

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/42319
IB/81552

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

B294_a

Universidade Estadual de Campinas



Daniela Sanchez Bassères

Alterações Moleculares nos Genes da Alfa e Beta-espectrina e no Promotor do Gene da Anquirina nas Doenças da Membrana Eritrocitária: Eliptocitoses e Esferocitoses Hereditárias

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Daniela Sanchez Bassères

e aprovada pela Comissão Julgadora. [Assinatura]

01/6/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Humana e Médica.

Orientadora: Prof. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad,

Campinas, São Paulo, Brasil

UNIDADE IB
 N.º CHAMADA: 7/11/2000
B294c
 V. Ex.
 TOMBO 42319
 PROC. 16-278100
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 22/09/00
 N.º CPD

CM-00144209-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

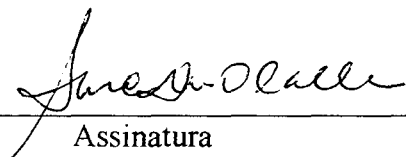
B295a ⁴ **Bassères, Daniela Sanchez**
 Alterações moleculares nos genes da alfa e beta espectrina
 e no promotor do gene da anquirina nas doenças da membrana
 eritrocitária: eliptocitoses e esferocitoses hereditárias/Daniela
 Sanchez Bassères. -- Campinas, SP:[s.n.], 2000.
 229f.:ilus.

Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Anemia hemolítica. 2. Membrana eritrocitária. 3. espectrina.
 4. Anquirina. I. Saad, Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual
 de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad



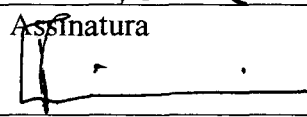
Assinatura

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Augusto Achucarro Silveira



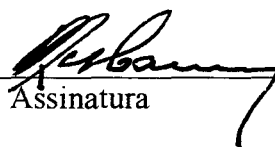
Assinatura

Prof. Dr. Adilson Leite



Assinatura

Prof. Dr. José Kerbaux



Assinatura

Profa. Dra. Christine Hackel

Assinatura

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Assinatura

À minha família, por todo amor,
apoio e torcida

Agradecimentos

À Sarita, pela amizade, apoio e orientação ao longo destes anos.

Ao professor Fernando Costa, pelo apoio, incentivo e colaboração nos trabalhos.

Ao Dr. Patrick Gallagher, por ter me recebido tão bem em seu laboratório na Universidade de Yale.

À professora Christine Hackel, por toda ajuda nas questões burocráticas do curso de pós-graduação e pelas sugestões no exame prévio.

À professora Carmen Sílvia Bertuzzo, por ter me encaminhado ao Hemocentro e pelas sugestões no exame prévio.

Aos professores Adilson Leite, Paulo Silveira e José Kerbauy, por terem aceito o convite para participar da banca examinadora

À professora Fátima Sonati, por ter aceito participar da banca examinadora como membro suplente.

À Rosana e à Sandra, pelo apoio audiovisual nos trabalhos encaminhados para apresentação em congressos e na confecção desta tese.

À Tereza, por ter me ensinado os primeiros passos no laboratório e por estar sempre disposta a ouvir e a ajudar.

À Clara, por ter sido uma amiga sincera em um país estranho.

À Mônica, pela amizade, companhia e por estar sempre presente quando a gente precisa.

À Silvana Bordin, por tudo que eu aprendi durante a nossa convivência.

À Lê, pela amizade.

À Dilmara, Lena, Carlos, Simone, Ângela, Carol, Luciana, Tutty e Natasha, pelo ambiente quase sempre descontraído e muitas vezes divertido no laboratório.

Aos colegas de pós-graduação Juliana, Roberta, Adriana, Arno, Paulo, Marcelo e Rodrigo, pela enriquecedora troca de experiências e por terem sempre um ótimo astral.

Aos colegas Wagner, Malú, Ângela, Katinha, Lilian, Kléber, Fernando e Walder.

Às novas colegas de laboratório Elaine, Édna, Manoela e Roberta II.

À Tita, Roberto e Beth, pela convivência e pela saudade.

Às secretárias Raquel, Silvana e recentemente Marcinha, pela ajuda com a burocracia científica.

À Fapesp e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao meu marido Eduardo, pelo amor, paciência e compreensão.

Ao meu avô Maurício, por ter feito brotar em mim a semente da curiosidade científica.

Ao meu pai, por estar sempre presente e por me apoiar sempre.

À minha mãe, pelo amor e carinho.

À minha avó Leonor por acreditar em mim.

À minha avó Vera, pelo amor, pelos conselhos e pelos ensinamentos de vida.

Aos meus irmãos Tiago, Carlos, André e Ivan.

Às minhas tias Vera e Fernanda.

Ao meu avô postiço Newton, pelo carinho.

Aos pacientes do Hemocentro, sem os quais, a realização desta tese não seria possível.

À todos aqueles, que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	xi
SUMMARY.....	xiii

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	1
1.1 A MEMBRANA ERITROCITÁRIA	1
1.1.1 Fração lipídica	1
1.1.2 Fração proteica.....	2
1.1.2.1 Proteínas integrais.....	2
<i>Banda 3</i>	2
<i>Glicoforinas</i>	4
<i>Outras proteínas integrais</i>	4
1.1.2.2 Proteínas periféricas.....	4
<i>Interações entre as proteínas da membrana eritrocitária</i>	5
<i>Espectrina</i>	9
<i>Anquirina ou proteína 2.1</i>	13
<i>Proteína 4.1</i>	17
<i>Palidina ou proteína 4.2</i>	19
<i>Actina</i>	20
1.2 A ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA (ELH) E A PIROPOIQUILOCITOSE HEREDITÁRIA (PPH)	21
1.2.1 Defeitos na auto-associação dos heterodímeros de espectrina	22

1.2.1.1 Defeitos da alfa-espectrina.....	22
<i>polimorfismo α^{LELY}</i>	24
1.2.1.2 Defeitos da beta-espectrina.....	28
1.2.2 Defeitos da proteína 4.1.....	29
1.2.3 Deficiência de glicoforina C.....	30
1.3 ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA (ESH).....	30
1.3.1 Defeitos da espectrina.....	32
1.3.1.1 Alfa-espectrina.....	33
1.3.1.2 Beta-espectrina.....	34
1.3.2 Defeitos da anquirina.....	35
1.3.3 Defeitos da banda 3.....	36
1.3.4 Defeitos da palidina ou proteína 4.2.....	37

CAPÍTULO 2

CASUÍSTICA.....	39
2.1 ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA.....	39
2.1.1 Grupo I: $\text{sp}\alpha\text{I}/65$	40
2.1.2 Grupo II: $\text{sp}\alpha\text{I}/50$	40
2.1.3 Grupo III: $\text{sp}\alpha\text{I}/74$	40
2.1.4 Grupo IV: $\text{sp}\alpha\text{I}/74 + \beta$ -espectrina truncada.....	40
2.2 ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA.....	41
2.2.1 Grupo I.....	41
2.2.2 Grupo II.....	41
2.2.3 Grupo III.....	41

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS.....	43
----------------	----

CAPÍTULO 4

ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA: RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 TRABALHOS 1, 2, 3 E 4.....	45
4.1.1 Resumo dos resultados apresentados nos trabalhos 1, 2, 3 e 4.....	46
4.1.2 Trabalho 1	51
Expression of spectrin $\alpha I/65$ hereditary elliptocytosis in patients from Brazil	
4.1.3 Trabalho 2	59
Expression of spectrin $\alpha I/50$ hereditary elliptocytosis and its association with the α^{LELY} allele	
4.1.4 Trabalho 3	69
Association of the α -spectrin R28H mutation with allele α^{LELY} and with $\alpha I/\alpha II$ domain haplotypes in three Brazilian families	
4.1.5 Trabalho 4	77
β -spectrin Campinas: a novel shortened β -chain variant associated with skipping of exon 30 and hereditary elliptocytosis	
4.1.6 Discussão geral dos trabalhos 1, 2, 3 e 4	87

CAPÍTULO 5

ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA: RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1 TRABALHOS 5, 6 E 7	93
5.1.1 Resumo dos resultados apresentados nos trabalhos 5, 6 e 7	94
5.1.2 Trabalho 5	101
β -spectrin Promissão: A translation initiation codon mutation of the β -spectrin gene (ATG→GTG) associated with hereditary spherocytosis and spectrin deficiency in a Brazilian family	

5.1.3 Trabalho 6.....	105
β-spectrin Santa Bárbara and β-spectrin São Paulo II: Two novel frameshift mutations of the β-spectrin gene associated with hereditary spherocytosis	
5.1.4 Trabalho 7.....	129
In vitro analysis of erythrocyte ankyrin promoter mutations associated with hereditary spherocytosis	
5.1.5 Discussão geral dos trabalhos 5, 6 e 7.....	153
CAPÍTULO 6	
CONCLUSÕES.....	161
APÊNDICE A.....	165
APÊNDICE B.....	171
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	173

Lista de Tabelas e Figuras

Tabelas

Capítulo 4:

Trabalho 1

Tabela 1: Dados hematológicos dos pacientes portadores de EIH do tipo sp α I/65	54
--	----

Trabalho 2

Tabela 1: Dados hematológicos e moleculares dos pacientes portadores de EIH relacionada à presença de sp α I/50	66
--	----

Trabalho 3

Tabela 1: Valores hematológicos e bioquímicos dos pacientes portadores de EIH do tipo sp α I/74 e associação com a presença do alelo α^{LELY}	72
Tabela 2: Haplótipos estendidos do gene da alfa-espectrina dos indivíduos da três famílias portadoras da mutação R28H.....	74

Capítulo 5:

Trabalho 6

Tabela 1: Investigação da paternidade pela técnica de Southern Blotting.....	127
Tabela 2: Polimorfismos no gene da beta-espectrina detectados neste trabalho.....	128

Trabalho 7

Tabela 1: Valores clínicos e hematológicos dos pacientes portadores de mutações na região promotora do gene da anquirina	151
--	-----

Tabela 2: Frequência das mutações -153 G→A e -108 T→C em uma amostra da população brasileira e em uma amostra de uma população de Ameríndios	151
--	-----

Apêndices:

Apêndice A

Tabela 1: Alterações moleculares no gene da alfa-espectrina na EIH	165
Tabela 2: Alterações moleculares no gene da beta-espectrina na EIH/PPH	166
Tabela 3: Correlação das alterações moleculares no gene da alfa-espectrina, detectadas nas famílias portadoras de EIH analisadas neste trabalho, com a manifestação clínica e com a presença do alelo α^{LELY}	168

Apêndice B

Tabela 1: Mutações no gene da beta-espectrina na EsH	171
Tabela 2: Mutações no gene da anquirina na EsH	172

Figuras

Capítulo 1:

Figura 1: Estrutura da Banda 3	3
Figura 2: Modelo esquemático da estrutura da membrana eritrocitária	6
Figura 3: Estrutura do complexo juncional.....	7
Figura 4: Interações proteicas da membrana eritrocitária e hipóteses para formação de eliptócitos e esferócitos	8
Figura 5: Estrutura da espectrina I.....	11
Figura 6: Estrutura da espectrina II.....	13
Figura 7: Estrutura da anquirina	15

Figura 8: Estrutura da proteína 4.1	17
Figura 9: Mecanismo molecular da baixa expressão do alelo α^{LELY}	25
Figura 10: Efeito do alelo α^{LELY} na proporção da espectrina contendo cadeias α -normais e α -eliptocitogênicas	27

Capítulo 4:

Trabalho 1

Figura 1: Digestão trípica da espectrina dos pacientes portadores de ElH do tipo sp α I/65	55
Figura 2: SDS-PAGE das proteínas de membrana, immunoblotting com anticorpo anti-beta-espectrina e eletroforese da espectrina em gel de poliacrilamida não desnaturante	56

Trabalho 2

Figura 1: Heredogramas das famílias portadoras de ElH do tipo sp α I/50.....	62
Figura 2: Esfregaço do sangue periférico dos pacientes portadores de ElH do tipo sp α I/50	63
Figura 3: Análise eletroforética das proteínas de membrana.....	64
Figura 4: Análise por SSCP não radioativo do éxon 6 do gene da alfa-espectrina.....	64
Figura 5: Sequenciamento direto do DNA genômico.....	64
Figura 6: Padrão de digestão com as enzimas de restrição AvaII e MwoI em função da presença do alelo α^{LELY}	65

Trabalho 4

Figura 1: Esfregaço do sangue periférico da paciente e sua mãe.....	80
Figura 2: Análise eletroforética das proteínas da membrana eritrocitária	81
Figura 3: Imunocaracterização da beta-espectrina com migração eletroforética anormal.....	82
Figura 4: Análise do cDNA da porção 3'-terminal do gene da beta-espectrina.....	82

Figura 5: Sequenciamento direto do DNA genômico da paciente.....	83
--	----

Capítulo 5:

Trabalho 5

Figura 1: SDS-PAGE das proteínas de membrana, esfregaço do sangue periférico do paciente e heredograma da família do paciente.....	103
Figura 2: Análise por SSCP não radioativo do éxon 2 do gene da beta-espectrina.....	104
Figura 3: Sequenciamento direto do DNA genômico.....	104

Trabalho 6

Figura 1: Análise molecular por SSCP e sequenciamento das mutações com desvio de leitura do gene da beta-espectrina.....	121
Figura 2: Análise da presença do alelo mutante por RT-PCR.....	122
Figura 3: Quantificação do provável alelo mutante na paciente SD.....	123
Figura 4: Imunocaracterização das espécies da beta-espectrina presentes na membrana eritrocitária e nos outros compartimentos celulares.....	124
Figura 5: Análise molecular por SSCP e sequenciamento das mutações missense no gene da beta-espectrina.....	125
Figura 6: Detecção de polimorfismos no gene da beta-espectrina por SSCP não radioativo.....	126

Trabalho 7

Figura 1: Análise molecular, por SSCP e sequenciamento, das mutações presentes no promotor do gene da anquirina.....	143
Figura 2: Esquema do promotor da anquirina	144
Figura 3: Análise da migração eletroforética de complexos DNA-proteína de sondas contendo a mutação -153 G→A	145
Figura 4: Análise da migração eletroforética de complexos DNA-proteína de sondas contendo a mutação -108 T→C	146

Figura 5:	Análise da migração eletroforética de complexos DNA-proteína de sondas contendo a mutação –72/73delTG	147
Figura 6:	Análise da migração eletroforética de complexos DNA-proteína de sondas contendo a mutação –204 C→G	148
Figura 7:	Gráfico representando a atividade relativa da luciferase em função da construção gênica em células HEL transfectadas transitoriamente	149
Figura 8:	Gráfico representando a atividade relativa da luciferase em função da construção gênica em células K562 transfectadas transitoriamente	150

Apêndices:

Apêndice A

Figura 1:	Análise da presença da duplL154 por hibridização alelo-específica do éxon 4 do gene da alfa-espectrina	169
Figura 2:	Caracterização molecular, por SSCP e seqüenciamento, da mutação R28H no éxon 2 do gene da alfa-espectrina	170

Lista de Abreviaturas

A – aminoácido alanina ou nucleotídeo adenina

Ank – anquirina

AP-1 – “*activator protein 1*”

AP-2 – “*activator protein 2*”

ATP – adenosina-5’- trifosfato

B3 ou b3 – banda 3

C – aminoácido cisteína ou nucleotídeo citosina

Cl⁻ - cloreto

COOH – grupamento carboxila

C-terminal – carboxi-terminal

D – aminoácido aspartato

del - deleção

DNA – “*deoxyribonucleic acid*”; ácido desoxirribonucléico

cDNA – DNA complementar

gDNA – DNA genômico

dupl – duplicação

E – ácido glutâmico

ElH – eliptocitose hereditária

EsH – esferocitose hereditária

F- aminoácido fenilalanina

fig. ou figs. – figura ou figuras

G – aminoácido glicina ou nucleotídeo guanina

GPA – glicoforina A

GPC ou GpC – glicoforina C

H – aminoácido histidina

Hb – hemoglobina

HCO₃⁻ - bicarbonato

I – aminoácido isoleucina

ins – inserção

IVS – “*intervening sequence*”; íntron

K⁺ - potássio

kb – kilobases

kDa – kilodaltons

N – aminoácido asparagina

Na⁺ - sódio

NF-E2 – “*nuclear factor – erythroid 2*”

NH₂ – grupamento amina

N-terminal – amino-terminal

P – aminoácido prolina

p – braço curto de um determinado cromossomo

PAGE – “*polyacrylamide gel electrophoresis*”; eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – pares de base

PCR – “*polymerase chain reaction*”; reação em cadeia da polimerase

PEA-1 – “*polyoma virus enhancer A-binding protein 1*”

q – braço longo de um determinado cromossomo

Q – aminoácido glutamina

R – aminoácido arginina

Retics. - reticulócitos

RNA – “*ribonucleic acid*”; ácido ribonucléico

mRNA – RNA mensageiro

RT-PCR – “*reverse transcribed PCR*”; PCR e transcrição reversa feitos simultaneamente

SDS – duodecil-sulfato de sódio

S – aminoácido serina

SH3 – “*Src (sarcoma) homology region 3*”

sp – espectrina

SpD – dímero de espectrina

SpT – tetrâmero de espectrina

SSCP – “single strand conformation polymorphism”; polimorfismo de conformação de fita simples

T – aminoácido tirosina ou nucleotídeo timina

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

W – aminoácido triptofano

Resumo

As alterações proteicas da membrana eritrocitária são responsáveis por algumas formas de anemia hemolítica congênita. Dentre estas, a eliptocitose hereditária (ElH) decorre principalmente por defeitos na auto-associação dos heterodímeros de espectrina. Foram selecionadas dez famílias portadoras de ElH atendidas no Hemocentro da Unicamp, cujo defeito bioquímico estava associado a uma auto-associação defeituosa dos heterodímeros de espectrina. Dentre os dez casos estudados, três apresentaram ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/65$, três apresentaram ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/50$, três apresentaram ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ e uma família apresentava ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ associada à presença de uma beta-espectrina truncada. O objetivo deste trabalho era esclarecer as mutações gênicas responsáveis pela ElH nestes casos e avaliar a presença do alelo de baixa expressão α^{LELY} nos casos de mutações no gene da alfa-espectrina. A abordagem metodológica incluiu a amplificação dos éxons dos genes da alfa e beta-espectrina normalmente afetados em cada subtipo de ElH, seguida de SSCP e seqüenciamento em alguns casos e análise do cDNA e seqüenciamento em outros. Os três pacientes portadores de $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ apresentavam uma duplicação da leucina 154 da alfa-espectrina, os três pacientes portadores de $\text{sp}\alpha\text{I}/50$ apresentavam a troca do leucina da posição 260 da alfa-espectrina por uma prolina e os três pacientes portadores de $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ apresentavam a troca da arginina da posição 28 pela histidina. O alelo α^{LELY} estava presente na maioria destes casos e sua associação e influência sobre a expressão da ElH foram determinadas. Finalmente, no caso do paciente portador de $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ associado a uma beta-espectrina truncada, foi observada uma mutação no sítio de clivagem 5'doador do íntron 30 do gene da beta-espectrina.

A esferocitose hereditária (EsH) é causada por defeitos nos genes da alfa-espectrina, beta-espectrina, anquirina, banda 3 e palidina. Foi objetivo deste trabalho realizar uma triagem de mutações na região codificadora do gene da beta-espectrina em 13 pacientes portadores de EsH atendidos no Hemocentro da Unicamp, o que foi realizado através da submissão de éxons individuais amplificados à técnica de SSCP, seguida de seqüenciamento dos produtos com migração

alterada. Foram detectadas duas mutações com desvio do quadro de leitura (a deleção de uma citosina no códon 638 e a deleção de uma citosina no códon 1392) e uma mutação de códon de início de tradução (ATG→GTG). Além disso, foram detectadas algumas mutações missense, cujo significado funcional permanece indeterminado (I220V, H1374R, A1884V) e alguns polimorfismos novos e já descritos. Outro objetivo consistia em realizar uma triagem de mutações no promotor do gene da anquirina em 41 pacientes portadores de EsH atendidos no Hemocentro da Unicamp e no Hemocentro da Universidade de Santa Catarina. A metodologia empregada foi similar à utilizada na triagem do gene da beta-espectrina. Foram detectadas duas alterações moleculares no promotor: uma já descrita (-108 T→C) e uma nova (-153 G→A) em dois pacientes. Estas mutações estavam ligadas *in cis* nos dois pacientes e foi possível detectar estas mutações em uma população controle. Estudos de mobilidade em gel de poliacrilamida e ensaios de expressão do gene da luciferase em linhagem de células eritróides transfectadas transitoriamente sugerem que estas alterações, bem como outras duas alterações já descritas neste promotor (-204 C→G e -72/73delTG), constituem meros polimorfismos.

Nossos dados indicam que a ElH e a EsH são comuns no Brasil, mas são geradas por diferentes tipos de mutações: a ElH decorre, principalmente, de mutações com origem monocêntrica amplamente distribuídas, enquanto a EsH decorre de mutações isoladas, diferentes em cada caso e nunca descritas anteriormente. Além disso, nossos resultados mostram que mutações no gene da beta-espectrina podem ser uma causa comum de EsH no Brasil e que mutações no promotor do gene da anquirina não parecem ser particularmente importantes no desencadeamento desta anemia hemolítica.

Summary

Most congenital hemolytic anemias are caused by defects in the erythrocyte membrane proteins. Hereditary elliptocytosis (HE) is caused mainly by a disruption in the spectrin dimers self-association process. Ten families with HE and impaired dimer self-association attended at the Hemocenter of the State University of Campinas were selected for study. Three families presented sp α I/65 HE, three families presented sp α I/50 HE, three families presented sp α I/74 HE and one family presented sp α I/74 HE associated with a truncated beta-spectrin chain. The aim of this study was to determine the genetic mutations responsible for HE in these families and assess the presence of the low expression allele α^{LELY} in the families bearing alpha-spectrin gene mutations. The technical approach included amplification of the exons of the alpha and beta-spectrin genes commonly affected in each subtype of HE, followed by SSCP or cDNA analysis and sequencing. The three patients with sp α I/65 HE presented a duplication of leucine 154 of the alpha-spectrin chain. The three patients with sp α I/50 HE beared a leucine-proline substitution at codon 260 of the alpha-spectrin gene. In the three patients with sp α I/74 HE, an arginine-histidine sustitution at codon 28 of the alpha-spectrin gene was detected. The α^{LELY} allele was present in most of these cases and its association with elliptocytogenic mutation and impact on the expression of HE was assessed. Finally, in the patient with sp α I/74 HE associated with a shortened beta-spectrin chain, a 5'donor splice site mutation was detected in íntron 30 of the beta-spectrin gene.

Hereditary spherocytosis (HS) is caused by mutations in the alpha-spectrin, beta-spectrin, ankyrin and band 3 genes. One of the aims of this study was to screen the beta-spectrin gene coding region in 13 HS patients attended at the State University of Campinas. This was performed through submission of individually amplified exons to the SSCP technique, followed by sequencing of the abnormally migrating products. Two frameshift mutations (a cytosine deletion at codon 638 and a cytosine deletion at codon 1392) and a translation initiation codon mutation (ATG→GTG) were detected. In addition, some new polymorphisms and a few described ones were detected. Another

goal of this study was to screen the ankyrin gene promoter region in 41 HS patients attended at the State University of Campinas and at the University of Santa Catarina. The technical approach was similar to that used for beta-spectrin gene screening. Two molecular alterations were detected in this region (–108 T→C and a –153 G→A) in two HS patients. These mutations were linked *in cis* and these mutations were also detected in a control population. Mobility shift assays and luciferase expression assays suggest that these alterations, as well as other two mutations described in this region (deletion of a TG dinucleotide at positions –72/-73 and –204 C→G), may represent mere polymorphisms with no functional consequences.

Our data indicates that HE and HS are common in Brazil, but are caused by different types of mutations: HE is triggered by widely distributed mutations of monocentric origin, whereas HS is triggered by “private” mutations, that are different in each case and result in single reports. Our results also show that beta-spectrin gene mutations may be a common cause of HS in Brazil and that ankyrin promoter mutations do not seem to be particularly important in the pathophysiology of this hemolytic anemia.

Capítulo 1

Introdução

1.1 A Membrana Eritrocitária

A membrana eritrocitária é responsável por muitas das funções fisiológicas e propriedades mecânicas da hemácia (LUX & PALEK, 1995; TSE & LUX, 1999). A estrutura da membrana eritrocitária é similar a de outras membranas biológicas seguindo o modelo de mosaico fluido de SINGER & NICHOLSON (1972) e sendo formada por lipídios e proteínas (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a).

1.1.1 Fração lipídica

A porção lipídica da membrana eritrocitária é constituída por uma mistura de fosfolipídios, colesterol não esterificado e glicolipídios, organizados em uma camada dupla e atravessados ao acaso por receptores e canais proteicos transmembranosos (LUX, 1988; LUX & PALEK, 1995). Os fosfolipídios estão organizados de tal forma que os seus grupamentos polares ficam expostos em cada lado da superfície da membrana, criando uma região hidrofílica com ligação para o plasma e citoplasma. Por outro lado, suas cadeias de ácidos graxos hidrofóbicas ficam retidas no núcleo da bicamada, criando um centro lipofílico, que contribui para a flexibilidade da membrana (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). A distribuição de lipídios é assimétrica, tanto dentro de cada camada (assimetria do tipo *cis*), como através do plano da bicamada (assimetria do tipo *trans*) (DRESSLER *et al*, 1984; SCHWARZ *et al*, 1985; RODGERS & GLASER, 1991; DEVAUX, 1993;

LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; KUYPERS, 1998). Esta assimetria é importante para manter o correto funcionamento fisiológico da membrana. A fosfatidilserina, por exemplo, é um aminofosfolípido, que está localizado exclusivamente na camada interna da membrana e sua presença na camada externa da membrana está associada com alterações hemostáticas e com um risco aumentado de trombose (KUYPERS, 1998).

1.1.2 Fração proteica

As proteínas da membrana da hemácia podem ser classificadas em dois grupos:

1.1.2.1 Proteínas integrais

As proteínas integrais da membrana penetram ou atravessam completamente a bicamada lipídica e interagem com o núcleo lipídico hidrofóbico (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Este grupo inclui as proteínas de transporte como a banda 3, que é o canal trocador de ânions da hemácia, e as glicoforinas, que carregam receptores ou antígenos de superfície (IOLASCON *et al*, 1998). Estas proteínas possuem normalmente três domínios específicos: um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático.

Banda 3

A banda 3 é a principal proteína integral do eritrócito, constituindo de 25 a 30% da fração proteica da membrana. Estima-se que um milhão e duzentas mil cópias estejam presentes na membrana (TANNER, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; IOLASCON *et al*, 1998).

O gene da banda 3 eritróide pertence a uma família multigênica de transportadores iônicos (ALPER, 1994), localiza-se no cromossomo 17q21-qter e codifica uma proteína de 911 aminoácidos (TANNER *et al*, 1988; LUX *et al*, 1989; SAHR *et al*, 1994; SCHOFIELD *et al*, 1994), que contem dois domínios funcionais e estruturais: um domínio citoplasmático N-terminal de 43 kDa e um domínio transmembrana C-terminal de 52 kDa (fig. 1).

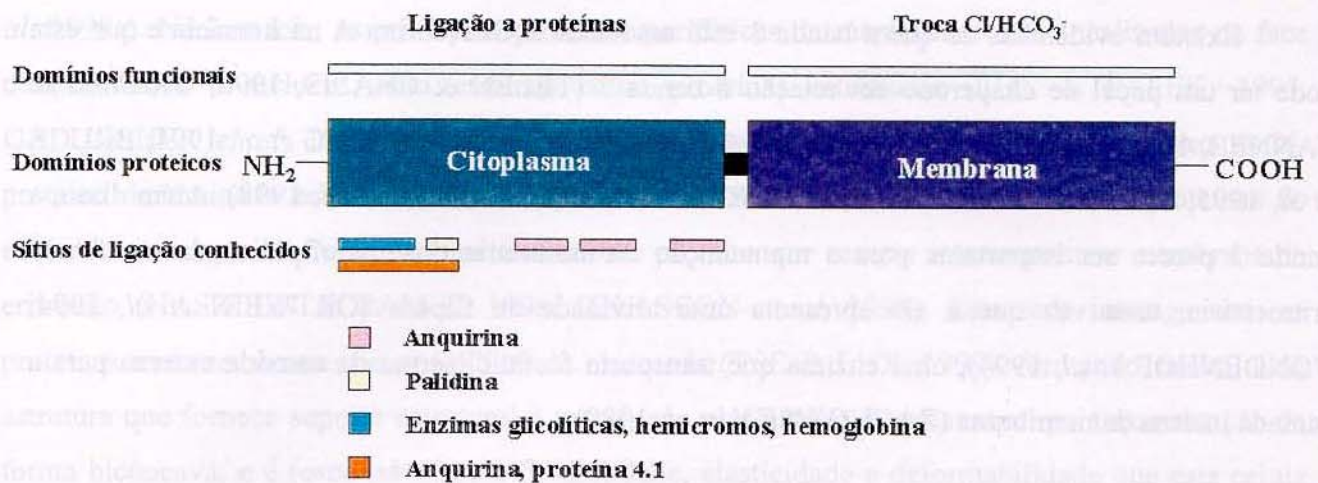


Figura 1: Estrutura da banda 3, mostrando os principais domínios funcionais e sítios de ligação a proteínas.

O domínio citoplasmático está envolvido com a ligação a diferentes proteínas eritrocitárias citoplasmáticas, como por exemplo, a ligação a enzimas glicolíticas, à hemoglobina e aos hemicromos resultantes da oxidação e desnaturação da hemoglobina (YU & STECK, 1975; DE & KIRTLEY, 1977; MURTHY *et al*, 1981; TSAI *et al*, 1982; JENKINS *et al*, 1984; WALDER *et al*, 1984; CHÉTRITE & CASSOLY, 1985; WAUGH *et al*, 1987; MCPHERSON *et al*, 1992). Este domínio também se liga a diferentes componentes do citoesqueleto (YU & STECK, 1975; BENNETT & STENBUCK, 1979; BENNETT & STENBUCK, 1980; PASTERNAK *et al*, 1985; KORSGREN & COHEN, 1986; KORSGREN & COHEN, 1988; DAVIS *et al*, 1989; THEVENIN & LOW, 1990; LOMBARDO *et al*, 1992), mantendo a estabilidade e integridade celular através da ancoragem do citoesqueleto à dupla camada lipídica (LOW, 1986; GIMSA & RIED, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; TANNER, 1997). O domínio transmembrana está embebido na bicamada lipídica e atravessa esta bicamada diversas vezes, formando alças intra e extracelulares (LUX *et al*, 1989; WANG, 1994; GROVES & TANNER, 1999a; GROVES & TANNER, 1999b). Este domínio é o responsável pela troca Cl/HCO_3^- , aumentando a capacidade do sangue de carregar dióxido de carbono dos tecidos para o pulmão (HO & GUIDOTTI, 1975; WIETH *et al*, 1982; JENNINGS, 1989). A banda 3 é expressa nos eritrócitos e nas células α -intercaladas dos túbulos distais do rim (DRENCKHAHN *et al*, 1985; ALPER *et al*, 1989; KOLLERT-JONES *et al*, 1993; TANNER, 1996).

Existem evidências de que a banda 3 está associada à Glicoforina A na hemácia e que esta pode ter um papel de chaperone em relação à banda 3 (TELEN & CHASIS, 1990; GROVES & TANNER, 1992; GROVES & TANNER, 1994; KNOWLES *et al*, 1994; RING *et al*, 1994; BRUCE *et al*, 1995; CHE & CHERRY, 1995; HUANG *et al*, 1996; HASSOUN *et al*, 1998). Além disso, a banda 3 parece ser importante para a manutenção da assimetria dos fosfolipídios da membrana eritrocitária, uma vez que a ela apresenta uma atividade de flipase (ORTWEIN *et al*, 1994; VONDENHOF *et al*, 1994), uma enzima que transporta fosfatidilserina da camada externa para a camada interna da membrana (ZACHOWSKY *et al*, 1989).

Glicoforinas

As Glicoforinas são sialoglicoproteínas cujas funções não estão muito bem esclarecidas. Entretanto, sabe-se que, além de carregar antígenos de superfície como os antígenos dos sistemas MN e Gerbich (CHASIS & MOHANDAS, 1992; CARTRON *et al*, 1993; COLIN, 1995), elas são responsáveis pela maior parte da carga negativa de superfície, que impede as hemácias de aderirem umas às outras e à parede vascular (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Além disso, as Glicoforinas possivelmente atuam no processo de sinalização celular (CHASIS *et al*, 1988) e provavelmente carregam receptores para o *Plasmodium falciparum* (ORLANDI *et al*, 1992) e para determinadas viroses e bactérias (CHASIS & MOHANDAS, 1992; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a).

Outras proteínas integrais

A membrana possui ainda outros tipos de proteínas integrais, como a proteína RH, o transportador de glicose, bombas iônicas dependentes de ATP como a Na^+/K^+ -ATPase, várias quinases e fosfatases, proteínas do sistema complemento, receptores hormonais, etc (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a).

1.1.2.2 Proteínas periféricas

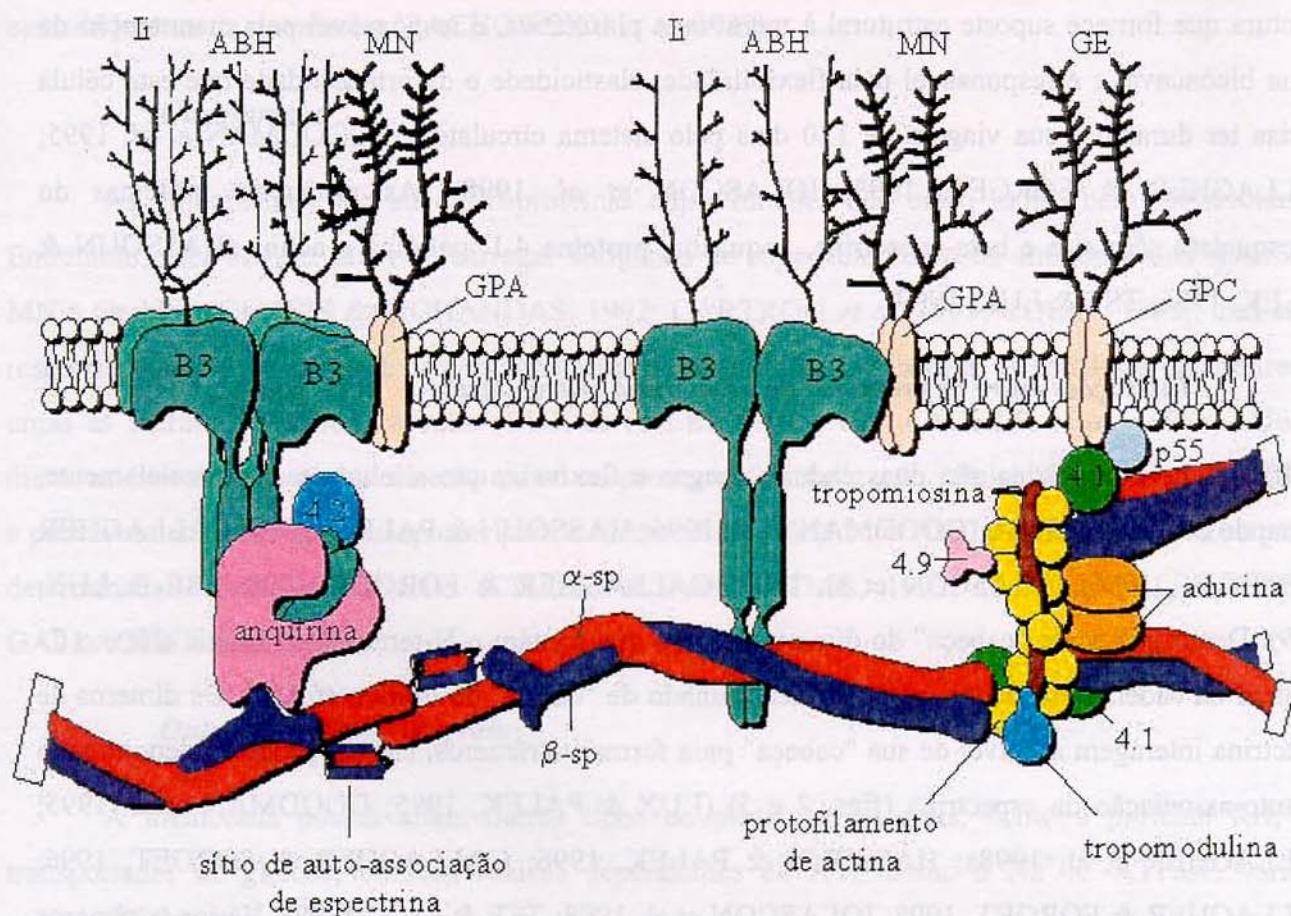
As proteínas periféricas interagem com as proteínas integrais ou com lipídios na superfície da membrana, mas não penetram no núcleo da bicamada (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*

al, 1998a). Na hemácia, as principais proteínas periféricas da membrana estão localizadas na face citoplasmática e incluem tanto enzimas como proteínas estruturais (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). As proteínas periféricas estruturais formam um complexo multiproteico denominado esqueleto da membrana eritrocitária (TSE & LUX, 1999). As proteínas do esqueleto interagem entre si, formando uma rede proteica que reveste internamente a membrana do eritrócito (HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). Esta rede interage com as proteínas transmembrana e com lipídios da bicamada (TSE & LUX, 1999), formando, assim, uma estrutura que fornece suporte estrutural à membrana plasmática, é responsável pela manutenção da forma bicôncava, e é responsável pela flexibilidade, elasticidade e deformabilidade que esta célula precisa ter durante a sua viagem de 120 dias pelo sistema circulatório (GOODMAN *et al*, 1995; GALLAGHER & FORGET, 1993; IOLASCON *et al*, 1998). As principais proteínas do citoesqueleto são: alfa e beta-espectrina, anquirina, proteína 4.1, palidina e actina (HASSOUN & PALEK, 1996; TSE & LUX, 1999).

Interações entre as proteínas da membrana eritrocitária

A alfa e a beta-espectrina são duas cadeias longas e flexíveis, que alinham-se antiparalelamente, formando um heterodímero (GOODMAN *et al*, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER & FORGET, 1996; IOLASCON *et al*, 1998; GALLAGHER & FORGET, 1998; TSE & LUX, 1999). Denomina-se de “cabeça” do dímero a região que contém o N-terminal da cadeia alfa e o C-terminal da cadeia beta, sendo o oposto denominado de “cauda” do dímero (fig. 6). Os dímeros de espectrina interagem ao nível de sua “cabeça” para formar tetrâmeros, em um processo denominado de auto-associação da espectrina (figs. 2 e 5) (LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al*, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER & FORGET, 1996; GALLAGHER & FORGET, 1998; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999). Vários tetrâmeros de espectrina são interligados ao nível das caudas através da interação com uma estrutura denominada de complexo juncional, composta de protofilamentos de actina, tropomiosina, tropomodulina, aducina e proteína 4.1, formando, assim, uma estrutura de rede (figs. 2 e 3) (GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY *et al*, 1996; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999). A interação de um tetrâmero com o complexo juncional se dá através da ligação da beta-espectrina com um monômero de actina. A proteína 4.1 se liga à beta-

espectrina na mesma região e aumenta a afinidade da ligação beta-espectrina/actina (figs. 2 e 3) (HASSOUN & PALEK, 1996; WORKMAN & LOW, 1998; TSE & LUX, 1999). A proteína 4.1 também é capaz de se ligar simultaneamente à Glicoforina C, uma proteína integral da membrana, fornecendo um ponto de ancoragem entre o citoesqueleto e a dupla camada lipídica (fig. 2) (HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY et al, 1996; WORKMAN & LOW, 1998; IOLASCON et al, 1998; TSE & LUX, 1999). Outro ponto importante de ancoragem se dá através da anquirina, que se liga simultaneamente à beta-espectrina na região da cabeça do dímero e à banda 3 na mem-



Lux e Palek, 1995

Figura 2: Modelo esquemático da estrutura da membrana eritrocitária, mostrando as principais relações interproteicas. (Ii) antígenos do grupo Ii. (ABH) antígenos do sistema ABH. (MN) antígenos do sistema MN. (GE) antígenos do sistema Gerbich. Modificado a partir de Lux e Palek (1995).

brana (fig. 2). A palidina ou proteína 4.2, por sua vez, se liga à banda 3 na região de ligação à anquirina, supostamente aumentando a interação banda 3/Anquirina (GALLAGHER et al, 1998a;

HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON et al, 1998; TSE & LUX, 1999). Finalmente, esta ancoragem do citoesqueleto à membrana é coadjuvada por interações fracas da espectrina e da proteína 4.1 com os lipídios negativamente carregados presentes na lâmina interna da bicamada (HASSOUN & PALEK, 1996).

As várias interações inter-proteicas que acontecem na membrana sugerem um modelo estrutural composto de dois tipos de interação (fig. 4): as interações proteicas verticais, que garantem a ancoragem do citoesqueleto à bicamada lipídica e as interações proteicas horizontais, que são responsáveis pela deformabilidade lateral e extensibilidade do esqueleto (PALEK, 1987; HASSOUN & PALEK, 1996; TSE & LUX, 1999).

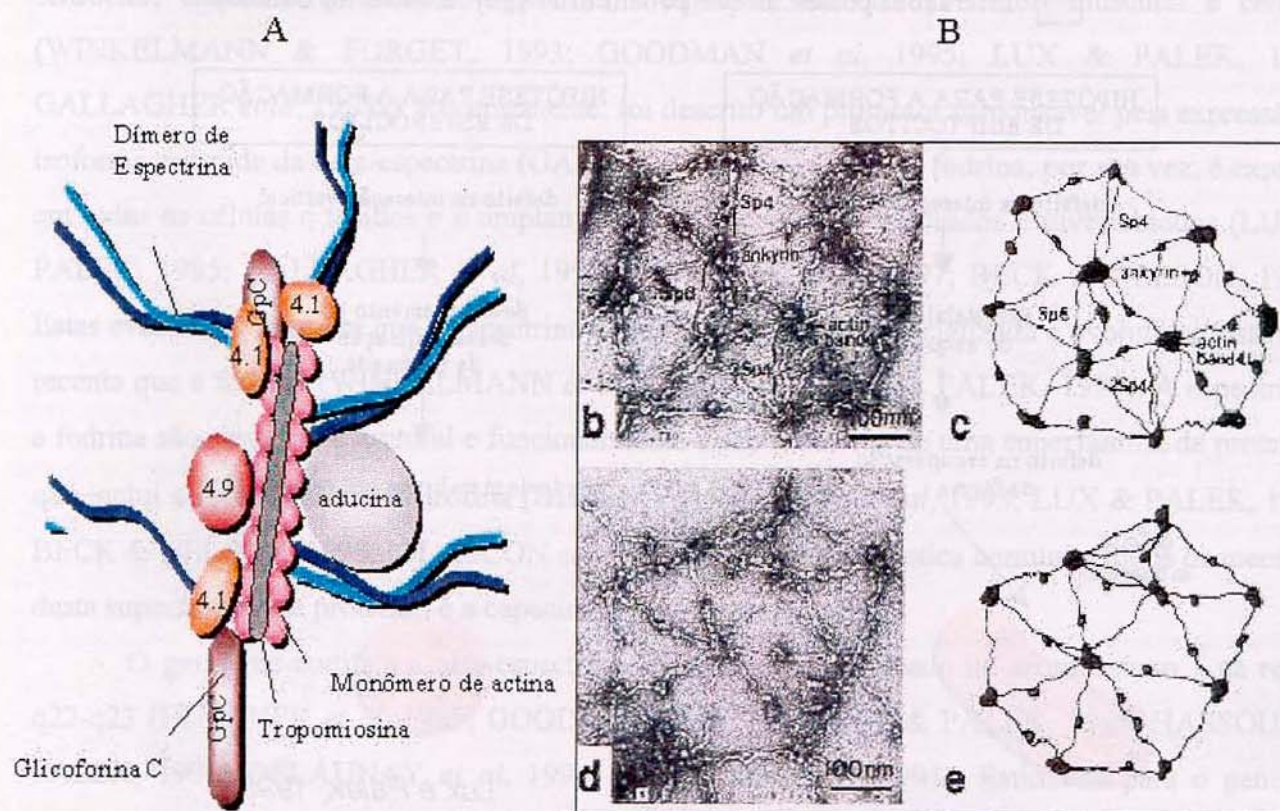


Figura 3: A) A estrutura do complexo juncional. B) eletromicrografia (b,d) e esquemas representativos (c, e), mostrando a formação de uma estrutura de rede do citoesqueleto eritrocitário, através da interligação dos tetrâmeros de espectrina pelo complexo juncional. Modificado a partir de Lux e Palek (1995).

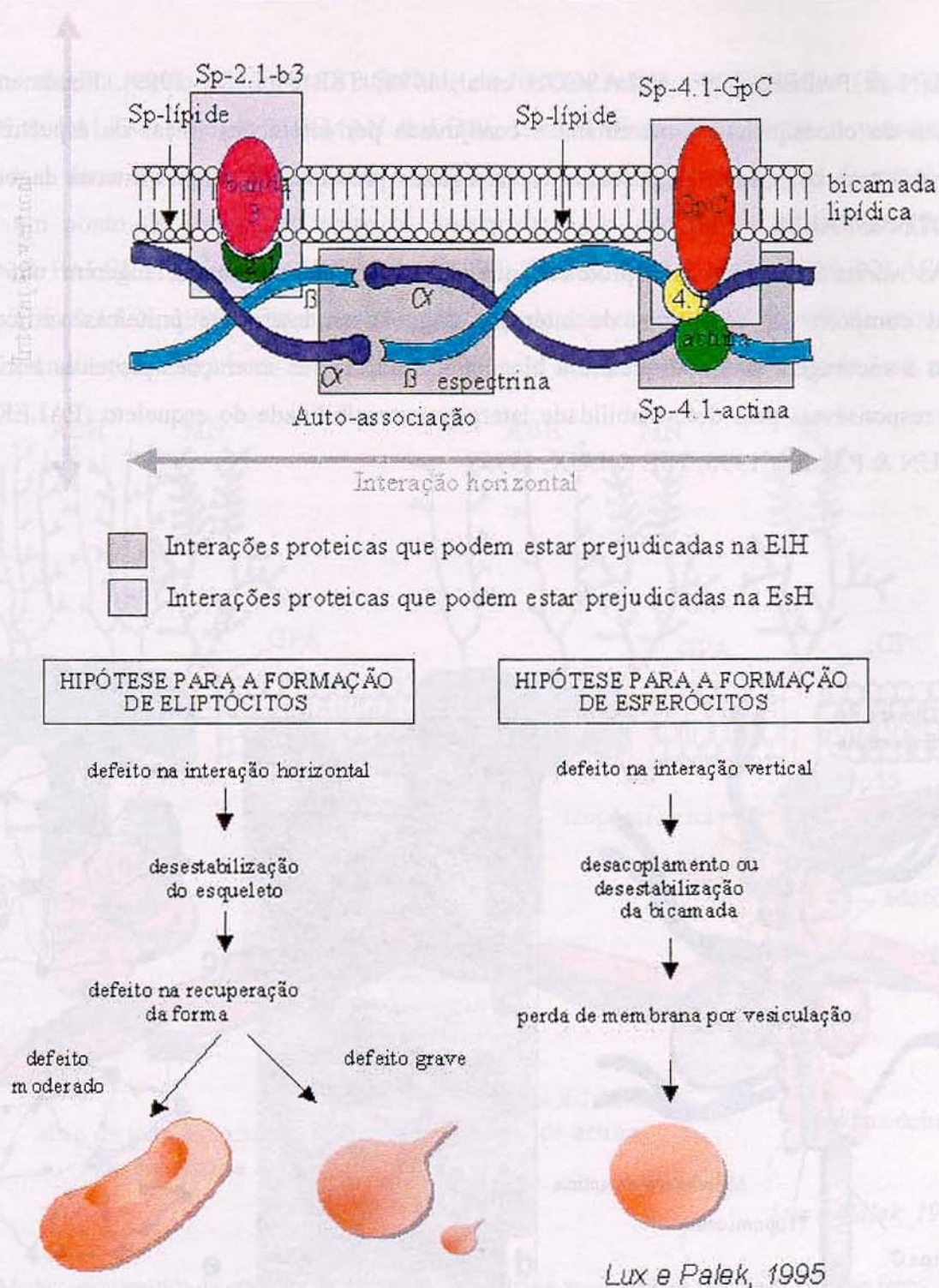


Figura 4: Esquema da membrana eritrocitária, evidenciando as interações proteicas horizontais e verticais. As hipóteses para a formação dos eritrócitos com morfologia alterada na eliptocitose e esferocitose hereditárias (EIH e EsH) também estão esquematizadas. Modificado a partir de Lux e Palek (1995).

Espectrina

A espectrina é uma das proteínas mais abundantes do esqueleto da membrana eritrocitária, estando presente em aproximadamente duzentas mil cópias por célula (GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). Ela tem a função de manter a forma celular, regular a mobilidade lateral das proteínas integrais da membrana e fornecer suporte estrutural à dupla camada lipídica (GOODMAN *et al*, 1995; GALLAGHER & FORGET, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER & FORGET, 1998).

Os humanos apresentam quatro genes relacionados à espectrina: os genes da alfa e beta-espectrina e os genes da alfa e beta-fodrina (também denominadas de espectrinas não eritróides) (LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al*, 1995). A alfa-espectrina é somente expressa no eritrócito, enquanto que a beta-espectrina é expressa também no tecido muscular e cerebral (WINKELMANN & FORGET, 1993; GOODMAN *et al*, 1995; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Recentemente, foi descrito um promotor responsável pela expressão da isoforma eritróide da beta-espectrina (GALLAGHER *et al*, 1999). A fodrina, por sua vez, é expressa em todas as células e tecidos e é amplamente distribuída nos vertebrados e invertebrados (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; PASCUAL *et al*, 1997; BECK & NELSON, 1998). Estas evidências sugerem que a espectrina é uma proteína mais especializada e evolutivamente mais recente que a fodrina (WINKELMANN & FORGET, 1993; LUX & PALEK, 1995). A espectrina e a fodrina são similares estrutural e funcionalmente e são membros de uma superfamília de proteínas, que inclui a α -actinina e a distrofina (DHERMY, 1991; AMIN *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995; BECK & NELSON, 1998; IOLASCON *et al*, 1998). Uma característica comum a todos os membros desta superfamília de proteínas é a capacidade de se ligar à actina.

O gene que codifica a alfa-espectrina eritróide está localizado no cromossomo 1 na região q22-q23 (HUEBNER *et al*, 1985; GOODMAN *et al*, 1995; LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY *et al*, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). Estima-se para o gene um tamanho de 80 kb correspondente ao DNA genômico. O cDNA é formado por 8001 pb, compreendido por 52 éxons que codificam 2429 aminoácidos (SAHR *et al*, 1990; KOTULA *et al*, 1991; GOODMAN *et al*, 1995; DELAUNAY *et al*, 1996; IOLASCON *et al*, 1998).

O gene que codifica a beta-espectrina eritróide encontra-se no cromossomo 14 (PRCHAL *et al.*, 1987; GOODMAN *et al.*, 1995), banda q23-q24.2 (FUKUSHIMA *et al.*, 1990; LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY *et al.*, 1996; IOLASCON *et al.*, 1998). Este gene de cerca de 100 kb, compreende 32 éxons com 6411 pb correspondentes ao cDNA, que codificam 2137 aminoácidos (WINKELMANN *et al.*, 1990a; AMIN *et al.*, 1993; DELAUNAY *et al.*, 1996; IOLASCON *et al.*, 1998).

As cadeias alfa e beta da espectrina apresentam uma organização estrutural similar, que consiste em uma sucessão de repetições de 106 aminoácidos (fig. 5) (SPEICHER & MARCHESI, 1984; LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al.*, 1995; GALLAGHER *et al.*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY *et al.*, 1996; IOLASCON *et al.*, 1998).

A alfa-espectrina apresenta 22 unidades de repetição, sendo que 20 destas repetições são relativamente homólogas e são numeradas de $\alpha 1$ - $\alpha 9$ e $\alpha 11$ - $\alpha 21$ (SAHR *et al.*, 1990; LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al.*, 1995; GALLAGHER *et al.*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al.*, 1998). Dois segmentos da alfa-espectrina não apresentam homologia com os demais: um segmento central curto, que corresponde à repetição $\alpha 10$ e possui um domínio SH3, e um segmento C-terminal mais longo (correspondente à repetição $\alpha 22$), que contem dois domínios de ligação de cálcio do tipo "EF hand" (fig. 5) (SAHR *et al.*, 1990; LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al.*, 1995; GALLAGHER *et al.*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al.*, 1998). Acredita-se que o cálcio tenha uma influência na estrutura do citoesqueleto (TAKAKUWA & MOHANDAS N, 1988; TANAKA *et al.*, 1991), embora nenhuma evidência direta exista de que a alfa-espectrina se ligue ao cálcio através dos seus domínios "EF hand" (GOODMAN *et al.*, 1995; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al.*, 1998a). A função do domínio SH3 da alfa-espectrina é desconhecida, mas em outras proteínas estes domínios funcionam como sítios de ligação de várias proteínas sinalizadoras às membranas (KOCH *et al.*, 1991; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al.*, 1998a). Logo, na hemácia, este domínio poderia ser importante para as interações do citoesqueleto e para as vias de sinalização celular (GOODMAN *et al.*, 1995).

