GTT TTT CCT TAG T-3'
Primer HS2as	5'-TAG ATC TGA CCC CGT ATG TGA GCA T-3'
Wild type γ promoter probe	5'-AGT ATC CTC TTG GGG GCC CCT TCC CCA CAC-3'
Mutation -195 C $\rightarrow$ G promoter probe	5'-AGT ATC CTC TTG GGG GCC CCT TCC CCA CAC-3'
Mutation -198 T $\rightarrow$ C promoter probe	5'-AGT ATC CTC TTG GGG GCC CCT CCC CCA CAC-3'
SP1 probe	5'-ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C-3'
CACCC box probe	5'-TGG CTA AAC TCC ACC CAT GGG TTG-3'

Cell culture and transfection assay

A transient transfection assay was performed with three cell lines: K562, HEL and 293. K562 and HEL cells were grown in RPMI 1640 medium plus 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C, 5% CO₂. Approximately 10⁷ cells in suspension were transfected by electroporation with 20 μ g of each construct at 975 μ F and 250 mV. The 293 cell was an adherent cell line, grown in DMEM medium plus 10% FBS at 37°C, 5% CO₂ and transfection was performed by lipofection. Two days previously, the cells were trypsinized, counted and plated to achieve confluence of 70–90% on the day of transfection. Each construct (3 μ g) was incubated with 10 μ L of cationic lipids (Lipofectamine; Promega, Madison, WI, USA) for 15 min at room temperature, before incubation together with cells for 2 h at 37°C. Transfection was accomplished using 1 and 0.15 μ g PRL-TK vector (which expresses renilla luciferase), to provide an internal control for electroporation and the lipofectamine assay, respectively.

The transfected cells were harvested for 20 h and Firefly and Renilla luciferase gene activities were measured sequentially in cell lysates using the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), as recommended by the manufacturer. Two vectors, PGL2-Basic and PGL2-Control were used for negative and positive controls, respectively, of the expression of the luciferase (data not shown). All experiments were performed in triplicate and repeated more than once.

Nuclear extraction

K562 and HEL were harvested in RPMI 1640 medium plus 10% FBS at 37°C, 5% CO₂. Approximately 1 $\times$ 10⁸ cells were washed twice with phosphate-buffered saline and once in 4.5 mL cold buffer A [10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT) and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. The pellet was incubated in

2 mL of buffer A on ice for 10 min, centrifuged for 30 s and the supernatant removed. The pellet was then resuspended in 350 μ L of buffer C (25% glycerol, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT and 0.2 mM PMSF) and incubated on ice for 20 min. Following centrifugation of the suspension for 2 min, the supernatant containing the nuclear proteins was frozen on dry ice and ethanol and stored at -80°C , until use. The protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Electrophoretic mobility shift assay

Three probes containing the consensus Sp1 site of the γ^A -globin promoter (-210 and -184 relative to the cap site) were synthesized, one with the wild type sequence and the other two with the -195 (C $\rightarrow$ G) and -198 (T $\rightarrow$ C) mutations. A Sp1 probe was used as a positive control and in a competition assay and, in the same manner, a CACCC box probe was used in competition assays (Table 1).

Each oligonucleotide (10 μ g) was annealed with its antisense strand in 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl and 1 mM DTT, at 65°C for 15 min. Soon after, 0.1 μ g of annealed oligonucleotide was labeled with $\gamma\text{-P}^{32}$ using T4 polynucleotide kinase and unincorporated labeled nucleotides were removed on a sephadex G-25 column (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA).

Nuclear proteins (5 μ g) were incubated with 50 000 cpm of labeled probe and 1.6 μ g poly dI-dC for 15 min at room temperature in binding buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 20% glycerol, 0.2 mM DTT). One microgram of purified Sp1 protein (Recombinant Human Sp1; Promega) was incubated under the same conditions, but in the presence of 200 mg/mL bovine serum albumin. Unlabeled probes were added at higher concentration (100-fold) together with the labeled probe to be used as competitor DNA to test specificity of interaction. Samples were electrophoresed in a 4% non-denaturing polyacrilamide gel in $1 \times$ Tris-borate/EDTA buffer (250 V) for 1 h and the gel exposed to X-ray film overnight at -70°C with an intensifying screen.