A beta-espectrina, por sua vez, é numerada de $\beta 1$ a $\beta 17$ com 17 repetições homólogas de 106 aminoácidos (WINKELMANN *et al.*, 1990a; LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al.*, 1995; GALLAGHER *et al.*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY *et al.*, 1996; IOLASCON *et al.*, 1998), além de um segmento não homólogo N-terminal que contém o domínio de ligação da

actina e um segmento não homólogo C-terminal curto que contém, pelo menos, quatro sítios de fosforilação e está envolvido na auto-associação dos heterodímeros de espectrina (fig. 5) (KARINCH *et al*, 1990; WINKELMANN *et al*, 1990a; AMIN *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al*, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996). A repetição $\beta 15$ e parte da repetição $\beta 16$ são modificadas, formando o sítio de ligação à anquirina (fig. 5) (KENNEDY *et al*, 1991; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). O sítio de ligação a proteína 4.1 não é bem definido, mas situa-se provavelmente logo após o sítio de ligação à actina na região N-terminal (fig. 5) (BECKER *et al*, 1990; LUX & PALEK, 1995; GOODMAN *et al*, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998).

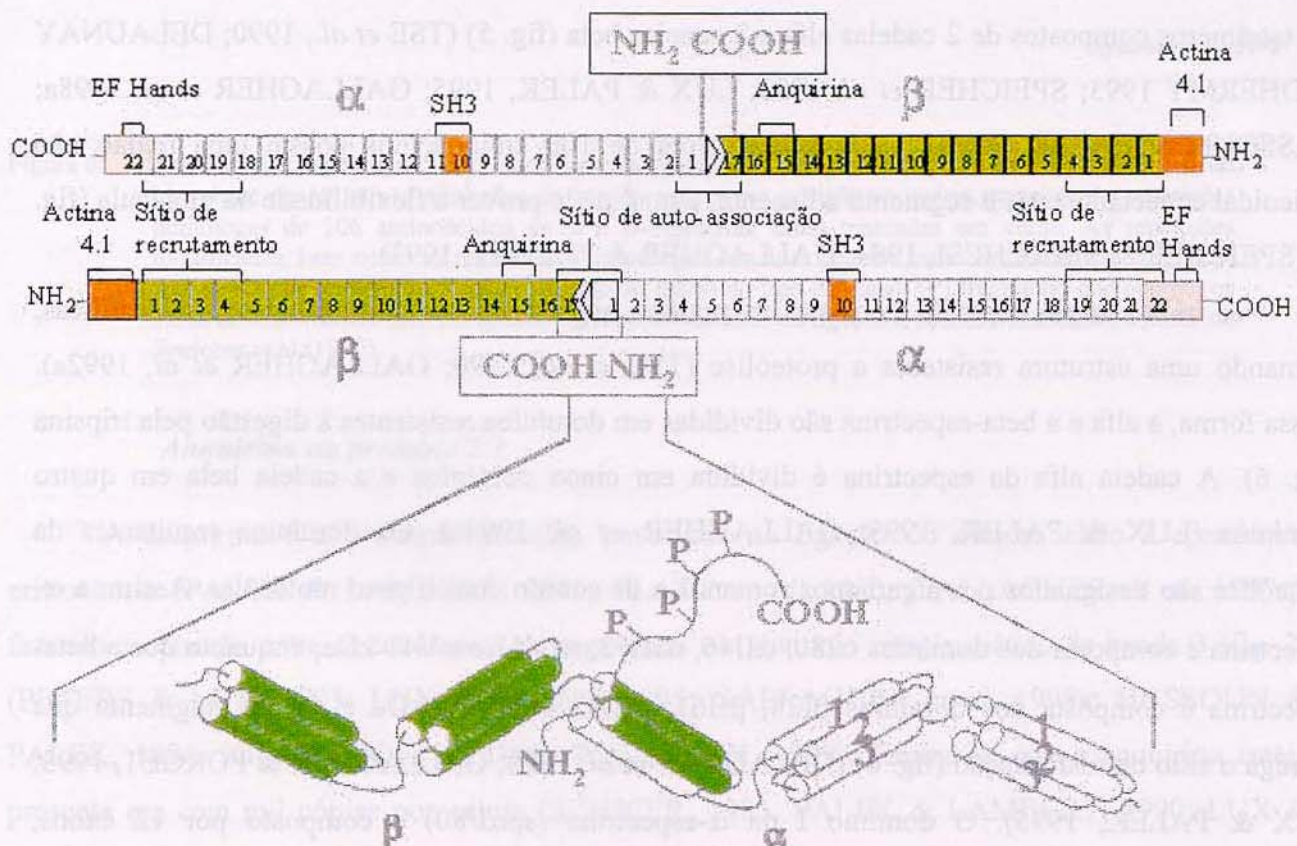
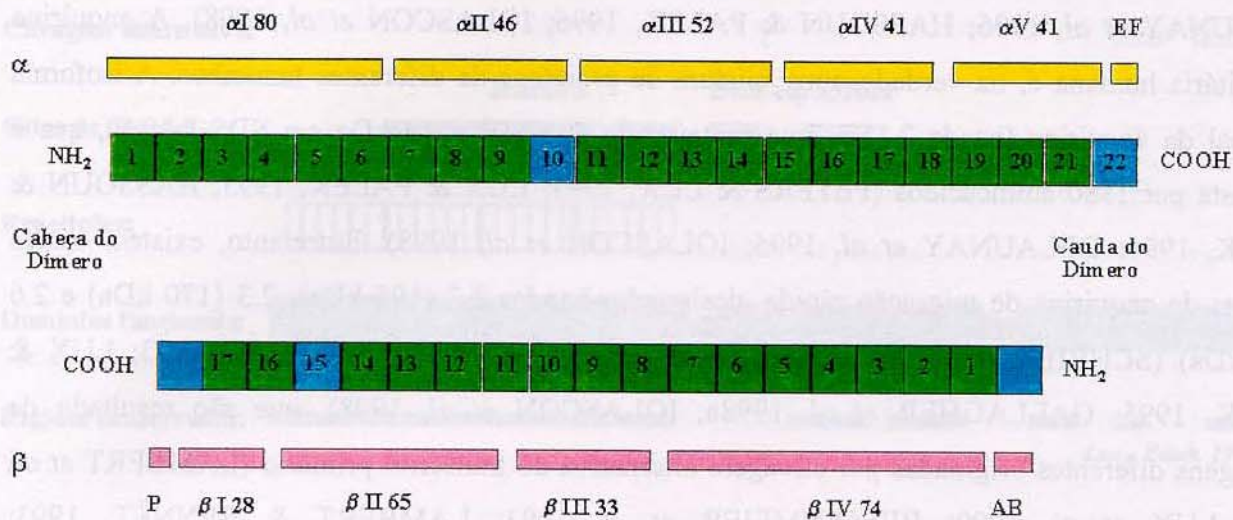


Figura 5: Estrutura da espectrina I. A estrutura das cadeias da α e β-espectrina, mostrando as repetições homólogas em verde ou branco e as repetições ou regiões não homólogas em laranja. Os sítios funcionais conhecidos estão assinalados. Na parte inferior da figura está o modelo de auto-associação da espectrina, com a formação de uma tripla-hélice híbrida entre as cadeias da α- e β-espectrina. (P) sítio de fosforilação. Modificado a partir de Lux e Palek (1995).

A formação dos heterodímeros de espectrina compostos de uma cadeia alfa e uma cadeia beta se dá como o fechamento de um zíper (“*zipper-like*”) a partir de um sítio de recrutamento composto de quatro repetições de cada cadeia ($\alpha 19$ - $\alpha 22$ e $\beta 1$ - $\beta 4$) e está localizado na cauda do dímero, onde ocorre a ligação com a actina (fig. 5) (SPEICHER *et al*, 1992; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999).

Segundo o modelo de SPEICHER & MARCHESI (1984), cada repetição de 106 aminoácidos está na forma de uma tripla hélice, sendo que 2 hélices β juntam-se a uma hélice α ao nível de cabeça de dímeros opostos (TSE *et al*, 1990; SPEICHER *et al*, 1993; DELAUNAY & DHERMY, 1993; TSE & LUX, 1999), formando uma tripla-hélice híbrida e associando os dímeros em tetrâmeros compostos de 2 cadeias alfa e 2 cadeias beta (fig. 5) (TSE *et al*, 1990; DELAUNAY & DHERMY 1993; SPEICHER *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996). Cada hélice tripla de 106 aminoácidos possui uma região não helicoidal conectante com o segmento adjacente, a qual pode prover a flexibilidade da molécula (fig. 5) (SPEICHER & MARCHESI, 1984; GALLAGHER & FORGET, 1993).

A hélice tripla repetida consiste de regiões alternadamente hidrofóbicas e hidrofílicas, formando uma estrutura resistente a proteólise (TSE *et al*, 1990; GALLAGHER *et al*, 1992a). Dessa forma, a alfa e a beta-espectrina são divididas em domínios resistentes à digestão pela tripsina (fig. 6). A cadeia alfa da espectrina é dividida em cinco domínios e a cadeia beta em quatro domínios (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Os domínios resultantes da proteólise são designados por algarismos romanos e de acordo com o peso molecular. Assim, a α -espectrina é composta dos domínios αI_{80} , αII_{46} , αIII_{52} , αIV_{41} e αV_{41} kDa, enquanto que a beta-espectrina é composta dos domínios βI_{28} , βII_{65} , βIII_{33} e βIV_{74} kDa e de um fragmento que carrega o sítio de fosforilação (fig. 6) (DELAUNAY *et al*, 1990; GALLAGHER & FORGET, 1993; LUX & PALEK, 1995). O domínio I da α -espectrina ($sp\alpha I/80$) é composto por 12 éxons, correspondentes a 17 kb, que codificam os primeiros 526 aminoácidos, formando 5 estruturas helicoidais triplas (SAHR *et al*, 1989; PALEK & LAMBERT, 1990; DELAUNAY & DHERMY, 1993). Este domínio localiza-se na região N-terminal e corresponde a região envolvida na auto-



Speicher et al, 1992

Figura 6: Estrutura da espectrina II. Os domínios da resistência à digestão triptica das cadeias α e β da espectrina encontram-se alinhados de acordo com a sua posição na cadeia proteica. As repetições homólogas de 106 aminoácidos da α e β -espectrina estão marcadas em verde. As repetições modificadas, bem como as regiões não homólogas das duas cadeias estão marcadas em azul. (EF) fragmento que contém os sítios de ligação de cálcio do tipo EF-hand. (P) fragmento que contém os sítios de fosforilação. (AB) fragmento que contém o sítio de ligação à actina. Modificado a partir de Speicher et al (1992).

Anquirina ou proteína 2.1

A anquirina é a principal proteína envolvida na ligação do citoesqueleto à membrana eritrocitária (PALEK & LAMBERT, 1990; PLATT *et al*, 1993; GALLAGHER *et al*, 1997c), fazendo a conexão entre os tetrâmeros de espectrina e o domínio citoplasmático da banda 3 (fig. 2) (PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999). Estima-se que a anquirina esteja presente em cem mil cópias por célula (SCHRIER, 1985; PALEK & LAMBERT, 1990; LUX & PALEK, 1995; DELAUNAY *et al*, 1996).

O gene que codifica a proteína 2.1 ou anquirina está localizado no cromossomo 8 na região p11.2, compreendendo 42 éxons, com cDNA estimado em 7 Kb (PETERS & LUX, 1993; DELAUNAY *et al*, 1996; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). A anquirina eritrocitária humana é, na verdade, uma mistura de proteínas de diferentes tamanhos. A isoforma

DELAUNAY *et al*, 1996; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). A anquirina eritrocitária humana é, na verdade, uma mistura de proteínas de diferentes tamanhos. A isoforma principal da anquirina (banda 2.1) é uma proteína de 206 kDa (210 kDa em SDS-PAGE), que é composta por 1880 aminoácidos (PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY *et al*, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). Entretanto, existem outras espécies da anquirina de migração rápida, designadas bandas 2.2 (195 kDa), 2.3 (170 kDa) e 2.6 (145 kDa) (SCHRIER, 1985; PALEK & LAMBERT, 1990; PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998), que são resultado de mensagens diferentes originadas por clivagem alternativa do transcrito primário (LAMBERT *et al*, 1990; LUX *et al*, 1990; BIRKENMEIER *et al*, 1993; LAMBERT & BENNET, 1993; GALLAGHER *et al*, 1992b; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; GALLAGHER *et al*, 1997c).

Assim como a espectrina, a anquirina pertence a uma família multigênica e os diferentes tipos de anquirina são amplamente expressos, talvez em todas as células (PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). A anquirina eritróide é expressa também em miócitos, em macrófagos, nas células endoteliais e no cérebro (MOON *et al*, 1985; PETERS *et al*, 1991; PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Assim como a anquirina eritróide, as anquirinas não eritróides se ligam a inúmeras proteínas integrais das membranas celulares, sugerindo que as anquirinas tem a função de recrutar estas proteínas integrais para domínios específicos das membranas, presumidamente através de interações locais com proteínas do citoesqueleto (PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; GALLAGHER *et al*, 1997c). Além disso, as anquirinas funcionam como adaptadores moleculares: proteínas que mediam e, presumidamente, regulam as interações entre componentes integrais da membrana (transportadores, receptores e proteínas adesivas) com elementos do citoesqueleto (PETERS & LUX, 1993)

A isoforma principal da anquirina eritróide (banda 2.1) é composta de três domínios funcionais distintos: um domínio N-terminal de 89 kDa, um domínio central de 62 kDa e um domínio C-terminal de 55 kDa (fig. 7). Todos os três domínios apresentam uma estrutura terciária globular e presume-se que exista uma molécula de anquirina por tetrâmero de espectrina (PALEK & LAMBERT, 1990; PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995).

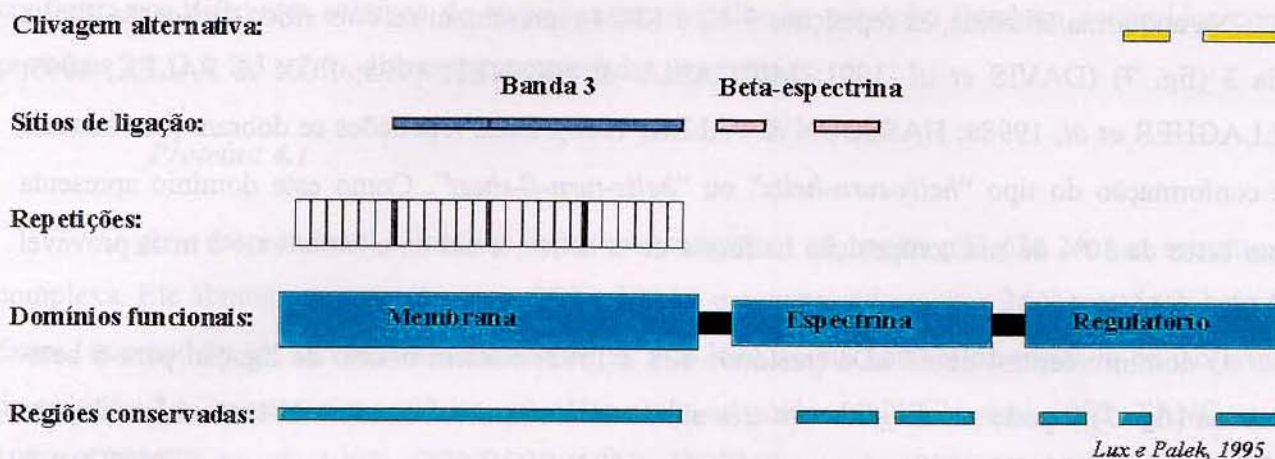


Figura 7: Estrutura da anquirina eritrocitária. O domínio de ligação à membrana (89 kDa) contém 24 repetições de 33 aminoácidos agrupadas em 4 unidades de dobramento, com 6 repetições cada. As repetições 7-12 (unidade de dobramento 2) e 13-24 (unidades de dobramento 3 e 4) formam dois sítios cooperativos para ligação à banda 3. O domínio de ligação à espectrina (62 kDa) contém o sítio de ligação à espectrina. O domínio regulatório (55 kDa) modula a função de ligação dos outros dois domínios e é alvo do processo de clivagem alternativa, que gera as diferentes isoformas da anquirina na hemácia e nos outros tecidos. Modificado a partir de Lux e Palek (1995).

O domínio N-terminal de 89 kDa (resíduos 2 a 827) contém o sítio de ligação para banda 3 (fig. 7). Os 10 primeiros aminoácidos e os últimos 30 são únicos, mas o núcleo do domínio (resíduos 11 a 796) é formado por 24 repetições sucessivas de 33 aminoácidos, dos quais 15 são evolutivamente bem conservados (LAMBERT *et al*, 1990; LUX *et al*, 1990; PETERS & LUX, 1993; HASSOUN & PALEK, 1996; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; GALLAGHER *et al*, 1997c; IOLASCON *et al*, 1998). Estas repetições têm sido descritas em diferentes organismos e em um grande número de proteínas evolutiva e funcionalmente muito diferentes (LUX *et al*, 1990; BLANK *et al*, 1992; PETERS & LUX, 1993). A conservação evolutiva destas repetições em um grupo tão diverso de proteínas sugere um importante papel estrutural e funcional (LUX *et al*, 1990; PETERS & LUX, 1993). Provavelmente, as porções conservadas das repetições estão envolvidas na formação de uma estrutura comum, que coloca os resíduos variáveis em diferentes arranjos na superfície da proteína, que, por sua vez, são capazes de interagir com uma variedade de proteínas. O sucesso evolutivo destas repetições se deve, portanto, ao fato destas repetições constituírem um módulo versátil de geração de interfaces de dimerização altamente específicas, que tem sido moldadas pela evolução para interagir com diferentes proteínas e até mesmo com o DNA (PETERS & LUX, 1993).

Na anquirina eritróide, as repetições 7-12 e 13-24 representam os dois sítios de ligação com a banda 3 (fig. 7) (DAVIS *et al*, 1991; MICHAELY & BENNET, 1995; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996). Estas repetições se dobram para assumir uma conformação do tipo “*helix-turn-helix*” ou “*helix-turn- β -sheet*”. Como este domínio apresenta apenas cerca de 30% de sua composição na forma de α -hélice, a última alternativa é a mais provável (PETERS & LUX, 1993).

O domínio central de 62 kDa (resíduos 828 a 1382) contém o sítio de ligação para a beta-espectrina (fig. 7) e pode ser dividido em três subdomínios: um subdomínio N-terminal ácido, um central básico e um C-terminal neutro, sendo estes dois últimos altamente conservados (PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; IOLASCON *et al*, 1998). O sítio de ligação à espectrina é formado pela região inicial (N-terminal) e central deste domínio (PLATT *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996). A porção conservada central deste domínio tem a função de ligação específica à espectrina, enquanto que a porção variável na região N-terminal pode dar contornos distintos ao sítio de ligação com a espectrina, de tal forma que a anquirina eritrocitária se ligaria preferencialmente com a espectrina eritrocitária e outros tipos de anquirina com outros tipos de espectrina (PETERS & LUX, 1993).

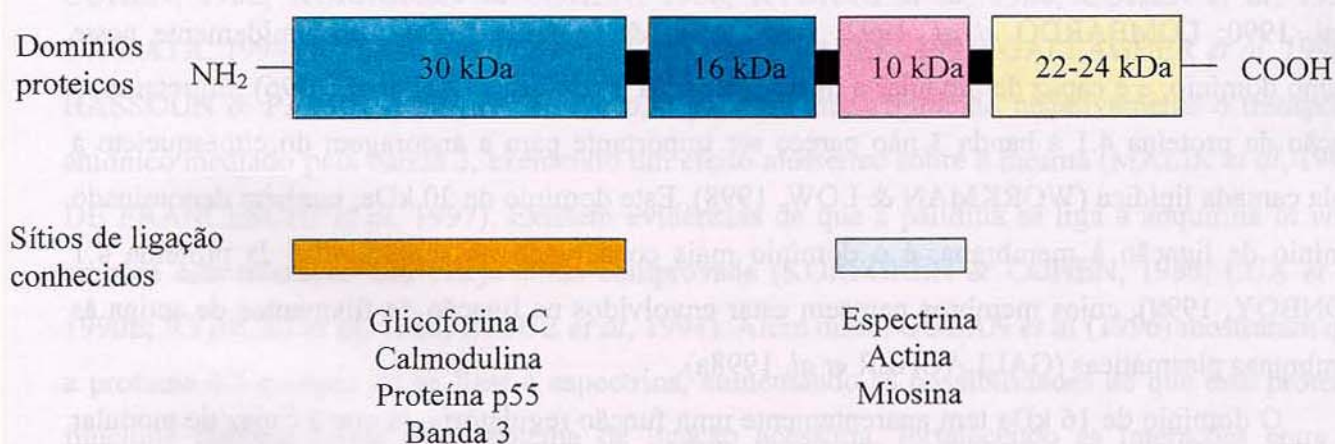
O domínio C-terminal de 55 kDa (resíduos 1383 a 1881) é chamado de regulatório, uma vez que ele contém seqüências regulatórias que aumentam ou diminuem a afinidade da anquirina pela espectrina e pela banda 3, modulando desta forma estas interações (fig. 7) (LUX *et al*, 1990a; HALL & BENNET, 1987; DAVIS *et al*, 1992; PETERS & LUX, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). Algumas destas seqüências regulatórias são geradas por clivagem alternativa, criando diferentes isoformas da anquirina com diferentes tamanhos e funções (HALL & BENNET, 1987; LAMBERT *et al*, 1990; LUX *et al*, 1990a; DAVIS *et al*, 1992; GALLAGHER *et al*, 1992b; BIRKENMEIER *et al*, 1993; LAMBERT & BENNET, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; GALLAGHER *et al*, 1997c; IOLASCON *et al*, 1998). A banda 2.2, por exemplo, é gerada por clivagem alternativa (LAMBERT *et al*, 1990; LUX *et al*, 1990; DAVIS *et al*, 1992) e é considerada uma isoforma ativada da anquirina, já que apresenta afinidade três vezes maior pela espectrina e maior capacidade de ligação à banda 3 (HALL & BENNET, 1987; DAVIS *et al*, 1992). Este mecanismo de clivagem alternativa, portanto,

conferiria aos diferentes subtipos de anquirina encontrados no eritrócito (também conhecidos como proteínas 2.1, 2.2, 2.3 e 2.6), diferentes propriedades regulatórias.

Proteína 4.1

O gene da proteína 4.1 localiza-se no cromossomo 1 na região p33-p34.2 e sua estrutura é complexa. Ele abrange uma região entre 200 e 300 kb e contém pelo menos 24 éxons, incluindo 10 éxons, que podem ser clivados alternativamente. Isto leva a uma notável diversidade de isoformas da proteína 4.1, expressas nas células eritróides e não-eritróides (COHEN *et al*, 1982; TANG *et al*, 1990; CHASIS *et al*, 1993; CONBOY, 1993; HORNE *et al*, 1993; HUANG *et al*, 1993, DELAUNAY *et al*, 1996; BAKLOUTI *et al*, 1997; SCHISCHMANOFF *et al*, 1997; CONBOY, 1999). Esta proteína pertence a uma superfamília de proteínas que inclui a talina, ezrina, moesina e radixina (FUNAYAMA *et al*, 1991; LANKES & FURTHMAYR, 1991; LUX & PALEK, 1995; DELAUNAY *et al*, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a).

A proteína 4.1 eritróide atua conectando os tetrâmeros de espectrina no plano do esqueleto e ajudando a ancorar o citoesqueleto à membrana subjacente (Figs 2 e 3) (CONBOY, 1993). É uma proteína globular de tamanho predito de 66 kDa, mas migra como uma proteína de 80 kDa em géis de SDS (CONBOY *et al*, 1986; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; CONBOY, 1999) e está presente em cerca de duzentas mil cópias por célula (CONBOY, 1993; GALLAGHER



Lux e Paleck, 1995

Figura 8: Estrutura da proteína 4.1, mostrando os domínios proteicos e as funções conhecidas. Modificado a partir de Lux e Palek (1995).

et al, 1998a). Existem quatro domínios estruturais definidos por proteólise: um domínio N-terminal de 30 kDa, dois domínios centrais de 16 e 10 kDa e um domínio C-terminal de 22/24 kDa (fig. 8) (LETO & MARCHESI, 1984; CONBOY, 1993; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a).

No plano do citoesqueleto, a proteína 4.1 atua amplificando a interação espectrina/actina, que, de outra forma, é uma interação fraca (figs. 2 e 3). Esta atividade é realizada através da ligação da proteína 4.1 com a beta-espectrina e actina (FIGS. 2 e 3) (COHEN & FOLEY, 1982; OHANIAN *et al*, 1984; COHEN & FOLEY, 1984; BECKER *et al*, 1990; CONBOY, 1993; MORRIS & LUX, 1995; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). A região da proteína 4.1 envolvida na interação com a espectrina corresponde a um peptídeo de 21 aminoácidos localizado na porção N-terminal do domínio de 10 kDa e a região envolvida na interação com a actina corresponde aos 26 aminoácidos seguintes localizados no mesmo domínio (LETO & MARCHESI, 1984; CORREAS *et al*, 1986a e b; DISCHER *et al*, 1993; CONBOY, 1993; HORNE *et al*, 1993; SCHISCHMANOFF *et al*, 1995; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a).

A proteína 4.1 também se liga à membrana e funciona como um segundo sítio de ancoragem para a espectrina, através da ligação do domínio de 30 kDa com a glicoforina C (figs. 2 e 8) (REID *et al*, 1990; CONBOY, 1993; GASCARD & COHEN, 1994; HEMMING *et al*, 1995; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; WORKMAN & LOW, 1998, CONBOY, 1999). Existem evidências de que a proteína 4.1 se liga à banda 3 (PASTERNAK *et al*, 1985; DANILOV *et al*, 1990; LOMBARDO *et al*, 1992; GASCARD & COHEN, 1994), presumidamente neste mesmo domínio, e é capaz de modular a interação banda 3/anquirina (AN *et al*, 1996). Entretanto, a ligação da proteína 4.1 à banda 3 não parece ser importante para a ancoragem do citoesqueleto à dupla camada lipídica (WORKMAN & LOW, 1998). Este domínio de 30 kDa, também denominado domínio de ligação à membrana, é o domínio mais conservado na superfamília da proteína 4.1 (CONBOY, 1999), cujos membros parecem estar envolvidos na ligação de filamentos de actina às membranas plasmáticas (GALLAGHER *et al*, 1998a).

O domínio de 16 kDa tem aparentemente uma função regulatória, já que é capaz de modular a afinidade de ligação dos domínios adjacentes pela banda 3 e pela espectrina (LING *et al*, 1988; EDER *et al*, 1986; CONBOY, 1993). Nenhuma função de ligação específica ou função regulatória foi atribuída, até o momento, para o domínio C-terminal de 22/24 kDa na principal isoforma

eritrocitária da proteína 4.1 (CONBOY, 1993). Entretanto, relatos de que esta região é capaz de se ligar à proteína NuMA do aparelho mitótico nuclear (MATTAGAJASINGH *et al*, 1996) e à imunofilina FKBP13 (WALENSKY *et al*, 1998), sugere a existência de múltiplas funções para este domínio nas diferentes isoformas da proteína 4.1 nas células eucarióticas (CONBOY, 1999).

Palidina ou proteína 4.2

A palidina ou proteína 4.2 é uma proteína de 72 kDa e está presente em cerca de duzentas e cinquenta mil cópias por célula (COHEN *et al*, 1993). O gene da proteína 4.2 ou palidina situa-se no cromossomo 15q15-q21, ocupa uma região de cerca de 20 Kb e é composto de 13 éxons (NAJFELD *et al*, 1992; KORSGREN & COHEN, 1991; HASSOUN & PALEK, 1996; DELAUNAY *et al*, 1996; IOLASCON *et al*, 1998). Existem várias isoformas geradas por clivagem alternativa dos éxons 1, 3 e 5 na região N-terminal da proteína (RYBICKI *et al*, 1988; RYBICKI *et al*, 1994; YAWATA, 1994; KORSGREN & COHEN, 1991; BOUHASSIRA *et al*, 1990; BOUHASSIRA *et al*, 1992; SUNG *et al*, 1992; COHEN *et al*, 1993; KANZAKI *et al*, 1995a e b; WADA *et al*, 1999). A proteína de 72 kDa, onde apenas parte do éxon 1 está ausente, é a espécie predominante nos eritrócitos normais. O significado da existência destas diferentes isoformas é desconhecido.

Sabe-se que a palidina se liga ao domínio citoplasmático da banda 3 (figs. 1 e 2) e parece ter um importante papel, fortalecendo a interação entre a banda 3 e a anquirina (KORSGREN & COHEN, 1986; KORSGREN & COHEN, 1988; RYBICKI *et al*, 1988; COHEN *et al*, 1993; YAWATA, 1994; RYBICKI *et al*, 1995a e b; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; HASSOUN & PALEK, 1996). Além disso, a palidina atua regulando negativamente o transporte aniônico mediado pela banda 3, exercendo um efeito alostérico sobre a mesma (MALIK *et al*, 1993; DE FRANCESCHI *et al*, 1997). Existem evidências de que a palidina se liga à anquirina *in vivo*, embora esta interação não esteja ainda comprovada (KORSGREN & COHEN, 1988; LUX *et al*, 1990b; RYBICKI *et al*, 1988; INOUE *et al*, 1994). Além disso, GOLAN *et al* (1996) mostraram que a proteína 4.2 é capaz de se ligar à espectrina, aumentando as possibilidades de que esta proteína funcione também como uma proteína de ligação acessória, fortalecendo as interações entre as proteínas do citoesqueleto e a banda 3 (RYBICKI *et al*, 1996).

Outra característica interessante desta proteína é a sua homologia com as transglutaminases, como o fator de coagulação VIII, sugerindo que a proteína 4.1 e as transglutaminases foram

originadas de um ancestral comum (KORSGREN *et al*, 1990; SUNG *et al*, 1990; KORSGREN & COHEN, 1991; KIM *et al*, 1992; POLAKOWSKA *et al*, 1992; PHILIPS *et al*, 1990; PHILIPS *et al*, 1992; WERAARCHAKUL-BOONMARK *et al*, 1992; COHEN *et al*, 1993; TOKUNAGA *et al*, 1993; KORSGREN & COHEN, 1994; RYBICKI *et al*, 1994; LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a). A palidina, entretanto, não tem atividade de transglutaminase (KORSGREN *et al*, 1990), de tal forma que uma outra característica comum a estas proteínas deve ser a responsável pela manutenção evolutiva desta homologia (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Apesar da boa caracterização genética e do possível envolvimento na estabilização da membrana, a função exata da proteína 4.2 permanece elusiva (KORSGREN & COHEN, 1994; HASSOUN & PALEK, 1996; ZHU *et al*, 1998).

Actina

A actina eritrocitária é estrutural e funcionalmente similar a outras actinas (TILNEY & DETMERS, 1975; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Entretanto, diferentemente das outras actinas não musculares, a actina eritrocitária está presente sob a forma de protofilamentos com cerca de 12 a 14 monômeros de comprimento, organizados em uma dupla-hélice curta (BYERS & BRANTON, 1985; LIU *et al*, 1987; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Certas evidências sugerem que o estado de polimerização da actina é funcionalmente importante para a hemácia, aumentando ou diminuindo a flexibilidade da membrana (NAKASHIMA & BEUTLER, 1979; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Finalmente, a actina se liga à beta-espectrina em uma interação fraca, que é coadjuvada pela proteína 4.1 (COHEN & FOLEY, 1982; OHANIAN *et al*, 1984; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a).

Defeitos congênitos nas proteínas da membrana eritrocitária são causas comuns de anemia hemolítica crônica como, por exemplo, a eliptocitose, a piropoiquilocitose e a esferocitose hereditárias.

1.2 A Eliptocitose Hereditária (ElH) e a Piropoiquilocitose Hereditária (PPH)

A Eliptocitose Hereditária (ElH) constitui um grupo clínica, bioquímica e geneticamente heterogêneo de doenças da membrana eritrocitária (GALLAGHER *et al*, 1998a; TSE & LUX, 1999), caracterizado pela presença de um grande número de hemácias elípticas (eliptócitos) ou ovais (ovalócitos) no sangue periférico (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a). A ElH apresenta também um amplo espectro de manifestações clínicas, desde o portador assintomático até a presença de anemia hemolítica grave dependente de transfusão (GALLAGHER *et al*, 1998a; TSE & LUX, 1999). Deste modo, os pacientes podem também apresentar icterícia pelo aumento da bilirrubina indireta, esplenomegalia, reticulocitose e redução de haptoglobina (DELAUNAY *et al*, 1990). Nos casos mais graves, manifesta-se a Piropoiquilocitose Hereditária (PPH), onde a morfologia eritrocitária assemelha-se àquela exibida por pacientes após o sofrimento de queimaduras térmicas (GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a), ocorrendo uma poiquilocitose acentuada, acompanhada de células de contorno bizarro, hemácias fragmentadas (esquizócitos), esferócitos (hemácias esféricas) e poucos ou nenhum eliptócito. Apesar da PPH ter sido considerada uma doença independente no passado, hoje sabe-se que ela é genética e bioquimicamente relacionada à ElH (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Pacientes portadores de PPH são freqüentemente homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações eliptocitogênicas ou, então, são portadores de um alelo eliptocitogênico acompanhado de um polimorfismo de baixa expressão (GALLAGHER *et al*, 1998a; TSE & LUX, 1999).

As estimativas para a incidência de ElH na população mundial oscilam em torno de 1 para cada 2000 até 1 para cada 4000 indivíduos. A incidência verdadeira é desconhecida porque a gravidade clínica da ElH é heterogênea e existem muitos portadores assintomáticos (GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a). Entretanto, sabe-se que a ElH é mais comum em indivíduos de origem africana, sendo que na África equatorial a incidência de ElH se aproxima de 1% (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Esta freqüência mais elevada se deve

provavelmente à pressão seletiva exercida pela malária, já que os eliptócitos conferem um certo grau de resistência à infecção malárica (SCHULMAN *et al*, 1990; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FERREIRA, 1997). A PPH apresenta uma herança de caráter recessivo, enquanto a ElH apresenta uma herança autossômica dominante (LUX & PALEK, 1995). Como a ElH e a PPH são diferentes manifestações da mesma síndrome, é correto afirmar que esta síndrome apresenta uma herança autossômica com dominância intermediária ou incompleta.

O defeito bioquímico principal dos eritrócitos portadores de ElH/PPH é uma fragilidade exacerbada do esqueleto da membrana eritrocitária (GALLAGHER & FERREIRA, 1997). Sabe-se que os precursores eritróides são arredondados (HARTZ *et al.*, 1984; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a) e que as células se tornam progressivamente mais elípticas à medida que envelhecem (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). É possível que as frágeis interações do esqueleto facilitem uma reorganização do mesmo após uma deformação celular prolongada ou repetitiva (fig. 4) (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a), como a que ocorre nos capilares. As bases moleculares deste defeito são mutações nos genes que codificam as proteínas do esqueleto da membrana, envolvidas na formação das interações proteicas na dimensão horizontal (fig. 4): alfa-espectrina, beta-espectrina e proteína 4.1 (TSE & LUX, 1999). Interessantemente, alguns casos de ElH foram associados com uma deficiência de Glicoforina C (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a).

1.2.1 Defeitos na auto-associação dos heterodímeros de espectrina

Mutações que afetam a integridade estrutural da espectrina são importantes desencadeadoras da ElH (TSE & LUX, 1999). Defeitos no sítio de auto-associação da espectrina são encontrados na maioria dos casos de ElH e em todos os casos de PPH (LUX & PALEK, 1995), tornando o citoesqueleto da membrana mecanicamente frágil e quebradiço (GALLAGHER & FERREIRA, 1997).

1.2.1.1 Defeitos da alfa-espectrina

Vinte e seis mutações no gene da alfa-espectrina já foram descritas em pacientes com ElH/PPH (tabela 1 – apêndice A). A maioria consiste de mutações de ponto do tipo missense

agrupadas em torno das primeiras unidades de repetição de 106 aminoácidos da alfa-espectrina, que constituem o sítio de auto-associação dos dímeros em tetrâmeros (TSE & LUX, 1999). Algumas mutações envolvem uma deleção “*in-frame*” de pequenos segmentos do peptídeo (tabela 1 – apêndice A). Estas mutações provavelmente impedem um dobramento correto da cadeia da alfa-espectrina, interferindo com a sua capacidade de interagir com a beta-espectrina (TSE & LUX, 1999).

Ao nível proteico a maioria destas mutações encontra-se no domínio αI de 80 kDa (fig. 6) correspondente à extremidade N-terminal da cadeia da alfa-espectrina (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Estes defeitos são de fácil caracterização, já que nestes casos, o peptídeo normal de 80 kDa ($\text{sp}\alpha I/80$), obtido pela digestão triptica da α -espectrina, encontra-se substituído por peptídeos de outros pesos moleculares, como por exemplo 50 kDa ($\text{sp}\alpha I/50$), 65 kDa ($\text{sp}\alpha I/65$), 74 kDa ($\text{sp}\alpha I/74$), etc (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Isto sugere a criação de novos sítios de clivagem para a tripsina ou o aumento da susceptibilidade de sítios já existentes devido, possivelmente, a alterações conformacionais ou a um dobramento incorreto das cadeias de espectrina.

Alguns casos foram descritos, com mutações no domínio αII de 46 kDa (tabela 1 – apêndice A), gerando também um padrão de digestão triptica anormal de fácil caracterização. Pacientes portadores de alterações no domínio αII apresentam uma sintomatologia clínica mais branda, que aquela apresentada por pacientes portadores de defeitos no domínio αI (TSE & LUX, 1999), já que essas mutações, devido à distância, tem um efeito mínimo sobre o processo de auto-associação (LUX & PALEK, 1995).

De forma geral, tem-se que quanto mais próxima estiver a mutação do sítio de auto-associação dos dímeros, maior será o seu efeito disruptivo (GALLAGHER *et al*, 1998a; TSE & LUX, 1999). Por exemplo, mutações no códon 28, que está localizado dentro do sítio de contato com a beta-espectrina, estão geralmente associadas com manifestações fenotipicamente graves da EIH ou com PPH. Por outro lado, a inserção de uma leucina no códon 154 (mutação freqüente na África Central e Ocidental), é fenotipicamente muito branda e está associada com pouca ou nenhuma eliptocitose (GALLAGHER & FERREIRA, 1997).

A gravidade de uma mutação específica também é influenciada pela quantidade de espectrina mutante presente na membrana, fator que é regulado por polimorfismos de baixa expressão, como o polimorfismo α^{LELY} (vide próxima seção) (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FERREIRA, 1997).

Casos de mutações que resultam em uma alfa-espectrina truncada (caracterizada por uma redução em sua massa molecular) são muito raros (TSE & LUX, 1999) e estão sempre associados à deleções “*in-frame*” (tabela 1 – apêndice A), ou seja, mutações que não alteram o quadro de leitura. Uma alteração do quadro de leitura está frequentemente associada ao aparecimento de um códon de terminação prematuro, que no caso da alfa-espectrina, levaria à perda do sítio de recrutamento (fig. 5) e, portanto, não haveria incorporação da alfa-espectrina mutante na membrana (TSE & LUX, 1999). Este tipo de mutação existe no gene da alfa-espectrina, mas está associado ao aparecimento de um segundo grupo de anemias hemolíticas: a esferocitose hereditária (EsH) (ver seção 1.3.1.1).

polimorfismo α^{LELY}

Como já mencionado anteriormente, uma das características mais marcantes da Eliptocitose hereditária é a sua variabilidade clínica. Isto é atribuído em parte à grande heterogeneidade de defeitos moleculares que podem provocar esta doença (PALEK & SAHR, 1992). Entretanto, em muitas famílias, existem indivíduos afetados que apresentam anemia hemolítica grave consistente com um diagnóstico de PPH, enquanto que outros membros da família apresentam apenas sintomas leves, condizentes com um diagnóstico clínico de EIH (TSE & LUX, 1999). Foi então proposto que nestes casos a mutação eliptocitogênica deveria associar-se a um segundo defeito genético, normalmente silencioso (GUETARNI *et al*, 1990). Este é o caso do polimorfismo α^{LELY} (“*low expression Lyon*”), que é um polimorfismo de baixa expressão e situa-se no gene da alfa-espectrina.

O alelo α^{LELY} é caracterizado pela presença de duas alterações moleculares principais, que se encontram sempre associadas *in cis* no gene da α -espectrina: uma no éxon 40 e uma no íntron 45 (WILMOTTE *et al*, 1993). O éxon 40 contribui com uma mutação de ponto na unidade de repetição $\alpha 18$, convertendo a leucina da posição 1857 para uma valina. Quando é considerada a estrutura terciária da proteína, nota-se que esta valina situa-se muito próxima do sítio de clivagem tríptica (lisina 1920), que é clivado para gerar os peptídeos correspondentes aos domínios αIV e αV da

espectrina (WILMOTTE *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995). A presença desta mutação resulta em uma clivagem mais acentuada deste sítio, resultando em uma concentração maior do peptídeo αV de 41 kDa após a digestão triptica (ALLOISIO *et al*, 1991; WILMOTTE *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995; WILMOTTE *et al*, 1997).

Entretanto, a característica de baixa expressão deste alelo deve-se a outra mutação, que consiste de uma substituição C→T na posição -12 dentro do sítio de clivagem 3' acceptor do íntron 45. Esta mutação interfere com a clivagem do éxon 46, de tal forma que este éxon é perdido em 50% dos transcritos de mRNA, gerando um padrão de clivagem alternativa parcial (fig. 9) (WILMOTTE *et al*, 1993; TSE & LUX, 1999). A deleção dos seis aminoácidos codificados por este éxon abole o sítio de recrutamento da alfa-espectrina (fig. 5), essencial para a formação dos heterodímeros com a beta-espectrina e a alfa-espectrina mutante deixa, portanto, de ser incorporada na membrana (WILMOTTE *et al*, 1997).

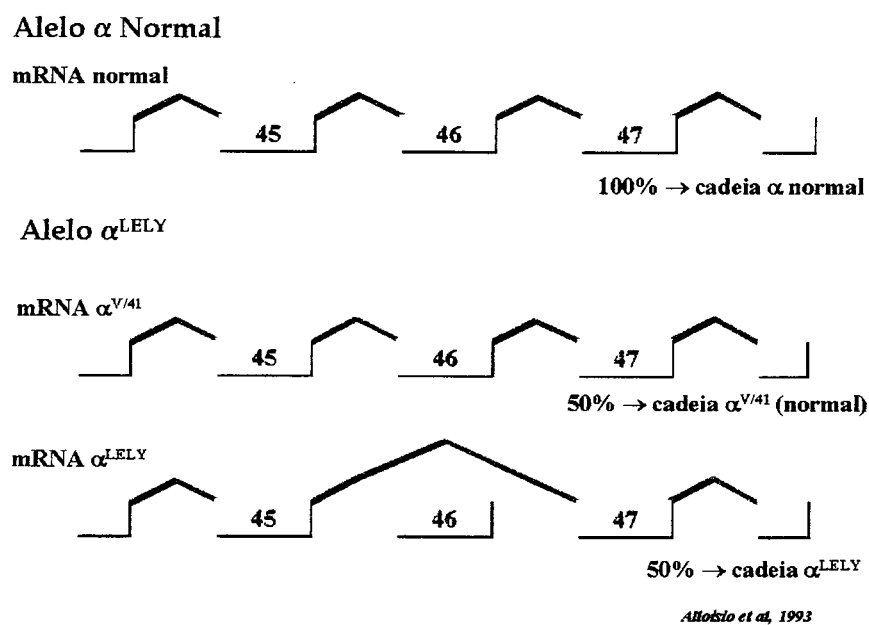


Figura 9: Mecanismo molecular da baixa expressão do alelo α^{LELY} . Clivagem alternativa parcial do éxon 46 devido à mutação C→T na posição -12 do íntron 45. Modificado a partir de Alloisio et al (1993).

Uma terceira alteração molecular no íntron 46 também foi descrita associada a este polimorfismo (posição -12, G→A), contudo ela não parece ser específica, ocorrendo também em alelos α -normais (WILMOTTE *et al*, 1993). Entretanto, até recentemente, não se podia descartar a

hipótese de que ela se associasse à mutação do íntron 45 para gerar o padrão de clivagem alternativa parcial do éxon 46 observado nos indivíduos portadores do polimorfismo (WILMOTTE *et al*, 1993). Entretanto, WILMOTTE *et al* (1999) mostraram que esta mutação não é capaz de gerar sozinha o padrão de clivagem alternativa parcial do éxon 46. Alternativamente, a mutação do íntron 45, mesmo isolada, é capaz de desencadear dramaticamente este processo (WILMOTTE *et al*, 1999). Portanto, se a mutação do íntron 46 exerce algum efeito modulatório sobre a mutação do íntron 45, este efeito é mínimo.

O alelo α^{LELY} é completamente silencioso em indivíduos normais, mesmo em homozigose (ALLOISIO *et al*, 1991; LUX & PALEK, 1995; TSE & LUX, 1999). Isto ocorre por duas razões: as cadeias da alfa-espectrina são normalmente sintetizadas em excesso em relação às cadeias da beta-espectrina, sendo que a quantidade de cadeias alfa é cerca de três a quatro vezes maior que a quantidade de cadeias beta. Além disso, a perda do éxon 46 ocorre em apenas metade dos transcritos (WILMOTTE *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995; TSE & LUX, 1999). Desta forma, sempre há cadeias alfa suficientes para interagirem, através do sítio de recrutamento, com as cadeias beta e serem incorporadas na membrana.

Entretanto, se este polimorfismo estiver associado *in trans* a um alelo que codifica uma alfa-espectrina estruturalmente anormal, esta alfa-espectrina mutante, portadora do defeito estrutural, será incorporada preferencialmente à membrana, aumentando a gravidade da doença (fig. 10A) (LUX & PALEK, 1995; TSE & LUX, 1999). Este tipo de associação já foi amplamente documentado para diferentes mutações eliptocitogênicas (GUETARNI *et al*, 1990; ALLOISIO *et al*, 1991; BAKLOUTI *et al*, 1991; BAKLOUTI *et al*, 1992; ALLOISIO *et al*, 1993; DALLA VENEZIA *et al*, 1993; GALLAGHER *et al*, 1993; LORENZO *et al*, 1993; WILMOTTE *et al*, 1993; PARQUET *et al*, 1994; PERROTA *et al*, 1994; RANDON *et al*, 1994; PERROTA *et al*, 1995) e, realmente, existe uma influência exercida por este alelo, que varia conforme a mutação específica.

Por outro lado, se este polimorfismo estiver associado *in cis* a um alelo que codifica um defeito estrutural da alfa-espectrina, a gravidade da doença é amenizada, já que a proteína portadora do defeito estrutural não será incorporada eficientemente à membrana (fig. 10B) (LUX & PALEK, 1995; TSE & LUX, 1999).

Outros alelos de baixa expressão já foram descritos (GALLAGHER *et al*, 1991b; HANSPAL *et al*, 1993; FOURNIER *et al*, 1997), mas o alelo α^{LELY} é especialmente importante, uma vez que

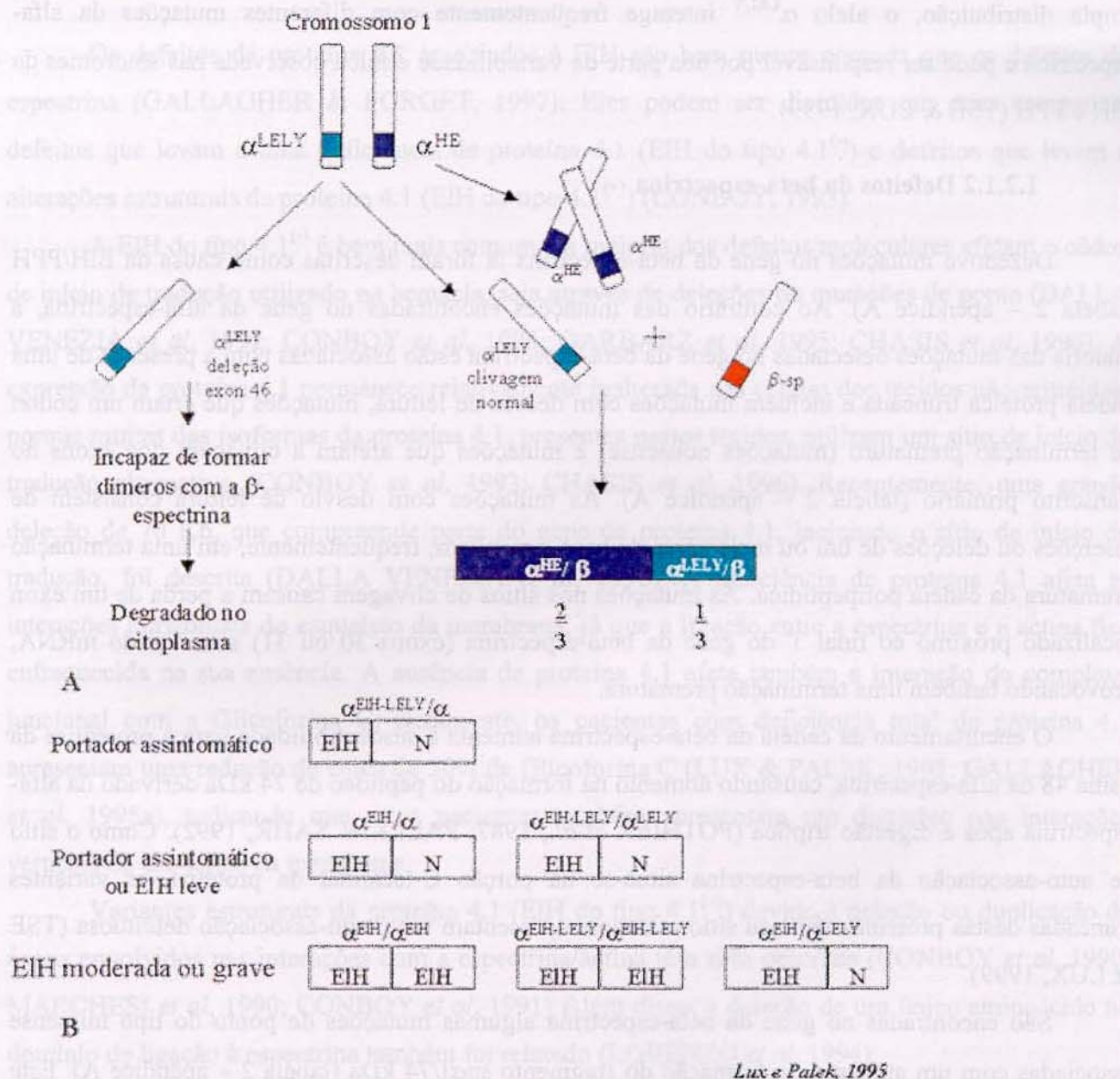


Figura 10: Efeito do alelo α^{LELY} na proporção da espectrina contendo cadeias α -normais e α -eliptocitogênicas. A) Efeito do alelo α^{LELY} associado *in trans*. B) Consequências clínicas das diferentes combinações possíveis entre os alelos α e α^{LELY} e um alelo eliptocitogênico (α^{ElH}). Modificado a partir de Lux e Palek (1995).

ele está presente em todas as populações já estudadas (negróides, caucasóides, asiáticos e índios brasileiros) em uma proporção significativamente elevada, variando de 16 a 30% (MARECHAL *et*

al, 1995; BASSÈRES *et al*, 1998a; PAPASSIDERI *et al*, 1999). Por causa da sua frequência e ampla distribuição, o alelo α^{LELY} interage frequentemente com diferentes mutações da alfa-espectrina e pode ser responsável por boa parte da variabilidade clínica observada nas síndromes da EIH e PPH (TSE & LUX, 1999).

1.2.1.2 Defeitos da beta-espectrina

Dezenove mutações no gene da beta-espectrina já foram descritas como causa da EIH/PPH (tabela 2 – apêndice A). Ao contrário das mutações encontradas no gene da alfa-espectrina, a maioria das mutações detectadas no gene da beta-espectrina estão associadas com a presença de uma cadeia proteica truncada e incluem mutações com desvio de leitura, mutações que criam um códon de terminação prematuro (mutações nonsense) e mutações que afetam a clivagem dos éxons no transcrito primário (tabela 2 – apêndice A). As mutações com desvio de leitura consistem de inserções ou deleções de um ou mais pares de base e resultam, frequentemente, em uma terminação prematura da cadeia polipeptídica. As mutações nos sítios de clivagem causam a perda de um éxon localizado próximo ao final 3' do gene da beta-espectrina (éxons 30 ou 31) ao nível do mRNA, provocando também uma terminação prematura.

O encurtamento da cadeia da beta-espectrina aumenta a susceptibilidade para a proteólise da lisina 48 da alfa-espectrina, causando aumento na formação do peptídeo de 74 kDa derivado da alfa-espectrina após a digestão triptica (POTHIER *et al.*, 1987; PALEK & SAHR, 1992). Como o sítio de auto-associação da beta-espectrina situa-se na porção C-terminal da proteína, as variantes truncadas destas proteínas têm seu sítio afetado e apresentam uma auto-associação defeituosa (TSE & LUX, 1999).

São encontradas no gene da beta-espectrina algumas mutações de ponto do tipo missense associadas com um aumento da formação do fragmento sp α I/74 kDa (tabela 2 – apêndice A). Este aumento ocorre, provavelmente, por interação inadequada das cadeias alfa e beta, aumentando a susceptibilidade à proteólise do resíduo de lisina da posição 48 da alfa-espectrina. Além disso, estas mutações afetam diretamente o sítio de auto-associação na beta-espectrina, alterando a estrutura da tripla-hélice que forma o sítio de auto-associação ou afetando resíduos críticos para que ocorra esta auto-associação (TSE & LUX, 1999).

1.2.2 Defeitos da proteína 4.1

Os defeitos da proteína 4.1 associados à ElH são bem menos comuns que os defeitos da espectrina (GALLAGHER & FORGET, 1997). Eles podem ser divididos em duas categorias: defeitos que levam a uma deficiência de proteína 4.1 (ElH do tipo 4.1⁽⁻⁾) e defeitos que levam a alterações estruturais da proteína 4.1 (ElH do tipo 4.1⁽⁺⁾) (CONBOY, 1993).

A ElH do tipo 4.1⁽⁻⁾ é bem mais comum e a maioria dos defeitos moleculares afetam o códon de início de tradução utilizado na hemácia, seja através de deleções ou mutações de ponto (DALLA VENEZIA *et al*, 1992; CONBOY *et al*, 1993; GARBARZ *et al*, 1995; CHASIS *et al*, 1996). A expressão da proteína 4.1 permanece relativamente inalterada nas células dos tecidos não-eritróides, porque muitas das isoformas da proteína 4.1, presentes nestes tecidos, utilizam um sítio de início de tradução alternativo (CONBOY *et al*, 1993; CHASIS *et al*, 1996). Recentemente, uma grande deleção de 70 Kb, que compreende parte do gene da proteína 4.1, incluindo o sítio de início de tradução, foi descrita (DALLA VENEZIA *et al*, 1998). A deficiência de proteína 4.1 afeta as interações horizontais do esqueleto da membrana, já que a ligação entre a espectrina e a actina fica enfraquecida na sua ausência. A ausência de proteína 4.1 afeta também a interação do complexo juncional com a Glicoforina C. Realmente, os pacientes com deficiência total de proteína 4.1 apresentam uma redução de cerca de 30% de Glicoforina C (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a), indicando que estes pacientes também apresentam um distúrbio nas interações verticais do esqueleto da membrana.

Variantes estruturais da proteína 4.1 (ElH do tipo 4.1⁽⁺⁾) devido à deleção ou duplicação de éxons envolvidos nas interações com a espectrina/actina têm sido descritas (CONBOY *et al*, 1990; MARCHESI *et al*, 1990; CONBOY *et al*, 1991). Além disso, a deleção de um único aminoácido no domínio de ligação à espectrina também foi relatado (LORENZO *et al*, 1994).

Os pacientes portadores de defeitos no gene da proteína 4.1 em heterozigose apresentam eliptocitose proeminente, mas pouca ou nenhuma hemólise (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Já os portadores destes defeitos em homozigose apresentam anemia hemolítica grave com eliptocitose, poiquilocitose e eritrócitos fragmentados (TSE & LUX, 1999).

1.2.3 Deficiência de glicoforina C

Eliptócitos são encontrados no sangue periférico de pacientes, cujas hemácias apresentam o fenótipo Leach (Gerbich negativo) (GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a). Estes pacientes não possuem as sialoglicoproteínas que carregam o antígeno Gerbich: as glicoforinas C e D (LUX & PALEK, 1995). Os pacientes portadores do fenótipo Leach apresentam uma EIH esferocítica branda associada com um aumento da fragilidade osmótica do eritrócito (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a).

O fenótipo Leach é normalmente causado por uma deleção de 7 kb no DNA genômico, que remove os éxons 3 e 4 do locus das Glicoforinas C e D (TANNER *et al*, 1988; WINARDI *et al*, 1993), embora uma mutação com desvio de leitura também tenha sido descrita (LOWE, 1994). A deficiência de Glicoforina C leva a uma deficiência secundária de proteína 4.1, que presume-se ser a causa da formação de eliptócitos (GALLAGHER & FERREIRA, 1997).

1.3 Esferocitose Hereditária (EsH)

A esferocitose hereditária (EsH) constitui um grupo comum de anemias hemolíticas, nas quais defeitos na espectrina ou nas proteínas que promovem a ligação da espectrina à dupla camada lipídica (anquirina, palidina e banda 3), levam ao aparecimento de hemácias esféricas e osmoticamente frágeis, que são retidas seletivamente no baço, mas que sobrevivem de forma quase normal após a esplenectomia (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; TSE & LUX, 1999).

A EsH ocorre em todos os grupos étnicos (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a), mas é particularmente comum em indivíduos com ascendência do norte da Europa, atingindo uma prevalência de 1 para cada 2000 indivíduos (TSE & LUX, 1999). Em cerca de 75% dos casos, a herança segue um padrão autossômico dominante. Nos 25% restantes, a doença tem uma manifestação esporádica, que pode se dever a uma forma recessiva da EsH ou a mutações espontâneas (mutações “*de novo*”) (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; TSE & LUX, 1999). Na média, a EsH recessiva é clinicamente mais grave que a EsH dominante, mas existe uma sobreposição considerável (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996).

Clinicamente, os pacientes portadores de EsH apresentam sintomatologia relacionada à presença de hemólise: anemia, icterícia, reticulocitose, esplenomegalia e colelitíase (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a). Em alguns casos são observadas complicações adicionais como gota, tumores hematopoéticos extramedulares, crises hemolíticas ou aplásticas, úlceras de perna, entre outros (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Como na EIH, a manifestação clínica é heterogênea, sendo descritas formas leves, moderadas e graves da EsH, bem como a presença de portadores assintomáticos (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998).

A análise morfológica dos eritrócitos na EsH demonstra porcentagens variáveis de microesferas mas, ocasionalmente, a identificação dos esferócitos à microscopia óptica pode ser difícil. A maior fragilidade osmótica do eritrócito irá, portanto, auxiliar a identificação de pacientes portadores da anormalidade (PALEK & LAMBERT, 1990; LUX & PALEK, 1995;). Frequentemente, podem ser observadas ainda, no sangue periférico, hemácias de contorno irregular (acantócitos), células pinçadas ou hemácias fragmentadas (esquizócitos) (GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998). As alterações morfológicas observadas advêm de lesões primárias da membrana eritrocitária, que envolvem perda de membrana por vesiculação, culminando com redução na área de superfície da membrana e formação de hemácias esféricas com deformabilidade reduzida (fig. 4) (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a). Duas hipóteses para explicar esta perda de superfície de membrana foram propostas (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a): 1) Defeitos nas proteínas de membrana, envolvidas nas denominadas interações verticais entre as proteínas do citoesqueleto e a bicamada lipídica, levariam a um desacoplamento entre o citoesqueleto e a bicamada e, conseqüentemente, à perda de membrana (fig. 4); 2) Um distúrbio nas interações horizontais entre os lipídios da membrana e as proteínas integrais, principalmente a banda 3, levaria à desestabilização da bicamada lipídica e à perda de membrana (fig. 4).

Modelos animais com inativação dos genes da banda 3 ou da proteína 4.2 apresentam um conteúdo normal de espectrina e a arquitetura do citoesqueleto encontra-se intacta, o que apóia a segunda hipótese para a perda de membrana observada nos eritrócitos (PETERS *et al*, 1996; PETERS *et al*, 1999). Esta hipótese também é capaz de explicar a perda de membrana observada em indivíduos com deficiência de anquirina e/ou espectrina. Sabe-se que o citoesqueleto limita fortemente a

mobilidade lateral da banda 3 (SHEETZ *et al*, 1980; CORBETT *et al*, 1994, TOMISHIGE *et al*, 1998), portanto uma deficiência de espectrina ou anquirina permitiria que mais moléculas da banda 3 estivessem livres para se mover no plano da membrana, levando à desestabilização da dupla camada lipídica e à perda de membrana (PETERS *et al*, 1999).

A perda de deformabilidade celular na EsH é uma consequência direta da relação superfície/volume diminuída, já que a capacidade da membrana de expandir a sua área vai se tornando menor, quanto maior for a perda de área de superfície (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Esta deformabilidade reduzida provoca o aprisionamento das hemácias na microcirculação esplênica, onde estas células são preferencialmente destruídas, uma vez que o baço constitui um ambiente hostil às hemácias (GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a). O baixo pH plasmático na circulação do baço, os baixos níveis de glicose e ATP, além das altas concentrações localizadas de radicais livres tóxicos, que são produzidos pelos macrófagos esplênicos, contribuem para danificar a membrana, levando, em última instância, à hemólise (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998). A esplenectomia cura quase todos os pacientes portadores de EsH, eliminando a anemia e reduzindo consideravelmente a reticulocitose. Pacientes portadores das formas mais graves podem não atingir remissão completa, mas são altamente beneficiados pelo procedimento (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a).

Na EsH, os defeitos moleculares são encontrados nas seguintes proteínas de membrana, que participam da ancoragem do citoesqueleto: espectrina, anquirina, banda 3 e proteína 4.2. A análise da composição das proteínas de membrana através de SDS-PAGE evidencia anormalidades bioquímicas nestas proteínas: Cerca de 30-45% dos pacientes apresentam deficiência combinada de espectrina e anquirina. Aproximadamente 30% apresentam deficiência isolada de espectrina e 20% apresentam deficiência de banda 3. Casos de deficiência isolada de proteína 4.2 foram relatados, contudo estes casos parecem ser mais freqüentes no Japão, do que nas populações ocidentais (LUX & PALEK, 1995; TSE & LUX, 1999).

1.3.1 Defeitos da espectrina

Os eritrócitos de muitos dos pacientes portadores de EsH apresentam deficiência de espectrina, incluindo tanto a forma dominante como a forma recessiva. O grau de deficiência de espectrina se

correlaciona com a esferoidicidade dos eritrócitos, a gravidade da hemólise e a resposta à esplenectomia (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999).

1.3.1.1 Alfa-espectrina

Nos humanos, a síntese da alfa-espectrina excede a síntese da beta-espectrina e uma grande quantidade de alfa-espectrina, que não participa da formação dos heterodímeros, é degradada no compartimento lisossomal (HANSPAL & PALEK, 1987). Portanto, heterozigotos para defeitos sintéticos no gene da alfa-espectrina deveriam produzir uma quantidade suficiente de cadeias normais para formarem dímeros com todas as cadeias da beta-espectrina sintetizadas no eritrócito. Desta forma, a deficiência de espectrina só seria evidente em homozigose (TSE *et al*, 1997; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER & FORGET, 1998).

Realmente, mutações no gene da alfa-espectrina não são descritas em pacientes portadores de EsH do tipo dominante (TSE & LUX, 1999). Defeitos em ambos os alelos da alfa-espectrina são, contudo, implicados na forma recessiva da EsH acompanhada de uma deficiência grave de espectrina (AGRE *et al*, 1982; WICHTERLE *et al*, 1996; TSE *et al*, 1997).

Cerca de metade dos pacientes portadores de EsH recessiva grave acompanhada de uma deficiência marcante de espectrina, possuem uma mutação no íntron 30 do gene da alfa-espectrina, que leva a uma clivagem aberrante do mRNA. Este alelo variante, denominado α^{LEPRA} (“*low expression Prague*”), produz aproximadamente seis vezes menos transcritos da alfa-espectrina corretamente clivados, do que o alelo normal (WICHTERLE *et al*, 1996). Além disso, este alelo está em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo da alfa-espectrina, denominado alelo α^{BUGHILL} , que é freqüente em famílias com EsH não-dominante e está presente em 2-15% dos indivíduos normais (BOIVIN *et al*, 1993; WICHTERLE *et al*, 1996; TSE *et al*, 1997). A presença da espectrina α^{LEPRA} em heterozigose é assintomática, conforme esperado (WICHTERLE *et al*, 1996; TSE *et al*, 1997). Entretanto, a presença do alelo α^{LEPRA} em homozigose ou a combinação do alelo α^{LEPRA} com defeitos no outro alelo da alfa-espectrina, como por exemplo a combinação com a alfa-espectrina truncada α^{PRAGUE} (WICHTERLE *et al*, 1996), leva a uma deficiência grave de espectrina e anemia esferocítica grave e deve ser uma causa comum de EsH recessiva (WICHTERLE *et al*,

1996; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; TSE & LUX, 1999). Interessantemente, pacientes homozigotos para o alelo alfa^{LEPRA} apresentam um fenótipo clinicamente mais moderado do que os pacientes heterozigotos compostos para o alelo alfa^{LEPRA} e um segundo defeito no gene da alfa-espectrina (TSE *et al*, 1997; GALLAGHER & FERREIRA, 1997).

1.3.1.2 Beta-espectrina

As cadeias da beta-espectrina são um fator limitante para a formação dos heterodímeros de espectrina, já que sua síntese é cerca de três a quatro vezes menor que a síntese das cadeias da alfa-espectrina. Conseqüentemente, defeitos da beta-espectrina, ao contrário dos defeitos da alfa-espectrina, podem se expressar em heterozigose e predominantemente correlacionam-se com uma EsH de herança dominante (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; GALLAGHER & FORGET, 1998; GALLAGHER *et al*, 1998a). Como a beta-espectrina é o fator limitante para a biossíntese do esqueleto da membrana eritrocitária, a maioria dos defeitos de espectrina na EsH encontra-se no gene da beta-espectrina (TSE & LUX, 1999).

Uma freqüente expressão mono-alélica do gene da beta-espectrina tem sido descrita em pacientes portadores de EsH e deficiência de espectrina, sugerindo que o alelo defeituoso não é expresso (DHERMY *et al*, 1998a; MIRAGLIA DEL GIUDICE *et al*, 1998). Mais de 10 alelos da beta-espectrina contendo mutações nulas (mutações que abolem a expressão do alelo) são descritos, todos associados com EsH do tipo dominante (tabela 1 – apêndice B). Estas defeitos incluem uma mutação no códon de início de tradução do gene, quatro mutações com desvio de leitura, duas mutações nonsense, uma deleção genômica de 4.6 Kb e duas mutações de clivagem (tabela 1 – apêndice B).

Além disso, são descritas quatro mutações missense no gene da beta-espectrina associadas com a EsH. Três delas afetam o sítio de ligação à proteína 4.1, tendo uma herança dominante (tabela 1 – apêndice A). A quarta mutação, também denominada de espectrina Birmingham, está associada a uma herança recessiva, embora o segundo defeito genético ainda não tenha sido determinado neste caso (HASSOUN *et al*, 1997).

Clinicamente, a EsH em pacientes portadores de defeitos na beta-espectrina apresenta uma ampla variabilidade, desde manifestações leves a graves (IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999). Morfologicamente, a esferocitose é proeminente e está associada com uma subpopulação de

eritrócitos densos e espiculados (acantócitos) não detectados em outras formas da EsH (GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999).

1.3.2 Defeitos da anquirina

A maioria dos pacientes portadores de EsH apresenta uma deficiência combinada de anquirina e espectrina (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FORGET, 1998; IOLASCON *et al*, 1998, TSE & LUX, 1999). Acredita-se que a deficiência de anquirina constitua o defeito primário nestes casos, sendo a deficiência de espectrina uma consequência secundária da deficiência de anquirina (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998). Isto não é inesperado, haja visto que a disponibilidade das moléculas de anquirina constitui um fator limitante para a formação do citoesqueleto, através do fornecimento de sítios de ligação de alta afinidade para a beta-espectrina (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER *et al*, 1998a). Portanto, a deficiência de anquirina limita a formação dos heterodímeros de espectrina, uma vez que estes heterodímeros só são estáveis quando acoplados à membrana via anquirina, e leva, assim, a um quadro secundário de deficiência de espectrina (LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FORGET, 1998; IOLASCON *et al*, 1998).

A EsH associada a defeitos no gene da anquirina pode apresentar herança do tipo dominante ou recessiva (LUX & PALEK, 1995; HASSOUN & PALEK, 1996; GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999). Aparentemente, desvios de leitura e mutações nonsense predominam na forma dominante e determinam ausência da anquirina mutada na membrana eritrocitária (tabela 2 – apêndice B). Realmente, utilizando-se como marcador um polimorfismo de repetição AC na porção 3' não traduzida do gene, demonstrou-se que cerca de um terço dos pacientes portadores de EsH associada a uma deficiência combinada de anquirina e espectrina apresentavam ausência da expressão de um dos alelos da anquirina (JAROLIM *et al*, 1995b). Até o presente momento foram descritas 15 mutações nulas com desvio de leitura ou do tipo nonsense e uma mutação no promotor na posição -204, que presumidamente levam a uma redução na síntese da anquirina (tabela 1 – apêndice B).

As mutações responsáveis pela EsH do tipo recessivo incluem principalmente mutações missense e uma mutação no promotor do gene (tabela 2 – apêndice B). A mutação no promotor -108 T→C é particularmente interessante. Esta mutação foi encontrada em 4 de 7 famílias portadoras de

EsH do tipo recessivo e reside imediatamente acima do primeiro sítio de iniciação da transcrição na região promotora (EBER *et al*, 1996). Esta mutação é silenciosa em heterozigose. Assim, os pacientes com manifestação da doença devem ter uma mutação adjacente no outro alelo. Esta suspeita foi confirmada em 2 pacientes, que apresentaram uma segunda mutação determinando uma troca de aminoácido no domínio de ligação com a banda 3 (V463I) ou criando um novo sítio de clivagem (+16C→T) (EBER *et al*, 1996).

Pacientes portadores de EsH com defeitos na anquirina apresentam uma esferocitose proeminente, sem outras alterações morfológicas. Clinicamente, a hemólise e a anemia variam de branda a grave. De forma geral, pacientes com defeitos dominantes são menos afetados que aqueles com mutações recessivas (TSE & LUX, 1999).

1.3.3 Defeitos da banda 3

A banda 3 é a principal proteína integral da membrana eritrocitária, que interage com o citoesqueleto (GALLAGHER & FORGET, 1997; TSE & LUX, 1999). Cerca de 20% dos pacientes americanos, brasileiros e europeus portadores de EsH do tipo dominante apresentam uma deficiência de banda 3, mas um conteúdo normal de espectrina (SAAD *et al*, 1994; GALLAGHER & FERREIRA 1997; GALLAGHER *et al*, 1998a; TSE & LUX, 1999). Acreditava-se que a banda 3 fosse necessária para uma biogênese estável do citoesqueleto da membrana eritrocitária (HANSPAL *et al*, 1992; GALLAGHER & FERREIRA, 1997), mas estudos com modelos animais de deficiência da banda 3 têm mostrado que esta proteína é essencial para a estabilidade da dupla camada lipídica, mas não para a formação do citoesqueleto (PETERS *et al*, 1996). Por esta razão, não é surpreendente que pacientes com defeitos na banda 3 apresentem uma quantidade normal de espectrina.

Muitas mutações que abolem a expressão de um dos alelos da banda 3 têm sido descritas em pacientes com EsH dominante (IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999), incluindo 5 mutações nonsense (variantes Hodonin, Lyon, Noirterre, Osnabrück I e Trutnov) (EBER *et al*, 1996; JAROLIM *et al*, 1996; JENKINS *et al*, 1996; ALLOISIO *et al*, 1996), 14 mutações que alteram o quadro de leitura (variantes Bicêtre II, Bohain, Brüggén, Foggia, Smichov, Evry, Hobart, Napoli I, Princeton, Worcester, Fukayama I, Fukayama II, Vesuvio e Kagoshima) (EBER *et al*, 1996; JAROLIM *et al*, 1996; MIRAGLIA DEL GIUDICE *et al*, 1997; PERROTA *et al*, 1999b; DHERMY *et al*, 1997), 2 mutações

de clivagem (variantes Campinas e Pribram)(LIMA *et al*, 1997; JAROLIM *et al*, 1996) e uma duplicação de 10 nucleotídeos (variante Prague) (JAROLIM *et al*, 1994). Além destas mutações, são descritas 7 mutações missense, que causam a substituição de resíduos de arginina altamente conservados e provavelmente interferem com a capacidade da proteína de atingir o dobramento correto e inserir-se no retículo endoplasmático (variantes Bicêtre I, Dresden, Hradec Kralove, Jablonec, Prague II, Nara e Prague III) (EBER *et al*, 1996; JAROLIM *et al*, 1995a; DHERMY *et al*, 1997). Outras 9 mutações missense são encontradas, com a substituição de aminoácidos altamente conservados e cruciais para a estabilização da banda 3 dentro da dupla camada lipídica (variantes Benesov, Birmingham, Chur, Coimbra, Most, Napoli II, Okinawa, Philadelphia e Tokyo) (MAILLET *et al*, 1995; JAROLIM *et al*, 1996; ALLOISIO *et al*, 1997; KANZAKI *et al*, 1997; MIRAGLIA DEL GLIUDICE *et al*, 1997; IAWASE *et al*, 1998). Quatro mutações missense e uma deleção sem desvio de leitura (deleção “*in-frame*”) são descritas no domínio citoplasmático, podendo interferir com a capacidade da banda 3 de se ligar à anquirina ou à palidina (variantes Nachod, Fukuoka, Montefiore, Tuscaloosa e Boston) (JAROLIM *et al*, 1996; KANZAKI *et al*, 1997; JAROLIM *et al*, 1992; RYBICKI *et al*, 1993). Uma inserção de 22 resíduos no domínio transmembrana da banda 3 também é descrita e provavelmente impede a incorporação da proteína na membrana (variante Milano) (BIANCHI *et al*, 1997). Também pode ser encontrada a deleção de um aminoácido no domínio transmembrana (variante Osnabrück II) (EBER *et al*, 1996). Um alelo composto de duas mutações missense (variante Mondegia) (ALLOISIO *et al*, 1997) e um alelo portador de uma mutação normalmente silenciosa no promotor do gene (variante Genas) (ALLOISIO *et al*, 1996) têm a capacidade de modular a gravidade da EsH em pacientes portadores de um outro defeito na banda 3.

Pacientes portadores de EsH com defeitos na banda 3 apresentam anemia relativamente branda e esferocitose. Muitos pacientes não esplenectomizados também apresentam uma população pequena de eritrócitos com formato de cogumelo (chamados também de hemácias pinçadas), que não são freqüentemente encontrados nas outras formas da EsH (GALLAGHER *et al*, 1998a; IOLASCON *et al*, 1998; TSE & LUX, 1999).

1.3.4 Defeitos da palidina ou proteína 4.2

Uma deficiência parcial de palidina é encontrada em pacientes com deficiência de anquirina ou banda 3 e é secundária a estas deficiências (TSE & LUX, 1999). A anquirina e a banda 3 parecem ser

necessárias para a integração normal da palidina na membrana. Estudos com modelos animais deficientes em anquirina mostram que suas membranas também são deficientes em palidina (RYBICKI *et al*, 1995b). Um modelo de rato com inativação do gene da banda 3 apresentava uma ausência da palidina na sua membrana (PETERS *et al*, 1996). Além disso, uma deficiência de palidina é encontrada em pacientes portadores de mutações missense no domínio citoplasmático da banda 3, que presumidamente interferem com a região da banda 3 envolvida na ligação à palidina (KANZAKI *et al*, 1997; JAROLIM *et al*, 1992; RYBICKI *et al*, 1993). Entretanto, alguns pacientes portadores de EsH apresentam deficiência isolada de palidina em suas membranas eritrocitárias acompanhadas por alterações moleculares no gene da palidina (TSE & LUX, 1999). Assim como no caso da banda 3, estudos com modelos animais de deficiência da proteína 4.2 mostram que esta proteína não afeta a formação do citoesqueleto (PETERS *et al*, 1999). Ela é importante para a estabilidade da dupla camada lipídica, provavelmente porque a sua ausência leva a uma deficiência parcial de banda 3 (PETERS *et al*, 1999). Devido à perda da banda 3, a ancoragem dos lipídios fica comprometida e estes são perdidos, resultando na esferocitose.

Até o presente momento foram descritas 8 mutações no gene da palidina associadas com a EsH, sendo que apenas 3 ocorrem fora da população Japonesa (variantes Tozeur, Lisboa e Nancy) (HAYETTE *et al*, 1995a e b; BEAUCHAMP-NICOUD *et al*, 2000). Uma variante comum é a palidina^{NIPPON}, causada por uma mutação de ponto (BOUHASSIRA *et al*, 1992). Recentemente esta variante foi detectada em uma paciente de origem Italiana (PERROTA *et al*, 1999a). Outras variantes se devem à mutações missense (variantes Fukuoka, Komatsu e Shiga) (TAKOAKA *et al*, 1994; KANZAKI *et al*, 1995a e b) e a uma mutação que altera a clivagem do mRNA com conseqüente alteração do quadro de leitura (variante Notame) (MATSUDA *et al*, 1995).

A EsH nestes casos apresenta uma herança recessiva, mas é clinicamente leve (TSE & LUX, 1999) e a morfologia eritrocitária pode demonstrar ovalócitos ou estomatócitos, além de uma leve esferocitose (TSE & LUX, 1999).

Capítulo 2

Casuística

2.1 Eliptocitose Hereditária

Dez famílias portadoras de ElH, atendidas no Hemocentro da Unicamp e diagnosticadas através da história clínica e da análise do esfregaço do sangue periférico, apresentavam alterações bioquímicas da espectrina. A caracterização bioquímica das proteínas da membrana eritrocitária destas famílias foi realizada através de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie, quantificação de dímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina (trabalhos 1-4; capítulo 4).

Os indivíduos portadores de ElH das dez famílias apresentavam quantidade de dímeros de espectrina aumentada, quando comparada com um controle normal (trabalhos 1-4; capítulo 4), o que é indicativo de auto-associação defeituosa dos heterodímeros em tetrâmeros. É importante enfatizar que os heterodímeros (spD) e tetrâmeros (spT) de espectrina estão em equilíbrio reversível na membrana e, em condições fisiológicas, este equilíbrio favorece a formação de tetrâmeros de espectrina (LIU & PALEK, 1980). Próximo à temperatura de 0°C, o equilíbrio spD-spT é cineticamente imobilizado (LIU *et al*, 1981; PALEK, 1985; PALEK & LAMBERT, 1990). Desta forma, após extração de espectrina a 0°C em tampão de baixa força iônica, os dímeros de espectrina em indivíduos normais constituem apenas $8 \pm 3\%$ da espectrina total (PALEK, 1985). Em indivíduos com auto-associação defeituosa esta porcentagem pode ser bem mais elevada.

Além disso, estas dez famílias apresentavam uma digestão tríptica anormal da espectrina, tendo sido subdivididas em quatro grupos de acordo com o tipo de digestão anormal encontrado e com as anormalidades detectadas por SDS-PAGE.

2.1.1 Grupo I: $\text{sp}\alpha\text{I}/65$

Três famílias apresentavam um peptídeo de 65 kDa correspondente ao domínio αI (normalmente com 80 kDa) após a digestão da espectrina com tripsina, apresentando, portanto, ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/65$. A descrição detalhada das três famílias e seus dados bioquímicos e hematológicos podem ser encontrados no trabalho 1 (capítulo 4)

2.1.2 Grupo II: $\text{sp}\alpha\text{I}/50$

Três famílias apresentavam ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/50$, com um peptídeo de 50 kDa correspondente ao domínio αI após a digestão tríptica da espectrina. A descrição detalhada das três famílias e seus dados bioquímicos e hematológicos podem ser encontrados no trabalho 2 (capítulo 4)

2.1.3 Grupo III: $\text{sp}\alpha\text{I}/74$

Três famílias apresentavam ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/74$, com um peptídeo de 74 kDa correspondente ao domínio αI após a digestão tríptica da espectrina. A descrição detalhada destas três famílias e seus dados bioquímicos e hematológicos podem ser encontrados no trabalho 3 (capítulo 4)

2.1.4 Grupo IV: $\text{sp}\alpha\text{I}/74 + \beta$ -espectrina truncada

Uma família apresentava ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ associada à presença de uma beta-espectrina com migração rápida em SDS-PAGE. A descrição detalhada desta família, bem como os dados bioquímicos e hematológicos podem ser encontrados no trabalho 4 (capítulo 4)

2.2 Esferocitose Hereditária

Quarenta e um pacientes portadores de EsH, diagnosticada através de história clínica, esfregaço de sangue periférico e teste de fragilidade osmótica do eritrócito, foram estudados. Foram excluídos do estudo pacientes com deficiência de banda 3. Estes pacientes foram divididos em três grupos:

2.2.1 Grupo I

Nove pacientes apresentavam freqüentes acantócitos no esfregaço do sangue periférico. Destes nove pacientes, 7 apresentavam deficiência isolada de espectrina e 2 não apresentavam nenhum tipo de deficiência proteica.

2.2.2 Grupo II

Quatro pacientes apresentavam eliptócitos, o que é condizente com um diagnóstico de eliptocitose esferocítica. Nenhum destes pacientes apresentava qualquer tipo de deficiência proteica.

2.2.3 Grupo III

Os vinte e oito pacientes restantes não apresentavam acantócitos ou eliptócitos no sangue periférico. Destes, onze apresentavam deficiência isolada de espectrina, quatro apresentavam deficiência de anquirina ou deficiência combinada de espectrina e anquirina, onze apresentavam uma quantificação proteica normal e um não foi estudado ao nível proteico.

Capítulo 3

Objetivos

O conjunto de trabalhos apresentados (capítulos 4 e 5) teve como objetivos:

- 3.1) Determinar as alterações moleculares responsáveis pela EIH em 10 famílias portadoras de alterações bioquímicas da espectrina, atendidas no Hemocentro da Unicamp.
- 3.2) Analisar a presença do alelo α^{LELY} e associar com a expressão da EIH em todos os pacientes portadores de mutações no gene da alfa-espectrina.
- 3.3) Fazer uma triagem das alterações moleculares presentes no gene beta-espectrina nos pacientes portadores de EsH dos grupos I e II (ver casuística), já que estes grupos têm maior probabilidade de apresentarem mutações no gene da beta-espectrina, devido à presença de acantócitos ou eliptócitos no sangue periférico. Os vinte e oito pacientes restantes foram submetidos à triagem para detecção de mutações no gene da anquirina (Tese da aluna Roberta Campanile Leite).
- 3.4) Fazer uma triagem das alterações moleculares presentes no promotor do gene da anquirina nos 41 pacientes portadores de EsH.
- 3.5) Realizar estudos *in vitro* para caracterizar o impacto de mutações na região promotora do gene da anquirina eritróide sobre a atividade deste promotor.

Capítulo 4

Eliptocitose Hereditária: Resultados e Discussão

4.1 Trabalhos 1, 2, 3 e 4

Trabalho 1: PRANKE PHL, BASSÈRES DS, COSTA FF, SAAD STO: Expression of spectrin α^{V65} hereditary elliptocytosis in patients from Brazil. **Br J Haematol** 94: 470-475, 1996

Trabalho 2: BASSÈRES DS, PRANKE PHL, VICENTIM D, COSTA FF, SAAD STO: Expression of spectrin α^{V50} hereditary elliptocytosis and its association with the α^{LELY} allele. **Acta Haematol** 100: 32-38, 1998

Trabalho 3: BASSÈRES DS, BORDIN S, COSTA FF, SAAD STO: Association of the α -spectrin R28H mutation with allele α^{LELY} and with $\alpha I/\alpha II$ domain haplotypes in three Brazilian families. **Eur J Haematol** 64: 53-58, 2000

Trabalho 4: BASSÈRES DS, PRANKE PHL, SALES TSI, COSTA FF, SAAD STO: β -spectrin Campinas: a novel shortened β -chain variant associated with skipping of exon 30 and hereditary elliptocytosis. **Br J Haematol** 97: 579-585, 1997

4.1.1 Resumo dos resultados apresentados nos trabalhos 1, 2, 3 e 4, de acordo com os objetivos propostos:

Objetivo I: Determinar as alterações moleculares responsáveis pela EIH em 10 famílias portadoras de alterações bioquímicas da espectrina, atendidas no Hemocentro da Unicamp.

Nas famílias com eliptocitose hereditária e auto-associação defeituosa da espectrina, que foram objeto deste estudo, o fragmento normal de 80 kDa correspondente ao domínio α I (sp α I/80), obtido pela digestão triptica da α -espectrina, encontrou-se substituído por fragmentos de 50 kDa (sp α I/50), 65 kDa (sp α I/65) e 74 kDa (sp α I/74).

Sp α I/65

O fragmento de 65 kDa proveniente do domínio α I da espectrina é resultado da clivagem triptica do resíduo de arginina da posição 137 (MARCHESI *et al*, 1987), que se torna exposto à clivagem triptica devido a alterações na estrutura terciária da espectrina, que por sua vez, são causadas por alterações moleculares no DNA.

Os defeitos da espectrina envolvidos no aparecimento do fragmento α I de 65 kDa são homogêneos do ponto de vista molecular. Até hoje, só duas alterações moleculares diferentes foram descritas (tabela 1; apêndice A). A inserção de um TTG no códon 154, gerando a duplicação da leucina 154 (duplL154) (ROUX *et al*, 1989) é o defeito molecular predominante, estando presente em todos os casos já descritos de sp α I/65 (MARCHESI *et al*, 1987; SAHR *et al*, 1989; MIRAGLIA DEL GIUDICE *et al*, 1992; QUALTIERI *et al*, 1995; GLELE-KAKAI *et al*, 1996), exceto por um único relato da troca GGT→GAT no códon 151 levando à substituição de uma glicina por um aspartato (G151D) (BOULANGER *et al*, 1994). A duplL154 ocorre predominantemente em indivíduos de origem africana (GLELE-KAKAI *et al*, 1996)

Para investigação da duplL154, foi realizada a amplificação do éxon 4 (onde ocorre a duplicação) por PCR dos indivíduos das três famílias estudadas (trabalho 1) e realizada a hibridização com uma sonda normal (sem a duplicação do TTG) e com uma sonda mutante (com a

duplicação do TTG). A duplL154 esteve associada à ElH nas três famílias e, na família 2, esta mutação esteve presente em homozigose no propósito (fig. 1; apêndice A – não incluída no trabalho 1).

SpαI/50

Os fragmentos de 50 kDa provenientes do domínio αI da espectrina são divididos em dois subgrupos: spαI/50a e spαI/50b. O primeiro grupo é resultado da clivagem tríptica dos resíduos de arginina da posição 256 ou lisina da posição 258 (MARCHESI *et al*, 1987). O segundo grupo é resultado da clivagem tríptica dos resíduos de arginina da posição 468 ou 470 (MARCHESI *et al*, 1987).

Os defeitos moleculares envolvidos no aparecimento do fragmento αI de 50 kDa são heterogêneos e afetam regiões diferentes do gene de acordo com cada subgrupo (tabela 1; apêndice A). Ambos os subgrupos são caracterizados pela presença de mutações missense, embora uma deleção de uma histidina no códon 469 e uma inserção de um elemento móvel de DNA no íntron 4, que afeta o padrão de clivagem do éxon 5, tenham sido relatadas (GALLAGHER *et al*, 1993; HASSOUN *et al*, 1994). O subgrupo spαI/50a é mais comum e parece estar confinado à população negróide (PALEK & SAHR, 1992; LUX & PALEK, 1995). São encontradas as mutações L207P no éxon 5 (GALLAGHER *et al*, 1992a; HANSPAL *et al*, 1993; GALLAGHER & FORGET, 1994; GLELE-KAKAI *et al*, 1996) e L260P e S260P no éxon 6 do gene da alfa-espectrina (MARCHESI *et al*, 1987; SAHR *et al*, 1989; GLELE-KAKAI *et al*, 1996). O subgrupo spαI/50b está associado à presença das mutações H469P (DALLA VENEZIA *et al*, 1993) e Q471P (MARCHESI *et al*, 1987; SAHR *et al*, 1989) no éxon 11 do gene da alfa-espectrina.

A investigação dos defeitos moleculares de três famílias portadoras de ElH do tipo spαI/50 (trabalho 2) foi realizada através da amplificação dos éxons 5 e 6 do gene da alfa-espectrina, com subsequente submissão dos produtos amplificados à técnica de SSCP (ORITA *et al*, 1989). Esta técnica é útil para se detectar mutações que alterem a conformação nativa da fita simples do DNA, resultando em um padrão de migração distinto do normal, quando o produto do PCR é submetido à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida. Em todos os indivíduos afetados das três famílias, foi detectada migração anormal do produto de amplificação do éxon 6 e o seqüenciamento

direto evidenciou, em todos os casos, a presença da mutação L260P em heterozigose (figs. 4 e 5 – trabalho 2).

O conjunto destes resultados sugere que, no Brasil, as mutações L260P e duplL154 possam ser oriundas do tráfico de escravos a partir da África e que possam constituir uma causa freqüente de ElH (trabalhos 1 e 2).

Sp α I/74

O fragmento de 74 kDa proveniente do domínio α I da espectrina é resultado da clivagem triptica aumentada dos resíduos de arginina na posição 45 ou de lisina na posição 48 (PALEK & SAHR, 1992; LUX & PALEK, 1995).

Os defeitos moleculares que originam o fragmento sp α I/74 são comuns e pertencem a um grupo heterogêneo de mutações, que envolvem os genes, tanto da alfa quanto da beta-espectrina (PALEK & LAMBERT, 1990; PALEK & SAHR, 1992; LUX & PALEK, 1995; GALLAGHER & FORGET, 1996; GALLAGHER & FERREIRA, 1997; DELAUNAY *et al*, 1996; TSE & LUX, 1999). Eles são encontrados em brancos, negros, árabes e melanésios (PALEK & SAHR, 1992) e resultam em anormalidades na região da “cabeça” do dímero de espectrina (MORLÉ *et al*, 1990). A detecção destas mutações fornece o modelo de auto-associação da espectrina, no qual a última unidade repetida da β -espectrina situa-se em justaposição direta com a primeira hélice da α -espectrina (fig. 5) (TSE *et al*, 1990; PALEK & SAHR, 1992; SPEICHER *et al*, 1993; LUX & PALEK, 1995). Como as mutações responsáveis pela ElH do tipo sp α I/74 comprometem uma das três hélices da espectrina envolvidas na formação dos tetrâmeros de espectrina, seria esperado que estas mutações tivessem um efeito marcante sobre o processo de auto-associação. Realmente, as mutações que geram o fragmento de 74 kDa são consideradas as mais graves das mutações eliptocitogênicas comuns (LUX & PALEK, 1995).

No caso do gene da alfa-espectrina, as mutações encontradas no códon 28 são bastante comuns e as trocas R28H, R28C, R28S e R28L já foram descritas, demonstrando que este códon constitui uma região do tipo “hot spot” (GARBARZ *et al*, 1990; BAKLOUTI *et al*, 1991; COETZER *et al*, 1991; GALLAGHER *et al*, 1991b; HANSPAL *et al*, 1993; LORENZO *et al*, 1993;

DHERMY *et al*, 1998b). Diversas outras alterações no gene da alfa-espectrina, associadas à ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/74$, foram descritas (tabela 1 – apêndice A) e constituem basicamente mutações missense localizadas no éxon 2.

No caso do gene da beta-espectrina, predominam as mutações de clivagem e inserções e deleções, que estão associadas com a presença de uma espécie truncada da beta-espectrina (tabela 2 – apêndice A). Mutações de ponto são mais raras (tabela 2 – apêndice A). Todas as alterações moleculares neste gene associadas à presença de ElH situam-se na porção 3', que codifica o domínio βIV , responsável pela auto-associação da espectrina.

As três famílias portadoras de ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/74$, analisadas no trabalho 3, não apresentavam uma beta-espectrina truncada, e, portanto, a mutação eliptocitogênica teria maior chance de localizar-se no gene da alfa-espectrina. Por esta razão, iniciamos a investigação dos defeitos moleculares através da amplificação do éxon 2 do gene da alfa-espectrina e da submissão dos produtos amplificados à técnica de SSCP. Um padrão de migração eletroforética alterado foi observado nos indivíduos afetados das três famílias e, após o seqüenciamento, determinou-se que a mutação R28H era a causa da ElH em todos os casos (fig. 2; apêndice A – não incluída no trabalho 3).

Todas as alterações moleculares no gene da alfa-espectrina, detectadas em nove das dez famílias estudadas, podem ser encontradas na tabela 3 (apêndice A).

No caso da família portadora de ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ associada à presença de uma beta-espectrina truncada (trabalho 4), a mutação eliptocitogênica tinha maior probabilidade de localizar-se no gene da beta-espectrina. Assim, iniciamos a investigação do defeito molecular através da análise do cDNA por PCR. Uma região abrangendo a porção final do gene, mais especificamente os últimos 4 éxons da beta-espectrina (éxons 29, 30, 31 e 32), foi amplificada. Isto foi feito com o objetivo de se detectar a perda de um destes éxons em um alelo, pois mutações de clivagem envolvendo as perdas dos éxons 30 e 31 tinham sido descritas (tabela 2 – apêndice A). Um fragmento de menor peso molecular foi detectado na paciente (fig. 4 – trabalho 4). Este fragmento do cDNA foi purificado e o seqüenciamento mostrou a ausência do éxon 30 (fig. 4 – trabalho 4). A perda do éxon 30 se deve a um padrão anômalo de clivagem do RNA, que é resultado de uma mutação de ponto G→A no nucleotídeo +1 do íntron 30 (IVS30 +1 G→A) (fig. 5 – trabalho 4).

Objetivo 2: Analisar a presença do alelo α^{LELY} e associar com a expressão da ElH em todos os pacientes portadores de mutações no gene da alfa-espectrina.

A determinação da presença do alelo α^{LELY} em todas as famílias estudadas portadoras de defeitos no gene da alfa-espectrina (trabalhos 1, 2 e 3), foi feita através da amplificação pela PCR do éxon 40 e do íntron 45 do gene da alfa-espectrina e subsequente digestão com as enzimas de restrição MwoI e AvaII, respectivamente. As mutações L1857V no éxon 40 e nt -12 C→T no íntron 45, que caracterizam o alelo α^{LELY} , abolem sítios de restrição existentes para estas enzimas, gerando um padrão de digestão de fácil caracterização (fig. 6 - trabalho 2).

O alelo α^{LELY} esteve presente em todas as famílias estudadas (trabalhos 1, 2 e 3), exceto na família 2, portadora de $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ (trabalho 1). Através da análise dos heredogramas familiares foi possível determinar o tipo de associação do alelo α^{LELY} com a mutação eliptocitogênica em todas as famílias, exceto na família 3, portadora de $\text{sp}\alpha\text{I}/65$, porque a mãe do propósito não estava disponível para estudo (trabalho 1).

Nas famílias portadoras de $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ e $\text{sp}\alpha\text{I}/50$, o alelo α^{LELY} esteve presente em heterozigose e associado em trans ao alelo eliptocitogênico (trabalhos 1 e 2), apresentando a seguinte configuração genética: $\alpha^{\text{ElH}}/\alpha^{\text{LELY}}$.

Já no caso das famílias portadoras de $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ o alelo α^{LELY} esteve presente tanto em heterozigose como em homozigose e três tipos de configuração genética foram encontrados: $\alpha^{\text{R28H}}/\alpha^{\text{LELY}}$ (configuração do tipo *trans*), $\alpha^{\text{R28H-LELY}}/\alpha$ (configuração do tipo *cis*) e $\alpha^{\text{R28H-LELY}}/\alpha^{\text{LELY}}$ (configuração do tipo *cis* e *trans* combinada ou configuração homozigota) (trabalho 3).

A descrição da presença do alelo α^{LELY} em todas as nove famílias portadoras de mutações no gene da alfa-espectrina, bem como o tipo de associação com o alelo eliptocitogênico, pode ser encontrada na tabela 3 (apêndice A).

4.1.2 Trabalho 1

Expression of spectrin $\alpha^{I/65}$ hereditary elliptocytosis in patients from Brazil

Expression of spectrin $\alpha^{I/65}$ hereditary elliptocytosis in patients from Brazil

PATRICIA H. L. PRANKE,^{1,3} DANIELA S. BASSERES,^{1,4} FERNANDO F. COSTA^{1,2} AND SARA T. O. SAAD^{1,2}

¹Hemocentro, ²Departamento de Clínica Médica, ³Departamento de Farmacologia, and ⁴Departamento Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

Received 29 December 1995; accepted for publication 13 May 1996

Summary. We report the clinical and laboratory findings in three unrelated families from southeastern Brazil with Sp $\alpha^{I/65}$ hereditary elliptocytosis (HE), including one homozygote and a patient presenting an elongated β -spectrin. In family 1, three patients presented the allele α -Lely in *trans* to the elliptocytogenic allele. In these three patients the blood smear showed pronounced elliptocytosis, poikilocytosis and a few small red cell fragments instead of the mild elliptocytosis observed in their father, who did not present the polymorphism. In family 2 we describe one homozygote, with consanguineous parents presenting with anaemia, splenomegaly, severe poikilocytosis and elliptocytosis, budding, microspherocytes and numerous fragments in the blood smear. In family 3 we found an elongated β Sp in a patient with Sp $\alpha^{I/65}$. The cause of the HE was the Sp $\alpha^{I/65}$, since the elongated β Sp was not found in his brother, who also presented with HE and Sp $\alpha^{I/65}$. Apparently the abnormal β Sp did not aggravate the HE, because both individuals had the same clinical and laboratory findings.

However, the proband presented a few more elliptocytes and poikilocytes than his brother, probably because the elongated β -spectrin may have disturbed the spectrin self-association. In fact, in the proband an abnormal band was observed in the nondenaturing gels, just above the Sp dimer, probably as a result of the association of the abnormal β Sp with the normal spectrin chains.

In the family studied here, both brothers presented the allele α -Lely, but, as their mother was dead, it was not possible to determine the polymorphism transmission. However, the high number of poikilocytes observed in the blood smear of both cases suggests an association in *trans* with the Sp $\alpha^{I/65}$. Thus, taken together, the data in this report indicate that HE secondary to Sp $\alpha^{I/65}$ abnormality is frequent in Brazil, and in one case it was associated with an apparently novel abnormal large β -spectrin.

Keywords: red cell membrane, hereditary elliptocytosis, α -spectrin, β -spectrin, elongated β -spectrin.

Hereditary elliptocytosis (HE) comprises a heterogeneous group of disorders characterized by elliptically shaped red cells and autosomal dominant inheritance. Patients have varying numbers of the abnormal erythrocytes in their blood and the clinical picture ranges from an asymptomatic condition to overt, clinically significant, haemolysis (Delaunay *et al.* 1990; Palek & Lambert, 1990). The most common abnormality involves a defective spectrin self-association (Liu *et al.* 1981, 1982; Coetzer & Zail, 1982). Spectrin, the major component of the red cell membrane skeleton, consists of two elongated chains arranged in an anti-parallel fashion to form $\alpha\beta$ heterodimers; the heterodimers interact in the head region of the two chains forming tetramers and oligomers (Morrow *et al.* 1980).

Limited tryptic digestion of spectrin (Sp) has enabled the identification of five α Sp and four β Sp structural domains (Speicher *et al.* 1980).

Several structural defects of the α I domain, associated with impaired $\alpha\beta$ heterodimer interaction, have been defined on the basis of abnormal limited tryptic digest maps in which there is a decrease in the normal 80 kD α I domain and a concomitant increase in one or more lower molecular weight peptides (Palek & Lambert, 1990). These spectrin defects are designated according to the molecular weight of the abnormal peptide (Palek, 1987). The inheritance of a low-expression allele of the red cell α -spectrin gene (allele α -Lely), associated to a defect in the Sp α I domain, is an important cause of the great variability of clinical expression in HE (Alloisio *et al.* 1991; Wilmoth *et al.* 1993).

The Sp $\alpha^{I/65}$ abnormality was discovered in black patients from West Africa (Lecomte *et al.* 1985; Alloisio *et al.* 1986)

Correspondence: Dr Sara T. O. Saad, HEMOCENTRO-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Table 1. Haematological data of patients with hereditary elliptocytosis (HE) related to spectrin $\alpha^{1/65}$.

	Hb (g/dl)	Retics ($\times 10^9/l$)	$\alpha 165/65 + 80$ (%)	SpD/SpD + SpT (%)	α Lely
Family 1					
Propositus	10.3	92	69	18	+/-
Mother	12.9	45	0	8	-/+
Father	14.1	58	48	20	-/-
Sister	12.7	72	66	21	-/-
Sister	11.4	59	ND	23	-/-
Brother	14.8	70	ND	ND	-/-
Family 2					
Propositus	7.9	224	100	33.9	--
Mother	13.5	100	43	31.2	--
Father	14.0	92	47	22.6	-/-
Family 3					
Propositus*	13.6	65	66	35	-/-
Father	14.5	53	0	10.5	+/-
Brother	13.4	60	59	28.5	-/-
Sister	12.7	ND	0	ND	-/-

* Presented an elongated β -spectrin (approximately 340 kD).

and in black patients from America and Haiti (Lawler *et al.* 1985). A similar variant was also reported in four families from North Africa and two South Italian families (del Giudice *et al.* 1992). The high incidence of this allele, reaching 1% in some Central West African countries (Lux & Palek, 1995), suggests that the $Sp\alpha^{1/65}$ allele provides resistance to malaria. This hypothesis has been supported by *in vitro* studies (Schulman *et al.* 1990).

The Brazilian population is characterized by different racial groups involved in an intense process of miscegenation. Thus, in addition to the native population and the Portuguese colonists, Brazil has 2.5–4.0 million inhabitants of African slave origin and large numbers of immigrants from Italy, Spain, Germany, Japan and the Middle East.

In this report, we present three unrelated families from Brazil with hereditary elliptocytosis and $Sp\alpha^{1/65}$, including one homozygote and a patient presenting an elongated β -spectrin. As far as we know, this is the first report about HE patterns in South America.

PATIENTS AND METHODS

We have studied three HE families from southeastern Brazil with hereditary elliptocytosis, detected by clinical features and examination of the peripheral blood smear. Table 1 shows the haematological parameters in these families.

Patients

Family 1. The propositus was a 23-year-old black woman, who presented with pronounced elliptocytosis, poikilocytes and a few small fragments in the blood smear. Hb 10.3 g/dl, MCV 83 fl, RBC $3.7 \times 10^{12}/l$ and reticulocyte count $92 \times 10^9/l$ (2.5%). Mild splenomegaly was detected by ultrasonography. Two sisters presented similar clinical and

laboratory findings. The blood smear of their mother was normal but their father presented mild common HE with predominance of elliptocytes and absence of poikilocytes.

Family 2. The propositus was a 5-year-old black child who had been anaemic since birth, and presented with splenomegaly. His blood smear showed pronounced poikilocytosis, with some cells in the process of budding, anisocytosis, marked elliptocytosis, a few microspherocytes and numerous fragments: Hb 7.9 g/dl, MCV 87 fl, RBC $2.8 \times 10^{12}/l$, reticulocyte count $224 \times 10^9/l$ (8.0%). His parents were consanguineous (cousins) and asymptomatic, but their blood smears showed mild common HE.

Family 3. The propositus was a 23-year-old black man with no clinical manifestation. His blood smear showed pronounced elliptocytosis and poikilocytosis, a few of them in the process of budding, several spherocytes: Hb 13.4 g/dl, MCV 90 fl, RBC $4.5 \times 10^{12}/l$, reticulocyte count $65 \times 10^9/l$. His brother presented similar clinical and laboratory findings, but budding and poikilocytosis were less pronounced. Their sister and father were asymptomatic, and without HE. Their mother had died.

METHODS

After obtaining informed consent from the patients, venous blood was collected into acid citrate/dextrose solution and kept on ice for evaluation.

Protein biochemistry. Within 24–72 h of phlebotomy, erythrocyte ghosts were prepared by hypotonic lysis according to Dodge *et al.* (1963). Duplicate membrane protein samples were subjected to SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970) and 3.5–17% exponential gradient gels (Fairbanks *et al.* 1971); the gels were stained with Coomassie blue.

In order to quantify spectrin dimers and tetramers,

472 Patricia H. L. Pranke *et al*

spectrin was extracted from erythrocyte membranes by incubation in a low ionic strength buffer at $+4^{\circ}\text{C}$ and analysed by nondenaturing electrophoresis (Liu *et al.* 1981).

The proteins were quantified by densitometry of Coomassie blue stained gels at 540 nm (Hoefer, model GS 300, San Francisco, Calif.) and the area under the peaks determined by the computer program GS 365W, version 3.01. The amount of spectrin was expressed as a ratio to band 3 and SpD content as a percentage of total SpD and SpT. The amounts of SpD and Sp:band 3, in 30 normal controls, were $9.9 \pm 2.5\%$ (varying from 5% to 14%) and 1.02 ± 0.05 (varying from 0.90 to 1.11), respectively.

Spectrin extracts were digested by trypsin (TPCK) 1:100 (wt/wt) at 0°C for 20 h in PBS, pH 8. The digested products were electrophoresed on discontinuous SDS-polyacrylamide slab gels (Laemmli, 1970). The separating gel was composed of 10% acrylamide and 0.38% bisacrylamide and stained with Coomassie blue.

To characterize a protein with decreased mobility on SDS-PAGE, we performed immunoblotting, using polyclonal antihuman α - and β -spectrin antibodies. For this experiment, we ran simultaneous samples in a Biorad minigel apparatus containing two 6% polyacrylamide-SDS gels and one was stained with Coomassie blue. Electrophoretic transfer of the red cell membrane proteins, from the 6% polyacrylamide-SDS gel to nitrocellulose, was carried out for 2 h at 100 V as described by Towbin *et al.* (1979). Non-specific protein binding was reduced by preincubating the filter overnight at $+4^{\circ}\text{C}$ in blocking buffer (3% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with polyclonal antihuman α - or β -spectrin antibodies (kindly provided by Dr H. Hassoun, St Elizabeth's Hospital of Boston) for 20 h at $+4^{\circ}\text{C}$ and then washed for 60 min with blocking buffer without BSA. The blots were subsequently incubated with $2 \mu\text{Ci}$ of ^{125}I -protein A in 10 ml of blocking buffer for 1 h at 22°C and then washed for 2 h. The filters were exposed to Kodak X-Omat film with intensifying screens at -70°C . The second gel was stained with Coomassie blue.