Results

Expression of the HPFH mutant promoter *in vitro*

To assess whether the -195 γ^A -promoter activates γ -globin gene expression, normal and mutant constructs (containing or not the HS2-LCR) were cotransfected with control vector into K562, HEL or 293 cells. The K562 (20) and HEL (21) cell lines

are erythroleukemia cells that express embryonic and fetal globins, whilst 293 is a human embryonic kidney cell line transformed with adenovirus type 5, able to transcribe the human globin gene (22, 23). Two different luciferase reporter genes were used, the tested vectors expressed firefly luciferase and the control vector expressed renilla luciferase.

The results of the transfection studies are summarized in Fig. 1. In the presence of the HS2 enhancer element, linked to the γ -globin wild-type promoter, gene expression was significantly increased in all cells lines (51.7 ± 0.3 -, 4.9 ± 0.1 - and 3.3 ± 0.1 -fold in the K562, HEL and 293 cells, respectively) compared with the construct without the HS2 enhancer. Thus all the comparative analysis were made with the constructs with the HS2 enhancer. The expression of the HS2-195 mutant vector were compared with the HS2 wild type γ^A -promoter, which was considered to have 100% activity.

The constructions with the promoter containing the -195 mutation with the HS2 enhancer increased the gene expression by 1.7 ± 0.6 -, 1.6 ± 0.3 - and 1.6 ± 0.3 -fold in the K562, HEL and 293 cells, respectively, when compared with the wild type promoter. These data were statistically significant in all cells lines. Data are reported as mean $\pm$ SD and groups were compared by the Wilcoxon statistical test.

Interaction of the Sp1 protein with the γ^A -globin promoter

The proximal promoter contains at least 15 binding sites for nuclear proteins. Previous experiments have shown a weak Sp1 binding site in the -200 region of the globin gene promoter, in addition point mutations in this region alter this binding (15, 18, 24). To test whether the -195 C $\rightarrow$ G point mutation that causes HPFH affects this binding, oligonucleotides encompassing this region (wild type, -198 T $\rightarrow$ C and -195 C $\rightarrow$ G mutant probes) were labeled with ^{32}P and subjected to gel retardation analysis alone or with a Sp1 cold probe. The wild type and the -198 T $\rightarrow$ C probes were used to compare the intensity of the shift produced, as previous studies showed that they produce a weak and a strong shift, respectively, when incubated with the Sp1 protein (18).

Figures 2 and 3 demonstrate that when Sp1 probe was incubated with crude K562 or HEL extract, respectively, or Sp1 purified protein, it produces a retarded complex, corresponding to the binding of the Sp1 protein (Fig. 2: lines 7 and 11; Fig. 3: lines 7 and 8). When the wild type γ promoter probe was incubated with purified Sp1 protein it produced a very weak band that co-migrated with the Sp1 shift (Fig. 2: line 8). The -198 T $\rightarrow$ C promoter probe produced a stronger