DNA analysis. Genomic DNA was extracted by standard techniques using phenol-chloroform. The duplication of codon 154 was detected through amplification of exon 4 by polymerase chain reaction (Saiki *et al.* 1985) and hybridization of allele-specific oligonucleotides as previously described (Roux *et al.* 1989). For the α Lely polymorphism investigation we screened the exon 40 and intron 45 mutations through the abolition of a *M*woI (Gallagher & Forget, 1994) and *A*vaII sites (Wilmotte *et al.* 1993), respectively.

RESULTS

Family 1

The spectrin content was normal; SpD was 18.3% in the proband, 20.7% and 23.0% in her two sisters (normal control SpD was 8%) and they were heterozygous for $\text{Sp}\alpha^{165}$. The ratio of α 165/65 + 80 kD fragment, obtained by densitometric tracings, was 70% in the proband and 50% in her father. The mother, who did not present HE, was homozygous for the α Lely polymorphism, but the

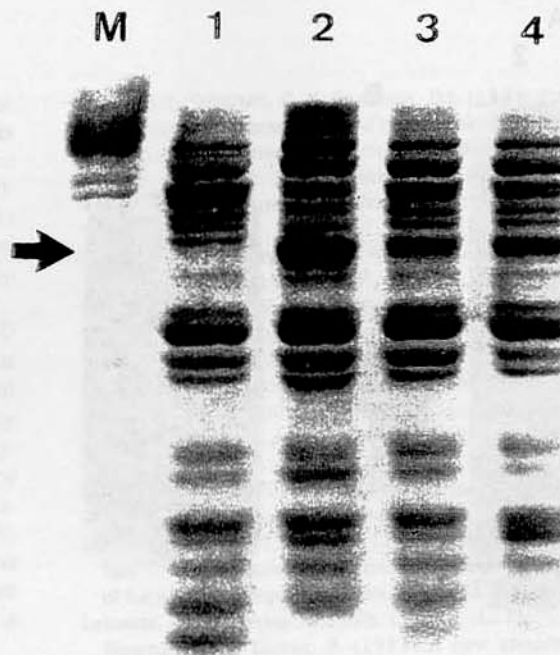


Fig 1. Spectrin digestion by trypsin (TPCK) 1:100 (wt/wt) at 0°C for 20 h in PBS showing the fragment $\text{Sp}\alpha^{165}$ (arrow). The fragments were subjected to SDS-10% polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. (M) white ghost; (1) normal control; (2) proband of family 2 (homozygote $\text{Sp}\alpha^{165}$); (3) and (4) father and mother of family 2 (heterozygotes $\text{Sp}\alpha^{165}$).

polymorphism was absent in the father (heterozygous for $\text{Sp}\alpha^{165}$). The patient and her two sisters presented the α Lely polymorphism in *trans* to the α^{165} allele. The brother, not affected by HE, was heterozygous for α Lely.

Family 2

The spectrin content was normal in the proband and his parents. SpD was 13.9% in the patient, 31.2% in his mother and 22.6% in his father (normal control SpD was 12.3%).

The proband was homozygous for the $\text{Sp}\alpha^{165}$ and his parents were heterozygous (Fig 1); the ratio of α 165/65 + 80 kD fragment was 43% in his mother and 47% in his father. They did not present the α Lely polymorphism.

Family 3

Although both brothers were heterozygous for the $\text{Sp}\alpha^{165}$, only the proband presented a protein with decreased mobility on SDS-PAGE (Fig 2). The molecular weight of this protein was 340 kD, based on the cDNA of α -spectrin (Sahr *et al.* 1990) and β -spectrin (Winkelmann *et al.* 1990). It was calculated in a semilog plot, from the Coomassie blue stained gels. In this individual the reduction of β -spectrin (β Sp) content suggested that this elongated protein was an

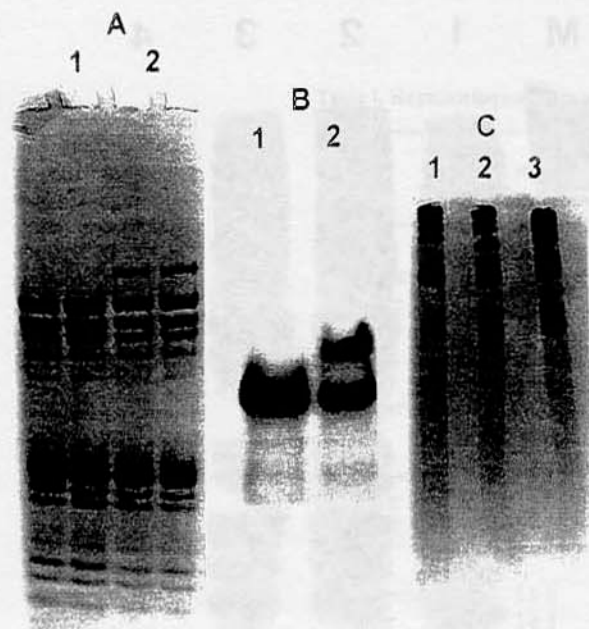


Fig 2. Family 1. (A) White ghost running in duplicate in SDS-PAGE 1.5–17% (Fairbanks, 1971) and stained with Coomassie blue: (1) brother; (2) propositus (note the abnormal band above the α -spectrin). (B) Immunoblotting with polyclonal antihuman β -spectrin antibody. The proteins were resolved on SDS 6% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, detected with the anti- β -spectrin antibody and 125 I-protein A and subjected to autoradiography: (1) brother; (2) propositus (the antibody identified the abnormal band). (C) Nondenaturing electrophoresis of spectrin extracted at 4°C (Liu *et al.*, 1981): (1) normal control; (2) brother; (3) propositus (note a double band at the Sp dimers zone).

abnormal β Sp. Thus the ratio of α/β Sp was 1.15 in the propositus, but was 0.91 in the control and 0.92 in his brother. The area of the abnormal band plus the β Sp area corrected this ratio in the propositus ($\alpha/\beta + \beta' = 0.91$). This elongated protein had an immunological identity to a polyclonal antihuman β Sp antibody (Fig 2) but did not react with antibody to α -spectrin. The Coomassie blue staining of the 6% polyacrylamide SDS gel confirmed the presence of the abnormal band in the same position detected by the antihuman β -spectrin antibody. Nondenaturing gels revealed an abnormal band just above the SpD in the propositus, probably product of dimers containing the elongated β Sp (Fig 2). SpD was 30.1% and 28.5% in the propositus and his brother, respectively, but when the area under the curve of the abnormal band was added to the SpD quantitation the SpD was 35%. Both brothers and their father and sister were heterozygous for the α^{165} polymorphism, but it was not possible to determine the polymorphism transmission, because we could not study the mother. The ratio of $\alpha^{165}/65 + 80$ kD fragment was 66% in the propositus and 59% in his brother.

Allele-specific oligonucleotides hybridization confirmed the duplication of codon 154 in all individuals with the $\text{Sp}\alpha^{165}$ allele.

DISCUSSION

The ethnic origin of the Brazilian population is heterogeneous and unevenly distributed within a country of continental dimensions: thus, non-whites make up 72% of the northeastern population and only 16% of the southern population.

This study is the first report of $\text{Sp}\alpha^{165}$ HE in South America. Apparently, the $\text{Sp}\alpha^{165}$ originated in Sub-Saharan Africa (Benin-Togo area) and spread through Europe, via North Africa (del Giudice *et al.*, 1992). The finding of this allele in three families from southeastern Brazil with African ancestry, indicates an African origin for the α^{165} allele in Brazil. On the other hand, due to the large number of slaves brought to our country from Central West Africa in the past, it is possible that this defect is a common cause of HE in Brazil. In fact, $\text{Sp}\alpha^{165}$ was observed in 30% of HE families studied in our clinic.

The molecular defect that gives rise to the $\text{Sp}\alpha^{165}$ is quite homogenous (Roux *et al.*, 1989) and the duplication of codon 154 was observed in all individuals presenting HE in this study. There is one description of another mutation, 151 Gly $\rightarrow$ Asp, causing $\text{Sp}\alpha^{165}$ (Boulanger *et al.*, 1994), but it was not observed in this study.

Allele α^{165} is a low-expression allele of the α -spectrin gene (Wilmutte *et al.*, 1993). It contains two mutations located in exon 40 (α^{1857} Leu $\rightarrow$ Val) and intron 45 (nt-12C $\rightarrow$ T). Probably the mutation in exon 40 has no functional consequence, but causes an increase of the α^{165} 41 kD fragment (Alloisio *et al.*, 1991). On the other hand, the mutation in intron 45 is responsible for a partial skipping of exon 46 (Wilmutte *et al.*, 1993).

Apparently the α -chains lacking exon 46 are poorly recruited by the β -chains (Speicher *et al.*, 1992). This polymorphism is a common defect in several populations (Marechal *et al.*, 1995) and the carriers are asymptomatic both in the heterozygous and the homozygous states. However, this polymorphism might increase the expression of the elliptocytogenic allele lying in *trans*, as observed in the propositus of family 1. She presented anaemia, mild reticulocytosis, and a high number of elliptocytes and poikilocytes, whereas her father, who was not a carrier of this polymorphism, had a lower number of elliptocytes, without poikilocytes, anaemia or reticulocytosis.

In family 2 we reported a case of a child with pronounced poikilocytosis and elliptocytosis, red cell fragmentation and few microspherocytes. He also presented moderate anaemia and splenomegaly. His parents were consanguineous and the child had inherited the $\text{Sp}\alpha^{165}$ from both of them. Despite the high frequency of $\text{Sp}\alpha^{165}$ in several populations, there are few descriptions of patients homozygous for this condition. Apparently this defect promotes a very homogenous picture, since our patient had similar clinical and haematological findings to the case described by Garbarz *et al.* (1986).

Finally, in family 3 we found an elongated β Sp in a patient with $\text{Sp}\alpha^{165}$. The cause of HE was $\text{Sp}\alpha^{165}$, since the elongated β Sp did not appear in another member of this family, also presenting HE and $\text{Sp}\alpha^{165}$. Apparently the abnormal β Sp did not aggravate the HE, because both

474 Patricia H. L. Franke et al

individuals had the same clinical and laboratory findings. However, the propositus presented a few more elliptocytes and poikilocytes than his brother, probably because the elongated β -spectrin may have disturbed the spectrin self-association. In fact, in the propositus, an abnormal band was observed in the nondenaturing gels, just above the Sp dimer, probably as a result of the association of the abnormal β Sp with the normal spectrin chains.

Considering the two bands in the SpD zone, the SpD quantitation was higher in the propositus (35%) than in his brother (28.5%). In addition, the elongated β Sp described in our study seems larger than β -spectrin Detroit reported by Johnson et al (1992), who did not analyse the allele α Lely. However, they found an association of the large β Sp with the $\text{Sp}\alpha^{1/65}$ and observed, in the patient presenting both defects, more severe microcytosis than usual for $\text{Sp}\alpha^{1/65}$. They suggested that this finding was related to functional defects in the large β -spectrin as a slight reduction in the tetramer association affinity and a reduced amount of spectrin, in a similar fashion to that observed in our patients.

In the family studied here, both brothers presented the allele α Lely but, as their mother was dead, it was not possible to determine the polymorphism transmission. However, the high number of poikilocytes observed in the blood smear of both cases suggests an association in *trans* with the $\text{Sp}\alpha^{1/65}$.

Therefore, taken together, the data in this report indicate that HE secondary to $\text{Sp}\alpha^{1/65}$ abnormality is frequent in Brazil, and in one case it is associated with an apparently novel abnormal large β -spectrin.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by FAPESP and CNPq.

REFERENCES

- Alloisio, N., Guertani, D., Morlé, L., Pothier, B., Ducluzeau, M.T., Soun, A., Colonna, P., Clerc, M., Philippe, N. & Delaunay, J. (1986) $\text{Sp}\alpha^{1/65}$ hereditary elliptocytosis in North America. *American Journal of Hematology*, 23, 113–122.
- Alloisio, N., Morlé, L., Marechal, J., Roux, A.F., Ducluzeau, M.T., Guetarni, D., Pothier, B., Baklouti, F., Baklouti, F., Ghanem, A., Kastally, R. & Delaunay, J. (1991) $\text{Sp}\alpha^{1/41}$: a common spectrin polymorphism at the α IV- α V domain junction: relevance to the expression level of hereditary elliptocytosis due to α -spectrin variants located in *trans*. *Journal of Clinical Investigation*, 87, 2169–2177.
- Boulanger, L., Dhermy, D., Garbaz, M., Silva, C., Randon, J., Wilmotte, R. & Delaunay, J. (1994) A second allele of spectrin α -gene associated with the $\alpha^{1/65}$ phenotype (allele $\alpha^{\text{Pont de Sûr}}$). *Blood*, 84, 2056–2057.
- Coetzer, T. & Zail, S. (1982) Spectrin tetramer-dimer equilibrium in hereditary elliptocytosis. *Blood*, 59, 900–905.
- Delaunay, J., Alloisio, N., Morlé, L. & Pothier, B. (1990) The red cell skeleton and its genetic disorders. *Molecular Aspects of Medicine*, 11, 161–241.
- del Giudice, E.M., Ducluzeau, M.T., Alloisio, N., Wilmotte, R., Delaunay, J., Perrotta, S., Cutillo, S. & Iolascon, A. (1992) $\alpha^{1/65}$ hereditary elliptocytosis in Southern Italy: evidence for an African origin. *Human Genetics*, 89, 553–556.
- Dodge, J.T., Mitchell, C. & Hanahan, D.J. (1963) The preparation and chemical characteristics of haemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 100, 119–130.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10, 2606–2614.
- Gallagher, P.G. & Forget, B.G. (1994) Spectrin St Louis and the α^{Lely} allele. *Blood*, 84, 1686–1687.
- Garbaz, M., Lecomte, M.C., Dhermy, D., Feo, C., Chaverroche, I., Gautero, H., Bournier, O., Picot, C., Goepp, A. & Boivin, P. (1986) Double inheritance of an $\alpha^{1/65}$ spectrin variant in a child with homozygous elliptocytosis. *Blood*, 67, 1661–1667.
- Johnson, R.M., Ravindranath, F.B. & Mukarram, H. (1992) A large erythroid spectrin β -chain variant. *British Journal of Haematology*, 80, 6–14.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–686.
- Lawler, J., Coetzer, T.L., Palek, J., Jacob, H.S. & Luban, N. (1985) $\text{Sp}\alpha^{1/65}$: a new variant of α subunit in a double heterozygous form of hereditary pyropoikilocytosis. *Blood*, 72, 1412–1415.
- Lecomte, M.C., Dhermy, D., Solis, C., Ester, A., Feo, C., Gautero, H., Bournier, O. & Boivin, P. (1985) A new abnormal variant of spectrin in black patients with hereditary elliptocytosis. *Blood*, 65, 1208–1217.
- Liu, S.C., Palek, J. & Prchal, J. (1982) Defective spectrin dimer-dimer association in hereditary elliptocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 2072–2076.
- Liu, S.C., Palek, J., Prchal, J. & Castleberry, R.P. (1981) Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 68, 597–605.
- Lux, S.E. & Palek, J. (1995) Disorders of the red cell membrane. *Blood: Principles and Practice of Hematology* (ed. by R. I. Handin, S. E. Lux and T. P. Stossel), p. 1701. Lippincott, Philadelphia.
- Maréchal, J., Wilmotte, R., Kanzaki, A., Dhermy, D., Garbaz, M., Galand, C., Tang, T.K., Yawata, Y. & Delaunay, J. (1995) Ethnic distribution of allele α^{Lely} , a low-expression allele of red cell spectrin α -gene. *British Journal of Haematology*, 90, 553–556.
- Morrow, J.S., Speicher, D.W., Knowles, W.J., Hsu, C.J. & Marchesi, T.J. (1980) Identification of functional domains of human erythrocyte spectrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 6592–6596.
- Palek, J. (1987) Hereditary elliptocytosis, spherocytosis and related disorders: consequence of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins. *Blood Reviews*, 1, 147–168.
- Palek, J. & Lambert, S. (1990) Genetics of the red cell membrane skeleton. *Seminars in Hematology*, 27, 290–332.
- Roux, A.F., Morlé, F., Guetarni, D., Colonna, P., Sahr, K., Forget, B.G., Delaunay, J. & Godet, J. (1989) Molecular basis of $\text{Sp}\alpha^{1/65}$ hereditary elliptocytosis in North America: insertion of a TGC triplet between codons 147 and 149 in the α -spectrin gene from five unrelated families. *Blood*, 73, 2196–2201.
- Sahr, K.E., Laurila, P., Kotula, L., Scarpa, A.L., Coupal, E., Leto, T.L., Linnenbach, A.J., Winkelmann, J.C., Speicher, D.W., Marchesi, V.T., Curtis, P.J. & Forget, B.G. (1990) The complete cDNA and polypeptide sequence of human erythroid alpha spectrin. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 4434–4443.
- Saiki, R., Scharf, S., Fallona, F., Mullis, K.B., Hornig, T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350–1354.
- Schulman, S., Roth, E.F., Jr, Cheng, B., Rybicki, A.C., Sussman, I.L., Wong, M., Wang, W., Ranney, H.M., Nagel, R.L. & Schwartz, R.S. (1990) Growth of *Plasmodium falciparum* in human erythrocytes

Spectrin $\alpha^{1/65}$ Hereditary Elliptocytosis in Brazil 475

- containing abnormal membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 7339–7343.
- Speicher, D.W., Morrow, J.S., Knowles, W.J. & Marchesi, T.V. (1980) Identification of proteolytically resistant domains of human erythrocyte spectrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 5673–5677.
- Speicher, D.W., Weglarz, L. & DeSilva, T.M. (1992) Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 14775–14782.
- Towbin, H., Staehlin, J.T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350–4354.
- Wilmotte, R., Maréchal, J., Morlé, L., Baklouti, F., Philippe, N., Kastally, R., Kotula, L., Delaunay, J. & Alloisio, N. (1993) Low expression allele α^{LELY} of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 ($\alpha^{V/41}$ polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 2091–2096.
- Winkeimann, J.C., Chang, J.G., Tse, W.T., Scarpa, A.L., Marchesi, V.T. & Forget, B.G. (1990) Full-length sequence of the cDNA for human erythroid β -spectrin. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 11827–11832.

4.1.3 Trabalho 2

Expression of spectrin $\alpha^{I/50}$ hereditary elliptocytosis and its association with the α^{LELY} allele

Daniela S. Bassères^{a, b}
Patricia H.L. Pranke^{a, c}
Dilmara Vicentim^a
Fernando F. Costa^{a, d}
Sara T.O. Saad^{a, d}

Expression of Spectrin α 1/50 Hereditary Elliptocytosis and Its Association with the α^{LELY} Allele

^a Hemocentro,
^b Departamento de Genética e Evolução,
^c Departamento de Farmacologia and
^d Departamento de Clínica Médica,
Universidade Estadual de Campinas, Brazil

Key Words

Hereditary elliptocytosis
Erythrocyte membrane
 α -Spectrin
Allele α^{LELY}
Brazilian population

Abstract

Hereditary elliptocytosis (HE) is a group of hemolytic anemias characterized by the presence of elliptical erythrocytes. The underlying alterations lie in the proteins of the membrane skeleton. Defects of the α 1 domain of spectrin have been defined based on a decrease in the normal 80-kD α 1 domain and a concomitant increase in one or more lower molecular weight peptides. We have studied three Brazilian kindreds with black ancestry, who presented mild common spa1/50 HE. Our aim was to determine the molecular alteration responsible for the spa1/50 HE observed in these three kindreds and to evaluate the presence and influence of allele α^{LELY} in the expression of this type of HE. In order to establish the molecular defect, exons 5, 6 and 11 were amplified and submitted to a nonradioactive single strand conformation polymorphism protocol. An identical band shift in exon 6 was observed in all 3 patients and their affected relatives. Direct sequencing of the amplification products of exon 6 showed the same molecular defect in all patients: a T→C substitution, responsible for the L260P mutation. Allele α^{LELY} , detected by PCR and restriction enzyme digestion, was present in the heterozygous form in the three probands and was associated *in trans* with the elliptocytogenic mutation. Blood smears of the patients with HE and α^{LELY} *in trans* showed pronounced elliptocytosis, poikilocytosis and a few small red cell fragments, whereas the blood smears of their relatives, who had HE without allele α^{LELY} , showed mild common HE with a predominance of ovalocytes and the absence of poikilocytes. We conclude that allele α^{LELY} does not lead to the worsening of clinical conditions when associated *in trans* with mild HE, but can be easily distinguished by a blood smear analysis. The predominance of the L260P mutation in the kindreds studied could be related to the colonization of Brazil during the slave trade by Africans from the Benin-Togo area, where this mutation is particularly common.

Introduction

Hereditary elliptocytosis (HE) is a group of disorders characterized by the presence of elliptical erythrocytes, a wide range of clinical manifestations and by an autosomal dominant inheritance [1]. The molecular defects responsible for these abnormalities lie in the membrane skeleton, a network of proteins on the inner surface of the red cell plasma membrane, which is responsible for maintaining the shape, stability and deformability of the erythrocyte [2].

Spectrin, the major component of the skeleton, is comprised of two homologous, but nonidentical, subunits known as α - and β -spectrin. These subunits intertwine in an antiparallel manner to form rodlike flexible heterodimers, which in turn self-associate in a head-to-head manner to form tetramers [2]. Both subunits can be cleaved into peptide domains (α I- α V and β I- β IV) after limited tryptic digestion. The α I domain is an 80-kD domain that comprises the NH₂-terminal region of the α subunit, whereas the β I domain (28 kD) contains the COOH-terminal region of the β -subunit. Both the α I and β I domains participate in the spectrin dimer (SpD) self-association process [3].

Several structural defects of the α I domain associated with impaired $\alpha\beta$ heterodimer interaction have been defined on the basis of abnormal limited tryptic digest maps. The latter have shown a decrease in the normal 80-kD α I domain and a concomitant increase in one or more lower molecular weight peptides [1, 4].

There are two subgroups of HE associated with an abnormal 50-kD proteolytic fragment: α I/50a and α I/50b. The subgroup α I/50a, which is more common and is apparently confined to the black population [5], consists of mutations occurring primarily in exon 6 of the α -spectrin gene. The substitutions α I L260P and α I S261P are very common and lead to an enhanced cleavage of 256 arginine and 258 lysine, respectively [5, 6]. Another mutation commonly observed, α I L207P, also leads to an enhanced cleavage of 258 lysine [7]. The α I/50b subgroup is more rare and is associated with mutations lying primarily in exon 11 of the α -spectrin gene, including E471P or H469R substitutions. These alterations lead to enhanced cleavage of arginine 470 or arginine 468, respectively [5, 6, 8]. It is of interest that, in the $\text{spaI}/50$ spectrin mutants, most of the amino acid substitutions are located in the helix 3 of a given repeat unit, near the connecting segment among the individual repeats [7]. Other defects have also been described in isolated cases of $\text{spaI}/50$ HE [9–11].

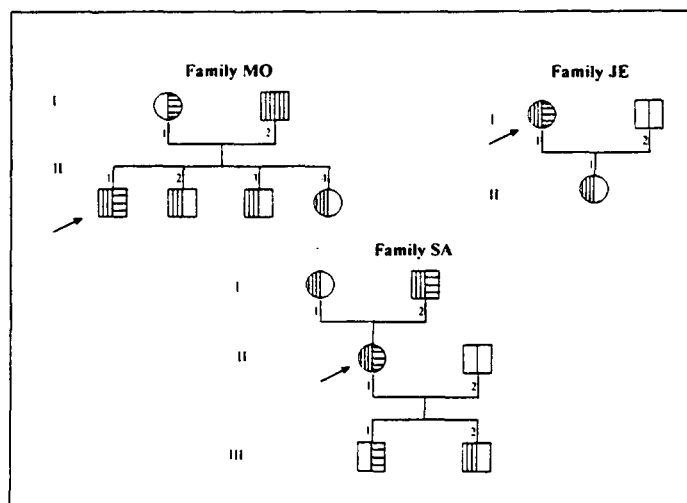


Fig. 1. Pedigrees of families MO, JE and SA. □ = Normal allele; ■ = L260P allele; ▨ = α^{LELY} allele. The arrows indicate the patients in each family.

Allele α^{LELY} is a low-expression allele of the α -chain of erythroid spectrin [12]. It is characterized by a C→G mutation at position α 1857 in exon 40 and a C→T (nt-12) mutation in intron 45. This last mutation is probably responsible for partial skipping of exon 46, which is essential for the nucleation process of the α -chains by the β -chains during erythropoiesis [12]. Allele α^{LELY} remains asymptomatic both in heterozygotes and homozygotes. In contrast, it enhances the expression level of deleterious α -alleles occurring *in trans*, and as such has clinical importance.

In this study we have determined the molecular defect responsible for HE in three Brazilian kindreds presenting with $\text{spaI}/50$ HE and impaired SpD self-association. In all 3 cases the defect was a T→C point mutation, resulting in L260P substitution. We have also assessed the presence and type of association of allele α^{LELY} in all 3 cases.

Patients and Methods

We have studied three families from southeast Brazil with HE detected by clinical features and examination of the peripheral blood smear. Family pedigrees are available in figure 1.

Patients

Family MO. The probitus was a 14-year-old boy, who presented with pronounced elliptocytosis, many poikilocytes and few small red cell fragments in the blood smear (fig. 2A). Hb 13.8 g/dl, MCV 80 fl, RBC $4.9 \times 10^{12}/l$ and reticulocyte count $42 \times 10^9/l$. The ultrasonography did not show splenomegaly or cholelithiasis. The

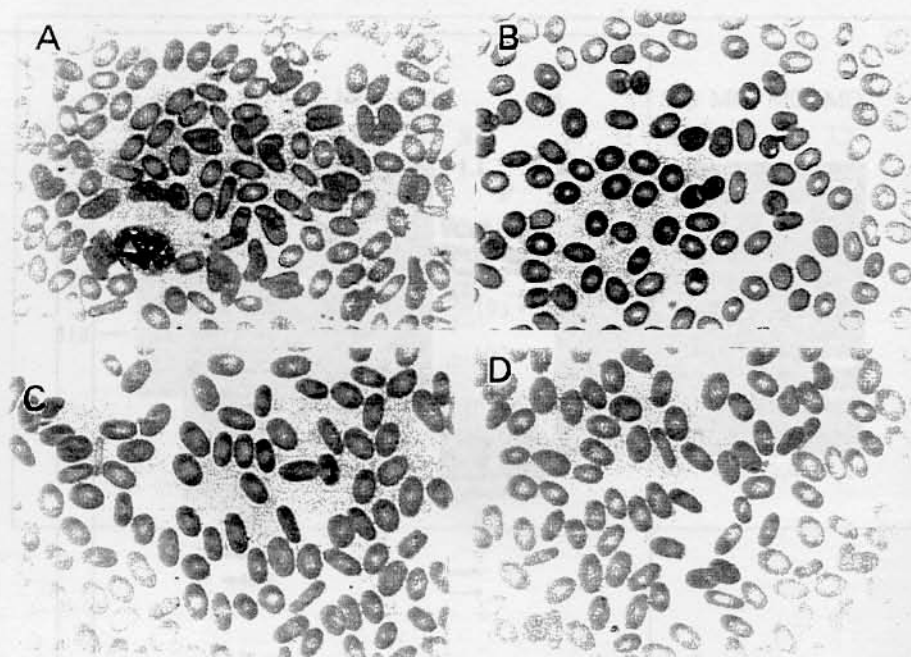


Fig. 2. Blood smear of the patient (subject II.1) of family MO (A), showing pronounced elliptocytosis (90%), many poikilocytes and few schisocytes. His mother (subject I.2; B), has many ovalocytes (40%) and no poikilocytes or schisocytes. Blood smears of the patient (subject I.1) of family JE (C) and the patient (subject II.1) of family SA (D) show pronounced elliptocytosis, several poikilocytes and few schisocytes.

blood smear of his mother showed a predominance of ovalocytes and few poikilocytes (fig. 2B). His father, 2 brothers and 1 sister did not present HE.

Family JE. The proband was a 35-year-old woman, who presented with mild splenomegaly and had previously undergone cholecystectomy. Her blood smear showed pronounced elliptocytosis and several poikilocytes (fig. 2C), Hb 11.7 g/dl, MCV 92.7 fl, RBC $3.73 \times 10^{12}/l$ and reticulocyte count $115 \times 10^9/l$. The blood counts were repeated at least 10 times during the follow-up of the patient and the Hb level varied from 11.3 to 12.7 g/dl. The reticulocyte count was also performed 5 times and showed the following values: 54, 89, 115, 119 and $169 \times 10^9/l$. Indirect bilirubin was normal or in the upper limit in 3 examinations. Haptoglobin quantitation was not performed. Her parents were not available for study, but her daughter did not present HE.

Family SA. The proband was a 33-year-old woman, who was pregnant. She was referred to our clinic because the clinical pathologist observed elliptocytes in her blood smear in a routine examination. Besides the pronounced elliptocytosis detected, her blood smear also showed many poikilocytes and few schisocytes (fig. 2D), Hb 12.3 g/dl, MCV 89 fl, RBC $3.97 \times 10^{12}/l$ and reticulocyte count $48 \times 10^9/l$. Her father and her son presented mild common HE. They did not present hemolysis, but the blood smear of her father showed the same picture as hers, whereas her son had many ovalocytes and an absence of poikilocytes in the blood smear. Her mother and another son were normal.

Methods

After obtaining informed consent from the patients, venous blood was collected into acid citrate/dextrose solution and kept on ice for evaluation.

Protein Biochemistry. Within 24–72 h of phlebotomy, erythrocyte ghosts were prepared by hypotonic lysis according to Dodge et

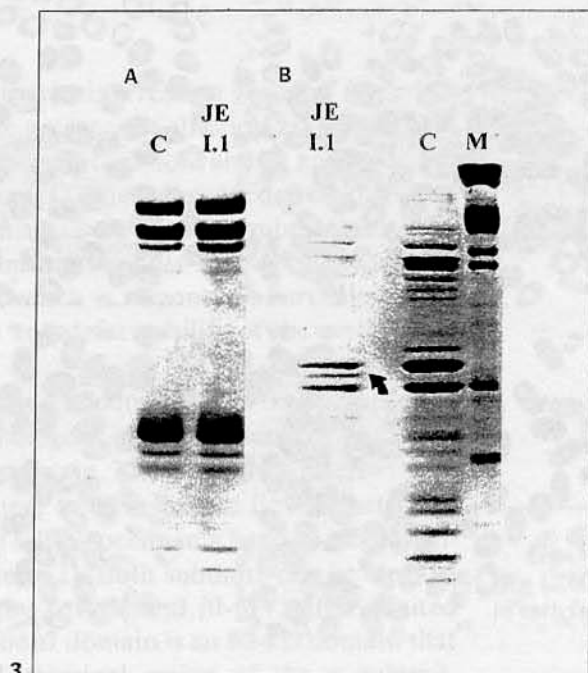
al. [13]. Membrane protein samples in duplicate were subjected to SDS-PAGE 12% [14] and 3.5–17% exponential gradient gels [15]; the gels were stained with Coomassie blue.

In order to quantify SpD and spectrin tetramers (SpT), spectrin was extracted from erythrocyte membranes by incubation in a low ionic strength buffer at 4°C and analyzed by nondenaturing electrophoresis [16].

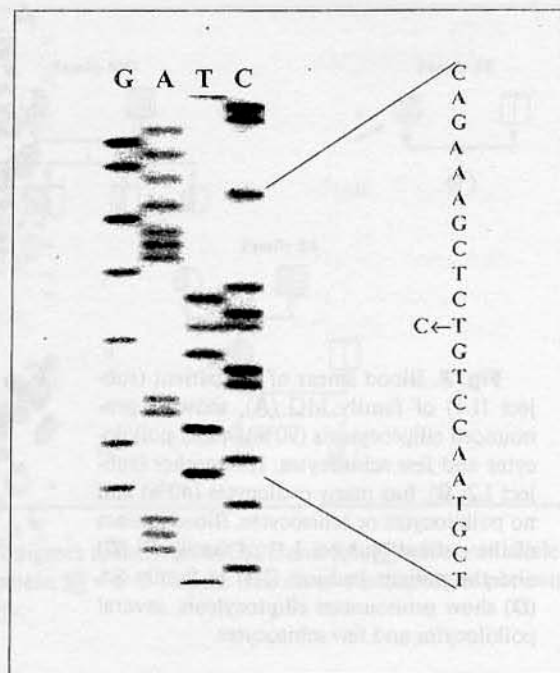
The proteins were quantified by densitometry of Coomassie blue-stained gels at 540 nm (Hoefer, model GS 300, San Francisco, Calif.) and the areas under the peaks were determined by the computer program GS 365W, version 3.01. The amount of spectrin was expressed as a ratio to band 3 and SpD content as a percentage of total SpD and SpT. The amount of SpD and Sp/band 3 in 30 normal controls was $9.9 \pm 5\%$ (varying from 5 to 14%) and 1.02 ± 0.05 (varying from 0.90 to 1.11), respectively.

Spectrin extracts were digested by trypsin (TPCK) 1:100 (wt/wt) at 0°C for 20 h in PBS pH 8.0. The digested products were separated by discontinuous SDS-polyacrylamide slab gels [14]. The separating gel was comprised of 10% acrylamide and 0.38% bisacrylamide and stained by Coomassie blue.

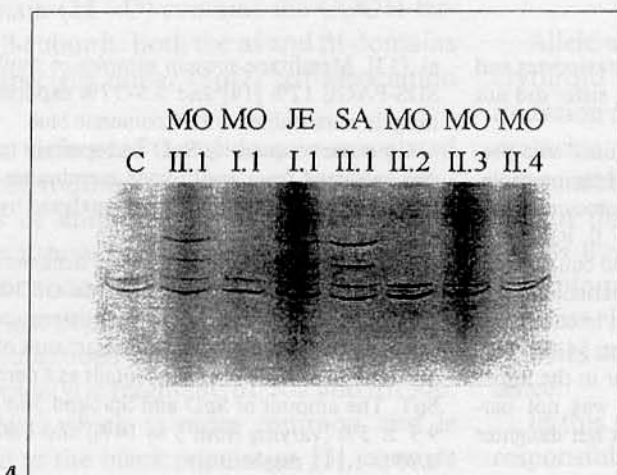
DNA Analysis. Genomic DNA was extracted by standard techniques using phenol-chloroform. PCR was performed as described elsewhere [17] in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Exons 5, 6 and 11 were amplified with primers described elsewhere [7, 10]. All amplification products were submitted to nonradioactive SSCP in the Phast System Apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) for 400 Vh at 15°C. The exon 6 amplification products were sequenced according to Thermo Sequenase™ cycle sequencing kit (Amersham, Cleveland, Ohio). For the α^{LELY} polymorphism investigation, we screened the exon 40 and intron 45 mutations through the abolition of a *MwoI* [18] and *AvaII* sites [12], respectively.



3



5



4

Fig. 3. Electrophoretic analysis of red cell membrane proteins. **A** 3.5–17% exponential gradient SDS-polyacrylamide gel of total membrane proteins stained with Coomassie blue. **B** Discontinuous SDS-PAGE of tryptic digests of spectrin shows an enhanced α I/50-kD fragment (arrow) in the patient of family JE compared to the control (C). M = Ghost.

Fig. 4. Nonradioactive SSCP showing an identical band shift in the patient (subject II.1) of family MO, the patient (subject I.1) of family JE and the patient (subject II.1) of family SA (6). The shift was absent in the control (C) and in the other members of family MO: father (I.1), brother 1 (II.2), brother 2 (II.3) and sister (II.4).

Fig. 5. Genomic DNA sequencing of patient (subject II.1) of family MO showing the T→C substitution in exon 6 (L260P).

Results

In this work we analyzed three Brazilian kindreds with $\text{spaI}/50$ HE. Densitometric scanning of Coomassie blue-stained SDS-PAGE did not reveal abnormal bands or protein deficiency in any of the 3 patients (fig. 3A). All the 3 probands and the subject I.2 of family MO showed increased amounts of SpD in relation to the control (table 1). After tryptic digestion of spectrin they showed an increased expression of the $\text{spaI}/50$ -kD fragment (fig. 3B).

The investigation of the underlying molecular defects was performed through PCR amplification of exons 5, 6 and 11 of the α -spectrin gene, followed by submission of the amplification products to nonradioactive single strand conformation polymorphism (SSCP). Exons 5 and 11 showed no migration abnormalities in all three families. However, the 20% nondenaturing polyacrylamide gel of single-stranded DNA of exon 6 showed an identical band shift in all individuals affected (fig. 4). Direct sequencing of the PCR products revealed, in all the probands of the three families, a T→C substitution, leading to the L260P amino acid change (fig. 5).

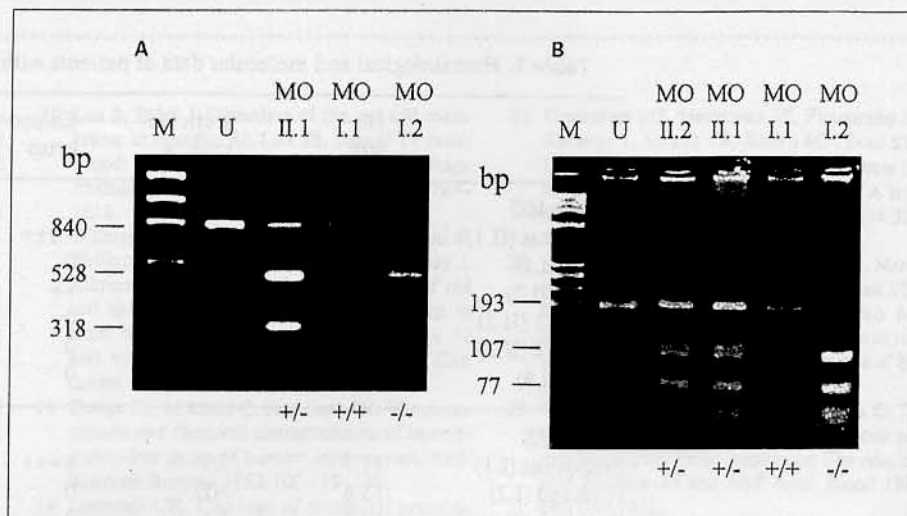


Fig. 6. Digestion patterns of PCR products using the enzymes *AvaII* (A) and *MwoI* (B) in family MO. Similar patterns were obtained for the other two families. M = ϕ X174; U = undigested PCR; +/- = $\alpha^{\text{LELY}}/\alpha$; -/- = α/α ; +/+ = $\alpha^{\text{LELY}}/\alpha^{\text{LELY}}$.

Allele α^{LELY} was present in the three propiiti in heterozygosity (fig. 6). By the analysis of family pedigrees it was possible to determine that the α^{LELY} polymorphism was associated *in trans* with the elliptocytogenic mutation in the patients of all three families (table 1).

The molecular analysis allowed us to build informative genealogical trees of the three families (fig. 1).

Discussion

In this study we present three Brazilian kindreds with *spaI/50a* HE. All the individuals affected bore the L260P substitution, indicating that this mutation may be frequent among black descendents in the southeast of Brazil.

In a study in West Africa, Lecomte et al. [19] observed that the *spaI/50a* variant, recurrently found in southern Benin and Togo, was associated with the L260P substitution and occurred among highly related ethnic groups. In a more recent study made in Benin [20], the L260P substitution was found among two highly related ethnic groups in a restricted area in the southeast. On the other hand, black HE subjects originating from the West Indies or North America [7] also present the *spaI/50a* variant associated with L207P substitution, known as sp Saint Louis [18], as well as the L260P mutation.

The lack of the L207P substitution in our study may reflect the fact that the Brazilian black population has a different genetic background from the West Indies or North American black population, where both the L207P

and L260P mutations seem to be frequent. In order to confirm that the *spaI/50a* mutations have different frequencies among these populations, a larger sample of *spaI/50a* HE subjects should be analyzed. The difference in the genetic background, however, was already observed in β -globin haplotypes studies [21, 22], where distinct β -globin haplotypes frequencies were observed among these populations. This difference in the genetic background probably arose through the use of different migration routes from Africa during the slave trade [23–26].

Allele α^{LELY} is a low expression allele of the α -spectrin gene [12] and is comprised of two mutations located in exon 40 (L1857V) and intron 45 (nt-12C→T). Probably, the mutation in exon 40 has no functional consequence, but causes an increase in the α V 41-kD fragment [27]. On the other hand, the mutation in intron 45 is responsible for the partial skipping of exon 46 during splicing [12].

Apparently, α -chains lacking exon 46 are poorly recruited by the β -chains during membrane assembly [28]. This polymorphism is a common defect in many populations [29] and the carriers are asymptomatic, whether heterozygous or homozygous. However, such polymorphism might increase the expression of the elliptocytogenic allele lying *in trans*.

Thus, in family MO and SA the patients had a normal Hb content and reticulocyte count, and showed no hemolysis. Both had a high number of elliptocytes, many poikilocytes and few schisocytes in their blood smears (fig. 2A, D). The HE members of both families, who lacked the α^{LELY} allele, had many ovalocytes, but no poikilocytes or schisocytes (fig. 2B). In family JE, the propiitus had

Table 1. Hematological and molecular data of patients with HE related to spectrin $\alpha^{I/50}$

	Hb g/dl	Reticulo- cyte, %	Ellipto- cytes	L260P	α^{LELY}	SpD/SpD+T ^a %
<i>Family MO</i>						
Propositus (II.1)	14.1	1.1	++++	+/-	+/-	33.3
Father (I.1)	14.4	1.4	0	-/-	+/+	ND
Mother (I.2)	13.2	1.0	++	+/-	-/-	35.0
Brother 1 (II.2)	14.4	1.0	0	-/-	+/-	ND
Brother 2 (II.3)	13.8	0.9	0	-/-	+/-	ND
Sister (II.4)	13.1	1.1	0	-/-	+/-	ND
<i>Family JE</i>						
Propositus (I.1)	11.7	3.7	++++	+/-	+/-	29.0
Husband (I.2)	13.6	ND	0	-/-	-/-	ND
Daughter (II.1)	13.5	1.5	0	-/-	+/-	ND
<i>Family SA</i>						
Propositus (II.1)	12.2	0.5	++++	+/-	+/-	30.0
Father (I.1)	14.9	1.3	++++	+/-	+/-	ND
Mother (I.2)	13.6	0.4	0	-/-	+/-	ND
Husband (II.2)	15.4	0.4	0	-/-	-/-	ND
Son 1 (III.1)	12.3	0.3	++	+/-	-/-	ND
Son 2 ^b (III.2)	9.9	1.1	0	-/-	+/-	ND

ND = Not determined.

^a Control values for SpD/SpD+T are depicted in Methods.^b Seven-month-old boy.

mild splenomegaly, having already undergone cholecystectomy, and sometimes showed an elevated number of reticulocytes, indicating the presence of hemolysis. This subject also had a high number of elliptocytes in the blood smear, with the presence of few poikilocytes and schisocytes (fig. 2C).

Hereditary pyropoikilocytosis has been described in a patient presenting a *spaI*/74 mutation associated *in trans* with the α^{LELY} allele [27]. However, our study showed that the association of α^{LELY} allele *in trans* with the *spaI*/50 L260P substitution did not lead to a pronounced worsening of clinical or laboratory features, although it may induce mild hemolysis. In another study [30], we observed that the α^{LELY} allele associated *in trans* with the 154 Leu duplication also had a low impact on the hematological data of HE patients with *spaI*/65.

Therefore, we should expect that allele α^{LELY} would not lead to severe conditions, when associated *in trans* with mild HE mutations, but at least it might be easily recognized by the blood smear examination. However, sur-

prisingly, it does not seem to worsen the impairment of the SpD self-association process, since the dimer quantification showed similar results in subjects bearing and subjects lacking the allele α^{LELY} . Moreover, this is the first report of *spaI*/50 HE in South America.

References

- 1 Palek J, Jarolim P: Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol* 1993;30:249-283.
- 2 Gallagher PG, Forget BG: Spectrin genes in health and disease. *Semin Hematol* 1993;30:4-21.
- 3 Speicher DW, Morrow JS, Knowles WJ, Marchesi VT: A structural model of human erythrocyte spectrin: Alignment of chemical and functional domains. *J Biol Chem* 1982;257:9093-9101.
- 4 Palek J, Lambert S: Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 1990;27:290-332.
- 5 Palek J, Sahr KE: Mutations of the red blood cell membrane proteins: From clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood* 1992;80:308-330.
- 6 Sahr KE, Takashi T, Scarpa A, Laughinghouse K, Marchesi SL, Agre P, Linnenbach AJ, Marchesi VT, Forget BG: Sequence and exon-intron organization of the DNA encoding the α domain of human spectrin. *J Clin Invest* 1989;84:1243-1252.
- 7 Gallagher PG, Tse WT, Coetzer T, Lecomte MC, Garbarz M, Zarkowsky HS, Baruchel A, Ballas SK, Dhermy D, Palek J, Forget BG: A common type of the spectrin α 46-50a-kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from the proteolytic cleavage site. *J Clin Invest* 1992;89:892-898.
- 8 Marchesi SL, Letsinger JT, Speicher DW, Marchesi VT, Agre P, Hyun B, Gulati G: Mutant forms of spectrin α -subunits in hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 1987;80:191-198.
- 9 Venezia ND, Alloisio N, Forissier A, Denoroy L, Aymerich M, Vives-Corrons JL, Besalduch J, Besson I, Delaunay J: Elliptopoikilocytosis associated with the α 469 His $\rightarrow$ Pro mutation in spectrin Barcelona ($\alpha^{1/50a-46b}$). *Blood* 1993;82:1661-1665.
- 10 Gallagher PG, Roberts WE, Benoit L, Speicher DW, Marchesi SL, Forget BG: Poikilocytic hereditary elliptocytosis associated with spectrin Alexandria: An α 150b kD variant that is caused by a single amino acid deletion. *Blood* 1993;82:2210-2215.
- 11 Lux S, Palek J: Disorders of the red cell membrane; in Handlin RI, Lux SE, Stossel TP (eds): *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Philadelphia, Lippincott, 1995, pp 1701-1818.
- 12 Wilmotte R, Maréchal J, Morlé L, Baklouti F, Philippe N, Kastally R, Kotula L, Delaunay J, Alloisio N: Low expression allele α^{LELY} of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 ($\alpha^{V/41}$ polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *J Clin Invest* 1993;91:2091-2096.
- 13 Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ: The preparation and chemical characteristics of haemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119-130.
- 14 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-686.
- 15 Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH: Electrophoretic analysis of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971;10:2606-2614.
- 16 Liu S-C, Palek J, Prchal J, Castleberry RP: Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest* 1981;68:597-605.
- 17 Saiki RK, Geelfond DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
- 18 Gallagher PG, Forget BG: Spectrin St Louis and the α^{LELY} allele. *Blood* 1994;84:1684-1686.
- 19 Lecomte MC, Dhermy D, Gautero H, Bourmier O, Galand C, Boivin P: L'elliptocytose héréditaire en Afrique de l'Ouest: fréquence et répartition des variants de la spectrine. *C R Acad Sci* 1988;306:43-46.
- 20 Giele-Kakai C, Garbarz M, Lecomte MC, Leborgne S, Galand C, Bourmier O, Devaux I, Gautero H, Zohoun I, Gallagher PG, Forget BG, Dhermy D: Epidemiological studies of spectrin mutations related to hereditary elliptocytosis and spectrin polymorphisms in Benin. *Br J Haematol* 1996;95:57-66.
- 21 Gonçalves MS, Nechtman JF, Figueiredo MS, Kerbaux J, Arruda VR, Sonati MF, Saad STO, Costa FF, Storing TA: Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: A study of the β s haplotypes. *Hum Hered* 1994;44:322-327.
- 22 Costa FF, Arruda VR, Gonçalves MG, Miranda SRP, Carvalho MH, Sonati MF, Saad STO, Gesteira F, Fernandes D, Nascimento ML, Queiroz IL: β s-Gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. *Am J Hematol* 1994;45:96-97.
- 23 Nagel RL, Rao SK, Dunda-Belk-Hadja O: The hematological characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: The relationship between A γ and HbF level. *Blood* 1987;69:1026-1030.
- 24 Month SR, Wood RW, Trifillis PT, Orchowski PJ, Sharon B, Ballas SK, Surrey S, Schwartz E: Analysis of 5' flanking regions of the γ -globin genes from major African haplotype backgrounds associated with sickle cell disease. *J Clin Invest* 1990;85:363-370.
- 25 Curtin PD: *The Atlantic Slave Trade: A Census*. Milwaukee, University of Wisconsin Press, 1969.
- 26 Nagel RL: The origin of hemoglobin S gene: Genetic and anthropologic consequences. *Einstein Q* 1984;2:53-62.
- 27 Alloisio N, Morlé L, Maréchal J, Roux A-F, Ducluzeau M-T, Guetarni D, Pothier B, Baklouti F, Ghanem A, Kastally R, Delaunay J: Sp $\alpha^{V/41}$: A common spectrin polymorphism at the α IV- α V domain junction. *J Clin Invest* 1991;87:2169-2177.
- 28 Speicher DW, Weglarz L, DeSilva TM: Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site. *J Biol Chem* 1992;267:14775-14782.
- 29 Maréchal J, Wilmotte R, Kanzaki A, Dhermy D, Garbarz M, Galand C, Tang TK, Yawata Y, Delaunay J: Ethnic distribution of allele α^{LELY} , a low-expression allele of red cell spectrin α -gene. *Br J Haematol* 1995;90:553-556.
- 30 Pranke PHL, Bassères DS, Costa FF, Saad STO: Expression of spectrin $\alpha^{1/65}$ in patients from Brazil. *Br J Haematol* 1996;94:470-475.

4.1.4 Trabalho 3

Association of the α -spectrin R28H mutation with allele α^{LELY} and with $\alpha\text{I}/\alpha\text{II}$ domain haplotypes in three Brazilian families

Eur J Haematol 2000; 64: 53–58
Printed in U.K. All rights reserved

Copyright © Munksgaard 2000
EUROPEAN
JOURNAL OF HAEMATOLOGY
ISSN 0902-4441

Association of the α -spectrin R28H mutation with allele α^{LELY} and with α I/ α II domain haplotypes in three Brazilian families

Bassères DS, Bordin S, Costa FF, Saad STO. Association of the α -spectrin R28H mutation with allele α^{LELY} and with α I/ α II domain haplotypes in three Brazilian families.

Eur J Haematol 2000; 64: 53–58. © Munksgaard 2000.

Abstract: We have studied three Brazilian kindreds presenting spectrin α I/74 hereditary elliptocytosis (HE) due to a G→A substitution, responsible for the R28H mutation. The mutant allele was associated with α I domain haplotype 1 (XbaI⁺/MspI⁺/PvuII⁺) in all three families and with two different α II domain haplotypes (1/RIT, 4/RVR). This result may reflect that this mutation occurs in a "hot spot" and may have arisen more than once or that a crossing over event may have occurred between the two domains studied. We detected one new haplotype in the α I domain (haplotype 3 – XbaI⁺/MspI⁺/PvuII⁺). The mutant allele was associated with the lack of the α II domain Alu insertion in all three cases. Allele α^{LELY} , detected by PCR and restriction enzyme digestion, was present in the heterozygous form in patient 1 ($\alpha^{HE}/\alpha^{LELY}$) and in the homozygous form in patients 2 and 3 ($\alpha^{HE-LELY}/\alpha^{LELY}$). It was found to be associated with α II domain haplotypes 1 (RIT) and 4 (RVR) and with the presence and absence of the Alu insertion. This may have arisen through recombination events, since this polymorphism is located in the α IV– α V domain junction, which is far distant from the α II domain.

**Daniela S. Bassères^{1,3},
Silvana Bordin¹,
Fernando F. Costa^{1,2},
Sara T. O. Saad^{1,2}**

¹Center of Hematology and Hemotherapy,
²Department of Internal Medicine and
³Department of Genetics and Evolution,
State University of Campinas, Campinas,
SP, Brazil

Key words: elliptocytosis; spectrin; α^{LELY} ; Brazil; haplotypes

Correspondence: Sara T.O. Saad,
Hemocentro-UNICAMP, CP5198,
Campinas, SP, Brazil, CEP 13081-970
Tel. +55-19-786-3734
Fax. +55-19-289-1089
e-mail: sara@opelix.unicamp.br

Accepted for publication 30 August 1999

Hereditary elliptocytosis (HE) is a group of disorders characterized by the presence of elliptical erythrocytes, a wide range of clinical manifestations and autosomal dominant inheritance (1).

Several structural defects of the α I domain of spectrin have been described in HE. These defects are associated with an impaired $\alpha\beta$ heterodimer interaction and have been defined on the basis of abnormal limited tryptic digest maps. Such maps have shown a decrease in the normal 80 kD α I domain and a concomitant increase in one or more lower molecular weight peptides (1, 2).

In the HE subgroup associated with an abnormal 74 kD proteolytic fragment, the impairment of spectrin dimer self-association may be particularly severe (3). The molecular defects underlying the α I/74 HE have been elucidated in a number of HE cases and most of them consist of point mutations in the α -spectrin gene (4). Indeed, a "hot spot"

region for mutations has been described in codon 28 of the α -spectrin gene (5).

Polymorphisms of the α I and α II domains of spectrin have been used to detect different haplotypes in these domains. Since most α -spectrin HE mutations occur in the α I domain, haplotyping of this domain is important in order to facilitate epidemiological and population-based genetic studies of these mutations (6). α II domain haplotyping is also considered valuable, since most α -spectrin HE mutations are linked to the same α II domain haplotype (7).

Allele α^{LELY} is a low-expression allele of the erythroid spectrin α -chain, which is characterized by an increased susceptibility of the α IV– α V domain junction to proteolysis, which enhances the α V/41 kD fragment after limited tryptic digestion of spectrin (8). This increased susceptibility to proteolysis is due to a C→G mutation at position α 1357 in

Bassères *et al.*

exon 40 of the α -spectrin gene (9). However, this mutation does not explain the low expression of allele α^{LELY} . A second mutation, C→T (nt -12), in intron 45 of the α -spectrin gene, was subsequently found to be linked to the exon 40 defect. This second mutation is probably responsible for the partial skipping of exon 46 during splicing, and therefore for the low level of expression (9). The skipping of exon 46 causes the deletion of six amino acids in the nucleation site of the α -spectrin chain. α -Chains lacking these amino acids are not recruited by the β -chains during membrane assembly, and consequently are not expressed (10, 11). Allele α^{LELY} remains asymptomatic in both heterozygotes and homozygotes because the α -chains are synthesized in a large excess relative to the β -chains, and the skipping of exon 46 is only partial. In contrast, allele α^{LELY} enhances the expression of deleterious α -alleles occurring *in trans*, and as such, has clinical importance. The clinical significance of this allele, compared to other low expression alleles, arises from its relatively high frequency in several populations (12, 13).

We have studied three Brazilian kindreds with $\alpha I/74$ HE and impaired self-association of spectrin dimers. The molecular defect was the R28H mutation in all cases. Allele α^{LELY} was present in all families. In one kindred it was associated *in trans*

to the R28H mutation ($\alpha^{HE}/\alpha^{LELY}$) and in the other two kindreds the patients were homozygous for this polymorphism ($\alpha^{HE-LELY}/\alpha^{LELY}$).

The mutant allele was also found to be associated with αI domain haplotype 1 (XbaI⁻/MspI⁻/PvuII⁻) in all three cases. Nevertheless it was associated with αII domain haplotype 1 (RIT) in one kindred and with αII domain haplotype 4 (RVR) in the other two kindreds. The Alu element was absent from the mutant allele in all cases. We have also detected a new haplotype in the αI domain.

Subjects and methods

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study, which was approved by the Ethics Committee of the University Hospital at Unicamp.

Family 1

The patient was an 8-yr-old boy of Black ancestry who presented increased osmotic fragility of the red cells, severe poikilocytosis and numerous schizocytes, spherocytes and a few ovalocytes in the blood smear (Table 1). The patient had a history of severe neonatal anemia and jaundice, and had received blood transfusions every 2 wk during the first year

Table 1. Hematological and protein biochemistry results for individuals with $\alpha I/74$ HE and association of the α^{LELY} polymorphism with the HE allele

	Hb levels (g/dl)	Reticulocyte count (%)	SpD/SpD + SpT ¹ (%)	$\alpha^{74}/\alpha^{74} + \alpha^{90}$ (%)	α^{LELY} allele association ²	Blood smear				
						Poiki	Schiz	Spher	Ovale	Ellip
Family 1										
Patient 1.1	3.8	20.5	35.5	51	Trans	---	---	--	-	0
Mother 1.2	12.9	5.2	33.0	48	None	0	0	0	--	-
Father 1.3	16.0	1.1	10.0	17	None					
Family 2										
Patient 2.1	10.1	3.5	32.0	44	Cis and trans	--	--	-	-	-
Mother 2.2	15.5	1.5	ND	ND	Cis	0	0	0	-	0
Father 2.3	17.9	0.9	3.0	25	None					
Family 3										
Patient 3.1	7.2	15.3	31.2	46	Cis and trans	--	--	-	0	-
Mother 3.2	12.3	1.9	17.5	24	Cis	0	0	0		
Father 3.3	14.9	0.7	ND	ND	None	0	0	0	-	0

¹ Hematological values before splenectomy.

² The amount of SpD in 30 normal controls was $9.9\% \pm 5\%$ (range 5–14%).

³ Type of association of the α^{LELY} allele in relation to the R28H mutation.

ND, not determined; Poiki, poikilocytes; Schiz, schizocytes; Spher, spherocytes; Ovalo, ovalocytes; Ellip, elliptocytes.

of life. At 14 months old he underwent splenectomy, and there was an improvement in his clinical picture. His hematological profile before splenectomy was Hb 3.8 g/dl, RBC $1.25 \times 10^{12}/l$, MCV 75fl, MCHC 35.0 g/dl, reticulocyte count $256.2 \times 10^9/l$ (20.5%), and his recent hematological profile was Hb 12.4 g/dl, RBC $5.92 \times 10^{12}/l$, MCV 54fl, MCHC 38.7 g/dl, reticulocyte count $153.9 \times 10^9/l$ (2.6%). His mother had a normal hematological profile, with the presence of ovalocytes and a few elliptocytes in the blood smear (Table 1). Nevertheless, her reticulocyte count was above normal (5.2%), which indicated the presence of compensated hemolysis.

Family 2

The patient was a 9-month-old boy of Italian origin who had many poikilocytes, a regular number of schizocytes and ovalocytes and a few spherocytes in the blood smear (Table 1). The patient had a history of neonatal anemia and jaundice, having received one blood transfusion. His hematological parameters were Hb 10.1 g/dl, RBC $3.5 \times 10^{12}/l$, MCV 77fl, MCHC 37.4 g/dl, reticulocyte count $122.5 \times 10^9/l$ (3.5%). His mother was asymptomatic and showed a normal hematological profile with only mild anisocytosis and a few ovalocytes in the blood smear (Table 1).

Family 3

The patient was a 3-month-old girl of Italian origin who had increased red cell osmotic fragility, many poikilocytes and a regular number of schizocytes and spherocytes in the blood smear (Table 1). She suffered from neonatal anemia and jaundice. Her hematological parameters were Hb 7.2 g/dl, RBC $2.51 \times 10^{12}/l$, MCV 78.6fl, MCHC 36.5 g/dl, reticulocyte count $384.0 \times 10^9/l$ (15.3%). Her mother was asymptomatic and showed a normal hematological profile, presenting only a mild anisocytosis and a few ovalocytes in the blood smear (Table 1).

Protein biochemistry

Analysis of spectrin dimers and digestion of spectrin extracts by trypsin were performed as described elsewhere (14–19). The α I/74 kD fragment content was expressed as a percentage of total α I/74 + α I/80 kD fragments.

Detection of the R28H mutation

Genomic DNA was extracted by standard techniques using phenol–chloroform. Exon 2 of the α -spectrin gene was PCR amplified with primers described elsewhere (5). All amplification products were submitted to nonradioactive SSCP in a Phast-

System Apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) for 400 V h at 15 °C. The exon 2 amplification products of the patients were subcloned into pMOSblue vectors (Amersham, Cleveland, OH), and sequenced using a Thermo Sequenase™ cycle sequencing kit (Amersham, Cleveland, OH).

Haplotyping of the α I and α II domains

To haplotype the α I domain, introns 2 and 5 of the α -spectrin gene were amplified as described elsewhere (6) and the polymorphisms assessed by digestion with restriction enzymes XbaI (intron 2) and MspI (intron 5). We also assessed the polymorphism in intron 5 through digestion with PvuII, since this polymorphism creates a MspI site and abolishes a PvuII site. To haplotype the α II domain, exons 16, 17 and 18 were amplified (7) and subsequently digested with HaeII, BamHI and DdeI, respectively. We also amplified intron 18 with the primers described by Gallagher *et al.* (7). A 450 bp difference in the size of the amplification product was used to determine the presence or absence of a known Alu insertion.

Detection of the α^{LELY} polymorphism

To study the α^{LELY} polymorphism, we screened for exon 40 and intron 45 mutations by digestion with restriction enzymes MwoI and an AvaII, respectively (9, 20).

Results

We have studied three Brazilian kindreds with HE and impaired self-association of spectrin dimers. Although no protein abnormalities were observed following SDS analysis, all patients of the three kindreds had increased amounts of spectrin dimers (SpD) in relation to the control (Table 1). The tryptic digestion of spectrin revealed an increase in the 74 kD fragment and a concomitant decrease in the normal 80 kD fragment in all patients, thus characterizing this type of HE as α I/74 HE (Table 1). In order to analyze the molecular defect, we performed a non-radioactive SSCP analysis of exon 2 of the α -spectrin gene of all patients and their parents followed by sequencing of abnormally migrating fragments. Using this technique we determined that all patients and affected parents showed a G→A (Arg→His) substitution in codon 28, thus confirming the R28H mutation (data not shown). All patients were heterozygous for the R28H mutation.

Haplotyping of the α I and α II domains of spectrin resulted in three different α I haplotypes and three different α II haplotypes in the three

Bassères *et al.*

families, including the presence of a haplotype not described previously, haplotype XbaI⁻/MspI⁻/PvuII⁻ in the α I domain (haplotype 3) (Table 2). The presence of an Alu insertion in intron 18 was also assessed. The mutant allele was associated with α I domain haplotype 1 (XbaI⁻/MspI⁻/PvuII⁻) in all three families (Table 2). Nevertheless, it was associated with α II domain haplotype 1 (RIT) in family 1 and haplotype 4 (RVR) in families 2 and 3 (Table 2). The Alu element was not present in the mutant allele in any case.

The α ^{LELY} allele was associated with α I domain haplotype 1, with α II domain haplotypes 1 and 4 and with the presence and absence of the Alu insertion in intron 18 (Table 2). This allele occurs *in trans* to the R28H mutation in patient 1 (α ^{HE}/ α ^{LELY}), but patients 2 and 3 were homozygous for this polymorphism (α ^{HE-LELY}/ α ^{LELY}). The α ^{LELY} allele occurs *in cis* to the R28H mutation (α ^{HE-LELY}/ α) in individuals 2.2 and 3.2 (Tables 1 and 2).

Discussion

This study describes three Brazilian kindreds with sp α I/74 HE and increased amounts of spectrin dimers. The same molecular defect, a CGT→CAT alteration in codon 28 (R28H), was observed in all

three kindreds and suggests that this mutation may be a frequent cause of α -spectrin-related sp α I/74 HE in Brazil.

The R28H mutation has been described in four families of known Negroid origin (5, 7, 10), in one family of Caucasian origin (21) and in one Tunisian family (22). We suggest that the R28H mutation may have reached Brazil through the immigration of Africans during the slave trade. Families 2 and 3 have no known Negroid ancestry. However, since the Brazilian population is very mixed, kindreds of alleged European ancestry may have had a certain degree of Negroid admixture in their past history.

Another possible explanation is that the R28H mutation may have arisen more than once in different ethnic backgrounds, particularly since codon 28 is considered a "hot spot" for mutations and three other alterations in this codon have been reported (5, 23, 24). The presence of R28H in a Caucasian French family supports this hypothesis (21). In an attempt to address this issue, we performed the haplotyping of the α I and α II domains of the α -spectrin gene and assessed the presence of an Alu insertion in intron 18 in the three families studied. The R28H mutation was associated with α I domain haplotype 1 (XbaI⁻/MspI⁻/PvuII⁻) in all three cases (Table 2), which strength-

Table 2. Extended haplotypes^a of all alleles encountered in the three families, including the presence or absence of the R28H mutation

		α I domain haplotype		α II domain haplotype			α II domain Alu insertion (a)	α ^{LELY} polymorphism	
		E ₁₅	E ₅ ^d	E ₁₅	E ₁	E ₄		E ₁₅	E ₄
Family 1									
Patient	+	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-
1.1	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-
Mother	+	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-
1.2	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (2)	H ⁻	I	T (3)	Alu ⁻	-	-
Father	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	+
1.3	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (3) ^e	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-
Family 2									
Patient	+	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	V	R (4)	Alu ⁻	+	+
2.1	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	+	+
Mother	+	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	V	R (4)	Alu ⁻	+	+
2.2	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (2)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-
Father	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	+	+
2.3	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-
Family 3									
Patient	+	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	V	R (4)	Alu ⁻	+	+
3.1	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	+	+
Mother	+	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	V	R (4)	Alu ⁻	+	+
3.2	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-
Father	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (1)	R	I	T (1)	Alu ⁻	+	+
3.3	-	XbaI ⁻	MspI ⁻ (2)	R	I	T (1)	Alu ⁻	-	-

^a Linkage of these alterations in specific alleles was determined through genotype analysis.

^b PvuII digestion of intron 5 was also performed and the digestion pattern was the opposite of that obtained with MspI digestion, as expected.

^c New haplotype.

(1), (2), (3) or (4): haplotypes designated numbers according to Gallagher *et al.* (6, 7).

E, exon; I, intron.

Haplotyping of α -spectrin R28H mutation

ens the hypothesis of a common origin for the mutant allele in the three families. However, one cannot overlook the fact that the αI haplotype 1, which has a frequency of approximately 50% (6), would be statistically as prone as haplotype 2 to bear the R28H mutation, had the latter occurred more than once.

The finding that families 2 and 3, both of Italian origin, bore the αII domain haplotype 4 associated with the R28H mutation, whereas family 1 bore haplotype 1 associated with R28H, supports the hypothesis that this mutation may have surfaced more than once in different ethnic backgrounds. Interestingly, αII domain haplotype 4 was found to be restricted to Black subjects in two population studies (7, 25). This is the first time that the αII domain haplotype 4 is described in subjects of Italian origin.

We also detected a new haplotype in the αI domain, since one of the subjects studied (individual 1.3) was heterozygous for XbaI digestion, but homozygous for a lack of digestion with MspI and for digestion with PvuII (XbaI⁺/MspI⁻/PvuII⁺ or haplotype 3). This new haplotype seems to be rare, since it has not been detected before.

Association of the α^{LELY} allele *in trans*, *in cis* or both with the R28H mutation were observed in these families (Table 2). The effect of such association on the expression of HE in the present study seems to correlate with that found by Randon *et al.* (10).

In the patient of family 1, the α^{LELY} allele was associated *in trans* with the R28H mutation. As expected, this individual had the most severe clinical picture of all the subjects studied, with a history of severe neonatal anemia and splenectomy. This patient's blood smear had a greater number of deformed cells (poikilocytes, schizocytes, spherocytes, and ovalocytes) (Table 1). He also had the highest amount of spectrin dimers (35.5%) and the highest expression of the 74 kD fragment (61%) (Table 1). His mother (individual 1.2), who also had the R28H mutation but lacked the α^{LELY} allele, had a rather benign clinical picture. Her hematological values were normal, except for a slight increase in the reticulocyte count and a few ovalocytes and elliptocytes in the blood smear. She had lower levels of spectrin dimers and 74 kD fragment expression (Table 1).

The patients of families 2 and 3 are homozygous for the α^{LELY} polymorphism, and therefore had a *cis* and *trans* association with the R28H mutation. Individuals with combined *cis* and *trans* association ($\alpha^{HE-LELY}/\alpha^{LELY}$) are expected to have the same clinical picture as those lacking allele α^{LELY} (α^{HE}/α). Indeed, Randon *et al.* (10) observed a similar

expression of HE of these two different genetic configurations, except during the neonatal period. In our case, there was a difference between these two genetic configurations that extended beyond the neonatal period. Whereas individual 1.2 (α^{HE}/α) had an almost normal hematological picture, and was diagnosed based on her son's condition, individuals 2.1 and 3.1 ($\alpha^{HE-LELY}/\alpha^{LELY}$) had anemia and more abnormal red cells in their blood smear (Table 1), being diagnosed based by the presence of severe anemia during the neonatal period. However, these two types of configuration had a similar protein biochemistry (Table 1).

The *cis* association ($\alpha^{HE-LELY}/\alpha$) tends to minimize the action of the mutant allele, and therefore patients with this genetic configuration show an improved clinical condition compared to the other configurations. Indeed, individuals 2.2 and 3.2, with a *cis* configuration, were asymptomatic and had only a slight alteration in the blood smear, presenting mild anisocytosis, a few ovalocytes and a slight increase in the amount of spectrin dimers and 74 kD fragment (Table 1).

These findings emphasize the influence of the α^{LELY} allele on the clinical picture of moderately severe HE mutations, such as the R28H mutation. The *trans* association of this allele with the R28H mutation leads to a discrete worsening of the clinical picture and alteration of the protein biochemistry values, whereas its association *in trans* with milder HE mutations, such as L260P and L154 duplication, leads only to an increased expression of deformed cells in the blood smear (18, 19).

The α^{LELY} allele is a very ancient allele, probably more ancient than the HE alleles themselves. Since this allele occurs with a frequency of approximately one third in most populations (12, 13), it is statistically more probable for HE mutations to have emerged in normal α -alleles (lacking the α^{LELY} polymorphism). Indeed, the L260P and R28C substitutions and the L154 duplication seem to be restricted to an *in trans* association with the α^{LELY} allele (8, 18, 19, 24). On the other hand, the L207P mutation is always found *in cis* to the α^{LELY} allele (20, 26), which suggests that this mutation indeed arose in an α^{LELY} allele. Finally, the R28H mutation presents both *in cis* and *in trans* association with the α^{LELY} allele (10, present study).

The presence of the R28H mutation in normal α alleles and in α^{LELY} alleles may have two explanations: 1) The mutation may have emerged more than once in different α -alleles concerning the α^{LELY} polymorphism, particularly since codon 28 is a "hot spot" for mutations (5). 2) The mutation may have been transferred to an α^{LELY} allele or to a normal α -allele through a recombination event. This raises the

Bassères *et al.*

possibility that the R28H mutation is more ancient than the L207P, L260P, R28C substitutions and L154 duplication.

Acknowledgements

We thank Dilmara L. Vicentim for her important technical contribution to this study. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

References

- PALEK J, JAROLIM P. Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol* 1993;30:249-283.
- PALEK J, LAMBERT S. Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 1990;27:290-332.
- COETZER T, LAWLER J, PRCHAL JT, PALEK J. Molecular determinants of clinical expression of hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. *Blood* 1987;70:766-772.
- LUX S, PALEK J. Disorders of the red cell membrane. In: HANDLIN RI, LUX SE, STOSSEL TP, eds. *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1995:1701-1818.
- COETZER TL, SAHR K, PRCHAL J, *et al.* Four different mutations in codon 28 of α spectrin are associated with structurally and functionally abnormal spectrin α^{1-4} in hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 1991;88:743-749.
- GALLAGHER PG, ROMANA M, WONG C, FORGET BG. Genetic basis of the polymorphisms of the α I domain of spectrin. *Am J Hematol* 1997;56:107-111.
- GALLAGHER PG, KOTULA L, WANG Y, *et al.* Molecular basis and haplotyping of the α II domain polymorphisms of spectrin: application to the study of hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. *Am J Hum Genet* 1996;59:351-359.
- ALLOISIO N, MORLE L, MARECHAL J, *et al.* Sp α^{V41} : a common spectrin polymorphism at the α IV- α V domain junction. *J Clin Invest* 1991;87:2169-2177.
- WILMOTTE R, MARECHAL J, MORLE L, *et al.* Low expression allele α^{LELY} of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 (α^{V41} polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *J Clin Invest* 1993;91:2091-2096.
- RANDON J, BOULANGER L, MARECHAL J, *et al.* A variant of spectrin low-expression allele alpha LELY carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. *Br J Haematol* 1994;88:534-540.
- WILMOTTE R, HARPER SL, URSITTI JA, MARECHAL J, DELAUNAY J, SPEICHER DW. The exon 46-encoded sequence is essential for stability of human erythroid α -spectrin and heterodimer formation. *Blood* 1997;90:4188-4196.
- MARECHAL J, WILMOTTE R, KANZAKI A, *et al.* Ethnic distribution of allele α^{LELY} , a low-expression allele of red cell spectrin α -gene. *Br J Haematol* 1993;90:553-556.
- BASSERES DS, SALLES TSI, COSTA FF, SAAD STO. Presence of allele α^{LELY} in an Amazonian Indian population. *Am J Hematol* 1998;57:212-214.
- DODGE JT, MITCHELL C, HANAHAN DJ. The preparation and chemical characteristics of haemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119-130.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-686.
- FAIRBANKS G, STECK TL, WALLACH DFH. Electrophoretic analysis of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971;10:2606-2614.
- LIU S-C, PALEK J, PRCHAL J, CASTLEBERRY RP. Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest* 1981;68:597-605.
- PRANKE PHL, BASSERES DS, COSTA FF, SAAD STO. Expression of spectrin $\alpha^{1/65}$ in patients from Brazil. *Br J Haematol* 1996;94:470-475.
- BASSERES DS, VICENTIM DL, COSTA FF, SAAD STO. Expression of spectrin α I/50 hereditary elliptocytosis and its association with the α^{LELY} allele in three Brazilian families. *Acta Hematol* 1998;100:32-38.
- GALLAGHER PG, FORGET BG. Spectrin St Louis and the α^{LELY} allele. *Blood* 1994;84:1684-1686 (correspondence).
- GARBARZ M, LECOMTE MC, FEO C, *et al.* Hereditary pyropoikilocytosis and elliptocytosis in a white French family with the spectrin α^{1-4} variant related to a CGT to CAT codon change (Arg to His) at position 22 of the spectrin α I domain. *Blood* 1990;75:1691-1698.
- BAKLOUTI F, MARECHAL J, MORLE L, *et al.* Occurrence of the α I 22 Arg-His (CGT-CAT) spectrin mutation in Tunisia: potential association with severe elliptopoikilocytosis. *Br J Haematol* 1991;78:108-113.
- FLOYD PB, GALLAGHER PG, VALENTINO LA, DAVIS M, MARCHESI SL, FORGET BG. Heterogeneity of the molecular basis of hereditary pyropoikilocytosis and hereditary elliptocytosis associated with increased levels of the spectrin α^{1-4} -kilodalton tryptic peptide. *Blood* 1991;78:1364-1372.
- LORENZO F, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, ALLOISIO N, *et al.* Severe poikilocytosis associated with a *de novo* α 28 Arg-Cys mutation in spectrin. *Br J Haematol* 1993;83:152-157.
- GLELE-KAKAI C, GARBARZ M, LECOMTE M-C, *et al.* Epidemiological studies of spectrin mutations related to hereditary elliptocytosis and spectrin polymorphisms in Benin. *Br J Haematol* 1996;95:57-66.
- DALLA VENEZIA N, WILMOTTE R, MORLE L, *et al.* An α -spectrin mutation responsible for hereditary elliptocytosis associated *in cis* with the α^{V41} polymorphism. *Hum Genet* 1993;90:641-644.

4.1.5 Trabalho 4

β -spectrin Campinas: a novel shortened β -chain variant associated with skipping of exon 30 and hereditary elliptocytosis

British Journal of Haematology, 1997, 97, 579–585

β -Spectrin Campinas: a novel shortened β -chain variant associated with skipping of exon 30 and hereditary elliptocytosis

DANIELA S. BASSÈRES,^{1,4} PATRICIA H. L. PRANKE,^{1,3} TEREZA S. I. SALES,¹ FERNANDO F. COSTA^{1,2}
AND SARA T. O. SAAD^{1,2} ¹Hemocentro, ²Depto de Clínica Médica, ³Depto de Farmacologia
and ⁴Depto de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brazil

Received 18 September 1996; accepted for publication 26 February 1997

Summary. β -Spectrin Campinas is a novel spectrin variant associated with a shortened β -chain in a kindred with hereditary elliptocytosis (HE). The propositus and her mother exhibited increased amounts of spectrin dimers and an increase in the α I 74 kD fragment from the α -chain after partial tryptic digestion of spectrin. The shortened β -chain appeared as an additional band of approximately 200 kD on SDS-PAGE. In order to delineate the molecular defect of this abnormality at the gene level, reticulocyte mRNA was transcribed into cDNA and the last four exons of the β -spectrin gene were amplified. Agarose gel of the amplification product of the propositus revealed the expected band of 487 bp as well as a shortened band of approximately 300 bp (size determined on gel). This shortened cDNA amplification product was cloned and nucleotide sequencing revealed the absence of the entire exon 30. In order to determine the underlying mutation responsible for this abnormal splicing,

a genomic DNA fragment containing exons 30 and 31 was amplified and nucleotide sequencing revealed a G $\rightarrow$ A substitution at the 5' donor splice site consensus sequence of intron 30 (nt + 1 IVS30). The skip splicing observed in this study results in a frameshift, creating a new stop codon and causing a deletion of 129 aminoacids at the very COOH-terminus of the protein, thus impairing spectrin dimers self-association.

We classified this HE as spherocytic HE because the propositus presented a few spherocytes in addition to many elliptocytes in the blood smear, whereas her mother, who was splenectomized, showed many schizocytes, poikilocytes and spherocytes.

Keywords: red cell membrane, hereditary elliptocytosis, truncated β -spectrin, splicing, exon skipping.

Hereditary elliptocytosis is a group of disorders characterized by the presence of elliptical erythrocytes and by a heterogeneous nature in terms of disease severity, abnormalities of red blood cell morphology and underlying molecular defects (Palek & Jarolim, 1993). These molecular defects lie in the membrane skeleton, a network of proteins on the inner surface of the red cell plasma membrane, responsible for maintaining the shape, stability and deformability of the erythrocyte (Gallagher & Forget, 1993).

Spectrin, the major component of the skeleton, is comprised of two homologous, but non-identical, subunits: α and β spectrin. These subunits intertwine in an anti-parallel manner to form rodlike flexible heterodimers, which in turn self-associate in a head-to-head manner to form tetramers (Gallagher & Forget, 1993). Both subunits can be divided into peptide domains after limited tryptic digestion,

named α I to α V and β I to β IV. The α I domain has normally 80 kD and comprises the NH₂-terminal region of the α subunit. The β I domain has 28 kD and comprises the COOH-terminal region of the β subunit. The α I and β I domains participate in the spectrin dimer self-association (Speicher *et al.* 1982).

Several alterations of spectrin have been demonstrated in HE, associated with an impaired self-association process (Palek & Jarolim, 1993). These alterations are characterized by an abnormal digestion of α I domain, with a partial or complete loss of the 80 kD fragment and appearance of abnormal smaller peptide fragments.

In the subgroup of HE associated with an abnormal 74 kD proteolytic fragment, the impairment in spectrin dimer self-association may be particularly severe (Coetzer *et al.* 1987). The molecular defects underlying α I/74 HE have been elucidated in a number of HE cases and most of them are point mutations in the α -spectrin gene (Lux & Palek, 1995). However, several HE patients with β -spectrin defects have

Correspondence: Dr Sara T. O. Saad, Hemocentro-Unicamp, Campinas SP, Brazil, CP6198, CEP 13081-970.

580 Daniela S. Bassères *et al*

also been described. Most of these subjects present with a truncated β -spectrin chain that is defective in spectrin dimer self-association (Gallagher *et al*, 1991; Garbarz *et al*, 1991, 1992; Kanzaki *et al*, 1992; Lecomte *et al*, 1992; Tse *et al*, 1991; Yoon *et al*, 1990; Delaunay & Dhermy, 1993). From these studies it was inferred that the deleted segment of β -spectrin contains an important part of the spectrin self-association site. Recently, terminal truncation of β -spectrin has been associated with spherocytic HB (Jarolim *et al*, 1995; Lux & Palek, 1995). Although very rare, point mutations in the β -spectrin gene have been associated with impairment of spectrin dimer self-association in the α I/74 HE (Sahr *et al*, 1992; Gallagher *et al*, 1992).

In this study we present a novel β -spectrin variant in a Brazilian kindred with α I/74 HE and a splice site mutation in

the first nucleotide of intron 30 (IVS30+1 G $\rightarrow$ A). This mutation results in the splicing out of the entire exon 30 followed by a premature termination of translation due to frameshift and creation of a new stop codon.

METHODS

Case report. The proband was a 19-year-old white female presenting with pronounced elliptocytosis and poikilocytes in the blood smear (Fig 1a), Hb 9.5 g/dl, MCV 73 fl, MCHC 37.2 g/dl, RBC $3.64 \times 10^{12}/l$, RDW 19.9% and reticulocyte count $182 \times 10^9/l$. She presented with splenomegaly and episodes of weakness and jaundice since childhood. Her mother, a woman of Italian origin, had less-pronounced elliptocytosis, but severe poikilocytosis, microspherocytes

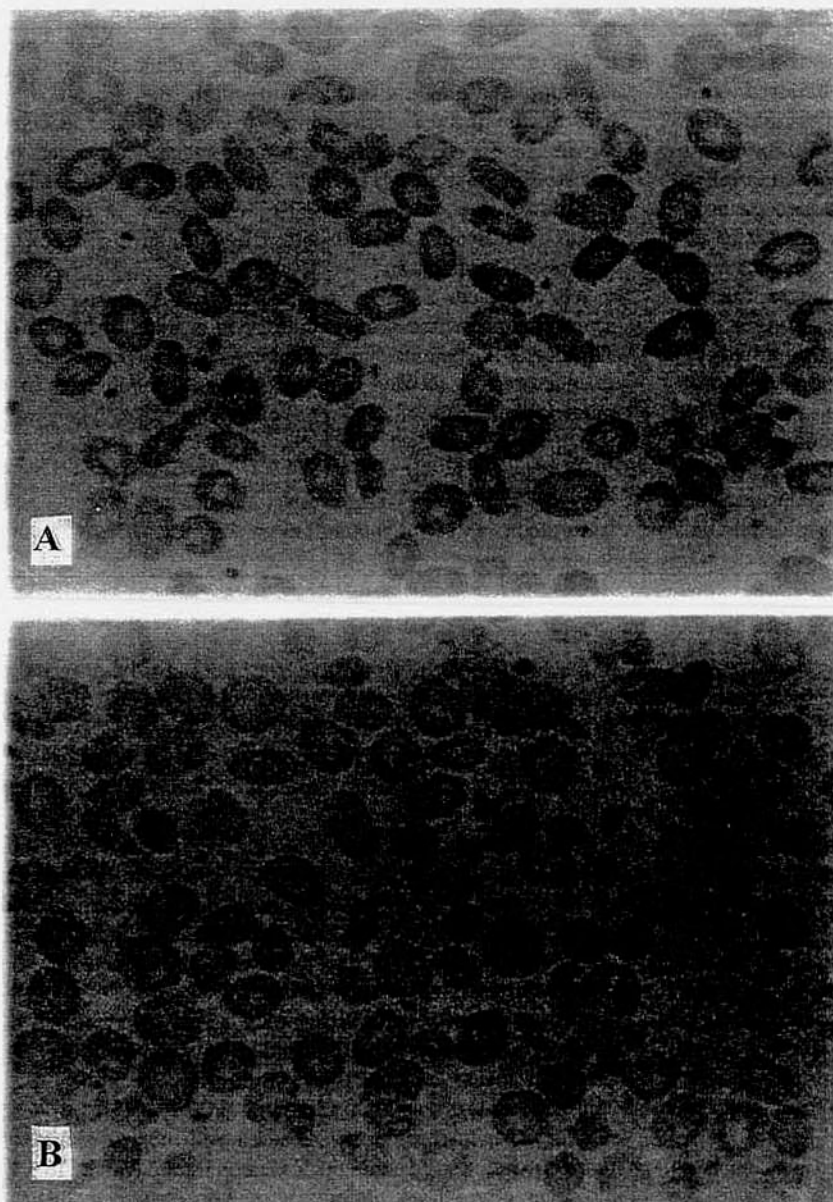


Fig 1. Blood smear of the proband (A), showing pronounced elliptocytosis and few microspherocytes. Her mother (B), who was splenectomized, has fewer elliptocytes and severe poikilocytosis with the presence of many schizocytes and microspherocytes.

β -Spectrin Campinas: a Novel Shortened β -chain Variant 581

and schizocytes in the blood smear (Fig 1b), having already undergone splenectomy. Her haematological parameters were: Hb 13.6 g/dl, MCV 65 fl, MCHC 39.8 g/dl, RBC $5.26 \times 10^{12}/l$, RDW 51.7% and reticulocyte count $263 \times 10^9/l$. The blood smear and haematological parameters of her father were within normal ranges.

Protein biochemistry. Within 24–72 h of phlebotomy, erythrocyte ghosts were prepared by hypotonic lysis according to Dodge *et al* (1963). Duplicate membrane protein samples were subjected to SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970) and 3.5–17% exponential gradient gels (Fairbanks *et al*, 1971); the gels were stained with Coomassie blue.

In order to quantify spectrin dimers and tetramers, spectrin was extracted from erythrocyte membranes by incubation in a low ionic strength buffer at 4°C and analysed by nondenaturing electrophoresis (Liu *et al*, 1981).

The proteins were quantified by densitometry of Coomassie blue stained gels at 540 nm (Hoefer, model GS 300, San Francisco, Calif.) and the areas under the peaks were determined by the computer program GS 365W, version 3.01. The amount of spectrin was expressed as a ratio to band 3 and SpD content as a percentage of total SpD and SpT. The amount of SpD and Sp/band 3 in 30 normal controls were $9.9 \pm 5\%$ (varying from 5% to 14%) and 1.02 ± 0.05 (varying from 0.90 to 1.11), respectively.

Spectrin extracts were digested by trypsin (TPCK) 1:100 (wt/wt) at 0°C for 20 h in PBS pH 8.0. The digested products were electrophoresed on discontinuous SDS-polyacrylamide slab gels (Laemmli, 1970). The separating gel was comprised

of 10% acrylamide and 0.38% bisacrylamide and stained by Coomassie blue.

To characterize the protein with increased mobility on SDS-PAGE, we performed immunoblotting, using polyclonal antihuman α - and β -spectrin antibodies. For this experiment, we ran the samples simultaneously in a Biorad minigel apparatus containing two 6% polyacrylamide-SDS gels. Electrotransfer of the red cell membrane proteins from one of the 6% polyacrylamide-SDS gels to nitrocellulose was carried out for 2 h at 100 V as described by Towbin *et al* (1979). Non-specific protein binding was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (3% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with polyclonal antihuman α - or β -spectrin antibodies (kindly provided by Dr H. Hassoun, St Elizabeth's Hospital, Boston, U.S.A.) for 20 h at 4°C and then washed for 60 min with blocking buffer without BSA. The blots were subsequently incubated with 74 kBq of ^{125}I -protein A in 10 ml of blocking buffer for 1 h at 22°C and then washed for 2 h. The filters were exposed to Kodak X-Omat film with intensifying screens at -70°C. The second gel was stained by Coomassie blue.

cDNA analysis. Total RNA was extracted from peripheral blood reticulocytes as described (Kan *et al*, 1975). Reverse transcription was performed with M-MuLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) for 3 h at 42°C in the presence of oligo dT. PCR was performed as described elsewhere (Saiki *et al*, 1988) in a DNA thermal cycler

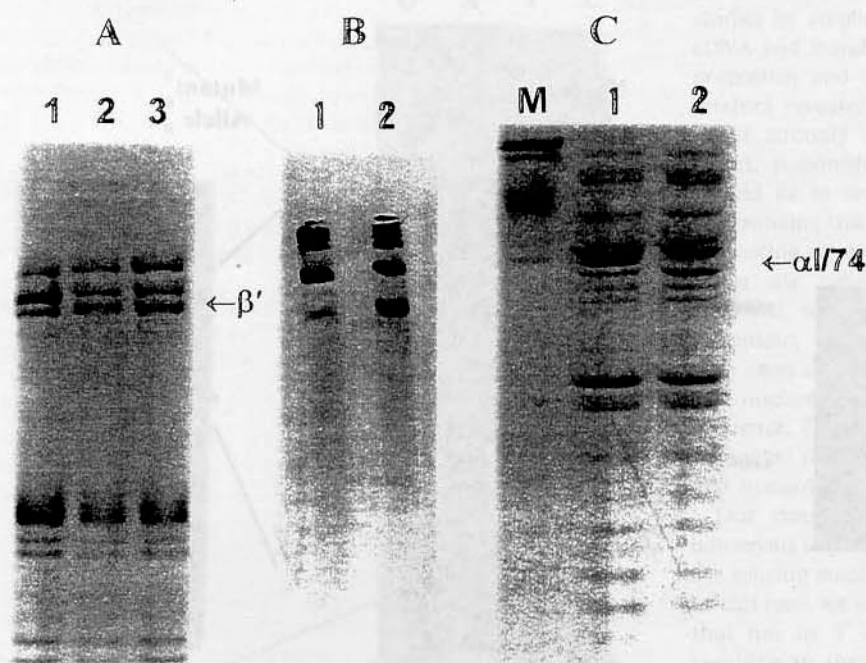


Fig 2. Electrophoretic analysis of red cell membrane proteins. (A) 3.5–17% exponential gradient SDS-polyacrylamide gel of total membrane proteins stained with Coomassie blue shows the presence of an abnormal band designated as β' in the mother (2) and the patient (3) but absent in the control (1). (B) Non-denaturing agarose gel of spectrin extracts reveals an increased amount of spectrin dimers in the patient (2) compared to the control (1). (C) Discontinuous SDS-PAGE of tryptic digests of spectrin shows an enhanced $\alpha/74$ kD fragment in the patient (2) compared to the control (1). M: ghost.

582 Daniela S. Bassères et al

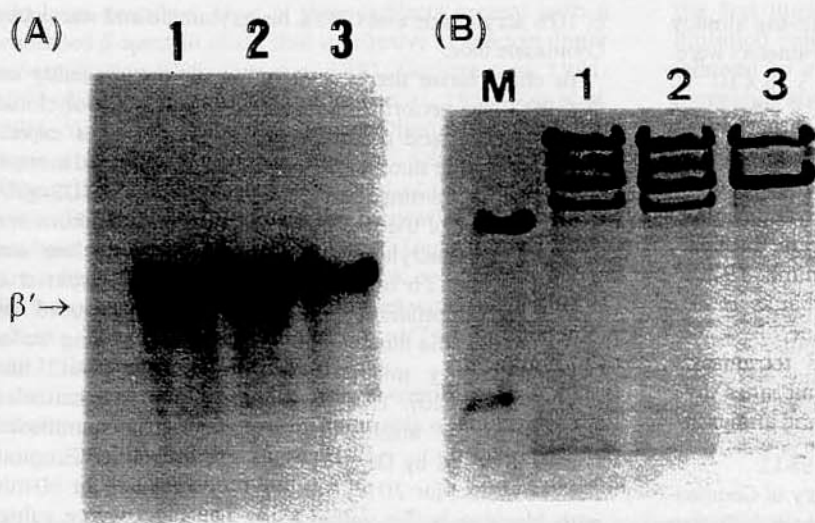


Fig 3. Immunoblotting of the abnormal β' spectrin. (A) Immunoblotting of total membrane proteins reveals immunological identity of the β' spectrin with antihuman β -spectrin antibodies. (1) patient; (2) mother; (3) control. (B) SDS-PAGE 6% replica of the immunoblotting filter stained with Coomassie blue. M: ghost.

(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Ct.) for 40 cycles (92°C 1 min; 55°C 1 min and 72°C 1 min 30 s) using the following primers: primer 1997 (5'-CGCGAGAAACTGCAGCAGGT-3') located in exon 29 (Tse *et al*, 1991) and primer C (5'-CACCTGGGCTGAGCTAGTAG-3') located in exon 32 (Tse *et al*, 1990). The cDNA amplification products were cloned according to pMOSBlue T-vector Kit protocol (Amersham, U.K.). Positive clones were PCR-screened using universal primers T7 and U19. Sequencing was performed using Sequenase PCR Product Kit, Version 2.0 (USB, Cleveland, Ohio).

Genomic DNA analysis. Genomic DNA was extracted by standard techniques using phenol-chloroform. PCR amplification was performed for 40 cycles (92°C 1 min; 55°C 1 min and 72°C 2 min) using the following primers kindly provided by Drs P. Gallagher and B. G. Forget (Yale University): primer 2222 (5'-CGAAGCTTGGTCCCAATGTCAGGT-3') located in intron 29 and primer 2223 (5'-GCGAATTCAGGAGTGAACGATTGGGTGCT-3') located in intron 31. The product of amplification (band of approximately 700 bp) was sequenced using primer A (5'-GTGGCTGAGGCGTGGCTGATTGC-3') located in exon 30 (Tse *et al*, 1990).

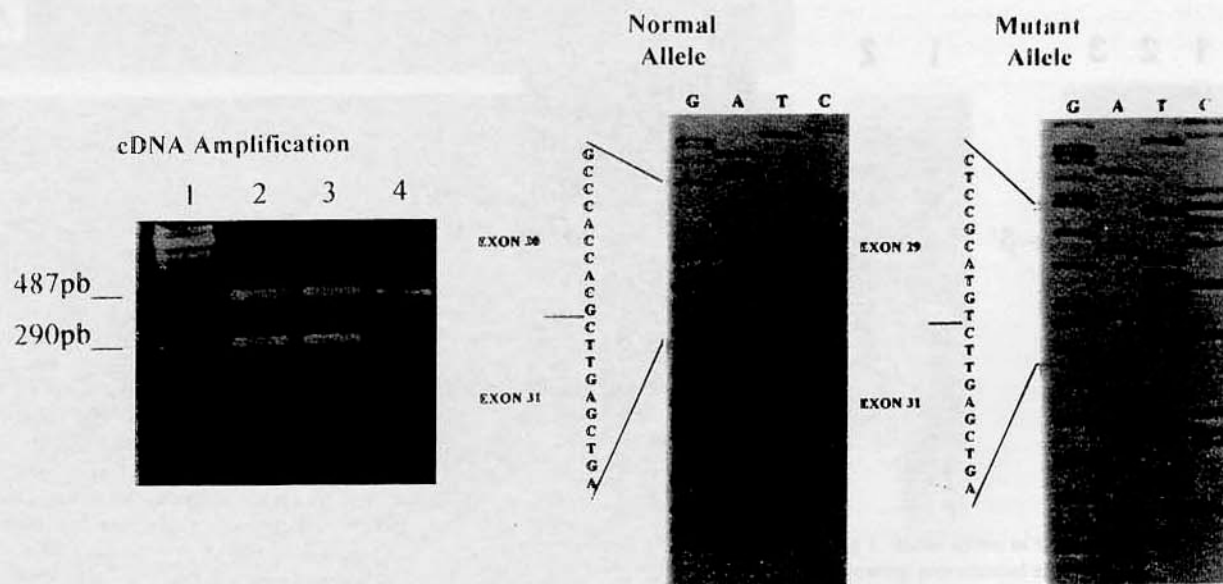


Fig 4. cDNA analysis of the 3' end of the β -spectrin gene. Left: cDNA amplification of the last four exons of the β -spectrin gene shows an additional band of 290 bp in the patient (2) and her mother (3). (1) ϕ X174; (4) control. Centre: cDNA sequencing of a clone containing the expected 487 bp band. Right: cDNA sequencing of a clone containing the 290 bp band, present in the patient and her mother, reveals the skipping of exon 30.

β -Spectrin Campinas: a Novel Shortened β -chain Variant 583

according to Sequenase PCR Product Kit, Version 2.0 (USB, Cleveland, Ohio).

RESULTS

The propositus and her mother presented a protein with increased mobility on SDS-PAGE (Fig 2a), whose molecular weight was estimated, in a semilog plot of the Coomassie blue stained gels, to be of 200 kD. They also showed increased amounts of spectrin dimers (SpD/SpD + SpT = 43% and 51%, respectively) compared to the father and the control (SpD/SpD + SpT = 14% and 12%, respectively) (Fig 2b). A second SpD quantitation was performed after another blood collection, followed by spectrin extraction, and it showed SpD 46% for the propositus and 49% for the mother. After tryptic digestion of spectrin, they showed an increased expression of the sp α I/74 kD fragment (Fig 2c). In order to confirm that this protein was indeed an abnormal β Sp, immunoblotting was performed and the shortened protein showed immunological identity to a polyclonal antihuman β Sp antibody (Fig 3a), but did not react with antibody to α -spectrin. The Coomassie blue staining of the 6% polyacrylamide gel replica confirmed the presence of the abnormal band at the same position detected by the antihuman β Sp antibody (Fig 3b). The proportion of the mutant β -spectrin related to the total β -spectrin was 25.3% in the propositus and 26.1% in her mother.

The analysis of the molecular defect leading to this shortened β -spectrin was initially performed by cDNA amplification of the last four exons of the β -spectrin gene

by the PCR technique. The expected product of 487 bp was present in all individuals tested. However, the propositus and her mother showed an additional product of 290 bp (Fig 4). Both cDNA products of amplification were cloned in pMOSBlue T-vectors. The sequence of clones containing the 487 bp product was normal, as expected (Fig 4). In contrast, sequencing of three clones containing the smaller product of amplification, present only in the propositus and her mother, revealed the absence of the entire exon 30 (Fig 4). In order to detect the underlying mutation, we amplified a region of the β -spectrin gene containing both the 3' acceptor splice site of intron 29 and the 5' donor splice site of intron 30. After sequencing the product of amplification we found a G $\rightarrow$ A substitution in the first nucleotide of intron 30, in the 5' donor splice site region (Fig 5). This mutation was confirmed in the mother of our patient, but sequencing of normal subjects did not reveal this defect.

DISCUSSION

Most elliptocytogenic mutations residing in the β -spectrin gene can be identified by a faster electrophoretic migration of the protein on SDS-PAGE, showing a truncated β -spectrin with a diminished C-terminal phosphorylation process and impairment of the spectrin dimer self-association (Lux & Palek, 1995). These mutations may include: (1) a splice site mutation leading to the splicing out of an exon located near the 3' end of the β -spectrin gene and resulting in the creation of a premature stop codon; (2) insertion or deletion of a few base pairs leading to premature termination due to a frameshift.

In order to identify the underlying defect in a kindred with HE and a truncated β -spectrin, we initiated our molecular studies by amplifying the last four exons of the β -spectrin cDNA and found an abnormal amplification product in the propositus and her mother. Sequencing of this abnormal product revealed the absence of the entire exon 30. This result strongly suggested that the underlying molecular defect, responsible for this abnormal pattern of splicing should lie in one of the splice site consensus sequences surrounding this exon. It is largely observed that mutations promoting skipping of an exon during splicing reside in the splice site consensus sequences surrounding the exon involved, mainly in the 5' consensus sequence (Nakai & Sakamoto, 1994). We were able to determine that in our case exon skipping was due to a G $\rightarrow$ A substitution at the first nucleotide of intron 30 in the 5' splice site consensus sequence. To our knowledge, this is the first description of a truncated β -spectrin resulting from the substitution of the first nucleotide of the 5' consensus sequence of intron 30.

Our results support the idea that the recognition of consensus sequences of introns is not the only way by which the splicing machinery could perform the process of splicing. In this case, we would expect a correct splicing of intron 29, that has its 5' and 3' consensus sequences intact, thus resulting in the inclusion of exon 30 to the mRNA. The mutation in the 5' site of intron 30 would prevent the recognition and splicing of this intron, resulting in its inclusion in the mRNA.

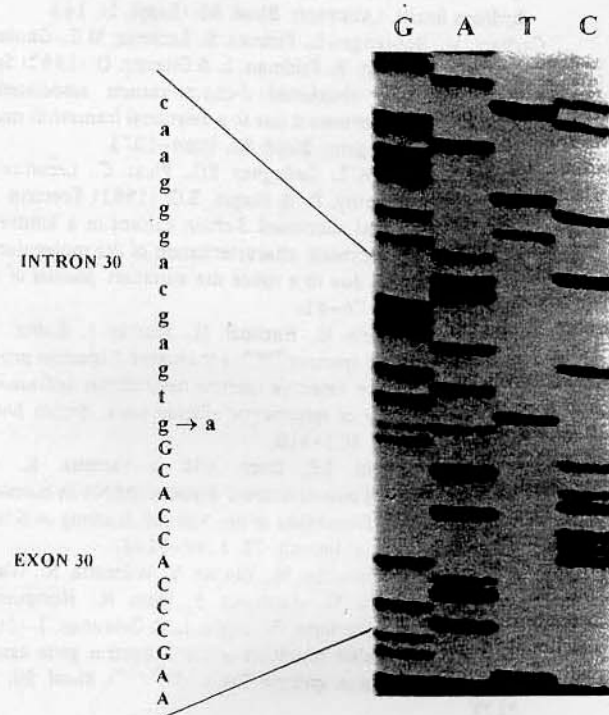


Fig 5. Sequencing of the patient's genomic DNA showing the G $\rightarrow$ A substitution in the first nucleotide of intron 30.

584 Daniela S. Bassères et al

However, exon skipping is far more common than intron retention in mammals (Nakai & Sakamoto, 1994). Moreover, in an *in vitro* splicing assay, Talerico & Berget (1990) observed that in three-exon transcripts, mutations in the 5' splice site of the internal exon prevented the correct splicing of the upstream intron, causing exon skipping. This probably occurs because the internal exon is recognized as part of a large intron that should be entirely spliced out.

Mutations in other nucleotides of the 5' donor splice site of intron 30 and 3' acceptor splice site of intron 29, associated with the splicing out of exon 30, have already been described (Yoon et al. 1991; Gallagher et al. 1991; Jarolim et al. 1995). Taken together, these results, including the case described in this paper, strongly support the model of exon definition proposed by Robberson et al (1990), which states that recognition of introns is not the sole determinant of splicing patterns and that exon recognition is essential for correct splicing. This exon recognition should be performed by the interaction of U1 and U2snRNP and associated splicing factors with splice sites consensus sequences, followed by neighbouring exons juxtaposition (Berget, 1995).

As previously described (Yoon et al. 1991; Gallagher et al. 1991), skipping of exon 30 results in a frameshift, creating a new stop codon and causing a deletion of 129 aminoacids at the very COOH-terminal region of β -spectrin, thus leading to a truncated protein.

The shortening of the β -spectrin chain increases the susceptibility to proteolysis of lysine 48 at the α -chain. This enhances the formation of the 74 kD fragment from α -spectrin after tryptic digestion and causes impairment of the spectrin dimer self-association, leading to common HE (Pothier et al. 1987; Tsé et al. 1990; Palek & Sahr, 1992). These alterations should be responsible for the clinical picture of HE, increase in spectrin dimers and enhancement of the 74 kD fragment after partial tryptic digestion of spectrin, as observed in our case. The small difference in dimer between the patient and her mother might be related to experimental error.

An interesting point of analysis is the difference in the haematological picture between the propositus and her mother, since both subjects have the same molecular alteration. The blood smear of the propositus, who was not splenectomized, showed mainly elliptocytes and a few spherocytes. However, her mother, who was splenectomized, presented severe poikilocytosis, many spherocytes, schizocytes and few elliptocytes. The RDW of the propositus was 19.9% whereas it was 51.7% in her mother. Probably the low number of poikilocytes, spherocytes and schizocytes in the propositus is due to splenic sequestration of these cells. On the other hand, the spleen may be an important spot for elliptocyte formation, once the mother has reduced elliptocytes in the blood smear. We cannot exclude, however, the possibility of another associated defect in the mother.

As in both subjects the presence of elliptocytes and spherocytes was confirmed, though in different quantities, due probably to spleen conditioning, it is possible to classify this haemolytic anaemia as spherocytic hereditary elliptocytosis. Therefore this report provides additional information that despite of the heterogeneity of the molecular defect in spherocytic HE, patients with terminal truncations of

β -spectrin have a similar clinical and haematological picture.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by FAPESP and CNPq.