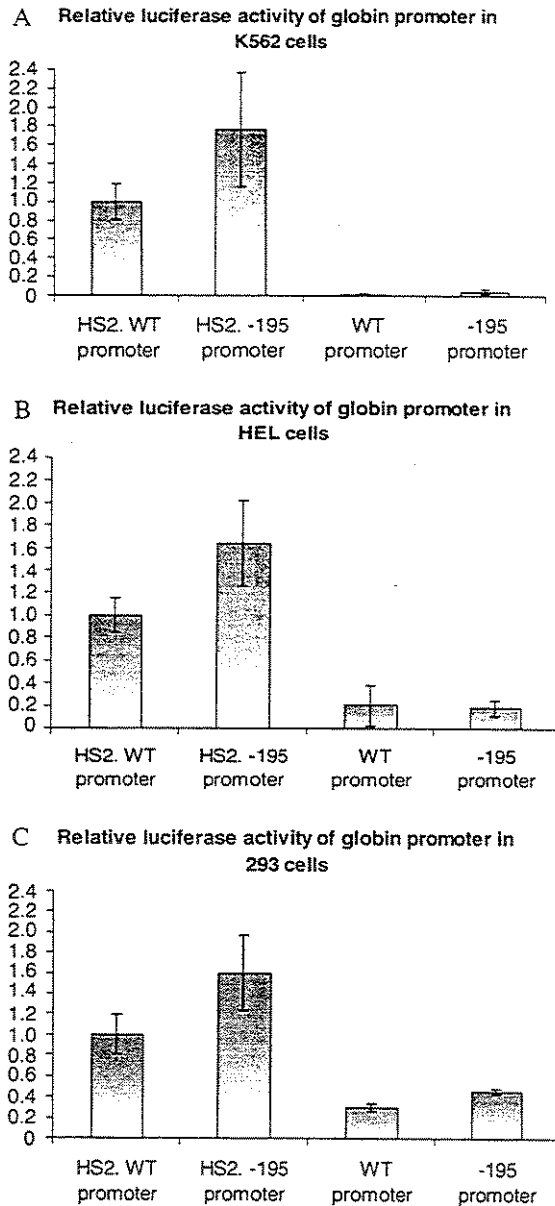


Fig. 1. Relative activity of wild-type and -195 mutant promoter plus HS2 enhancer or without enhancer. Experiments in (A) K562 cells, (B) HEL, and (C) 293 cells. WT promoter, wild type promoter; -195 promoter, promoter with the -195 mutation; HS2.WT promoter, wild type promoter plus HS2; HS2.-195 promoter, promoter with the -195 mutation plus HS2.

shift, demonstrating that this mutation has a greater affinity for Sp1 than the normal promoter (Fig. 2: line 10). In addition, the -195 C → G promoter probe did not produce any shift (Fig. 2: line 9).

The complex produced after binding the nuclear extract to the wild type promoter presented a weak shift (Figs 2 and 3: line 1) and the -198 T → C promoter probe demonstrated a strong shift (Figs 2

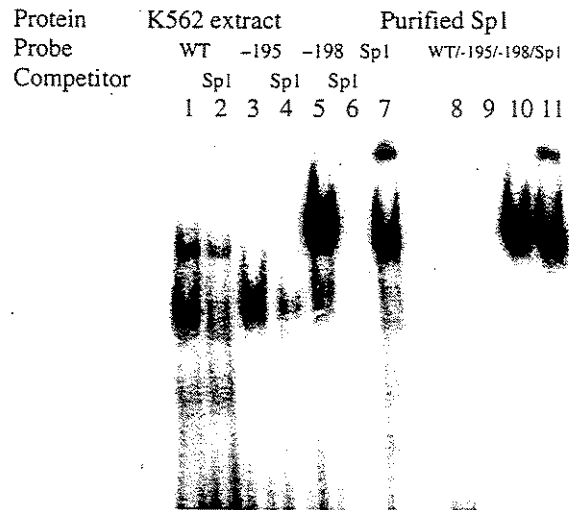


Fig. 2. Binding of K562 nuclear extract proteins (lines 1-7) or purified Sp1 protein (lines 8-11) to the probes. Lines 1, 2, 8: wild type γ promoter probe; lines 3, 4, 9: -195 C → G mutation promoter probe; lines 5, 6, 10: -198 T → C mutation promoter probe; and lines 7, 11: Sp1 probe. Lines 2, 4, 6 contain a cold Sp1 probe as a competitor.

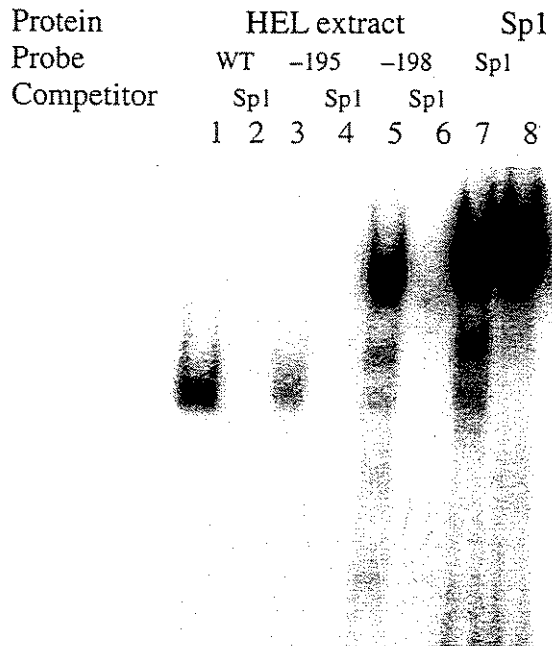


Fig. 3. Binding of HEL nuclear extract proteins (lines 1-7) or purified Sp1 protein (line 8) to the probes. Lines 1 and 2: wild type γ promoter probe; lines 3 and 4: -195 C → G mutation promoter probe; lines 5 and 6: -198 T → C mutation promoter probe; and lines 7 and 8, Sp1 probe. Lines 2, 4, 6 contain a cold Sp1 probe as a competitor.