REFERENCES

- Berget, S.M. (1995) Exon recognition in vertebrate splicing. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 2411–2414.
- Coetzer, T., Lawler, J., Prchal, J.T. & Palek, J. (1987) Molecular determinants of clinical expression of hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. *Blood*, **70**, 766–772.
- Deiaunay, J. & Dhermy, D. (1993) Mutations involving the spectrin heterodimer contact site: clinical expression and alterations in specific function. *Seminars in Hematology*, **30**, 21–33.
- Dodge, J.T., Mitchell, C. & Hanahan, D.J. (1963) The preparation and chemical characteristics of haemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **100**, 119–130.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606–2614.
- Gallagher, P.G. & Forget, B.G. (1993) Spectrin genes in health and disease. *Seminars in Hematology*, **30**, 4–21.
- Gallagher, P.G., Tse, W.T., Costa, F.F., Scarpa, A., Boivin, P., Deiaunay, J. & Forget, B.G. (1991) A splice site mutation of the β -spectrin gene causing exon skipping in hereditary elliptocytosis associated with a truncated β -spectrin chain. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 15154–15159.
- Gallagher, P.G., Tse, W.T., Mohandas, N., Marchesi, S.L. & Forget, B.G. (1992) Spectrin Providence: a defect of erythrocyte beta spectrin ($\beta^{2109\text{Ser-Pro}}$) homozygosity for which is associated with fatal hydrops fetalis. (Abstract). *Blood*, **80** (Suppl. 1), 145.
- Garbarz, M., Boulanger, L., Pedroni, S., Lecomte, M.C., Gautero, H., Galand, C., Boivin, P., Feldman, L. & Dhermy, D. (1992) Spectrin β^{Tandil} , a novel shortened β -chain variant associated with hereditary elliptocytosis is due to a deletional frameshift mutation in the β -spectrin gene. *Blood*, **80**, 1066–1073.
- Garbarz, M., Tse, W.T., Gallagher, P.G., Picat, C., Lecomte, M.C., Galibert, F., Dhermy, D. & Forget, B.G. (1991) Spectrin Rouen ($\beta^{220-218}$), a novel shortened β -chain variant in a kindred with hereditary elliptocytosis: characterization of the molecular defect as exon skipping due to a splice site mutation. *Journal of Clinical Investigation*, **88**, 76–81.
- Jarolim, P., Wichterle, H., Hanspal, M., Murray, J., Rubin, H.L. & Palek, J. (1995) β spectrin^{Prozac}, a truncated β spectrin producing spectrin deficiency, defective spectrin heterodimer self-association and a phenotype of spherocytic elliptocytosis. *British Journal of Haematology*, **91**, 502–510.
- Kan, Y.W., Holand, J.P., Dozy, A.M. & Varmus, K. (1975) Demonstration of non-functional β -globin mRNA in homozygous β^0 -thalassaemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**, 5140–5144.
- Kanzaki, A., Rabodonirina, M., Yawata, Y., Wilmotte, R., Wada, H., Ata, K., Yamada, O., Akatsuka, J., Iyori, H., Horiguchi, M., Nakamura, H., Mishima, T., Morie, L. & Deiaunay, J. (1992) A deletional frameshift mutation of the β -spectrin gene associated with elliptocytosis in spectrin Tokyo $\beta^{220-218}$. *Blood*, **80**, 2115–2121.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–686.
- Lecomte, M.C., Gautero, H., Bournier, O., Galand, C., Lahary, A.,

β -Spectrin Campinas: a Novel Shortened β -chain Variant 585

- Vannier, J.P., Garbarz, M., Delaunay, J., Tchernia, G., Boivin, P. & Dhermy, D. (1992) Elliptocytosis-associated spectrin Rouen $\beta^{220/218}$ has a truncated but still phosphorylatable β chain. *British Journal of Haematology*, 80, 242–250.
- Liu, S.-C., Palek, J., Prchal, J. & Castleberry, R.P. (1981) Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 68, 597–605.
- Lux, S. & Palek, J. (1995) Disorders of the red cell membrane. *Blood: Principles and Practice of Hematology* (ed. by R. I. Handlin, S. E. Lux and T. P. Stossel), pp. 1701–1818. Lippincott, Philadelphia.
- Nakai, K. & Sakamoto, H. (1994) Construction of novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. *Gene*, 141, 171–177.
- Palek, J. & Jarolim, P. (1993) Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Seminars in Hematology*, 30, 249–283.
- Palek, J. & Sahr, K.E. (1992) Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood*, 80, 308–330.
- Pothier, B., Morlé, L., Alloisio, N., Ducluzeau, M.T., Caedani, C., Féo, C., Garbarz, M., Chaveroche, I., Dhermy, D., Lecomte, M.C., Boivin, P. & Delaunay, J. (1987) Spectrin Nice ($\beta^{220/216}$): a shortened β -chain variant associated with an increase of the $\alpha^{1/74}$ fragment in a case of elliptocytosis. *Blood*, 69, 1759–1765.
- Robberson, B.L., Cote, G.J. & Berget, S.M. (1990) Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Molecular Cell Biology*, 10, 84–94.
- Sahr, K.E., Coetzer, T.L., Moy, L.S., Derick, L.H., Chishti, A.H., Jarolim, P., Gallanillo, R., Cao, A., Liu, S.C. & Palek, J. (1992) An Ala to Gly substitution in β spectrin associated with spectrin $\alpha^{1/74}$ in hereditary elliptocytosis (HE) and hereditary pyropoikilocytosis (HPP). (Abstract). *Blood*, 80, (Suppl. 1), 276.
- Saiki, R.K., Geelfond, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.
- Speicher, D.W., Morrow, J.S., Knowles, W.J. & Marchesi, V.T. (1982) A structural model of human erythrocyte spectrin: alignment of chemical and functional domains. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 9093–9101.
- Talerico, M. & Berget, S.M. (1990) Effect of 5' splice site mutations on splicing of the preceding intron. *Molecular Cell Biology*, 10, 6299–6305.
- Towbin, H., Staehlin, J.T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheep: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350–4354.
- Tse, W.T., Gallagher, P.G., Pothier, B., Costa, F.F., Scarpa, A., Delaunay, J. & Forget, B.G. (1991) An insertional frameshift mutation of the β -spectrin gene associated with elliptocytosis in spectrin Nice ($\beta^{220/216}$). *Blood*, 78, 517–523.
- Tse, T.W., Lecomte, M.-C., Costa, F.F., Garbarz, M., Féo, C., Boivin, P., Dhermy, D. & Forget, B.G. (1990) Point mutation in the β -spectrin gene associated with $\alpha^{1/74}$ hereditary elliptocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 86, 909–916.
- Yoon, S.H., Yu, H., Eber, S. & Prchal, J.T. (1991) Molecular defect of truncated β -spectrin associated with hereditary elliptocytosis: β -spectrin Göttingen. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 8490–8494.

4.1.6 Discussão geral dos trabalhos 1, 2, 3 e 4

No decorrer deste trabalho foram estudadas dez famílias portadoras de EIH. A variante $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ foi detectada em três famílias, a variante $\text{sp}\alpha\text{I}/50$ em três famílias e a variante $\text{sp}\alpha\text{I}/74$ em quatro famílias.

A variante $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ foi observada na África Centro-Occidental (LECOMTE *et al*, 1985; GARBARZ *et al*, 1986; LECOMTE *et al*, 1988; GLELE-KAKAI *et al*, 1996), na África Atlântico-Occidental (ALLOISIO *et al*, 1991), na Tunísia (ALLOISIO *et al*, 1991), na África do Norte (ALLOISIO *et al*, 1986; ROUX *et al*, 1989), nas Índias Ocidentais (LECOMTE *et al*, 1985; GLELE-KAKAI *et al*, 1996), nos Estados Unidos (LAWLER *et al*, 1985; MARCHESI *et al*, 1987; GALLAGHER *et al*, 1996), no Haiti (LAWLER *et al*, 1985) e no sul da Itália (MIRAGLIA DEL GIUDICE *et al*, 1992; QUALTIERI *et al*, 1995). Em todos os casos, os pacientes portadores do defeito tinham origem étnica africana ou pertenciam a populações que sofreram alguma influência africana durante a sua história. A variante $\text{sp}\alpha\text{I}/50$ também parece estar confinada a indivíduos de origem africana, tendo sido encontrada na África Centro-Occidental (LECOMTE *et al*, 1988; GLELE-KAKAI *et al*, 1996), na América do Norte e nas Índias Ocidentais (GALLAGHER *et al*, 1992a; HANSPAL *et al*, 1993).

Além disso, a EIH é cerca de vinte vezes mais comum na África do que na Europa ou na América do Norte, atingindo uma frequência de 1,6% da população africana (GLELE-KAKAI *et al*, 1996). Esta alta frequência pode estar relacionada a uma maior resistência à malária conferida pelas alterações na membrana eritrocitária (SCHULMAN *et al*, 1990). Dentre as alterações eliptocitogênicas, a duplL154 e a mutação L260P prevalecem na África (GLELE-KAKAI *et al*, 1996).

Em um estudo realizado na África Ocidental, LECOMTE *et al* (1988) mostraram que a variante $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ era a mais freqüente e encontrava-se espalhada por toda África Ocidental e por diferentes grupos étnicos africanos. Já a variante $\text{sp}\alpha\text{I}/50$ só foi encontrada em Benin na fronteira Benin-Togo. Um estudo recente feito em Benin (GLELE-KAKAI *et al*, 1996) mostrou a presença da duplL154 em três grupos étnicos diferentes, enquanto que a mutação L260P foi encontrada na região sul confinada a um único grupo étnico. A mutação L207P também foi detectada na região nordeste,

mas em um único indivíduo de origem étnica distinta dos indivíduos com a mutação L260P, sugerindo que a freqüente observação de spoI/50 em Benin se deva à mutação L260P. O fato da duplL154 ser mais freqüente, ter uma distribuição mais ampla na África do que a mutação L260P e atingir diferentes grupos étnicos africanos, sugere que a origem desta mutação deva ser anterior ao surgimento da substituição L260P.

Existe apenas um relato da mutação L207P na África (GLELE-KAKAI *et al*, 1996), sendo que todas as outras descrições desta mutação foram feitas nos Estados Unidos ou nas Índias Ocidentais (GALLAGHER *et al*, 1992a; HANSPAL *et al*, 1993; GALLAGHER *et al*, 1996). GALLAGHER *et al* (1996; 1997b) mostraram que as mutações duplL154, L260P e L207P estavam associadas com haplótipos específicos do gene da alfa-espectrina, o que contribui para confirmar a origem monocêntrica destas mutações, que, posteriormente se espalharam. Além disso, ele sugere que as mutações L260P e L207P tenham surgido em cromossomos com composição genética distinta, já que estas mutações estão associadas a haplótipos diferentes. Isto é condizente com o fato destas mutações serem encontradas em regiões diferentes em Benin e em etnias africanas diferentes (GLELE-KAKAI *et al*, 1996).

Supõe-se que a duplL154 tenha surgido na África Centro-Occidental e depois se espalhado para a África Subsaariana e África do Norte, e então, atingido a Europa e a América do Norte (SAHR *et al*, 1989; GUETARNI *et al*, 1990; DELAUNAY & DHERMY, 1993). A mutação L260P também deve ter surgido na África Centro-Occidental e depois migrado para a América do Norte através do tráfico de escravos. Não se sabe a região exata da África onde surgiu a mutação L207P, mas ela também deve ter atingido a América do Norte e as Índias ocidentais através do comércio de escravos.

A presença da duplL154 e da substituição L260P em seis famílias brasileiras de etnia negróide sugere uma origem africana para estas mutações no Brasil e dá suporte à teoria da origem monocêntrica destas mutações com subsequente efeito fundador. Entretanto, a ausência da mutação L207P pode se dever a um erro de amostragem (só três famílias portadoras de spoI/50 foram analisadas) ou pode refletir uma diferença entre o Brasil e a América do Norte nas rotas migratórias provenientes da África. Realmente, diferenças genéticas entre as populações negras brasileiras e norte-americanas foram observadas em estudos de haplótipos de beta-globina (GONÇALVES *et al*, 1994; COSTA *et al*, 1994).

A variante $sp\alpha I/74$ é a variante mais heterogênea da ElH com 29 mutações diferentes descritas nos genes da alfa e beta-espectrina (tabelas 1 e 2 – apêndice A) e atinge diferentes grupos étnicos (ver seção 4.1.1). No trabalho 3, nós detectamos a presença da mutação R28H em três famílias brasileiras, o que sugere que, no Brasil, esta seja uma mutação freqüente responsável pela ElH do tipo $sp\alpha I/74$. Duas famílias tinham origem étnica italiana e uma origem étnica africana. Esta mesma mutação já havia sido detectada em 4 famílias de etnia negróide e uma família de etnia caucasóide (COETZER *et al*, 1991; GALLAGHER *et al*, 1996, RANDON *et al*, 1994; GARBARZ *et al*, 1990).

A haplotipagem do domínio αII (GALLAGHER *et al*, 1996) do alelo mutante nas três famílias é consistente com a origem distinta desta mutação no Brasil, já que as famílias italianas apresentam um haplótipo no domínio αII do gene da alfa-espectrina diferente daquele apresentado pela família negróide. Entretanto, o haplótipo apresentado pelas famílias italianas só havia sido descrito anteriormente em indivíduos de etnia africana (GALLAGHER *et al*, 1996; GLELE-KAKAI *et al*, 1996), o que levanta a questão de uma possível origem africana para as três mutações $dupL154$, $L260P$ e $R28H$, tendo a mutação $R28H$ atingido diferentes grupos étnicos através da miscigenação racial.

A mutação $R28H$, por situar-se numa região de “*hot spot*”, pode ter-se originado mais de uma vez em diferentes grupos étnicos humanos ou ter origem monocêntrica e se espalhado posteriormente para diferentes grupos étnicos. No nosso estudo, esta mutação foi encontrada em associação com dois tipos de haplótipos αII em dois grupos étnicos diferentes, apoiando a hipótese de que esta mutação se originou mais de uma vez.

A $sp\alpha I/74$ da família apresentada no trabalho 4 deve-se a uma beta-espectrina truncada. Normalmente as mutações no gene da beta-espectrina associadas com ElH do tipo $sp\alpha I/74$ são mutações esporádicas e constituídas por relatos únicos (tabela 2 – apêndice A). No nosso caso, o defeito molecular responsável por esta beta-espectrina truncada foi uma mutação no sítio 5’ doador de clivagem do íntron 30, mais especificamente a troca $G \rightarrow A$ no primeiro nucleotídeo do íntron 30. Conforme o padrão genético de mutações no gene da beta-espectrina na ElH, esta mutação nunca havia sido descrita anteriormente e a proteína anômala foi denominada beta-espectrina Campinas.

Esta mutação é responsável pela perda do éxon 30 observada no cDNA. Nenhuma outra alteração molecular foi detectada nesta região ou no sítio de clivagem 3' acceptor do íntron 29.

Se a maquinaria de clivagem realizasse o processamento do transcrito primário apenas através do reconhecimento dos íntrons e remoção dos mesmos, esperaríamos, neste caso, uma falha no reconhecimento do íntron 30, resultando na inclusão deste íntron no transcrito primário. Entretanto uma retenção do íntron 30 não foi observada no nosso estudo, nem em nenhum dos casos já descritos de mutações no sítio 5' doador do íntron 30 (YOON *et al*, 1991; GALLAGHER *et al*, 1991a), o que apóia fortemente o modelo de definição de éxon de ROBBERSON *et al* (1990). Este modelo postula que o reconhecimento de íntrons não é o único determinante dos padrões de clivagem e que o reconhecimento dos éxons é essencial para um processamento adequado do transcrito primário. O reconhecimento dos éxons seria realizado através da associação da maquinaria de clivagem aos sítios consenso 3' acceptor e 5' doador presentes nos íntrons, seguida da justaposição de éxons vizinhos (BERGET, 1995). Este mecanismo explica a perda do éxon 30 observada nos casos de mutação no sítio 5' doador do íntron 30, bem como no caso da mutação no sítio 3' acceptor do íntron 29. Ele também explica a perda do éxon 31 resultante de uma mutação no sítio 5' doador do íntron 31 (GARBARZ *et al*, 1991)

A perda do éxon 30 leva a uma alteração do quadro de leitura com a criação de um códon de terminação prematuro, causando a deleção de 129 aminoácidos da extremidade C-terminal da beta-espectrina. O resultado é uma proteína truncada com capacidade de auto-associação defeituosa, o que leva, em última instância, à ElH.

Com relação à influência exercida pelo alelo α^{LELY} na expressão da ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ analisada no trabalho 1, fica claro, na família 1, que os indivíduos portadores do alelo α^{LELY} associado *in trans* à duplL154 apresentam expressão mais grave da ElH, evidenciada por uma maior quantidade do fragmento de 65 kDa e uma maior alteração das hemácias, conforme observado no esfregaço do sangue periférico (tabela 1 – trabalho 1; tabela 3 – apêndice A). Similarmente, no caso das famílias portadoras de ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/50$ analisadas no trabalho 2, a presença do alelo α^{LELY} *in trans* à mutação L260P não provoca uma piora marcante das condições clínicas e laboratoriais, apenas uma diferença na morfologia eritrocitária (fig. 2 – trabalho 2; tabela 3 – apêndice A). Nossos resultados são consistentes com os relatos existentes da presença do alelo α^{LELY} *in trans* em pacientes portadores de ElH do tipo $\text{sp}\alpha\text{I}/65$ (GUETARNI *et al*, 1990; ALLOISIO *et al*, 1991;

WILMOTTE *et al*, 1993). No entanto, este é o primeiro relato que mostra a associação do alelo α^{LELY} com a mutação L260P, que leva à ElH do tipo spoI/50a.

Por outro lado, a associação *in trans* do alelo α^{LELY} com a mutação R28H analisada no trabalho 3, leva a uma piora considerável do quadro clínico, constatado no paciente da família 1, que apresentava anemia grave dependente de transfusão até ser submetido à esplenectomia (tabela 3 – apêndice A). Sua mãe (indivíduo 1.2), portadora do mesmo defeito molecular, mas sem associação com o alelo α^{LELY} (α^{R28H}/α), não apresentava anemia (tabela 3 – apêndice A). A presença deste alelo *in trans* também leva a uma alteração marcante nos valores bioquímicos e na morfologia eritrocitária (tabela 3 – apêndice A). Estes resultados são consistentes com os já descritos na literatura para uma associação *in trans* com a mutação R28H (ALLOISIO *et al*, 1991; BAKLOUTI, 1991; WILMOTTE *et al*, 1993; RANDON *et al*, 1994) e enfatizam o impacto da influência do alelo α^{LELY} , quando associado *in trans* a mutações eliptocitogênicas moderadamente graves. Este impacto parece ser bem menos importante em mutações eliptocitogênicas leves, como a duplL154 e a troca L260P, onde apenas a morfologia eritrocitária apresenta uma alteração significativa.

Da mesma forma que uma associação *in trans* do alelo α^{LELY} tende a levar ao agravamento da ElH, espera-se que a associação *in cis* leve à redução na expressão da mesma (fig. 10). Realmente, a associação *in cis* do alelo α^{LELY} com a mutação R28H ($\alpha^{R28H-LELY}/\alpha$) nos indivíduos 2.2 e 3.2 determinou uma melhora do quadro clínico (trabalho 3; tabela 3 – apêndice A). Eles são assintomáticos, apresentando apenas uma leve alteração da morfologia eritrocitária. O mesmo já foi observado para a associação *in cis* do alelo α^{LELY} com a mutação L207P, determinando a ausência de sintomatologia (DALLA VENEZIA *et al*, 1993; HANSPAL *et al*, 1993; GALLAGHER & FORGET, 1994; GLELE-KAKAI *et al*, 1996). Além disso, os valores bioquímicos no indivíduo 3.2 são os que mais se aproximam dos valores obtidos para os indivíduos normais. Esta foi a primeira vez que indivíduos portadores do alelo α^{LELY} *in cis* à mutação R28H, foram analisados em detalhe, embora já existisse menção na literatura da existência desta configuração genética (RANDON *et al*, 1994).

Espera-se que a presença do alelo α^{LELY} em homozigose ($\alpha^{R28H-LELY}/\alpha^{LELY}$) seja equivalente à ausência do alelo α^{LELY} (α^{R28H}/α) (RANDON *et al*, 1994), pois a presença da alteração *in trans* seria compensada pela presença da mesma alteração *in cis*. Entretanto, a configuração homozigota

parece apresentar uma manifestação clínica um pouco mais grave do que a ausência do polimorfismo (trabalho 3; tabela – apêndice A). Assim, o componente α^{LELY} , que é invariavelmente inócuo nos indivíduos $\alpha/\alpha^{\text{LELY}}$ e $\alpha^{\text{LELY}}/\alpha^{\text{LELY}}$, pode gerar uma fragilização do esqueleto da membrana eritrocitária nos indivíduos $\alpha^{\text{R28H-LELY}}/\alpha^{\text{LELY}}$, ilustrado no trabalho 3 pela presença de crises hemolíticas graves neonatais e persistência de anemia após este período.

O alelo α^{LELY} é muito antigo e, portanto, as alterações moleculares que o constituem devem ser anteriores ao surgimento das mutações eliptocitogênicas. Como a frequência deste alelo em diferentes populações varia de 16 a 30 % (MARÉCHAL *et al*, 1995; BASSÈRES *et al*, 1998a; PAPASSIDERI *et al*, 1999), há maior probabilidade de uma mutação eliptocitogênica ocorrer em um alelo α -normal do que em um alelo α^{LELY} . Isto parece ser verdade para as alterações L260P, duplL154, I24S, H469P, H469del, IVS17 -1 G→A, IVS4ins1kb, R45T, R34W, R41W, G46V, D791E, L49F (tabela 1 – apêndice A), que estão sempre localizadas em alelos α (trabalho 2, GUETARNI *et al*, 1990; ALLOISIO *et al*, 1991; WILMOTTE *et al*, 1993; BAKLOUTI *et al*, 1992; PARQUET *et al*, 1994; DALLA VENEZIA *et al*, 1993; GALLAGHER *et al*, 1993; ALLOISIO *et al*, 1993; HASSOUN *et al*, 1994; PERROTA *et al*, 1995; PERROTA *et al*, 1994; ALLOISIO *et al*, 1992). Já a mutação L207P parece ter surgido em um alelo α^{LELY} , pois está sempre ligada *in cis* as alterações moleculares que constituem o alelo α^{LELY} (DALLA VENEZIA *et al*, 1993; HANSPAL *et al*, 1993; GALLAGHER & FORGET, 1994; GLELE-KAKAI *et al*, 1996). As mutações R28H e R28C são as únicas mutações eliptocitogênicas do gene da alfa-espectrina que são encontradas tanto em alelos α -normais, como em alelos α^{LELY} (ALLOISIO *et al*, 1991; BAKLOUTI, 1991; LORENZO *et al*, 1993; WILMOTTE *et al*, 1993; RANDON *et al*, 1994; DHERMY *et al*, 1998b). Isto pode ser explicado de duas formas: a) a presença da mutação R28H ou R28C em alelos distintos da alfa-espectrina pode ser resultado de eventos mutacionais independentes, o que é possível, porque o códon 28 é considerado um “*hot-spot*” para mutações. b) as mutações R28H e R28C podem ter surgido em um determinado alelo da alfa-espectrina e terem sido transferidas para um alelo α -distinto por recombinação. Esta hipótese leva à especulação de que estas mutações sejam mais antigas que as demais mutações eliptocitogênicas.

Capítulo 5

Esferocitose Hereditária: Resultados e Discussão

5.1 Trabalhos 5, 6 e 7

Trabalho 5: BASSÈRES DS, VICENTIM DL, COSTA FF, SAAD STO, HASSOUN H: β -spectrin Promissão: A translation initiation códon mutation of the β -spectrin gene (ATG→GTG) associated with hereditary spherocytosis and spectrin deficiency in a Brazilian family. **Blood**, 91: 368-369, 1998

Trabalho 6: BASSÈRES DS, TAVARES A, COSTA FF, SAAD STO: β -spectrin Santa Bárbara and β -spectrin São Paulo II: Two novel frameshift mutations of the β -spectrin gene associated with hereditary spherocytosis. **Blood** (submetido)

Trabalho 7: BASSÈRES DS, COSTA FF, SAAD STO, GALLAGHER PG: In *vitro* studies of ankyrin-1 gene promoter mutations. (Manuscrito em fase final de correção)

5.1.1 Resumo dos resultados apresentados nos trabalhos 5, 6 e 7, de acordo com os objetivos propostos:

Objetivo 3.3: Fazer uma triagem das alterações moleculares presentes no gene beta-espectrina nos pacientes portadores de EsH

A EsH é a anemia hemolítica hereditária mais freqüente. Os defeitos moleculares da EsH estão restritos aos genes da beta-espectrina, banda 3 e anquirina. Mais raramente, ocorrem defeitos nos genes da palidina e alfa-espectrina.

Descrições de mutações no gene da beta-espectrina associadas à EsH dominante são freqüentes, principalmente em indivíduos que apresentam deficiência de espectrina e acantocitose (referências da tabela 1 – apêndice B). Além disso, defeitos na porção final do gene da beta-espectrina podem levar a um quadro de eliptocitose esferocítica, no qual a beta-espectrina anormal tem uma meia-vida menor e é deficiente no processo de auto-associação.

Desta forma, foram selecionados para estudo, quatro pacientes com eliptocitose esferocítica e nove pacientes com acantocitose, dos quais sete apresentavam deficiência isolada de espectrina.

A triagem de mutações no gene da beta-espectrina foi realizada através da amplificação de éxons individuais com iniciadores intrônicos (trabalho 6). Os produtos amplificados obtidos foram então submetidos à técnica de SSCP (ver seção 4.1.1). Através desta técnica, foram encontradas três alterações únicas em três pacientes distintos, nos éxons 2 (fig. 1- trabalho 5), 14 e 20 (fig. 1 – trabalho 6).

Na família do paciente portador da alteração no éxon 2, a esferocitose hereditária apresentava uma herança autossômica dominante (fig. 1 – trabalho 5). A descrição das características clínicas e hematológicas deste paciente encontram-se descritas no trabalho 5. É importante ressaltar que este indivíduo apresentava uma redução no conteúdo de espectrina de cerca de 18%, como identificado através da quantificação por densitometria das proteínas fracionadas em gel desnaturante de poliacrilamida e coradas pelo azul de Coomassie. Este paciente apresentou uma mutação no códon de início da tradução ATG→GTG (fig. 1 – trabalho 5) e esta beta-espectrina anormal foi denominada beta-espectrina Promissão.

A paciente SD, portadora da alteração detectada no éxon 14, apresentava uma redução no conteúdo de espectrina de cerca de 11%. A descrição das características clínicas e hematológicas desta paciente encontram-se descritas no trabalho 6. Esta paciente apresentou uma deleção de uma citosina no códon 638 (fig. 1 – trabalho 6), levando à alteração do quadro de leitura com terminação prematura após a adição de 31 aminoácidos. Esta beta-espectrina anormal foi denominada beta-espectrina S^{la} Bárbara.

A paciente RS, portadora da alteração distinta no éxon 20 apresentava uma deficiência de espectrina de cerca de 20%. A descrição das características clínicas e hematológicas desta paciente encontram-se descritas no trabalho 6. Após a detecção, por SSCP, da alteração no éxon 20, o seqüenciamento do produto amplificado deste éxon demonstrou a deleção de uma citosina no códon 1392 (fig. 1 – trabalho 6), levando a uma alteração do quadro de leitura com terminação prematura após a adição de 19 aminoácidos à cadeia proteica. Esta beta-espectrina mutante foi denominada beta-espectrina São Paulo II.

Com o objetivo de verificar a presença das espécies truncadas da beta-espectrina na membrana eritrocitária ou no citoplasma, foi realizado “*immunoblotting*” com anticorpo anti-beta-espectrina das proteínas totais extraídas a partir de hemácias intactas ou das proteínas da membrana, obtidas a partir da lise osmótica das hemácias (“*ghosts*”). Tanto a beta-espectrina S^{la} Bárbara como a beta-espectrina São Paulo II não foram detectadas na fração das proteínas de membrana ou na fração das proteínas totais, que incluem as proteínas presentes no citoplasma (fig. 4 – trabalho 6; os mesmos resultados foram obtidos para a paciente RS).

A estabilidade dos mRNAs mutantes também foi analisada em ambos os casos. A paciente RS apresentava uma perda de heterozigosidade do cDNA (fig. 2A – trabalho 6), indicando que um dos alelos do gene da beta-espectrina não era expresso ao nível do mRNA. A paciente SD, por sua vez, não perdeu a heterozigosidade do cDNA (fig. 2B – trabalho 6), mas um dos alelos apresentou redução de cerca de 67% da expressão ao nível do mRNA (fig. 3 – trabalho 6).

Como os pais da paciente não apresentavam o defeito molecular responsável pela beta-espectrina S^{la} Bárbara e como a paciente tinha um irmão que apresentava este defeito, foi realizado um exame de “*fingerprinting*”, para determinação da paternidade. A paternidade não foi excluída, tanto em relação à paciente quanto ao seu irmão com uma probabilidade de 99.99933% e 99.99988%, respectivamente (tabela 1 – trabalho 6).

Finalmente, durante a triagem de mutações do gene da beta-espectrina, foram detectados diversos polimorfismos, alguns descritos na literatura e alguns novos, sendo que, em alguns casos, foi realizada uma estimativa da frequência destes polimorfismos nos quarenta e um pacientes portadores de EsH estudados (tabela 2- trabalho 6).

Objetivo 3.4: Fazer uma triagem das alterações moleculares presentes no promotor do gene da anquirina nos 41 pacientes portadores de EsH

O promotor é uma região regulatória dos genes, que determina a eficiência de transcrição. Os promotores apresentam elementos básicos situados próximos ao sítio de início de transcrição, aos quais se ligam as proteínas responsáveis pela formação do complexo de iniciação, e elementos específicos situados normalmente à montante, que regulam a formação deste complexo de iniciação e podem, inclusive, abolir completamente a transcrição. Estes elementos específicos permitem que a expressão de certos genes seja limitada a tecidos específicos ou a determinados estágios do desenvolvimento celular.

A espectrina, anquirina e banda 3 são expressas não só nos eritrócitos, como também em outros tecidos (capítulo 1), embora o controle da transcrição seja feito por promotores distintos daqueles utilizados para expressão das isoformas eritróides (GALLAGHER *et al*, 1999; GALLAGHER *et al*, 1998b e c; SAHR *et al*, 1994; SAHR *et al*, 1996; SCHOFIELD *et al*, 1994; PHILLIP *et al*, 1998)

O promotor utilizado na expressão da anquirina eritrocitária (GALLAGHER *et al*, 1998b) não contém o TATAbox, um elemento básico que tem a função de posicionar corretamente o complexo de iniciação. A ausência do TATAbox não impede a transcrição, mas faz com que o início da transcrição não ocorra em um sítio preciso, podendo haver variações. O promotor da anquirina é altamente dependente de um elemento CACCC, que se liga à Sp1, um fator de transcrição ubíquo (KADONAGA *et al*, 1987), e de um sítio consenso de ligação a GATA-1, um fator de transcrição eritróide-específico (PLUMB *et al*, 1989; TSAI *et al*, 1989). Além disto, um elemento de ligação ao fator de transcrição AP-2 (WILLIAMS *et al*, 1988) e um possível elemento de ligação ao fator de transcrição PEA-1 (MARTIN *et al*, 1988) foram identificados neste promotor.

Defeitos na região promotora dos genes das proteínas de membrana podem contribuir para a etiopatogenia da EsH, pois estas alterações podem descaracterizar os elementos regulatórios do

promotor, impedindo a sua interação com fatores de transcrição e, desta forma, afetando a transcrição do gene.

Com o objetivo de detectar possíveis alterações moleculares na região promotora do gene da anquirina nos pacientes portadores de EsH atendidos no Hemocentro da Unicamp e na Universidade de Santa Catarina, foi realizada a amplificação pela PCR de dois fragmentos correspondentes a este promotor (trabalho 7) e submissão destes à técnica de SSCP. Em dois pacientes foi detectado um padrão alterado de migração em um dos fragmentos do promotor (fig. 1A – trabalho 7), cujo seqüenciamento demonstrou uma transição T→C na posição -108, já descrita anteriormente por EBER *et al* (1996), ligada *in cis* a uma transição G→A na posição -153, nunca antes observada (fig. 1B – trabalho 7). As características clínicas dos pacientes portadores destas alterações no promotor encontram-se descritas no trabalho 7 (tabela 1).

A pesquisa destas duas alterações foi realizada em 139 indivíduos controles pertencendo a diferentes etnias: 106 indivíduos não relacionados pertencendo a uma amostra miscigenada da população Brasileira e 33 Índios Parakanã (tabela 2 – trabalho 7). As alterações não foram encontradas no grupo indígena. Entretanto, a mutação -153 G→A esteve presente em 2,4% da população brasileira, sempre ligada *in cis* à alteração da posição -108. A mutação -108 T→C, por sua vez, foi detectada isoladamente em três indivíduos (tabela 2- trabalho 7) e teve frequência de 3,8% na população estudada.

Objetivo 3.5: Realizar estudos *in vitro* para caracterizar o impacto de mutações na região promotora do gene da anquirina eritróide sobre a atividade deste promotor

Este objetivo foi levado a efeito através de estudos da mobilidade de complexos DNA-proteína em gel de poliacrilamida na presença das mutações na região promotora do gene da anquirina detectadas neste estudo (-153 G→A; -108T→C), bem como de outras já descritas neste promotor (-204 C→G e -72/73delTG) (tabela 2 – apêndice B).

A mutação -108T→C ocorre dentro de um sítio consenso para ligação do fator de transcrição AP-2 (fig. 2 - trabalho 7). O fator de transcrição AP-2 (*activator protein 2*) humano é uma proteína que se liga a elementos indutíveis no DNA viral e celular (WILLIAMS *et al*, 1988),

estimulando a transcrição de genes específicos. Ele se liga a uma sequência palindrômica de reconhecimento no DNA na forma de um dímero (WILLIAMS & TIJAN, 1991). A sua função de indução da transcrição é realizada pelo domínio de transativação, que é rico em resíduos de prolina e glutamina (WILLIAMS *et al*, 1988).

A mutação -108T→C pode prejudicar a interação AP-2/DNA e, desta forma, alterar os níveis de transcrição. Entretanto, nosso estudo *in vitro* revelou que esta mutação não prejudicou a ligação com AP-2 (fig. 4 – trabalho 7). A fig. 4 mostra a formação de um complexo DNA-proteína quando adicionado o extrato nuclear (canaletas 2 e 7). Estes complexos desaparecem na presença da sonda controle do sítio de AP-2 não marcada (canaletas 5 e 10), indicando que a proteína envolvida na formação do complexo está sendo seqüestrada por estes oligonucleotídeos e deve ser a AP-2. De qualquer forma, o fato da sonda mutante formar, ao que tudo indica, um complexo com AP-2 (canaleta 7), sugere que a presença da mutação não altera significativamente a ligação do promotor com este fator de transcrição *in vitro*.

Com relação à mutação -153 G→A, nenhum complexo DNA-proteína foi observado tanto com a sonda selvagem como com a mutante, na presença de extrato nuclear e ausência de competidores (fig. 3, canaletas 2 e 6 – trabalho 7), sugerindo que esta mutação situa-se em uma região livre de elementos regulatórios.

A deleção do dinucleotídeo TG na posição -72/-73 situa-se em uma região, na qual nenhum sítio regulatório conhecido foi identificado (fig. 2 - trabalho 7). Entretanto, nosso estudo *in vitro* demonstrou que esta região do promotor é capaz de se ligar a fatores nucleares (fig. 5, canaletas 2 e 6 – trabalho 7) e que a deleção do dinucleotídeo TG não modifica a interação com estes fatores.

A mutação -204 C→G ocorre dentro de um possível sítio de ligação ao fator de transcrição PEA-1 (fig. 2 – trabalho 7). A sequência consenso é bastante parecida com a sequência consenso descrita para PEA-1. O sítio regulatório PEA-1 (*polyoma virus enhancer A binding protein 1*) pertence à família de sítios relacionados ao fator de transcrição AP-1 (MARTIN *et al*, 1988), que, por sua vez, se liga ao DNA na forma de heterodímeros fos/jun ou homodímeros jun/jun (NEUBERG *et al*, 1989). Realmente, o sítio PEA-1 presente no *enhancer* do vírus poliovírus interage com as proteínas celulares fos e jun, que constituem o fator de transcrição AP-1 (GUO *et al*, 1996). É possível, no caso do promotor da anquirina, que esta sequência também interaja com AP-1, ou

com o fator NF-E2, um fator de transcrição eritróide, membro da família de proteínas AP-1 (ANDREWS *et al*, 1993).

Após a análise eletroforética da migração de complexos DNA-proteína da região -204 do promotor da anquirina, tanto a sonda selvagem, quanto a mutante, apresentaram a formação de um complexo idêntico, quando adicionado o extrato nuclear (fig. 6, canaletas 2 e 7 – trabalho 7). Ambos os complexos desapareceram na presença das próprias sondas não marcadas radioativamente (canaletas 3, 4, 8 e 9), sugerindo que a mutação não interfere na capacidade desta região do promotor de interagir com este fator nuclear. A inclusão de uma sonda controle contendo o sítio consenso de ligação à PEA-1 revelou que esta sonda controle PEA-1 não causou o desaparecimento dos complexos formados com as sondas selvagem e mutante (canaletas 5 e 10), sugerindo que a região que inclui a mutação -204 C→G não é sítio preferencial de ligação a PEA-1. Além disso, o complexo formado pela sonda controle após a adição de extrato nuclear não é idêntico aos complexos formados pelas outras sondas, apresentando uma migração eletroforética distinta (canaleta 12).

O estudo do efeito destas mutações na expressão do gene da anquirina foi realizado *in vitro*, através do uso do gene repórter da luciferase em células K562 (linhagem derivada de leucemia mielóide crônica) e em células HEL (linhagem eritroleucêmica). Para tanto, foram preparados plasmídeos contendo as seguintes construções gênicas ligadas ao gene da luciferase (ver também trabalho 7):

- a) Controle negativo: apenas plasmídeo (sem promotor)
- b) Controle positivo: plasmídeo + promotor da anquirina na ausência de mutações
- c) -108/-153: plasmídeo + promotor da anquirina contendo as mutações -108T→C e -153G→A ligadas *in cis*
- d) -108: plasmídeo + promotor da anquirina contendo somente a mutação -108T→C
- e) -72/73: plasmídeo + promotor da anquirina contendo a mutação -72/73delTG

Nossos resultados mostraram que nenhuma das alterações analisadas diminuíram significativamente a expressão obtida no plasmídeo controle, tanto em células da linhagem K562 (fig. 7 – trabalho 7), quanto em células da linhagem HEL (fig. 8 – trabalho 7).

A mutação -204C→G não foi analisada por esta metodologia porque não estavam disponíveis pacientes portadores desta mutação.

5.1.2 Trabalho 5

β -spectrin Promissão: A translation initiation codon mutation of the β -spectrin gene (ATG→GTG) associated with hereditary spherocytosis and spectrin deficiency in a Brazilian family

severe phenotype of kindred 2, who have a naturally occurring noncomplementary nucleotide substitution close to the IRP binding site, may therefore reflect a broader structural derangement of the IRE.

Our kindreds help clarify the relationship between genotype and phenotype in HHCS, and the description of two novel mutations illustrates the increasing genotypic diversity of this disorder. The severity of the phenotype of our patients and the position of the nucleotide substitution support the existing models of IRE-IRP interaction.

A.D. Mumford
T. Vulliamy
J. Lindsay
Imperial College School of Medicine
Hammersmith Hospital
London, UK
A. Watson
Stoke Mandeville Hospital NHS trust
Aylesbury, Bucks, UK

REFERENCES

1. Cazzola M, Bergamaschi G, Tonon L, Arbustini E, Grasso M, Vercesi E, Baroi G, Bianchi PE, Cairo G, Arosio P: Hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome: Relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. *Blood* 90:814, 1997
2. Bettany AJE, Eisenstein RS, Munro HN: Mutagenesis of the iron-regulatory element further defines a role for RNA secondary structure in the regulation of ferritin and transferrin receptor expression. *J Biol Chem* 267:16531, 1992
3. Jaffrey SR, Haile DJ, Klausner RD, Harford JB: The interaction between the iron-responsive element and its cognate RNA is highly dependent upon both RNA sequence and structure. *Nucleic Acids Res* 21:4627, 1993
4. Leibold EA, Laudano A, Yu Y: Structural requirements of iron-responsive element for binding of the protein involved in both transferrin receptor and ferritin mRNA post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 18:1819, 1990

β -Spectrin Promissão: A Translation Initiation Codon Mutation of the β -Spectrin Gene (ATG $\rightarrow$ GTG) Associated With Hereditary Spherocytosis and Spectrin Deficiency in a Brazilian Family

To the Editor:

Hereditary spherocytosis (HS) is a common inherited anemia characterized by the presence of spheroidal red cells and increased osmotic fragility of erythrocytes.¹ This disorder is heterogeneous in terms of its clinical presentation, molecular basis, and inheritance.² HS mutations have been ascribed to several genes,¹ including the β -spectrin gene. So far 13 β -spectrin mutations have been described associated with HS.³⁻⁶

We have studied a Brazilian family with HS diagnosed in eight subjects from two generations and inherited in an autosomal dominant fashion (Fig 1). The proband was a 28-year-old black man, who presented compensated hemolytic disease with splenomegaly, hyperbilirubinemia, increased osmotic fragility, and a regular number of spherocytes and acanthocytes in the blood smear (Fig 1). His recent hematological profile was: hemoglobin (Hb) 15.0 g/dL, red blood cell $4.49 \times 10^{12}/L$, mean corpuscular volume 88 fL, mean corpuscular hemoglobin concentration 38.0 g/dL, reticulocyte count $530 \times 10^9/L$ (11.8%). His mother, uncle, and two cousins were splenectomized.

Densitometric scans of Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the proband's membrane proteins showed an 18% reduction in spectrin content (Fig 1). This pointed to the β -spectrin gene as the most likely candidate for bearing the primary defect. Therefore, we started screening for mutations in the β -spectrin gene. This was performed through the amplification of the individual exons of the β -spectrin gene with intronic primers. The amplification products were submitted to nonradioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique in a PhastSystem apparatus (Pharmacia, Uppsalla, Sweden) to detect sequence abnormalities. The DNA amplification products of exon 2 of the patient and his mother showed an identical band shift in two independent experiments (Fig 2). No such band pattern was observed in 2 independent controls, nor was it observed in 12 other HS patients with spectrin deficiency and acanthocytes in the blood smear, suggesting that this patient bore a unique or at least a rare sequence alteration in this region of the gene. Sequencing revealed an heterozygous A $\rightarrow$ G nucleotide substitution at the translation initiation codon of the β -spectrin

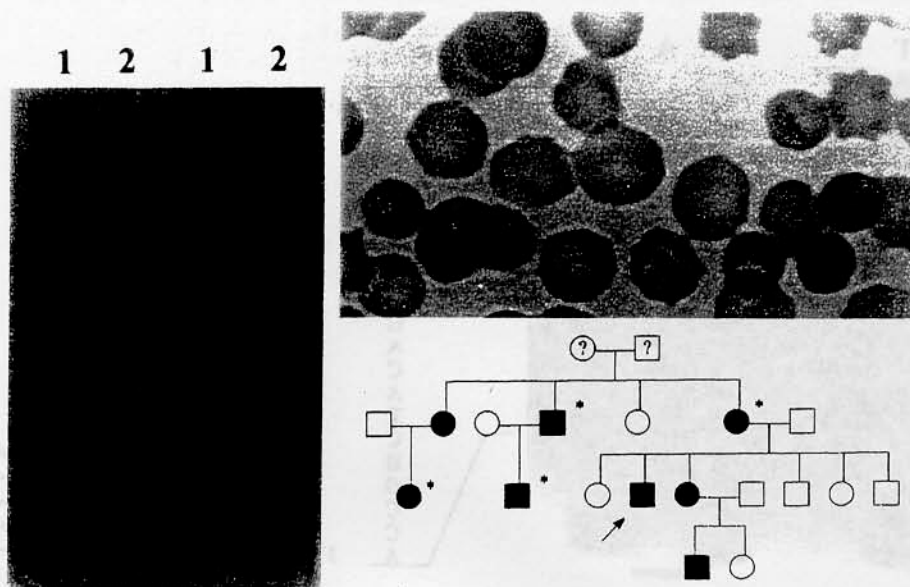


Fig 1. (Left) 3.5% to 17% exponential gradient SDS-polyacrylamide gel of total membrane proteins stained with Coomassie blue, showing a reduction of spectrin content in the patient (lane 2) compared with the control (lane 1). (Upper right) Blood smear of the proband showing regular numbers of spherocytes and acanthocytes. (Lower right) Family pedigree showing all affected members from two generations. Splenectomized individuals are indicated by asterisk and the proband is indicated by an arrow.

1 2 3

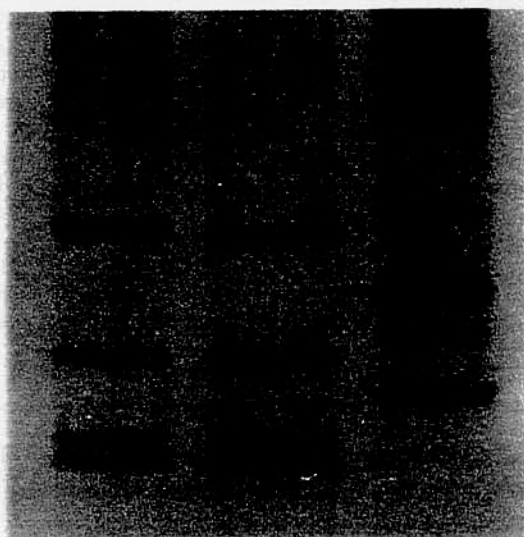


Fig 2. Nonradioactive SSCP of exon 2 showing a band shift in the amplification products of the patient (lane 1) and his mother (lane 2), but absent in a control (lane 3).

gene (ATG $\rightarrow$ GTG) (Fig 3). This is the first report of an initiation codon mutation in this gene, but such mutations have already been reported for other genes, including the β -globin gene.⁷ In this case, the mutations led to β^0 -thalassemia phenotypes, suggesting that alternative triplets for ATG are nonfunctional as initiation codons for this gene. Therefore, we suggest that in our case translation from the mutated allele is also impaired. Based on this supposition, the ATG $\rightarrow$ GTG mutation could be held responsible for the reduced spectrin content observed in the patient. The propositus would have only one functional allele and, as β -spectrin quantities are considered limiting

for membrane assembly, this could account for the picture of spherocytosis observed in this patient.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Daniela S. Bassères
Dilmara L. Vicentim
Fernando F. Costa
Sara T.O. Saad
Hemocentro
Universidade Estadual de Campinas, Brazil
Hani Hassoun
Division of Hematology/Oncology
St Elizabeth's Medical Center, Boston, MA

REFERENCES

1. Lux S, Palek J: Disorders of the red cell membrane, in RI Handlin, SE Lux, TP Stossel, eds: *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Lippincott, Philadelphia, PA, 1995, p 1701
2. Becker PS, Lux SE: Hereditary spherocytosis and related disorders. *Clin Haematol* 14:15, 1985
3. Becker PS, Tse WT, Lux SE, Forget BG: β -spectrin Kissimmee: A spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding to protein 4.1. *J Clin Invest* 92:612, 1993
4. Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Yi SJ, Hanspal M, Ware RE, Winter SS, Chiou S-S, Palek J: Molecular basis of spectrin deficiency in β spectrin Durham. *J Clin Invest* 96:2623, 1995
5. Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Yi SJ, Hanspal M, Johnson CA, Palek J: Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency due to an unstable truncated β spectrin. *Blood* 87:2538, 1996
6. Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Njolstad PR, Rogus JJ, Ballas SK, Schaffer F, Jarolim P, Brabec V, Palek J: Characterization of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency. *Blood* 90:398, 1997
7. Baysal E, Carver MFH: The β - and δ -thalassemia repository. *Hemoglobin* 19:213, 1995

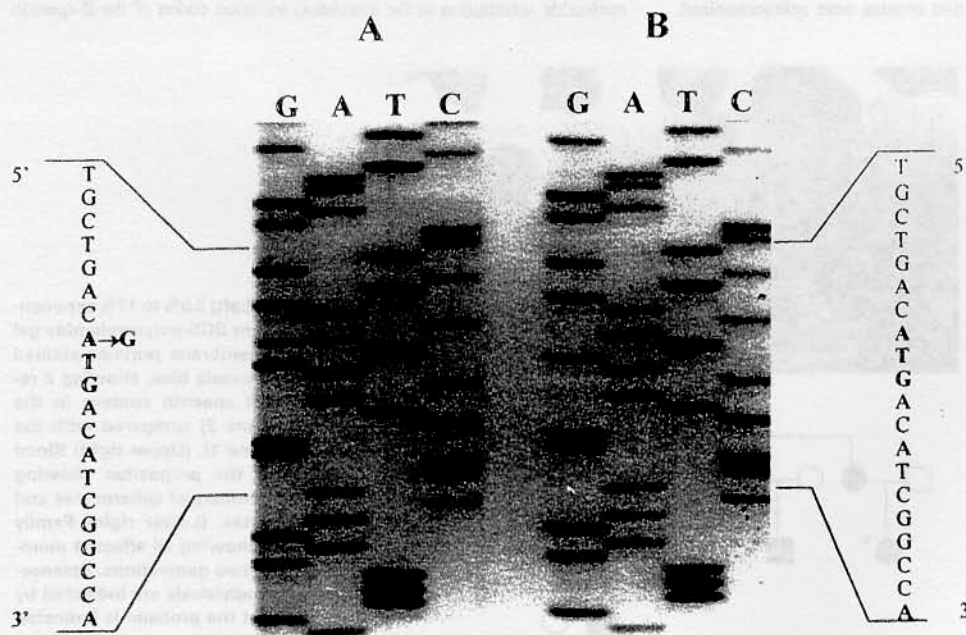


Fig 3. Direct sequencing of the amplified DNA from a control (B) and the patient (A), showing an A $\rightarrow$ G substitution in the latter. The initiation codon is indicated by bold letters.

5.1.3 Trabalho 6

β -spectrin Santa Bárbara and β -spectrin São Paulo II: Two novel frameshift mutations of the β -spectrin gene associated with hereditary spherocytosis

**β -SPECTRIN SANTA BÁRBARA AND β -SPECTRIN SÃO PAULO^{II}: TWO NOVEL
FRAMESHIFT MUTATIONS OF THE β -SPECTRIN GENE ASSOCIATED WITH
HEREDITARY SPHEROCYTOSIS**

Daniela S. Bassères^{1,3}, Alessandra C. Tavares¹, Hani Hassoun⁴, Fernando F. Costa^{1,2} and Sara T. O. Saad^{1,2}

¹Hemocentro, ²Depto. de Clínica Médica, and ³Depto. de Genética e Evolução - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil. Cep 13081-970; CP 6198.

⁴Division of Hematology/Oncology, St. Elizabeth's Medical Center, Boston

Correspondence

Sara T.O.Saad, M.D.

HEMOCENTRO-UNICAMP

Campinas, SP, Brazil.

CP6198

CEP 13081-970

e-mail address: sara@obelix.unicamp.br

Abstract:

Hereditary spherocytosis is a common inherited anemia characterized by the presence of spherocytic red cells and by a heterogeneous nature in terms of its clinical presentation, molecular basis and inheritance. Defects in several membrane protein genes have been involved in the pathogenesis of HS. β -spectrin-related HS seems to be fairly common. We have screened the β -spectrin gene coding region in 13 Brazilian HS patients presenting elliptocytes or acanthocytes in the blood smear. Spectrin deficiency was present in most cases. We detected two novel HS frameshift mutations expressed as a dominant trait (β -spectrin S^{ta} Bárbara and β -spectrin São PauloII) and two missense mutations that are associated with recessive HS and could have functional significance (β -spectrin São Paulo and β -spectrin Florianópolis). These findings suggest that β -spectrin-related HS may be common in Brazil. The mRNA encoding β -spectrin São Paulo II was undetectable. However, detectable levels of the mutant mRNA were found in the patient presenting the β -spectrin S^{ta} Bárbara mutation. Unfortunately, the mutant protein was not detected in the membrane or in other cellular compartments. Interestingly, the mutation resulting in β -spectrin S^{ta} Barbara seems to have surfaced during the germ cell lineage differentiation of one of the patient's progenitors and must be present in a mosaic pattern in these cells. Besides, we were able to detect some new missense mutations and polymorphisms in the β -spectrin gene coding region.

Introduction:

Hereditary spherocytosis is a common inherited anemia characterized by the presence of spherocytic and osmotically fragile red cells.¹ This disorder is heterogeneous in terms of its clinical presentation, molecular basis and inheritance.² The primary molecular defects reside in the proteins involved in the vertical interactions between the erythrocyte membrane skeleton and the lipid bilayer³, namely α -spectrin, β -spectrin, ankyrin, band 3 and protein 4.2. These defects cause local disconnections between the skeleton and the bilayer, resulting in vesiculation of the unsupported membrane components⁴. The loss of membrane surface area results in a consequent loss of cellular deformability, which causes the spherocytes to be selectively trapped and destroyed in the spleen^{1,4}.

β -spectrin-related HS is relatively common⁵⁻¹¹, and is frequently a result of null mutations, where the mutant mRNA is unstable and the allele is not expressed^{8,11,12}. Indeed, many patients with HS have spectrin-deficient red cells and it has been stated that the degree of spectrin deficiency correlates well with the spheroidicity of HS erythrocytes, the severity of hemolysis, and the response to splenectomy⁴. One other characteristic feature of β -spectrin-related dominant HS is the presence of acanthocytes in the blood smear⁸. In some cases, elliptocytes can be found in the blood smear associated with mutations located in a relative proximity to the self-association site, leading to spectrin-deficient red cells, which are also defective in self-association.

We have screened 13 Brazilian HS patients for mutations in the β -spectrin gene coding region. Nine patients presented acanthocytosis and 4 presented elliptocytes in the blood smear. Seven patients presented spectrin deficiency. We have found two novel frameshift mutations leading to HS: a C deletion at codon 638 (β -spectrin S^{la} Bárbara) and a C deletion at codon 1392 (β -spectrin São Paulo II). The mRNA encoding β -spectrin São Paulo II was undetectable. However, detectable levels of the mutant mRNA were found in the patient presenting the β -spectrin S^{la} Bárbara mutation. Unfortunately, the mutant protein was not detected in the membrane or in other cellular compartments. Since this mutation was not present in the patient's parents, but was detected in her affected brother, we propose a germ cell mosaicism for this mutation in one of the progenitors. Finally, the screening procedure allowed us to detect several polymorphisms in the β -spectrin gene, including a missense mutation A1884V (β -spectrin São Paulo) and a missense mutation G1408R (β -spectrin Florianópolis), that could represent recessive HS mutations.

Material and Methods:

Case reports:

β-spectrin S^{aa} Barbara. The propositus (SD) was a 25-year-old white woman of Italian origin, who presented compensated hemolytic disease with splenomegaly, hyperbilirubinemia, increased osmotic fragility of the red cells and a regular number of spherocytes and acanthocytes in the blood smear. Coombs's test was negative. Her brother also presented a history of anemia and jaundice since childhood and had been previously subjected to splenectomy. Interestingly, both parents presented a normal clinical picture. The patient's recent hematological profile was: Hb 11.0g/dl, RBC $3.01 \times 10^{12}/l$, MCV 80fl, MCHC 32.8g/dl, reticulocyte count $644 \times 10^9/l$ (21.4%).

β-spectrin São Paulo II. The propositus (RS) was a 20-year-old white woman, who was diagnosed based on the presence of splenomegaly, jaundice, hemolysis and increased osmotic fragility of the erythrocytes. Her peripheral smear also displayed many spherocytes and acanthocytes. In her case, HS was inherited as a dominant trait. Her father and brother were also affected, having undergone splenectomy. Her hematological values were: Hb 12.5g/dl, RBC $3.8 \times 10^{12}/l$, MCV 87fl, MCHC 37.7g/dl, reticulocyte count $395 \times 10^9/l$ (10.4%).

β-spectrin São Paulo. The propositus (RL) is a 23-year old white male presenting with anemia, jaundice, hemolysis and increased osmotic fragility of red cells after incubation. His hematological parameters were: Hb 10.3g/dl, RBC $3.6 \times 10^{12}/l$, MCV 85fl, MCHC 35.5g/dl, reticulocyte count $338 \times 10^9/l$ (9.5%). He presented many spherocytes and ovalocytes in the blood smear. His parents are clinically and hematologically normal, indicating a recessive inheritance in this case.

β-spectrin Florianópolis. This abnormal β-spectrin was detected in 3 HS patients, including patient SD. The other two HS patients with β-spectrin Florianópolis presented anemia, splenomegaly, reticulocytosis and an increased osmotic fragility of the erythrocytes. They also presented some degree of spectrin deficiency.

Red cell membrane protein quantification analysis. Red cell membrane proteins were fractionated in nonlinear gradient 3.5-17% polyacrylamide gels, as described elsewhere¹³.

Quantification of the red cell membrane proteins was carried out by densitometry of Coomassie blue stained gels at 540nm (Hoefer Scientific Instrument, model GS300, San Francisco, CA) and the areas under the peaks were determined by the computer program GS 365W, version3.01. The amount of spectrin was expressed as a ratio to band 3 and the Sp/band 3 ratio in 30 normal controls was 1.02 ± 0.05 (varying from 0.90 to 1.11).

Immunoblotting analysis. Immunoblotting using a polyclonal antihuman β -spectrin antibody was performed with proteins extracted from erythrocyte ghosts prepared by hypotonic lysis¹⁴ and from intact red cells. For this experiment, the samples were run, simultaneously, in a Biorad minigel apparatus containing two 6% polyacrylamide-SDS gels. Electrotransfer of the red cell membrane proteins from one of the 6% polyacrylamide-SDS gels to nitrocellulose was carried out for 2 hours at 100V as described by Towbin et al¹⁵. Non-specific protein binding was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (3% nonfat dry milk, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0.02% tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with polyclonal antihuman β -spectrin antibodies for 20 hours at 4°C and then, washed for 60min with blocking buffer without BSA. The blots were subsequently incubated with 2 μ Ci of ¹²⁵I-protein A in 10ml of blocking buffer for 1h at 22°C and then washed for 2h. The filters were exposed to Kodak X-Omat film with intensifying screens at -70°C. The second gel was stained by Coomassie blue.

PCR-SSCP analysis. Leucocyte genomic DNA from the subjects analyzed was extracted with standard techniques using phenol-chlorophorm. The 31 coding exons of the β -spectrin gene were amplified by the PCR reaction¹⁶, using previously described intronic primers⁸. The amplified products were subsequently analyzed by non-radioactive-SSCP, in a PhastSystem apparatus (Pharmacia, Uppsalla, Sweden). The temperature and voltage conditions varied according to each specific exon.

Direct Sequencing of the amplified DNA. The PCR products exhibiting abnormally migrating bands in the SSCP analysis were directly sequenced according to the Thermo SequenaseTM radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham, Cleveland, OH).

Sequencing of cloned DNA amplification products. The amplification products presenting frameshift mutations were subcloned into pMOSblue vectors (Promega, Madison, WI) and sequenced according to Thermo SequenaseTM cycle sequencing kit (Amersham, Cleveland, OH).

RT-PCR analysis. In order to investigate the stability of the mutant mRNAs bearing the frameshift mutations, we took advantage of the presence of heterozygous polymorphisms in the patients, that created or abolished restriction sites. A polymorphism G1408R in exon 20, that abolishes a MspI site, was used to determine mRNA stability in patient SD and a polymorphism N439S in exon 11, that creates a DdeI site, was used to determine mRNA stability in patient RS. Reticulocyte mRNA was extracted according to Kan et al¹⁷. The mRNA was reverse-transcribed and amplified in a single-step reaction that included a 30min cycle at 42°C followed by 40 cycles of a standard PCR cycling reaction, which varied according to the fragment amplified. AMV reverse transcriptase (Amersham, Cleveland, OH), Rnasin (Pharmacia, Uppsalla, Sweden) and oligodT (Pharmacia, Uppsalla, Sweden) were added to this reaction and specific primers designed in the coding region of exons 11 and 20 were used for amplification purposes. The amplification products were then digested with the specific restriction enzymes. In order to quantify the putative mutant mRNA present in patient SD, we performed genomic DNA PCR amplification and repeated the RT-PCR amplification for 30 cycles, removing one tube successively at the end of each two cycles for each type of amplification reaction, starting at cycle 20. We, subsequently, submitted the amplified products to restriction enzyme digestion with MspI. The integrated density of the digestion bands was determined through the program Stratagene Eagle Sight version 3.1 (Stratagene, La Jolla, CA). The relative abundance of the putative mutant band in relation to the normal band present in the patient cDNA was compared and corrected by the relative abundance of the mutant band in relation to the normal band at the genomic DNA level (fig. 3).

Paternity Investigation. In order to confirm biological paternity of patient SD's father in relation to herself and to her affected brother, a fingerprinting test was requested. This analysis assessed, through the use of the Southern Blotting technique, the presence of specific alleles from five highly polymorphic loci in the father, mother, patient and her affected brother (table 1).

Restriction enzyme analysis. Some polymorphisms, which altered the restriction map of the β -spectrin gene, were analyzed through restriction enzyme digestion in order to determine their frequency in 41 unrelated HS patients (table 2).

Results and Discussion:

β -spectrin frameshift mutations. Screening for mutations in the β -spectrin gene coding region through SSCP revealed abnormal migration patterns in the DNA amplification products of exon 14 from patient SD and of exon 20 from patient RS in two independent experiments (fig. 1A). Sequencing of the cloned PCR products revealed, in both patients, a normal and a mutant clone, the latter bearing a C deletion at codon 638 in patient SD and a C deletion at codon 1392 in patient RS (fig. 1B). The codon 638 and 1392 deletions cause frameshifts, accompanied by premature terminations after addition of 31 and 19 aminoacids to the polypeptide chain, respectively. The truncated proteins were named β -spectrin S^{la} Barbara and β -spectrin São Paulo II, respectively.

Both patients present acanthocytes in the blood smear, which is commonly seen in dominantly inherited β -spectrin-related HS⁸. Besides, both patients have spectrin-deficient erythrocytes. Densitometric scans of Coomassie blue stained SDS-PAGE of erythrocyte membrane proteins show an 11% and a 22% reduction in spectrin content in patient SD and patient RS, respectively (not shown), suggesting that the mutant protein is not incorporated into the membrane in both cases.

Taking advantage heterozygous polymorphisms, we next assessed the presence of the mutant mRNA transcripts in the reticulocytes. Patient RS was heterozygous for a N439S polymorphism in exon 11, which creates a DdeI site. RT-PCR analysis, followed by digestion with DdeI shows that patient RS is heterozygous at the genomic DNA level, but not at the cDNA level (fig. 2A). The absent allele at the cDNA level is the mutant allele, since it was inherited from the affected father, together with the N439S polymorphism. This indicates that the mRNA is unstable and that the anomalous protein is not expressed in this case. Patient SD was heterozygous for a G1408R polymorphism in exon 20, which abolishes a MspI site. In this case, however, no loss of heterozygosity at the cDNA level could be demonstrated (figs. 2B), indicating that the mutant mRNA transcripts are present in detectable levels.

We could not determine which allele was the mutant allele in patient SD, since her parents do not present the C deletion at codon 638. However, it is most probable that the mutant allele is the less abundant one (band of 145bp). In an attempt to quantify this putative mutant allele, we digested the genomic DNA PCR products and RT-PCR products after each two PCR cycles between 20 and 30 cycles (fig. 3). The relative amount of the putative mutant band remained constant throughout the

experiment, which is demonstrated by the low standard deviation obtained, and represents 33% of the abundance of the putative wildtype 188bp band (fig. 3).

Anyway, if both alleles are expressed at mRNA level, one would expect to detect the mutant protein in the red cells of patient SD. Due to the premature termination at exon 14, β -spectrin S^{la} Barbara would not have the repeat unit β 15, which is encoded by a great portion of exon 26 and by part of exon 27. The repeat unit β 15 and part of the repeat unit β 16 represent the ankyrin binding site, the main attachment site of β -spectrin to the membrane¹⁸. Indeed, immunoblotting experiments with erythrocyte ghosts' proteins, using anti- β -spectrin antibodies, do not show the presence of truncated species of β -spectrin (fig.4A). This indicates that β -spectrin S^{la} Barbara is not incorporated into the membrane, as expected. However, the same experiments performed with proteins extracted from intact erythrocytes show no truncated species as well, indicating that β -spectrin S^{la} Barabara is not present in other cellular compartments (fig. 4B). This could be explained by a high instability of the mutant protein, that would be degraded rapidly after protein synthesis or by a potential lack of translation from the mutant mRNA. Anyway, regardless of the mechanism, both mutations lead to a null phenotypes, which are apparently common in β -spectrin-related dominant HS^{8, 11, 12}.

Interestingly, the parents of patient SD do not present the deletion at codon 638. This finding could have been indicative of a *de novo* mutation. However, the patient's affected brother presents the same molecular alteration, which statistically rules out this possibility. In addition, a fingerprinting test utilizing highly polymorphic markers did not exclude paternity with a confidence index of 99.99933% and 99.99988%, respectively (table 1). We propose that this mutation surfaced during the differentiation of one the progenitors' germ cell line precursors. Since the patient also has unaffected siblings, this mutation must present a mosaic distribution in the germ cells of the carrier. There is a higher probability that the mother is the affected progenitor, since she is the one, who transmitted the less abundant allele to patient SD and her affected brother.

β -spectrin missense mutations. We also detected two potentially significant missense mutations in the coding region: a GGC→CGC; G1408R (β -spectrin Florianópolis) substitution in 3 HS patients and a GCG→GTG; A1884V substitution (β -spectrin São Paulo) in patient RL (fig. 5; table 2). which had already been reported by our group¹⁹ and was recently described by Garbarz et al⁹ and renamed β -spectrin Vay. In this study, it is claimed that this mutation represents a mere

polymorphism, since no loss of heterozygosity was detected at the mRNA level. However, this mutation was never described in a control subject. Since this mutation does not alter the restriction map of the gene, we have analyzed 27 control samples of similar ethnic background as patient RL through SSCP, using the mutant sample as a positive control. No abnormalities were detected in the control subjects. This suggests that this mutation is either a rare polymorphism or a recessive HS mutation. Patient RL did not present spectrin deficiency after quantification analysis, which is consistent with the finding that this mutation does not affect the mutant mRNA levels⁹. It could, nevertheless, alter the function of the mutant protein in a way, that combined with a second recessive defect, it would lead to HS. For instance, since this mutation is located in exon 27, it could disturb the self-association process slightly. Indeed, this patient presents many ovalocytes in his blood smear. Besides that, the alanine at position 1884 is the eleventh residue from the β 16 repeat unit, and belongs to the portion of this repeat involved in ankyrin binding¹⁸. It is not a conserved residue between traditional β -spectrin repeats, but the aminoacid at the eleventh position of the β 16 repeat unit of β -fodrin is also an alanine¹⁸, suggesting that this aminoacid could be of some importance for ankyrin binding, probably by helping the protein achieve a correct folding and not by a direct interaction. Unfortunately, we did not detect a second molecular defect in the β -spectrin coding region in this patient.

The G1408R mutation affects a conserved glycine residue at position 59 of repeat unit β 11²¹ and could have a functional consequence. Nevertheless, if this is true, it must associate with a second defect or be present in homozygosis in order to lead to HS, since the father of patient SD, who is heterozygous for this polymorphism, has a normal clinical picture with no hemolysis. This mutation is present in 3.6% of 41 unrelated HS patients. A study of this mutation in a normal population would be useful.

β -spectrin polymorphisms. During the screening of the coding region of the β -spectrin gene, four new molecular alterations and eight described ones were detected (fig. 5, 6; table 2). Some of them were assessed through restriction enzyme digestion, in order to determine their frequency in 41 unrelated HS patients.

The alterations H136H, F222F, L423L, I1620I and V1845V are silent and represent obviously mere polymorphisms.

The I220V polymorphism was previously described by Hassoun et al⁸ as a potential HS mutation, since it was not detected in 222 subjects, and was named β -spectrin Oakland. This mutation was discovered in our study, because it was linked to a second mutation in the same exon, namely F222F (fig. 6). We did not know, at first, which mutation led to the abnormal migration at the SSCP level in the patient. In order to determine that, we sequenced the region of one of the other 12 HS patients, who were being screened and, who did not show the abnormal pattern. This patient did not present the F222F mutation, but he was heterozygous for the I220V mutation (fig. 6), suggesting that it might be present as well in all the other patients analyzed through SSCP, and thus, be very common and represent a mere polymorphism. This mutation lies in the first domain of β -spectrin, which is composed of 272 residues and is not homologous to the β -spectrin canonical repeats²¹.

The missense mutations N439S, N1151D and R1403Q seem to be very common and do not affect conserved residues, which suggests that they represent mere polymorphisms.

The mutation H1374R could have an impact on spectrin function. The exchange of a positively charged aminoacid for a negatively charged one, could alter the chemical properties of the protein and alter its conformation and function. This could be particularly important, since this residue lies at position 25 of repeat β 11, next to a highly conserved leucine²⁰. We cannot disregard the fact, however, that an arginine is found at position 25 in repeats β 3, β 6, β 13 and β 17²¹, raising the possibility that this position might not be critical for protein function and that alterations at this position in all β -spectrin repeats would lead to mere polymorphisms. A control population survey would be valuable to determine the significance of this mutation.

The identification of new polymorphisms is useful for the study of linkage and inheritance of unknown defects and to build a more complete haplotype in order to study common origins of alleles. Besides that, they are extremely useful to determine the mRNA stability of a specific allele.

Acknowledgements:

We would like to thank Dilmara L. Vicentim for her important technical support throughout the development of this study. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

References:

1. Lux S and Palek J: Disorders of the red cell membrane. In *Blood: Principles and Practice of Hematology*. RI Handlin, SE Lux, TP Stossel, editors. JB Lippincott, Philadelphia. 1701-1818, 1995.
2. Becker PS, Lux SE: Hereditary spherocytosis and related disorders. *Clin Haematol* 14: 15-43, 1985
3. Tse WT, Lux SE: Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* 104: 2-13, 1999
4. Gallagher PG, Forget BG, Lux SE: Disorders of the erythrocyte membrane. In: Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood. DG Nathan and SH Orkin, editors, Saunders, Philadelphia, 5th edn, Vol 1. 544-664, 1998
5. Becker PS, Tse WT, Lux SE, Forget BG: β -spectrin Kissimmee: a spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding to protein 4.1. *J Clin Invest* 92: 612-616, 1993
6. Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Yi SJ, Hanspal M, Ware RE, Winter SS, Chiou S-S, Palek J: Molecular basis of spectrin deficiency in β spectrin Durham. *J Clin Invest* 96: 2623-2629, 1995
7. Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Yi SJ, Hanspal M, Johnson CA, Palek J: Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency due to an unstable truncated β spectrin. *Blood* 87: 2538-2545, 1996
8. Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Njolstad PR, Rogus JJ, Ballas SK, Schaffer F, Jarolim P, Brabec V, Palek J: Characterization of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency. *Blood* 90: 398-406, 1997
9. Garbarz M, Galand C, Bibas D, Bournier O, Devaux I, Harousseau J-L, Grandchamp B, Dhermy D: A 5' splice region G $\rightarrow$ C mutation in exon 3 of the human β -spectrin gene leads to decreased levels of β -spectrin mRNA and is responsible for dominant hereditary spherocytosis (spectrin Guemene-Penfao). *Br J Haematol* 100: 90-98, 1998.
10. Bassères DS, Vicentim DL, Costa FF, Saad STO, Hassoun H: β -spectrin Promissão: A translation initiation codon mutation of the β -spectrin gene (ATG $\rightarrow$ GTG) associated with hereditary spherocytosis and spectrin deficiency in a Brazilian family. *Blood* 91: 368-369, 1998.
11. Dhermy D, Galand C, Bournier O, Cynober T, Mechinaud F, Tchemia G, Garbarz M: Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency related to null mutations of the β -spectrin gene. *BCMD* 24: 251-261, 1998.
12. Miraglia del Giudice E, Lombardi C, Francese M, Nobili B, Conte ML, Amendola G, Cutillo S, Iolascon A, Perrotta S: Frequent de novo monoallelic expression of beta-spectrin gene (SPTB) in children with hereditary spherocytosis and isolated spectrin deficiency. *Br J haematol* 101: 251-254, 1998
13. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH: Electrophoretic analysis of the human erythrocyte membrane. *Biochem* 10: 2606-2614, 1971
14. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100: 119-130, 1963
15. Towbin H, Staehlin JT, Gordon J: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheep: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979
16. Saiki RK, Geelfond DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988
17. Kan YW, Holand JP, Dozy AM, Varmus HE: Demonstration of non-functional β -globin mRNA in homozygous β^0 -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 5140-5144, 1975
18. Kennedy SP, Warren SL, Forget BG, Morrow JS: Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid beta-spectrin. *J Cell Biol* 115: 267-277, 1991

19. Bassères DS, Tavares AC, Bordin S, Vicentim DL, Melo MB, Costa FF, Hassoun H, Saad STO: Novel β -spectrin variants associated with hereditary spherocytosis in Brazil. *Blood* 90 (Suppl 1): 4b, 1997 (abstr.)
20. Prchal JT, Morley BJ, Yoon S-H, Coetzer TL, Palek J, Conboy JG, Kan YW: Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte β -spectrin. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 7468-7472, 1987
21. Winkelmann JC, Chang J-G, Tse WT, Scarpa AL, Marchesi VT, Forget BG: Full-length sequence of the cDNA for human erythroid β -spectrin. *J Biol Chem* 265: 11827-11832, 1990

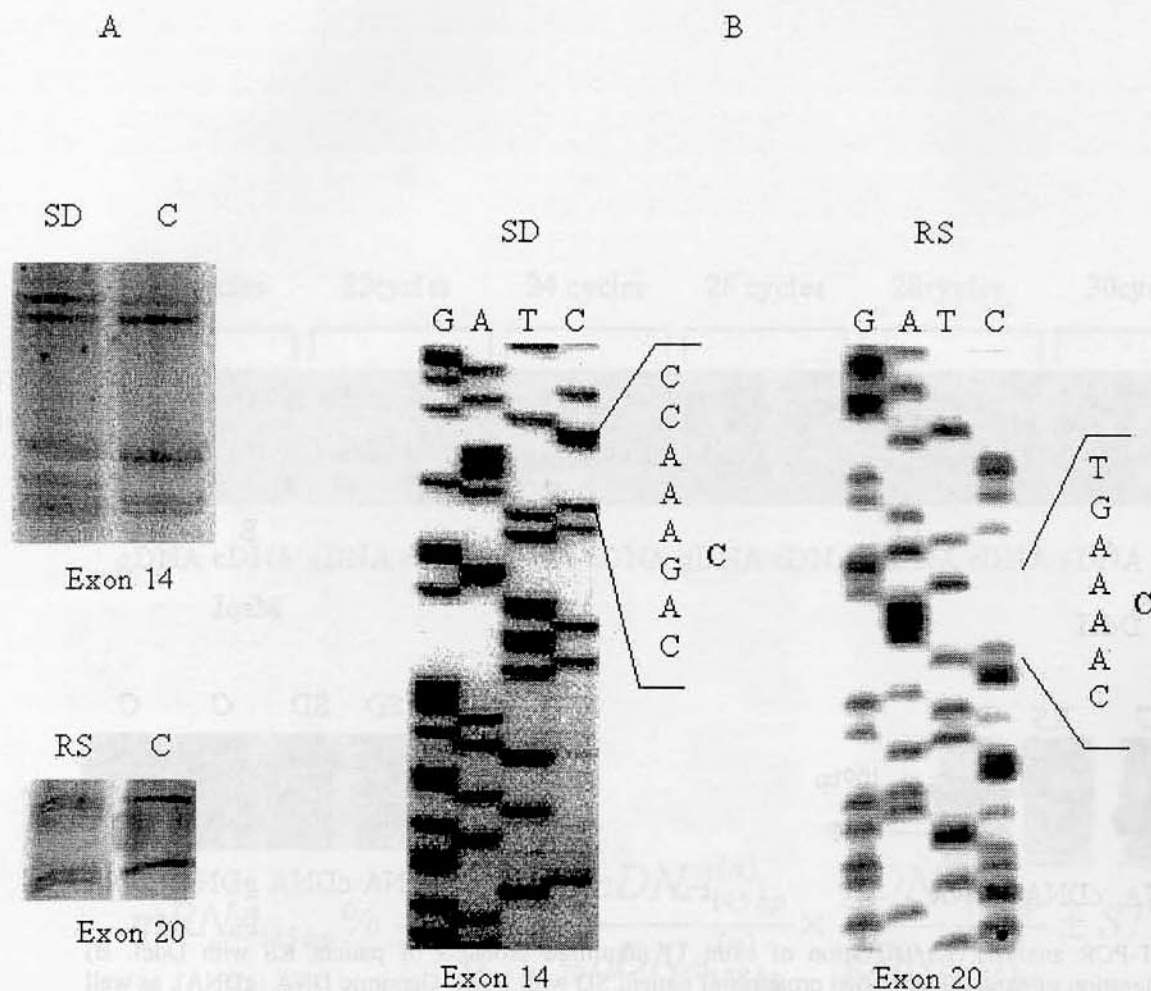


Figure 1: Molecular analysis of the β -spectrin gene frameshift mutations. A) Non-radioactive SSCP showing a band shift in the amplification product of exon 14 of patient SD (upper) and a band shift in the amplification product of exon 20 of patient RS (lower). (C): control. B) Sequence analysis of a mutant clone originated from patient SD (left) and a mutant clone originated from patient RS (right). The sequences in the region of the deletion are indicated and the deleted nucleotides (not present in the clones) appear in bold letters next to the position where they should be found.

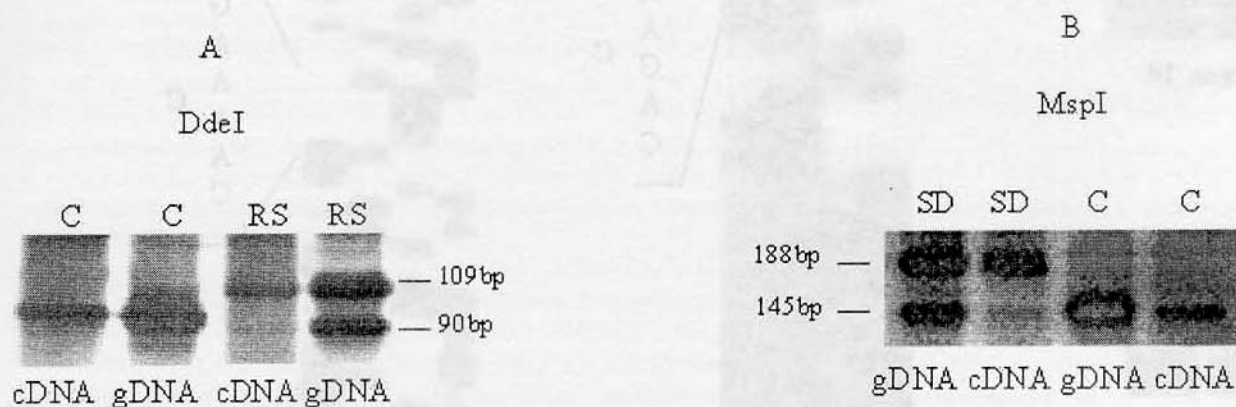
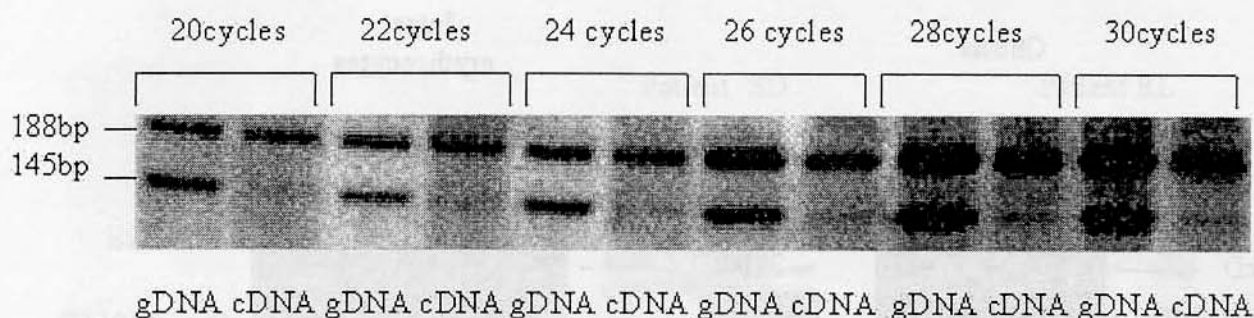


Figure 2: RT-PCR analysis. A) Digestion of exon 11 amplified products of patient RS with DdeI. B) Digestion of exon 20 amplified products of patient SD with MspI. Genomic DNA (gDNA), as well as cDNA reverse transcribed from reticulocyte mRNA, were used as templates for PCR as indicated. Note patient SD retains an heterozygous digestion pattern at the cDNA level. (C) control. The control is homozygous for the wild type allele in what concerns exon 20, but homozygous for the N439S polymorphism in exon 11.



$$mRNA_{145bp} \% = \frac{100}{6} \sum_{n=20}^{30} \frac{cDNA_{145bp}^{(n)}}{cDNA_{188bp}^{(n)}} \times \frac{gDNA_{188bp}^{(n)}}{gDNA_{145bp}^{(n)}} \pm STD$$

$$mRNA_{145bp} \% = 33 \pm 3\%$$

Figure 3: Quantification of the putative mutant allele in patient SD. PCR tubes were removed from the thermal cycler after each two cycles as explained in methods. The picture shows a steady increase in the putative 145bp mutant band between cycles 20 and 30. The digestion bands were quantified and the abundance of the mutant band was determined according to the stated formula, which takes into account the parameters mentioned in methods. STD) standard deviation; n) number of cycles.

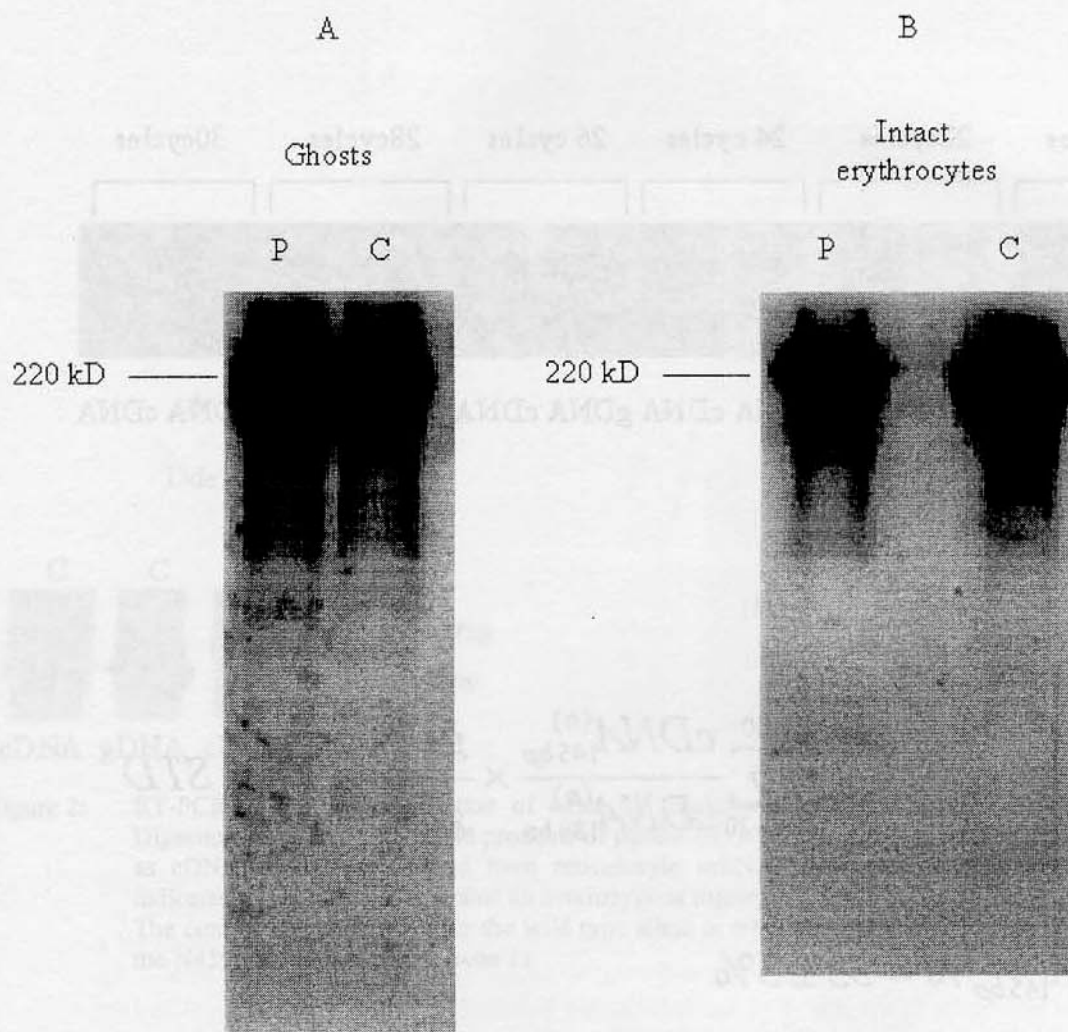


Figure 4: Immunocharacterization of β -spectrin in the membrane and in other cellular compartments. Left) Immunoblotting of total membrane proteins extracted from erythrocyte ghosts reveals immunological identity of the anti- β -spectrin antibodies with the normal 220kD β -spectrin in the patient (P) and in the control (C). No truncated proteins were detected. Right) Immunoblotting of the proteins extracted from intact erythrocytes reveals immunological identity of the anti- β -spectrin antibodies with the normal 220kD β -spectrin in the patient (P) and in the control (C), but again no truncated proteins were detected.

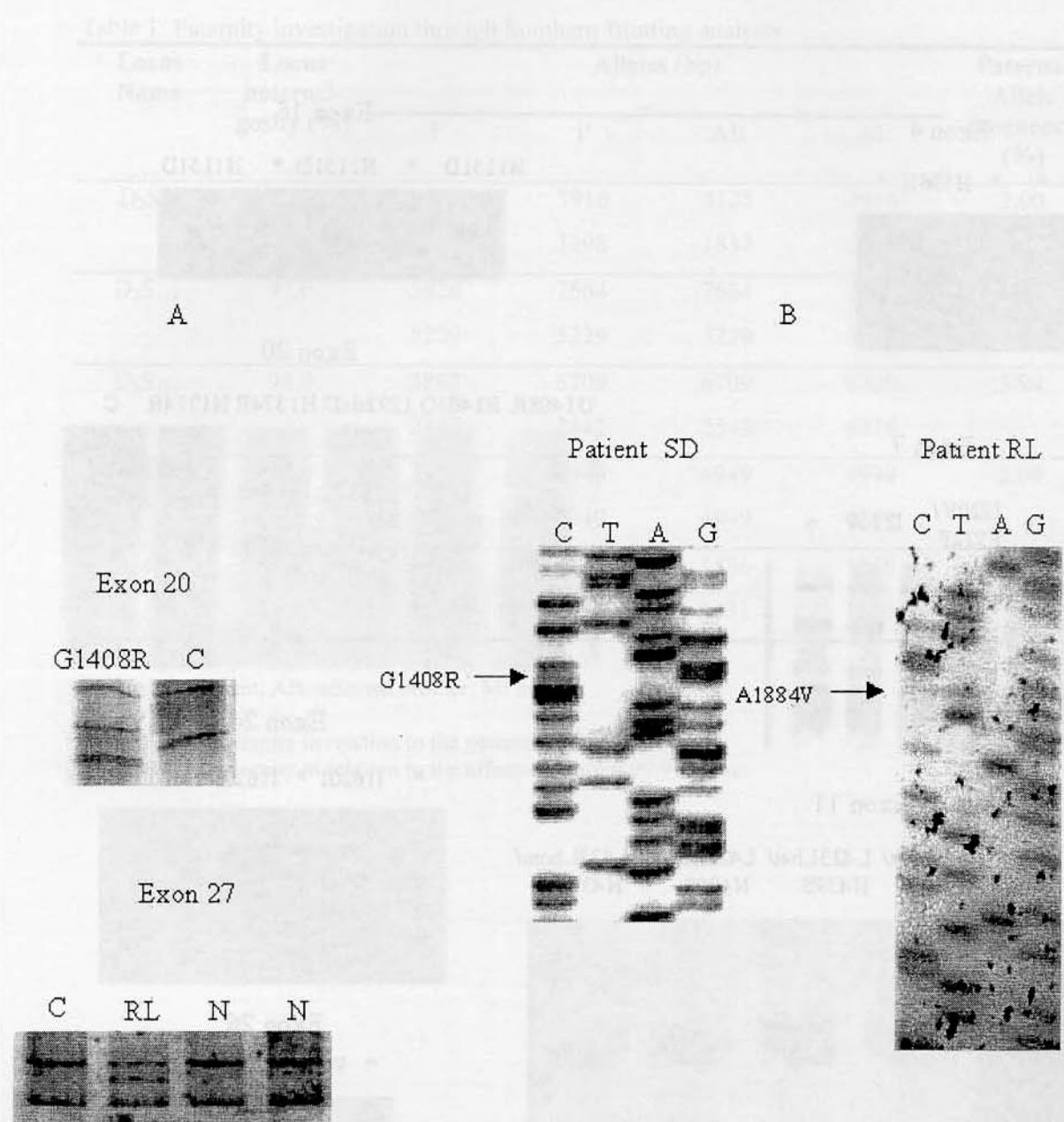


Figure 5: Molecular analysis of the β -spectrin gene missense mutations. A) Non-radioactive SSCP showing a band shift in the amplification product of exon 20 of patient SD (upper) and a band shift in the amplification product of exon 27 of patient RL (lower). (C): control. B) Direct sequencing of the PCR product of exon 20 of patient SD (left) and the PCR product of exon 27 of patient RL (right). The mutations are indicated by arrows.

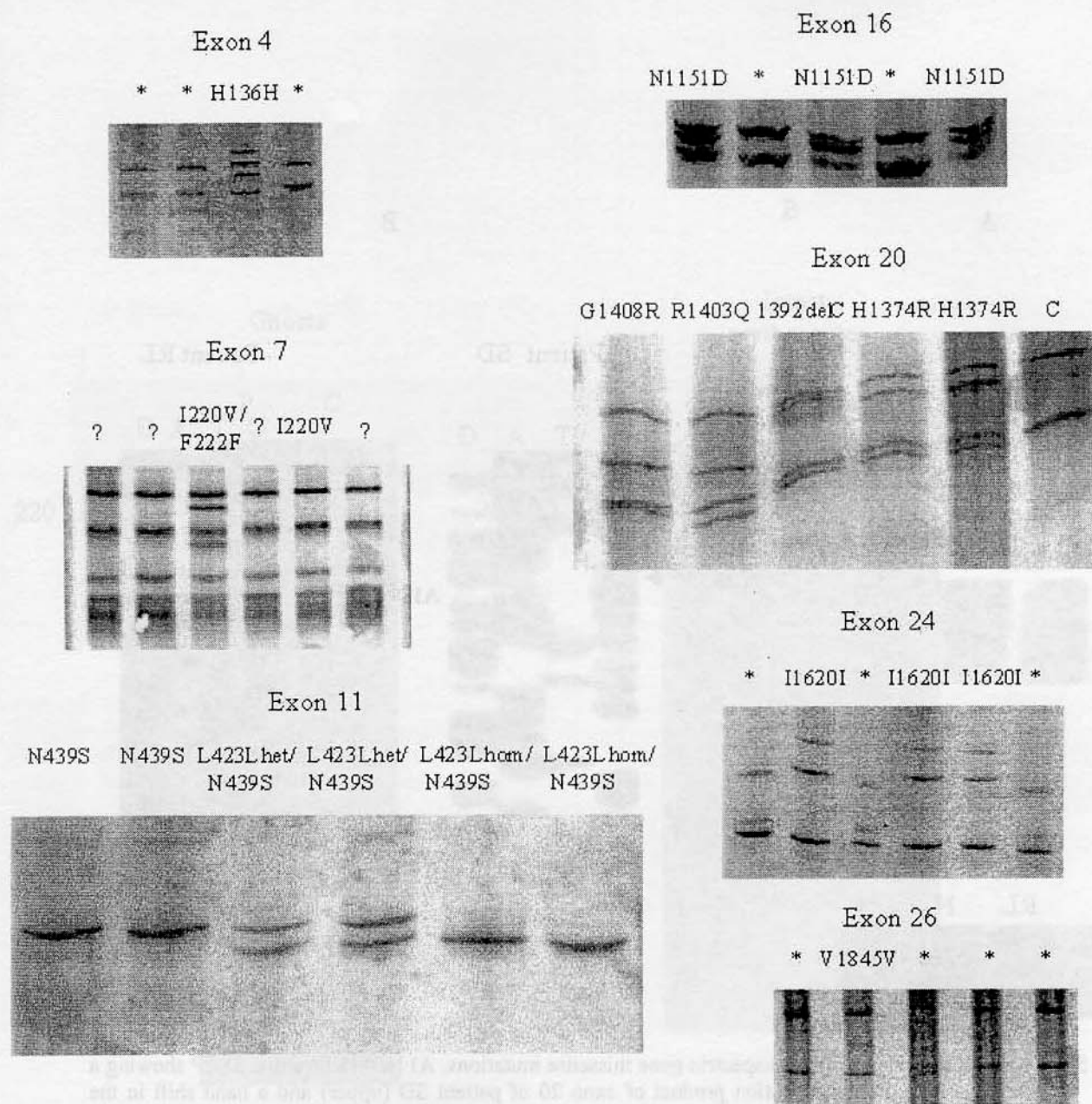


Figure 6: Detection of β -spectrin polymorphisms. Non-radioactive SSCP showing the abnormal electrophoretic migration patterns found in exons 4, 7, 11, 16, 20, 24 and 26. The electrophoretic patterns associated with specific molecular alterations are indicated. HS patients used as controls are indicated by asterisks. Interrogation marks were used when more than two molecular alterations were found in the same exon and it was not determined which mutation (if any) was present in the HS patient analyzed. (het) heterozygous mutation. (hom) homozygous mutation. (C) control.

Table 1: Paternity investigation through Southern Blotting analysis

Locus Name	Locus heterozygosity (%)	Alleles (bp)				Paternal Allele frequency (%)
		F	P	AB	M	
D ₂ S ₄₄	95.0	4125	3916	4125	3916	2.00
		3298	3298	1837	1837	
D ₄ S ₁₃₉	97.0	5926	7664	7664	7664	4.27
		5229	5229	5229	3986	
D ₅ S ₁₁₀	98.0	3882	6709	6709	6709	5.94
		2542	2542	2542	6975	
D ₁₀ S ₂₈	97.0	3425	4949	4949	4949	2.00
		4949	4949	4949	4639	
D ₁₇ S ₇₉	91.8	1431	1536	1536	1536	7.15
		1431	1431	1431	1536	

F: father; P: patient; AB: affected brother; M: mother

Probability of paternity in relation to the patient: 99.99933%

Probability of paternity in relation to the affected brother: 99.99988%

Table 2: β -spectrin gene polymorphisms or potential polymorphisms detected in this study:

Gene Region	Molecular Alteration	Functional Meaning	Prior description	Allele frequency in 41 unrelated HS patients (%)	References
exon 4	H136H	polymorphism	+	ND	8
exon 7	I220V	polymorphism?	+ (β -sp Oakland)	ND	8
exon 7	F222F	polymorphism	-	ND	present study
exon 11	L423L	polymorphism	+	68.29	11
exon 11	N439S	polymorphism	+	64.63	8
exon 16	N1151D	polymorphism	+	ND	8
exon 20	R1403Q	polymorphism?	-	14.63	present study
exon 20	G1408R	recessive HS mutation?	-	3.65	present study
exon 20	H1374R	polymorphism?	-	ND	present study
exon 24	I1620I	polymorphism	+	40.24	11
exon 26	V1845V	polymorphism	+	8.53	8
exon 27	A1884V	recessive HS mutation?	+ (β -sp Vay, β -sp São Paulo)	ND	9, 10

5.1.4 Trabalho 7

***In vitro* analysis of erythrocyte ankyrin promoter mutations associated with hereditary spherocytosis**

***IN VITRO* ANALYSIS OF ERYTHROCYTE ANKYRIN PROMOTER MUTATIONS ASSOCIATED
WITH HEREDITARY SPHEROCYTOSIS**

D.S. Bassères^{1,3}, C. Wong⁴, S.T.O. Saad^{1,2}, F.F. Costa^{1,2} and P.G. Gallagher⁴

¹Hemocentro, ²Depto. de Clínica Médica, and ³Depto. de Genética e Evolução - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil. Cep 13081-970; CP 6198.

⁴Department of Pediatrics, Yale University, New Haven, CT.

Correspondence

Sara T.O.Saad, M.D.

HEMOCENTRO-UNICAMP

Campinas, SP, Brazil.

CP6198

CEP 13081-970

e-mail address: sara@obelix.unicamp.br

Abstract:

Hereditary spherocytosis is a common inherited anemia characterized by the presence of spherocytic red cells and by a heterogeneous nature in terms of its clinical presentation, molecular basis and inheritance. Defects in several membrane protein genes have been involved in the pathogenesis of HS. Ankyrin mutations are considered the major cause of HS. Many ankyrin mutations have been reported, including mutations in the promoter region. Promoter mutations may alter specific consensus sites for DNA-binding proteins and, thus, affect the ability of regulatory factors to interact with DNA and alter the gene expression level. We have screened the ankyrin promoter region in 41 unrelated HS patients and detected a novel G→A substitution at position –153. This alteration was linked *in cis* to the –108 T→C mutation, frequently found associated with recessive HS. The –108/-153 allele showed a frequency of 2.4% in a Brazilian control population of 106 subjects.

The functional significance of all the promoter mutations reported to date was investigated by mobility shift assays and by the use of the luciferase reporter gene expression assay. Our results indicate that these mutations have no impact on the capacity of the promoter DNA to interact with regulatory factors or on the level of transcription of the gene, suggesting that these mutations consist, in fact, mere polymorphisms.

Introduction

Hereditary spherocytosis (HS) is a common inherited hemolytic anemia affecting all ethnic groups. This disorder is heterogeneous in terms of its clinical presentation, molecular basis and inheritance¹. The primary molecular defects of HS reside in proteins that link the red cell membrane skeleton to the plasma membrane, namely spectrin, ankyrin, band 3 and protein 4.2². Mutations in the ankyrin-1 gene have been reported as the major cause of HS^{3,4}.

Ankyrin belongs to a multigene family of linker/adaptor molecules that are widely expressed. The available data suggests that one of the major functions of these proteins is to localize integral membrane proteins to particular membrane domains, presumably by local interactions with cytoskeletal proteins¹.

Ank 1, the erythrocyte ankyrin attaches spectrin to the cytoplasmic domain of band 3 and is also expressed in endothelial cells, muscle and brain. It is a globular protein containing 1880 amino acids with three functional domains: the N-terminal 89kDa domain which binds to band 3, the central 62kDa spectrin-binding domain and the C-terminal 55kDa regulatory domain, which can modulate the affinity of spectrin and band 3 binding⁵.

The ankyrin-1 gene is subdivided in 42 exons with a 7Kb cDNA. The promoter that drives the expression of this gene in erythrocytes has been recently identified⁶. It is a Tataless promoter that is dependent on a GATA-1 and a CACCC binding site for its activity. GATA-1 is known to be erythroid-specific^{7,8} and seems to be crucial for the activity of this promoter. The finding of kindreds with HS and co-segregating neurologic or myopathic manifestations could be explained by the recent description of an alternative ankyrin-1 promoter, driving the expression of ankyrin-1 in brain, heart and skeletal muscle⁹.

Mutations in the ankyrin gene erythroid promoter region have been reported^{3,10}, associated with both dominant and recessive HS, although the impact of these mutations on the promoter activity has not been assessed. The -108T→C mutation, reported by Eber et al³ was found in 4 out of 7 families with recessive HS and might be of importance in HS. Since promoter mutations are potentially capable of affecting the interaction of regulatory factors with the promoter DNA, they might be an important cause of HS.

We have screened 41 unrelated Brazilian HS patients for mutations in the promoter region. A new mutation was detected at position -153, which appears to be in linkage disequilibrium with the apparently common -108³ promoter mutation and, therefore, could be of importance in recessive HS. Furthermore, the -108/-153 allele was assessed in the Brazilian population and seems to be common. We also report a few cases where the -108 mutation stands alone, indicating that it is evolutionarily more ancient than the -153 mutation. We have also performed *in vitro* expression studies of all promoter mutations described to date in order to determine their impact on the transcription level of the gene. Our results suggest that these mutations may have no functional significance, and, thus, represent mere polymorphisms.

Subjects and Methods:

Subjects. By PCR-SSCP and DNA sequencing we analysed the 5'-untranslated promoter region of the ankyrin-1 gene of 41 unrelated HS Brazilian patients seen at the University of Campinas and at the University of Santa Catarina. Patients with band 3 deficiency were excluded from this study. According to the severity index¹, 13 patients were classified as mild, 21 as moderate, 5 as moderately severe and 2 as severe. Dominant inheritance was clearly observed in 36 patients. Quantification of the red cell membrane proteins by densitometry of Coomassie blue stained polyacrylamide gels¹¹ showed deficiency of spectrin in 16 patients, combined deficiency of spectrin and ankyrin in 7 patients, isolated ankyrin deficiency in 2 patients and normal protein content in 16 patients. We also included in this study 106 unrelated normal controls and 33 amerindians.

PCR-SSCP analysis. Leukocyte gDNA was obtained with standard techniques using phenol-chloroform. The ankyrin gene promoter region was amplified in two fragments: one 260bp fragment extending from position -559 to -299 (fragment A) and one 338bp fragment extending from position -382 to -44 (fragment B) in relation to the translation start site. The primers utilized were:

5'- CAGGGCCGAAGCTTCCTCTAC-3' (A sense)

5'-CGGGGAGAGCTGAGTTCAGAG-3' (A antisense)

5'-GCGACTAAACCGGACTCCCTTTC-3' (B sense)

5'-AGGAGGAGCAGCTGGGGC-3' (B antisense)

The PCR conditions utilized for fragment A and B were 35 cycles of 94°C for 45sec, 60°C for 30sec and 72°C for 30sec and 35 cycles of 94°C for 45sec, 59°C for 45sec and 72°C for 45sec, respectively.

The amplified promoter fragments were submitted to non-radioactive SSCP in a PhastSystem apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden). 12.5% acrylamide gels were run for 300Vh at 340V. Each band shift obtained was reconfirmed with a second independent PCR product, before sequencing.

DNA Sequencing. The PCR products exhibiting an abnormal SSCP pattern were directly sequenced or cloned into pMOSblue vectors (Amersham, Cleveland, OH) for sequencing¹². Sequencing of the double-stranded amplified DNA was performed according to the Thermo Sequenase™ radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham, Cleveland, OH) and for the sequencing of the cloned products we used the Thermo Sequenase™ cycle sequencing kit (Amersham, Cleveland, OH)

DNA-protein complexes mobility shift assays. The following nucleotides spanning the mutated promoter regions were synthesized:

- 108 wildtype sense: 5'-CCCTCGGGGGCCTGGCCCGCACGT-3'
- 108 wildtype antisense: 5'-ACGTGCGGGCCAGGCCCCCGAGGG-3'
- 108 mutant sense: 5'-CCCTCGGGGGCCCGGCCCGCACGT-3'
- 108 mutant antisense: 5'-ACGTGCGGGCCGGGCCCCCGAGGG-3'
- 153 wildtype sense: 5'-GGAGCGCCCGGCCCGACAGCA-3'
- 153 wildtype antisense: 5'-TGCTGTCGGGCCGGGCGCTCC-3'
- 153 mutant sense: 5'-GGAGCGCCCGACCCGACAGCA-3'
- 153 mutant antisense: 5'-TGCTGTCGGGTCGGGCGCTCC-3'
- 72/73 wildtype sense: 5'-GCAGAGGCTGCGGTGAGTCCGCCAGCC-3'
- 72/73 wildtype antisense: 5'-GGCTGGCGGACTCACCGCAGCCTCTGC-3'
- 72/73 mutant sense: 5'-GCAGAGGCTGCGG--AGTCCGCCAGCC-3'
- 72/73 mutant antisense: 5'-GGCTGGCGGACT--CCGCAGCCTCTGC-3'
- 204 wildtype sense: 5'-TTGTAATCTGCGGTCCCCAGG-3'
- 204 wildtype antisense: 5'-CCTGGGGACCGCCAGATTACAA-3'
- 204 mutant sense: 5'-TTGTAATCTGGGGTCCCCAGG-3'
- 204 mutant antisense: 5'-CCTGGGGACCGCCAGATTACAA-3'

The following oligonucleotides containing transcription factors AP-2 and PEA-1 consensus sequences were also synthesized:

- AP2 control sense: 5'-GATCGAACTGACCGCCCCGCGGCCCGT-3'
- AP2 control antisense: 5'-ACGGGCCGCGGGCGGTCAGTTCGATC-3'
- PEA-1 control sense: 5'-GGATATTGCGGTTAGCA-3'

PEA-1 control antisense: 5'-TGCTAACCGCAAATATCC-3'

The primers were annealed in pairs to create double-stranded fragments. 10ug of each primer of a specific pair was incubated in 1X buffer M pH 7.5 (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTE “dithioerythriol”) at 65°C for 15min and then left at room temperature for 2h. The double-stranded fragments were then radioactively labeled with $\gamma^{32}\text{P}$ -CTP using the T₄-polynucleotide kinase enzyme (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) and applied to a G25 Quick Spin Column (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) in order to remove radioactive unincorporated nucleotides. In order to form DNA-protein complexes, the labeled fragments were incubated in binding buffer A (40mM Tris-HCl pH7.9, 100mM NaCl, 20% Glicerol, 0.2mM DTT) in the presence of K562 nuclear extracts and polyIdC (Gibco-BRL, Rockville, MD). Unlabeled double-stranded fragments were added to specific binding reactions as cold competitors. The nuclear extracts were prepared according to Dignam et al¹³. The binding reactions were run in 4% polyacrylamide gels for 1h at 290V. The gels were, then, dried and exposed overnight with Kodak-X-Omat autorradiographic films.

Luciferase reporter gene expression assays. Plasmids containing ankyrin promoter fragments linked to a luciferase reporter gene were prepared, transfected into K562 and HEL cells, and reporter gene expression was assayed. These ankyrin promoter plasmids included:

- (1) a wildtype ankyrin promoter fragment
- (2) an ankyrin promoter fragment with the -108T→C mutation
- (3) an ankyrin promoter fragment with -108T→C and -153G→A mutations
- (4) an ankyrin promoter fragment with the TG deletion at positions -72/73

The plasmid constructs were submitted to maxipreparation according to the Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA). 20ug of each construct plus 0.5ug of an internal control plasmid containing the β -galactosidase gene were cotransfected into K562 and HEL cells by electroporation in a Gene Pulser (Biorad, Hercules, CA). The transfected cells were grown, lysed and the supernatant used to measure the luciferase and β -galactosidase activities. The luciferase activity was measured in a Luminometer (Berthold) in the presence of the Luciferase Assay substrate (Promega, Madison, WI). The β -galactosidase activity was assessed through spectrophotometer readings at

570nm, after methabolization of the compound Chlorophenolred- β -galactopyranoside (CPRG – Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) by β -galactosidase. The activity results were corrected by the activity values obtained for a promoterless construct. Each plasmid construct, including the promoterless construct, was transfected in triplicate and the results represent the statistical mean of these three experiments.

Results and Discussion:

Detection and analysis of new mutations in the ankyrin gene promoter region. No migration alterations were detected in the promoter fragment A of the 41 HS patients after SSCP analysis. However, an identical electrophoretic migration pattern alteration in fragment B was detected in two unrelated HS patients (fig. 1A). Direct sequencing revealed the presence of a heterozygous G→A substitution at position –153 in the promoter region in both patients. They also carried the described –108 T→C promoter mutation, assumed to be frequent in recessive HS³ (fig. 1B). Indeed, one of these two patients also presented a second molecular alteration in the coding region, namely I1075T in exon 28 (data not shown). The clinical and hematological values of these patients is described in table 1. After cloning, the –153 and the –108 mutations were found to lie on the same chromosome (fig. 1C), thus having a *cis* association. This G→A substitution at position –153 resides between the Sp1 and GATA-1 binding sites⁶ (fig. 2). The fact that this alteration is localized in a region where no known transcription factors consensus sites are found, suggests that it is a mere polymorphism. However, it was always found to be linked *in cis* to –108 T→C mutation described by Eber et al³. The –108 mutation alters an AP-2 binding site^{6,14} (fig. 2) and could affect AP-2/DNA binding and, as such, have an impact on the expression of the gene. Indeed, it has been suggested that this mutation might be of importance in recessive HS³. Therefore, the –153 mutation could also be of importance in recessive HS, because of its linkage disequilibrium with the –108 mutation.