and 3: line 5). Other bands below the Sp-1 complex were also observed, as described in other studies (18, 24). When the -195 mutant probe was analyzed, the band corresponding to the Sp-1 shift disappeared and the second band remained

although it was weaker than that of the wild type (Fig. 2: line 3). Competition experiments showed that these bands corresponded to a specific DNA binding protein, as the addition of Sp1 cold probe to the binding reaction produced a significant decrease in the number of complexes bound (Fig. 2: line 4).

Previous studies have shown that the -198 T → C mutation creates a motif that behaves like a novel CACCC box in the γ promoter (11). To determine whether the motif created by the -195 mutant also competes with proteins that bind to the CACCC box, an oligonucleotide encompassing the CACCC box was 32 P-labeled and incubated with increased amounts of -195 and -198 cold probes. When the CACCC box probe was incubated with K562, two shifted bands could be seen on the gel (Fig. 4). As expected, these bands disappeared when incubated with the cold CACCC box probe. There was no difference when the normal or -195 mutant cold probes were introduced, however, the binding of all complexes was inhibited by addition of excess -198 cold probe. Like the normal probe, none of the bands could be competed out by the presence of the -195 cold probe, thus this mutation does not compete with the CACCC box probe, as observed with the -198 mutation.

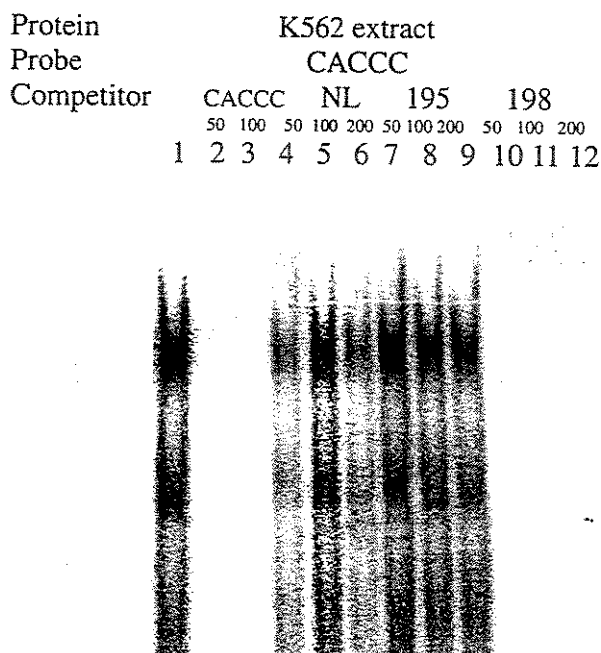


Fig. 4. Binding of K562 nuclear extract proteins to the CACCC box probe. Lines 2 and 3: wild type γ promoter cold probe as competitors; lines 4-6: -195 C → G mutation promoter cold probe; and lines 7-9: -198 T → C mutation promoter cold probe. The competition assay used 50-, 100- or 200-fold more cold probe.

Discussion

Our previous preliminary data (19), employing a construction without the inclusion of the LCR region, showed that the -195 mutation was not able to increase gene expression *in vitro*. The introduction of the HS2 fragment in the construction, as carried out in this study, produced a significant increase in gene expression by the mutant promoter. These data suggest that a single base change of the γ -globin gene promoter at -195 C → G may cause upregulation of the luciferase gene in erythroid cells and that the presence of a LCR element (HS2) is necessary for the increase in the expression of these vectors *in vitro* and, therefore, for effective promoter action. The enhancement produced in the gene expression by the mutant promoter, however, was several times less than that seen *in vivo*. These results were not unexpected and similar results have also been described with other mutations, such as the $\Delta\gamma$ -175 HPFH mutation (25). Moreover, some mutations, for example $\Delta\gamma$ -196 and $\Delta\gamma$ -202, did not show any increase in gene expression *in vitro*, following mutant promoter gene expression (24, 25).

The mechanism by which HPFH may cause upregulation of γ expression is probably mediated by the alteration of a binding site for an activator or repressor protein. The proximal promoter contains at least 15 binding sites for nuclear proteins (26). Previous experiments have shown a weak Sp1 binding site in the -200 region of the globin gene promoter, and have demonstrated that point mutations in this region [e.g. -198 (18, 24, 27) and -202 (15)] alter this binding. To test whether the -195 C → G point mutation that causes HPFH affects this binding, oligonucleotides with this mutation were subjected to gel retardation analysis. As described previously (18), when incubated with purified Sp1 protein, the wild type γ promoter probe produced a very weak band that co-migrated with the Sp1 positive control shift. The -198 T → C promoter probe produced a stronger shift, demonstrating that this mutation has a greater affinity for Sp1 than the normal promoter. Our data clearly show that the -195 mutation does not bind the Sp-1 protein, as has also been described for the -196 and -202 mutations. Thus, it is probable that other transcription factors are involved in the -195 PHHF. Other authors have observed more than one retarded band, which may be secondary to proteolysis or post-translational modification of the Sp1 protein (18).

Several studies have suggested an important role for the CACCC box, located at position -144 relative from the cap site in the γ -globin gene

promoter, as a positive regulatory element (14, 28). Dierks et al. (29) and Li et al. (11), demonstrated that the -198 T → C mutation creates a motif that behaves like a novel CACCC box in the γ promoter, re-establishing the HPFH phenotype in CACCC-less transgenic mice. Conversely, we showed, herein, that the CACCC probe bands could not be competed out by the -195 cold probe. Thus, this mutation does not compete with the CACCC box probe, as observed with the -198 mutation.

The data registered here represent the first *in vitro* gene expression and protein interaction study of the -195 HPFH mutation. Our results show that the mechanism of HbF elevation by the -195 mutation is neither mediated by the Sp-1 transcription factor nor by the creation of a CACCC box, as described for the -198 mutation. Thus, other proteins may be involved in the over-expression of the γ -globin chain and/or may depend on DNA structure and these mechanisms remain to be clarified.

Acknowledgement

This work was supported by FAPESP and CNPq, Brazil.

References

1. COLLINS FS, METHERALL JE, YAMAKAWA M, PAN J, WEISSMAN SM, FORGET BG. A point mutation in the A gamma-globin gene promoter in Greek hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature* 1985;313:325-326.
2. STOMING TA, STOMING GS, LANCLOS KD, FEI YJ, ALTAY C, KUTLAR F, HUISMAN TH. An A gamma type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin with a T → C mutation at position -175 to the cap site of the A gamma globin gene. *Blood* 1989;73:329-333.
3. COSTA FF, ZAGO MA, CHENG G, NECHTMAN JF, STOMING TA, HUISMAN TH. The Brazilian type of nondeletional A gamma-fetal hemoglobin has a C → G substitution at nucleotide -195 of the A gamma-globin gene. *Blood* 1990;76:1896-1897.
4. GELINAS R, BENDER M, LOTSHAW C, WABER P, KAZAZIAN H Jr, STAMATOYANNOPOULOS G. Chinese A gamma fetal hemoglobin: C to T substitution at position-196 of the A gamma gene promoter. *Blood* 1986;67:1777-1779.
5. TATE VE, WOOD WG, WEATHERALL DJ. The British form of hereditary persistence of fetal hemoglobin results from a single base mutation adjacent to an SI hypersensitive site 5' to the A gamma globin gene. *Blood* 1986;68:1389-1393.
6. GILMAN JG, MISHIMA N, WEN XJ, KUTLAR F, HUISMAN TH. Upstream promoter mutation associated with a modest elevation of fetal hemoglobin expression in human adults. *Blood* 1988;72:78-81.
7. GIGLIONI B, CASINI C, MANTOVANI R, MERLI S, COMI P, OTTOLENGHI S, SAGLIO G, CAMASCHIELLA C, MAZZA U. A molecular study of a family with Greek hereditary persistence of fetal hemoglobin and beta-thalassemia. *EMBO J* 1984;3:2641-2645.
8. GELINAS R, ENDLICH B, PFEIFFER C, YAGI M, STAMATOYANNOPOULOS G. G to A substitution in the distal CCAAT box of the A gamma-globin gene in Greek hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature* 1985;313:323-325.
9. OTTOLENGHI S, NICOLIS S, TARAMELLI R, et al. Sardinian G gamma-HPFH: a T → C substitution in a conserved "octamer" sequence in the G gamma-globin promoter. *Blood* 1988;71:815-817.
10. SURREY S, DELGROSSO K, MALLADI P, SCHWARTZ E. A single-base change at position -175 in the 5'-flanking region of the G gamma-globin gene from a black with G gamma-beta + HPFH. *Blood* 1988;71:807-810.
11. LI Q, DUAN ZJ, STAMATOYANNOPOULOS G. Analysis of the mechanism of action of non-deletion hereditary persistence of fetal hemoglobin mutants in transgenic mice. *EMBO J* 2001;20:157-164.
12. SUPERTI-FURGA G, BARBERIS A, SCHAFFNER G, BUSSLINGER M. The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the gamma-globin gene. *EMBO J* 1988;7:3099-3107.
13. MANTOVANI R, MARGARETTI N, NICOLIS S, RONCHI A, GIGLIONI B, OTTOLENGHI S. The effects of HPFH mutations in the human gamma-globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid specific nuclear factors. *Nucleic Acids Res* 1988;16:7783-7797.
14. GUMUCIO DL, ROOD KL, GRAY TA, RIORDAN MF, SARTOR CI, COLLINS FS. Nuclear proteins that bind the human gamma-globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol Cell Biol* 1988;8:5310-5322.
15. SYKES K, KAUFMAN R. A naturally occurring gamma globin gene mutation enhances SP1 binding activity. *Mol Cell Biol* 1990;10:95-102.
16. BLACK AR, BLACK JD, AZIZKHAN-CLIFFORD J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001;188:143-160.
17. KRIKUN G, LOCKWOOD CJ. Steroid hormones, endometrial gene regulation and the Sp1 family of proteins. *J Soc Gynecol Invest* 2002;9:329-334.
18. GUMUCIO DL, ROOD KL, BLANCHARD-MCQUATE KL, GRAY TA, SAULINO A, COLLINS FS. Interaction of Sp1 with the human gamma globin promoter: binding and transactivation of normal and mutant promoters. *Blood* 1991;78:1853-1863.
19. SCHREIBER R, GONCALVES MS, JUNQUEIRA ML, SAAD ST, KRIEGER JE, COSTA FF. The Agamma-195 (C → G) mutation in hereditary persistence of fetal hemoglobin is not associated with activation of a reporter gene *in vitro*. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:489-492.
20. DONOVAN-PELUSO M, YOUNG K, DOBKIN C, BANK A. Erythroleukemia (K562) cells contain a functional beta-globin gene. *Mol Cell Biol* 1984;4:2553-2555.
21. MARTIN DI, ORKIN SH. An erythroid-specific DNA binding factor mediates increased gamma-globin expression in hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH). *Prog Clin Biol Res* 1989;316A:217-228.
22. RIXON MW, GELINAS RE. A fetal globin gene mutation in A gamma nondeletion hereditary persistence of fetal hemoglobin increases promoter strength in a nonerythroid cell. *Mol Cell Biol* 1988;8:713-721.
23. TREISMAN R, GREEN MR, MANIATIS T. Cis and trans activation of globin gene transcription in transient assays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:7428-7432.
24. RONCHI A, NICOLIS S, SANTORO C, OTTOLENGHI S. Increased Sp1 binding mediates erythroid-specific overexpression of a mutated (HPFH) gamma-globulin promoter. *Nucleic Acids Res* 1989;17:10231-10241.
25. LANGDON SD, KAUFMAN RE. Gamma-globin gene promoter elements required for interaction with globin enhancers. *Blood* 1998;91:309-318.
26. CUNNINGHAM JM, JANE SM. Hemoglobin switching and fetal hemoglobin reactivation. *Semin Hematol* 1996;33:9-23.

27. FISCHER KD, NOWOCK J. The T → C substitution at -198 of the A gamma-globin gene associated with the British form of HPFH generates overlapping recognition sites for two DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5685-5693.
28. CATALA F, DEBOER E, HABETS G, GROSVELD F. Nuclear protein factors and erythroid transcription of the human A gamma-globin gene. *Nucleic Acids Res* 1989;17:3811-3827.
29. DIERKS P, VAN OUYEN A, COCHRAN MD, DOBKIN C, REISER J, WEISSMANN C. Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit beta-globin gene in mouse 3T6 cells. *Cell* 1983;32:695-706.