The –153/-108 allele was assessed in 106 individuals from a miscigenated Brazilian population and in 33 Amerindians (table 2). The allele was absent in the Indian population, which is consistent with the very limited genetic variability of this population¹⁵. Nevertheless, it was present in the Brazilian population. The frequency of the –153/-108 allele was 2.4% and the frequency of the –108 mutation alone was 1.4% in the Brazilian population. No individuals bearing the –153 mutation alone were detected. This indicates that the –153 mutation is evolutionarily more recent than the –108 mutation and that it probably arose in a –108 allele, through a single mutational event and apparently remains confined to it. The relatively high frequency of the –153 and the –108 mutations in the Brazilian population indicates that, if these mutations have a functional significance, it should only be evident in homozygosis or when associated with a second molecular

defect, which is consistent with the hypothesis that one of these alterations might be a recessive HS mutation.

Investigation of DNA-protein interactions. The DNA sequence containing the -153 G→A substitution does not contain consensus binding sequences for any known DNA binding proteins (fig. 2) and neither wildtype nor mutant -153 G→A oligonucleotides formed a complex with erythroid cell extracts (fig. 3). This suggests that the -153 promoter region does not interact with proteins *in vitro*. The DNA sequence containing the -108 T→C substitution contains a potential consensus sequence for an AP-2 binding site¹⁴ (fig. 2). In mobility shift assays, both wildtype and mutant oligonucleotides formed a DNA-protein complex (fig. 4, lanes 2; 7) that migrated at the same mobility as the consensus AP-2 oligonucleotide complex (lane 12). In competition assays, the mutant -108 oligonucleotide competed away both the corresponding wildtype ankyrin and consensus AP-2 complexes (fig. 4, lanes 4; 15), suggesting that this region binds, in fact, to the AP-2 transcription factor and that the binding of AP-2 to this region is not affected by the presence of the -108 T→C mutation.

The promoter mutations -72/73delTG and -204 C→G, described by Eber et al¹⁰, were also analyzed by mobility shift assays. The DNA sequence containing the -72/73 TG deletion does not contain consensus sequences for any known DNA-binding proteins (fig. 2). Both wildtype and mutant -72/73 TG deletion oligonucleotides formed a faint complex of unknown origin (fig. 5, lanes 2; 6), indicating that an unknown DNA-binding protein interacts with the ankyrin -72/73 promoter region *in vitro*. In competition assays, the mutant -72/73 oligonucleotide competed away the corresponding wildtype ankyrin oligonucleotide complex (fig. 5, lane 8) and, therefore, the binding of this unknown factor is not affected by the presence of the -72/73 TG deletion. The DNA sequence containing the -204 C→G substitution contains a potential consensus sequence for a PEA-1 binding site¹⁶ (fig. 2). In mobility shift assays, both wildtype and mutant oligonucleotides formed a complex (fig. 6, lanes 2; 7) that migrated at a slightly different mobility as the consensus PEA-1 oligonucleotide complex (lane 12). In competition assays, the PEA-1 consensus oligonucleotide was unable to compete away both the wildtype and mutant complexes (fig. 6, lanes 5; 10). These facts suggest that the -204 ankyrin promoter region does not bind the PEA-1 transcription factor *in vitro*.

Nevertheless, it interacts with an unknown DNA-binding protein and this interaction is not affected by the presence of the -204 C→G mutation. Finally, the PEA-1 complex is competed away by the -204 wildtype oligonucleotide, but not by the -204 mutant oligonucleotide (fig. 6, lanes 14; 15), indicating that the -204 wildtype oligonucleotide is capable of binding PEA-1, whereas the mutant oligonucleotide is not. The complex of unknown origin formed with the wildtype and mutant oligos (fig. 6, lanes 2; 7) might constitute an artifact and, *in vivo*, this region might bind PEA-1. If that is true, the fact that the -204 mutant oligonucleotide cannot bind PEA-1 becomes significant.

Ankyrin expression analysis. None of the mutant constructions analyzed (see methods) reduced significantly the luciferase expression level when compared to the control promoter in HEL cells, as well as in K562 cells (figs. 7 and 8), suggesting that the ankyrin promoter mutations do not have functional consequences and constitute, therefore, polymorphisms. The -204 C→G promoter mutation was not included in this analysis and should also be investigated in order to confirm its functional role.

Finally, *in vivo* studies should be performed in order to confirm the *in vitro* results obtained in this study, since what happens *in vitro* might not always mimic what happens *in vivo*.

Acknowledgements:

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

References:

1. Lux SE, Palek J: Disorders of Red Cell Membrane. In *Blood: Principles and Practice of Hematology* (eds Handlin RI, Lux SE, Stossel TP) pp17021-1818. JBLippincott, Philadelphia, 1995
2. Tse WT, Lux SE: Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* 104: 2-13, 1999
3. Eber SW, Gonzalez JM, Lux ML, Scarpa AL, Tse WT, Dornwell M, Herbers J, Kugler W, Ozcan R, Pekrun A, Gallagher PG, Schroter W, Forget BG, Lux SE: Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat Genet* 13: 214-218, 1996
4. Lanciotti M, Perutelli P, Valetto A, Ditino D, Mori PG: Ankyrin deficiency is the most common defect in dominant and non dominant hereditary spherocytosis. *Haematologica* 82: 460-462, 1997
5. Gallagher PG, Forget BG, Lux SE: Disorders of the erythrocyte membrane. In: *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood* (ed. by DG Nathan and SH Orkin), 5th edn, Vol 1, pp544-664. Saunders, Philadelphia, 1998
6. Gallagher PG, Sabatino DE, Garrett LJ, Bodine DM, Forget BG: Expression of the human ankyrin 1 (Ank1) gene in vitro and in vivo is mediated by a promoter that requires GATA-1 and CACCC-binding proteins for its activity. *Blood* 92 (suppl1): 7a, 1998
7. Plumb M, Frampton J, Wainwright H, Walker M, Macleod K, Goodwin G, Harrison P: GATAAG: a cis-control region binding an erythroid-specific nuclear factor with a role in globin and non-globin gene expression. *Nucleic Acids Res* 17: 73-92, 1989
8. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH: Cloning of cDNA of the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339: 446-451, 1989
9. Gallagher PG, Wong E, Wong C: A novel isoform of ankyrin 1 expressed in brain, heart and skeletal muscle is directed by a alternative promoter. *Blood* 92 (suppl1): 300a, 1998
10. Eber SW, Lux ML, Gonzalez JM, Scarpa A, Tse WT, Gallagher PG, Pekrun A, Forget BG, Lux SE: Discovery of 8 ankyrin mutations in hereditary spherocytosis (HS) indicates that ankyrin defects are a major cause of dominant and recessive HS. *Blood* 82 (suppl1): 308a, 1993
11. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH: Electrophoretic analysis of the human erythrocyte membrane. *Biochem* 10: 2606-2614, 1971
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977
13. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11: 1475-1489, 1983
14. Williams TJ, Admon A, Luscher B, Tijan R: Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev* 2: 1557-1569, 1988
15. Black FL, Salzano FM, Layrisse Z, Franco MHLP, Harris NS, Weimer TA: Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in the Parakanã indians of Brazil. *Am J Phys Anthropol* 52: 119-132, 1981
16. Martin ME, Piette J, Yaniv M, Tang WJ, Folk WR: Activation of the polyoma virus enhancer by a murine activator protein 1 (AP-1) homolog and two contiguous proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5839-5843, 1988

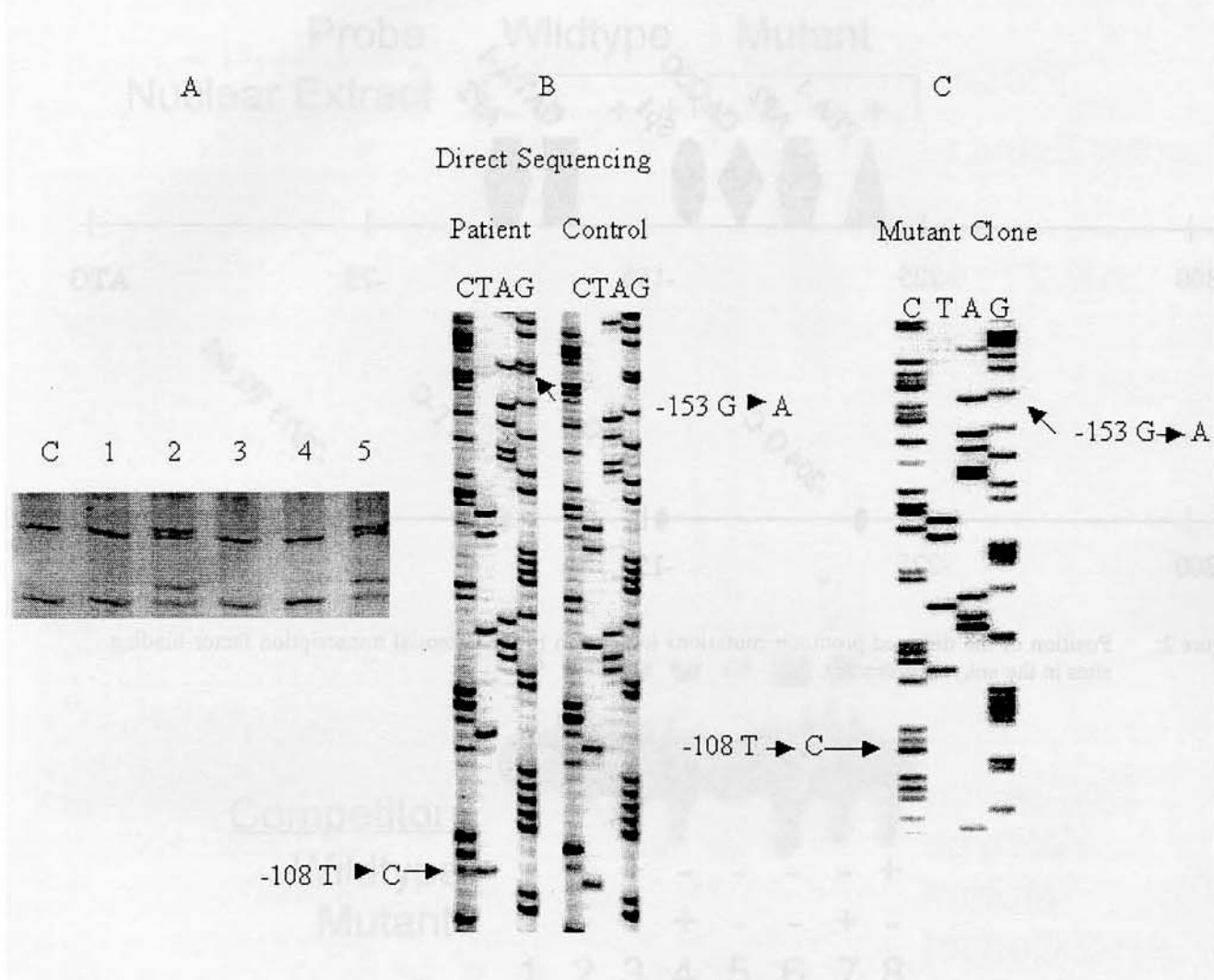


Figure 1: Non-radioactive SSCP, showing an identical band shift in patients 1 (lane 2) and 2 (lane 5). (C): control. (lanes 1, 3 and 4): other unrelated HS patients. B) Direct sequencing of PCR products showing the presence of two heterozygous mutations in patient 1: -108 T→C and -153 G→A. The same molecular alterations were found in patient 2. C) Sequencing of a mutant clone originated from patient 1, showing that both mutations are linked *in cis*. The mutations were also linked *in cis* in patient 2.

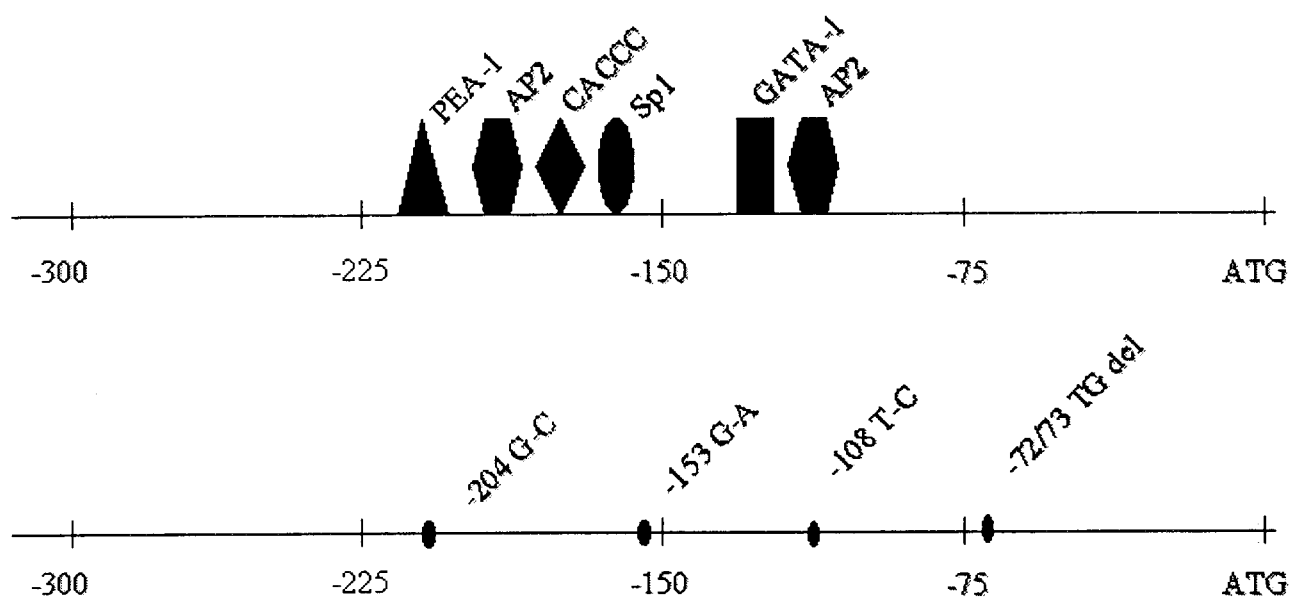


Figure 2: Position of the detected promoter mutations in relation to the potential transcription factor-binding sites in the ankyrin promoter.

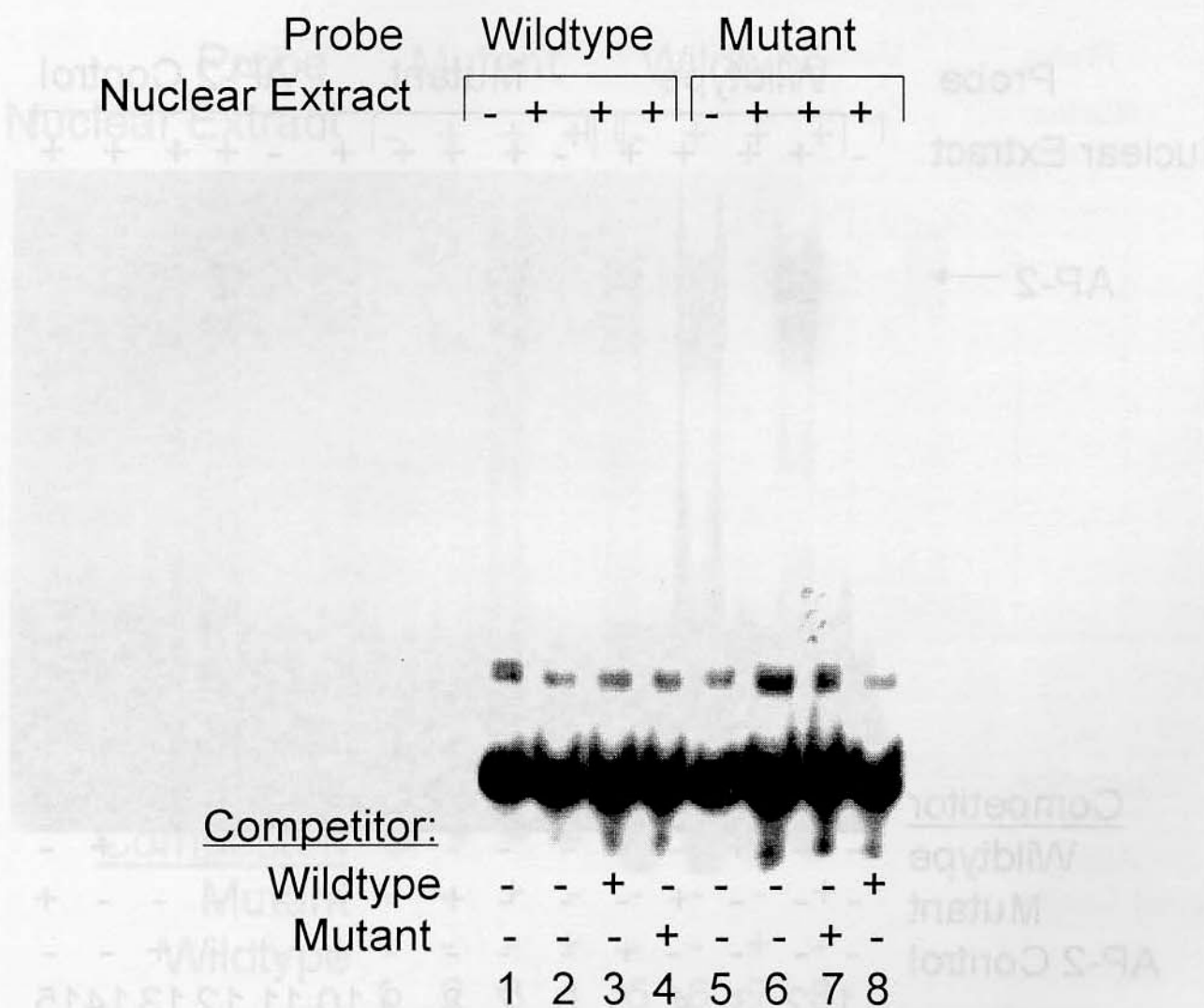


Figure 3: Electrophoretic mobility shift analysis of the binding of nuclear factors to the promoter region containing the -153 G→A mutation. The double-stranded fragments (probes) utilized are indicated at the top of the figure. They are specifically described in methods. The presence or absence of nuclear extracts in a determined lane is also indicated at the top of the figure. The presence or absence of cold competitors in a specific lane is indicated at the bottom.

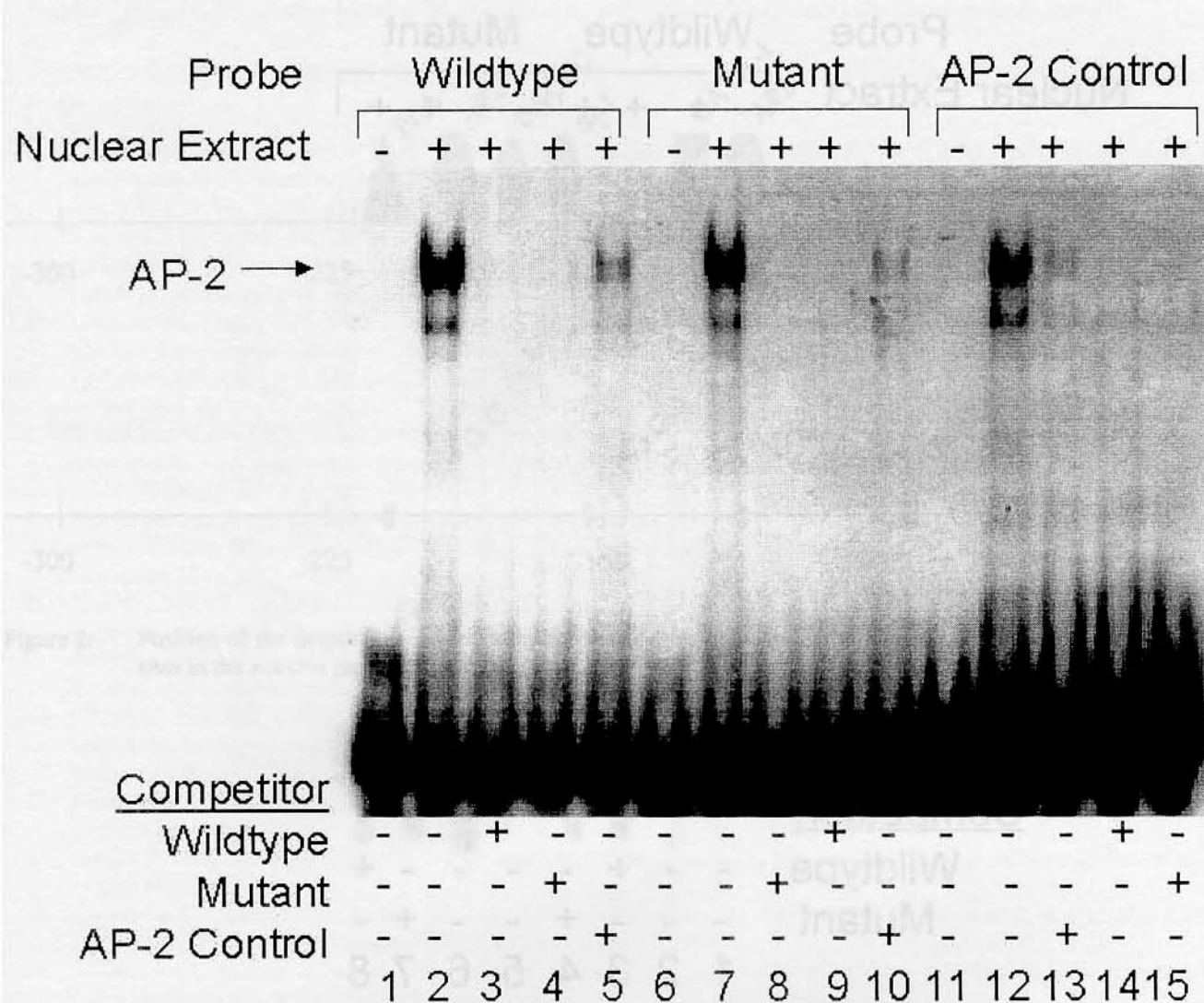


Figure 4: Electrophoretic mobility shift analysis of the binding of AP-2 to the promoter region containing the -108 T→C mutation. The AP-2/DNA complex is indicated by an arrow. The double-stranded fragments (probes) utilized are indicated at the top of the figure. They are specifically described in methods. The presence or absence of nuclear extracts in a determined lane is also indicated at the top of the figure. The presence or absence of cold competitors in a specific lane is indicated at the bottom.

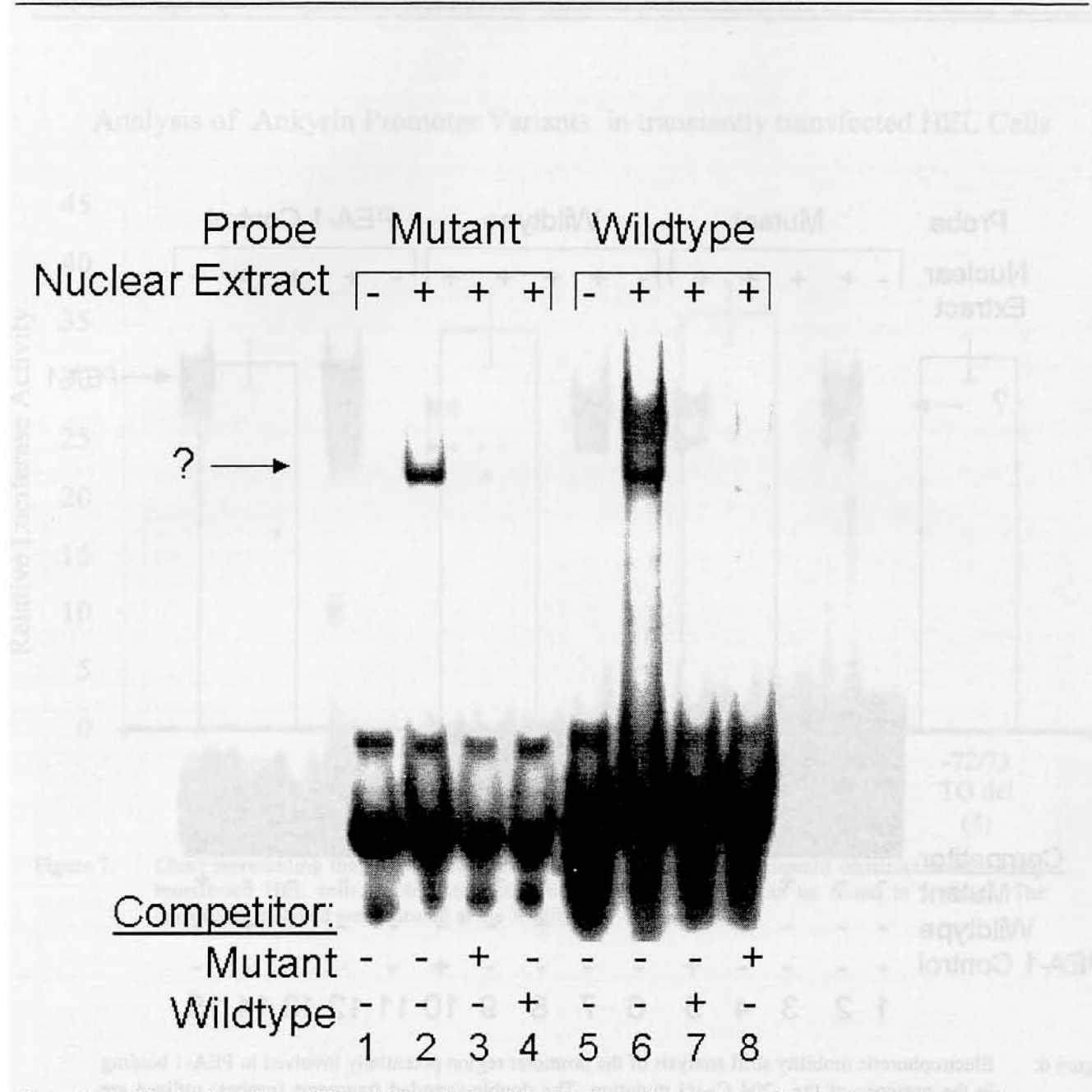


Figure 5: Electrophoretic mobility shift analysis of the binding of nuclear proteins to the promoter region containing the -72/73 TG deletion. The double-stranded fragments (probes) utilized are indicated at the top of the figure. They are specifically described in methods. The DNA-protein complex formed in the presence of the wildtype and mutant probes is indicated by an arrow and an interrogation mark, since the protein involved in the formation of this complex is unknown. The presence or absence of nuclear extracts in a determined lane is also indicated at the top of the figure. The presence or absence of cold competitors in a specific lane is indicated at the bottom.

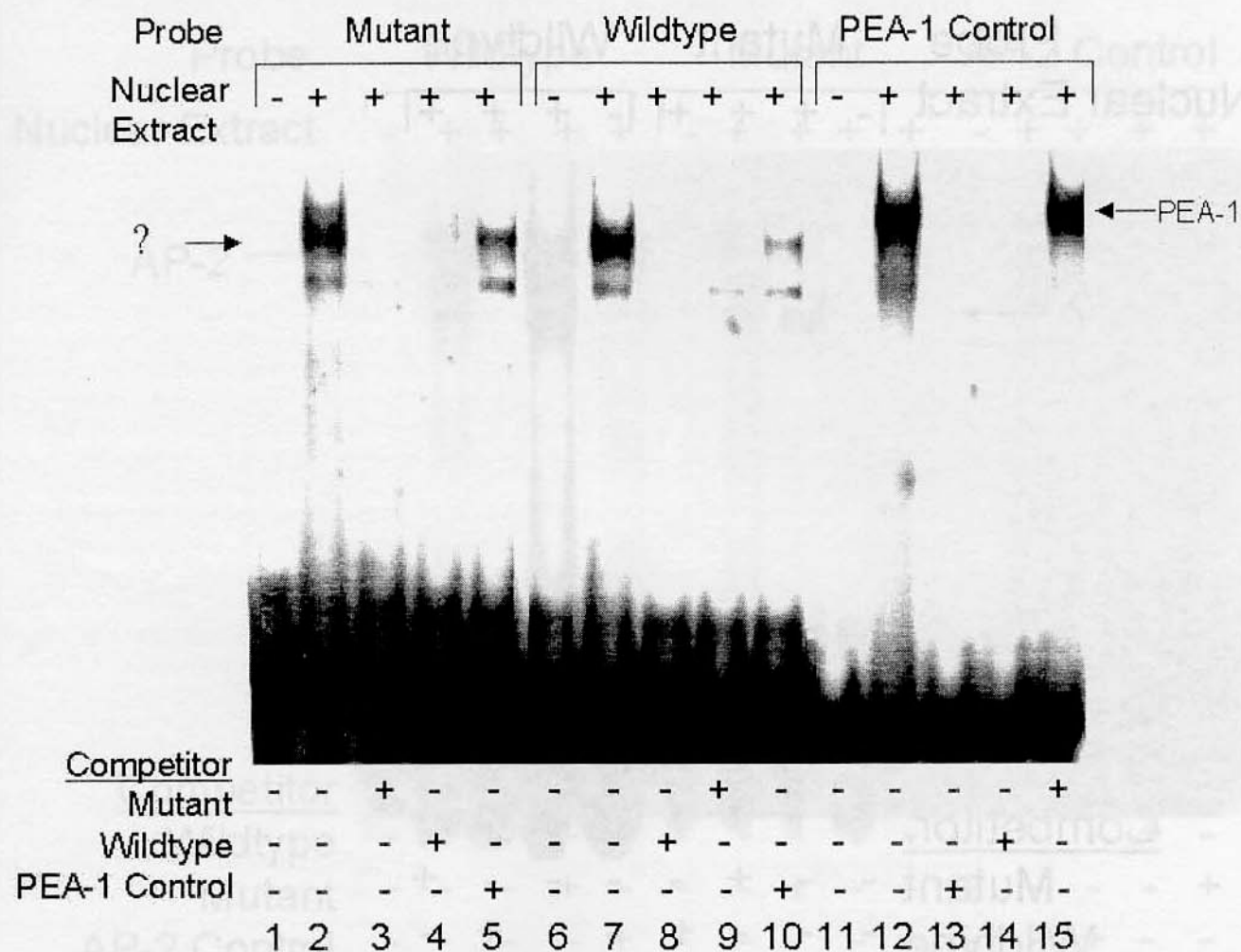


Figure 6: Electrophoretic mobility shift analysis of the promoter region potentially involved in PEA-1 binding in the presence of the -204 C→G mutation. The double-stranded fragments (probes) utilized are indicated at the top of the figure. They are specifically described in methods. The PEA-1/DNA complex is indicated by an arrow. The DNA-protein complex formed in the presence of the wildtype and mutant probes is indicated by an arrow and an interrogation mark, since the protein involved in the formation of this complex is unknown. The presence or absence of nuclear extracts in a determined lane is also indicated at the top of the figure. The presence or absence of cold competitors in a specific lane is indicated at the bottom.

Analysis of Ankyrin Promoter Variants in transiently transfected HEL Cells

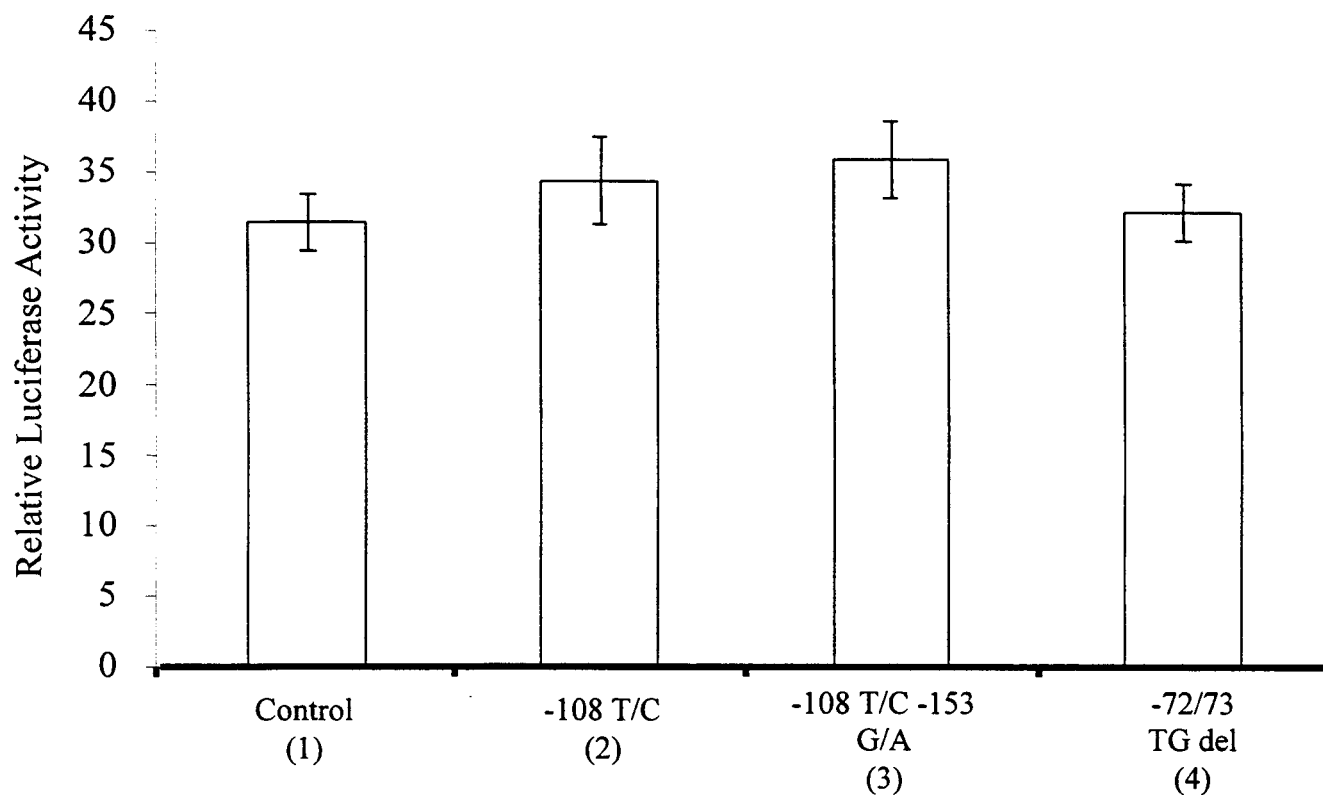


Figure 7: Chart representing the relative luciferase activity according to the plasmid construct in transiently transfected HEL cells. A detailed description of the constructs can be found in methods. The constructs analyzed are indicated at the X axis.

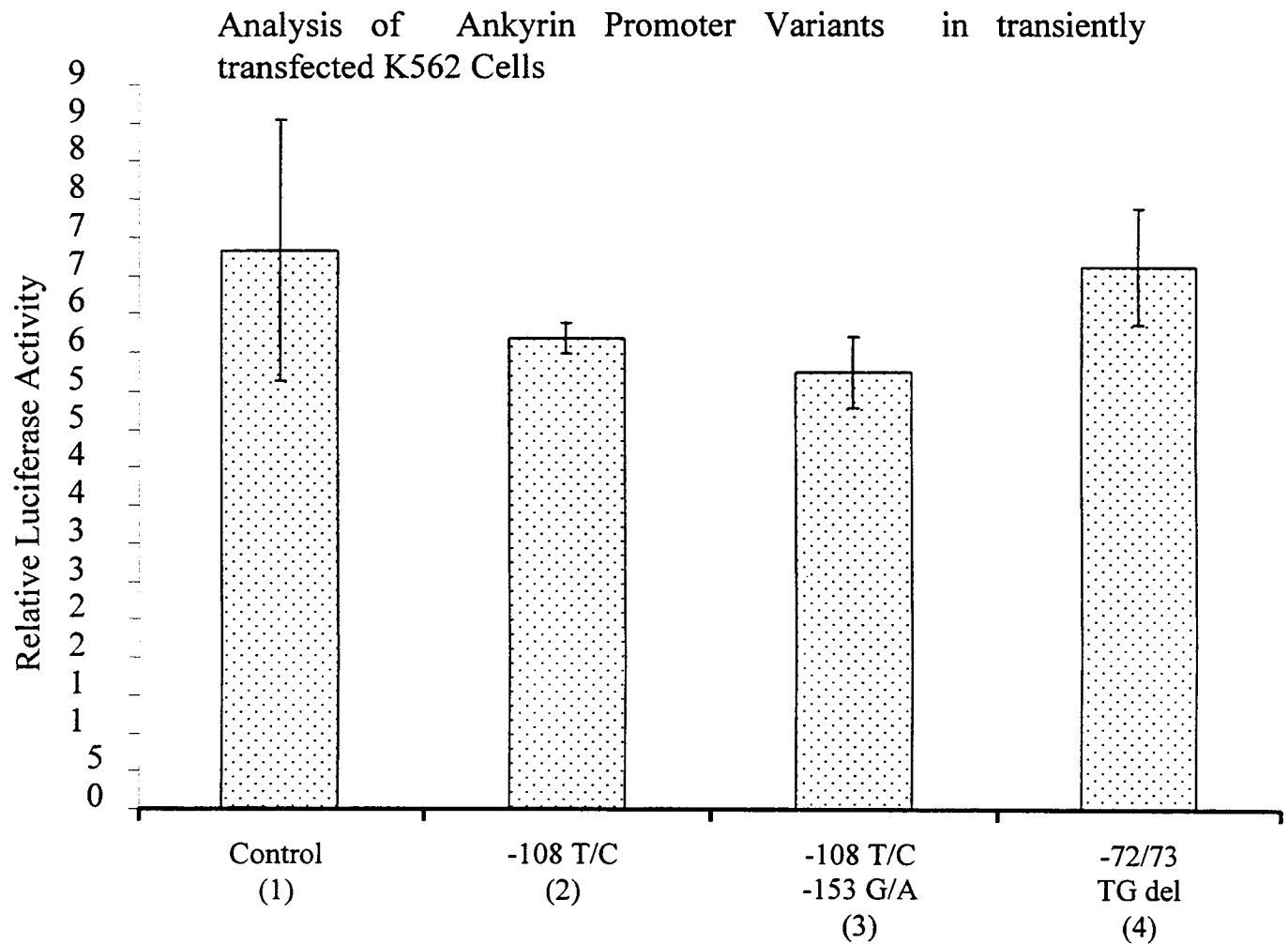


Figure 8: Chart representing the relative luciferase activity according to the plasmid construct in transiently transfected K562 cells. A detailed description of the constructs can be found in methods. The constructs analyzed are indicated at the bottom of the X axis.

Table 1: Clinical and hematological values of the patients presenting the -108 C→T and -153 G→A ankyrin promoter mutations:

Patient	Age (years)	Sex	Hb (g/dl)	Retic. Count (%)	MCV (fl)	MCHC (%)	Sp (%)	Ank (%)	Splenectomy	IOF
Patient 1 ^a	15	F	7.5	8.7	75	39	75	80	+	+
Patient 2 ^b	49	M	10.5	11.8	84	36	58	53	+	+

Hb: hemoglobin; MVC: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; Sp: spectrin content in relation to band 3 content; Ank: ankyrin content in relation to band 3 content; IOF: increased osmotic fragility; a: values measured before splenectomy; b: values of protein biochemistry measured before splenectomy

Table 2: Frequency of the ankyrin promoter mutations -153 G→A and -108 T→C in a Brazilian and an Amerindian population:

	Total number of alleles	Normal alleles	-108/-153 allele	-108 allele
Amerindians	66	66	0	0
Frequency (%)	100	100	0	0
Brazilians	212	204	5	3
Frequency (%)	100	96.2	2.4	1.4

5.1.5 Discussão geral dos trabalhos 5, 6 e 7

No presente estudo, três mutações novas no gene da β -espectrina foram detectadas. Com relação à família do trabalho 5, foi detectada a presença de uma mutação no códon de início de tradução ATG→GTG. Este é o primeiro relato de uma mutação no códon de início de tradução em um caso de EsH. Entretanto, este tipo de mutação já foi descrita para outros genes, incluindo o gene da proteína 4.1 (seção 1.2.2; pag.31) e β -globina (BAYSAL & CARVER, 1995). Em ambos os casos, este tipo de mutação leva a uma expressão nula do alelo mutante, sugerindo que códons alternativos ao ATG não são funcionais como códons de iniciação. Desta forma, a mutação aqui descrita torna, provavelmente, a tradução deficiente ou nula, levando a uma deficiência de beta-espectrina e, conseqüentemente, a EsH.

O intrigante neste caso é que a redução na quantidade de espectrina é de apenas 18%, o que pode ser explicado por três alternativas: a) a tradução a partir do alelo mutante não é inteiramente abolida; b) existe uma alteração na regulação da expressão gênica para favorecer a transcrição a partir do alelo normal; c) o alelo normal da beta-espectrina seria capaz de contribuir com mais da metade das cadeias de beta-espectrina, que vão, de fato, se incorporar à membrana eritrocitária. Esta última hipótese pode ser explicada pelo fato de que as proteínas do citoesqueleto são sintetizadas em excesso durante a eritropoese, sendo que apenas uma fração destas proteínas é incorporada à membrana (GALLAGHER *et al*, 1998a).

Com relação às famílias das pacientes SD e RS (trabalho 6), duas novas mutações, que resultam em alteração do quadro de leitura, foram detectadas: uma deleção de uma citosina no códon 638 (beta-espectrina S^{la} Bárbara), levando à terminação prematura da cadeia polipeptídica após a adição de 31 aminoácidos, e uma deleção de uma citosina no códon 1392 (beta-espectrina São Paulo II), com terminação prematura após a adição de 19 aminoácidos.

Devido à terminação prematura da cadeia polipeptídica na altura dos éxons 14 e 20, tanto a beta-espectrina S^{la} Bárbara como a beta-espectrina São Paulo II perdem a repetição β 15, que é codificada por grande parte do éxon 26 e por um pedaço do éxon 27. Esta repetição representa o sítio de ligação à anquirina (KENNEDY *et al*, 1991; fig. 5 – CAPÍTULO 1), que é responsável pela incorporação da beta-espectrina ao citoesqueleto durante a eritropoese (SPEICHER *et al*, 1992). A

perda da repetição $\beta 15$ leva, assim, a um quadro de deficiência de espectrina similar ao observado no caso da beta-espectrina Promissão. Além disso, mutações que alteram o quadro de leitura da beta-espectrina estão freqüentemente associadas a uma instabilidade do mRNA, refletida pela perda de heterozigosidade ao nível do cDNA (HASSOUN *et al*, 1997; DHERMY *et al*, 1998a; MIRAGLIA DEL GIUDICE *et al*, 1998). Portanto uma outra possibilidade é de que a deficiência proteica seja consequência da degradação do mRNA mutante no citoplasma.

Realmente, através da investigação da perda de heterozigosidade ao nível do cDNA, observamos que o alelo mutante não é expresso ao nível do mRNA na paciente RS e está, provavelmente, bastante reduzido no caso da paciente SD (figs. 2 e 3 – trabalho 6). O fato de nenhuma β -espectrina truncada ter sido detectada na membrana ou no citoplasma nestes casos (fig. 4 – trabalho 6), apóia a evidência de que o alelo mutante não é expresso, levando à deficiência de espectrina. Da mesma forma que no caso da beta-espectrina Promissão, a redução no conteúdo de espectrina nestas pacientes foi de apenas 20% e 11%, respectivamente, o que também pode ser explicado por uma super-expressão do alelo normal ou por uma possível contribuição assimétrica do alelo normal, devido a um excesso de síntese das cadeias de beta-espectrina.

A ausência da deleção da citosina no códon 638 nos pais biológicos da paciente SD e seu irmão afetado, sugere que esta mutação ocorreu durante a diferenciação e proliferação das células germinativas de um dos dois progenitores. Como os progenitores também têm filhos normais (que não tem a mutação), conclui-se, que o progenitor afetado também apresenta células germinativas normais, e por isso a mutação deve apresentar um padrão de mosaico. Existe uma maior probabilidade de que o progenitor afetado neste caso seja a mãe, já que o alelo com expressão reduzida observado na paciente foi herdado da mãe.

A triagem de mutações no gene da beta-espectrina também revelou oito polimorfismos já descritos na literatura e quatro polimorfismos novos (tabela 2 – trabalho 6). A identificação de novos polimorfismos é útil para estudos de ligação e herança de defeitos ainda desconhecidos e serve para a construção de um haplótipo mais completo no sentido de se estudar a origem comum de alelos, quando se trata de mutações recorrentes. Além disso, os polimorfismos são extremamente úteis na determinação da estabilidade do mRNA proveniente de um alelo específico de um gene.

Os polimorfismos detectados neste estudo estão presentes nos éxons 4, 7, 11, 16, 20, 24, 26 e 27 (figs. 5 e 6 e tabela 2 – trabalho 6).

A alteração N1151D no éxon 16 e a alteração H136H no éxon 4 (fig. 6 e tabela 2 – trabalho 6) já foram descritas anteriormente (HASSOUN *et al*, 1997) e, aparentemente, não tem nenhum impacto sobre a expressão da EsH.

O polimorfismo I220V (beta-espectrina Oakland) foi descrito por HASSOUN *et al* (1997) como sendo uma mutação missense que poderia ter consequências funcionais e resultar na EsH. A razão desta alteração ter sido considerada uma provável desencadeadora da EsH no trabalho em questão, foi o fato dela não ter sido detectada em 222 amostras testadas. Em contrapartida, nossos estudos sugerem que esta alteração seja na verdade um polimorfismo, sem consequências funcionais. Além disto, este polimorfismo é, ao contrário do observado nos Estados Unidos, freqüente no Brasil, uma vez que os 13 pacientes analisados eram heterozigotos para esta mutação.

Os dois polimorfismos encontrados no éxon 11 (fig. 6 e tabela 2 – trabalho 6) já eram conhecidos (HASSOUN *et al*, 1997; DHERMY *et al*, 1998a). O polimorfismo L423L esteve presente em 16 pacientes em heterozigose e em 20 em homozigose, com uma freqüência alélica de 68,3%. O polimorfismo N439S esteve presente em 23 pacientes em heterozigose e em 15 em homozigose, com uma freqüência alélica de 64,6%.

As duas alterações encontradas no éxon 20 não haviam sido descritas anteriormente. No sentido de tentar elucidar o significado funcional destas alterações, foi realizada uma triagem de duas destas mutações através do uso de enzimas de restrição em 41 pacientes portadores da EsH. A alteração R1403Q apresentou uma freqüência de 14,6% (tabela 2 – trabalho 6) e deve se tratar, portanto, de um polimorfismo. Não podemos, entretanto, descartar a hipótese desta alteração constituir uma mutação freqüente, já que até o presente momento nenhum dos indivíduos portadores desta alteração tiveram seu defeito molecular caracterizado. Um estudo desta mutação em uma população controle pode ser um bom indicativo do seu significado funcional. A mutação G1408R apresenta uma freqüência bem menor (3,6%) (tabela 2 – trabalho 6), o que é esperado, uma vez que transversões são mais raras do que transições.

Nós também determinamos a freqüência dos polimorfismos presentes nos éxons 24 e 26 nos 41 pacientes portadores de EsH. A alteração I1620I (éxon 24) mostrou ser bastante freqüente nos nossos pacientes (40,2%) (tabela 2 – trabalho 6). O polimorfismo do éxon 26 (V1845V) apresentou uma freqüência de 8,5%, que é condizente com a freqüência de 7,5% descrita por HASSOUN *et al* (1997).

Em um paciente com EsH eliptocítica recessiva, detectou-se a mutação A1884V no éxon 27, que foi denominada beta-espectrina São Paulo (BASSÈRES *et al*, 1997b). O defeito também estava presente na mãe do paciente. Esta alteração foi descrita recentemente por GARBARZ *et al* (1998) em dois indivíduos com EsH. Ela foi considerada um polimorfismo, uma vez que ela não levava à perda de estabilidade do mRNA, sendo denominada β -espectrina Vay (GARBARZ *et al*, 1998). No nosso estudo, esta variante não foi encontrada em 27 controles de mesma origem étnica do paciente estudado. Além disso, o fato desta alteração molecular não estar associada a uma perda de estabilidade do mRNA, não significa que ela não possa ter um impacto funcional sobre a estrutura da proteína e a sua capacidade de interagir com a anquirina ou alfa-espectrina. O paciente portador deste defeito no nosso estudo apresentava, além de esferócitos, eliptócitos no esfregaço do sangue periférico, o que é condizente com a presença de alterações moleculares mais próximas da região 3' do gene, próximo ao sítio de auto-associação da espectrina. Portanto, não se pode descartar a hipótese de que a beta-espectrina São Paulo constitua uma mutação esferocitogênica recessiva. Infelizmente, a segunda alteração molecular potencialmente responsável pela EsH neste caso não foi detectada.

Com relação à investigação da presença de alterações moleculares na região promotora do gene da anquirina, foram detectadas duas alterações moleculares em dois pacientes portadores de EsH: uma alteração T→C na posição -108 e uma alteração G→A na posição -153. Além disso, em outros estudos, duas outras alterações moleculares foram detectadas neste promotor: a troca C→G na posição -204 e a deleção de um dinucleotídeo TG na posição -72/73 (tabela 2 – apêndice B). Como pode ser observado na fig. 2 (trabalho 7), todas as alterações descritas foram encontradas em uma região do promotor, que compreende os principais sítios de ligação a fatores de transcrição e que está próxima do códon de início de tradução e poderiam, portanto, levar a uma diminuição da expressão da anquirina e, conseqüentemente, à EsH. Portanto, é importante analisar o impacto funcional de todas estas alterações sobre a atividade do promotor.

A triagem da mutação -108 T→C revelou a presença desta alteração em 3,8% de uma população controle normal (tabela 2 – trabalho 7). Entretanto, o fato desta mutação estar presente em indivíduos normais em heterozigose não descarta a possibilidade de que esta mutação constitua um defeito recessivo. Realmente, em dois pacientes portadores desta alteração, descritos por EBER *et al* (1996), foram detectados outros defeitos moleculares na região codificadora do gene da

anquirina. O mesmo é verdadeiro para o paciente 2 (tabela 1 - trabalho 7), que apresenta a alteração I1075T no éxon 28 do gene da anquirina.

Estudos de mobilidade de complexos DNA-proteína em gel de poliacrilamida, utilizando sondas contendo esta mutação, sugerem que a presença da mutação não altera significativamente a ligação *in vitro* do promotor com o fator de transcrição AP-2 (fig. 4 – trabalho 7). Além disso, a análise da expressão, através do uso do gene repórter da luciferase, demonstrou que esta mutação não provocou modificação significativa nos níveis de expressão, quando comparada com o promotor selvagem (figs. 7 e 8 – trabalho 7).

A mutação -153G→A não está diretamente envolvida com nenhum sítio de ligação a fatores de transcrição conhecido, ficando entre os sítios de ligação a Sp1 e GATA-1 (fig. 2 - trabalho 7). Esta posição provavelmente não deve afetar a ligação destas duas proteínas ao promotor, já que seus sítios de ligação permanecem inalterados. Entretanto, seria possível que este defeito (-153G→A) estivesse localizado sobre um sítio de ligação a uma proteína regulatória desconhecida. Nossos resultados, entretanto, mostram que este não é o caso, pois, através da técnica de análise da migração de complexos DNA-proteína em gel de poliacrilamida, nenhum complexo DNA-proteína foi detectado, após a adição de extrato nuclear, tanto com a sonda selvagem quanto com a sonda mutante (fig. 3, canaletas 2 e 6 – trabalho 7). Além disso, a análise de expressão do gene repórter da luciferase revelou que plasmídeos, cujo inserto continha esta mutação (plasmídeo -108/-153), não apresentavam uma diferença significativa de expressão em relação ao controle (figs. 7 e 8 – trabalho 7).

A deleção de um dinucleotídeo TG nas posições -72/73 (tabela 2 – apêndice B) também não ocorre dentro de nenhum sítio de ligação a fatores de transcrição conhecidos (fig. 2 - trabalho 7). A fig. 5 (trabalho 7) mostra a formação de um complexo DNA-proteína idêntico com as sondas selvagem e mutante, quando adicionado o extrato nuclear (canaletas 2 e 6). Este complexo desaparece na presença de ambas as sondas selvagem e mutante não marcadas radioativamente (canaletas 3, 4, 7 e 8), indicando que a proteína envolvida na formação do complexo está sendo seqüestrada tanto pela sonda mutante como pela selvagem. Portanto, esta deleção não altera significativamente a ligação do promotor com esta proteína *in vitro*. É possível que este complexo seja um artefato inespecífico devido à adição de excesso de extrato nuclear, e que, *in vivo*, nenhuma proteína se ligue de fato a esta região. Com relação a análise de expressão, esta mutação também

não alterou significativamente os níveis de luciferase quando comparada com o promotor controle (figs. 7 e 8 – trabalho 7).

Estes resultados indicam que as alterações $-108\text{T}\rightarrow\text{C}$, $-153\text{G}\rightarrow\text{A}$ e $-72/73$ del TG podem se tratar de polimorfismos ou de mutações inócuas. Entretanto, estudos *in vivo* serão extremamente importantes para uma conclusão definitiva. De fato, resultados preliminares em animais transgênicos, utilizando o promotor da anquirina eritróide humana com as mutações $-108\text{T}\rightarrow\text{C}$ e $-153\text{G}\rightarrow\text{A}$ ligadas *in cis* para dirigir a expressão do gene da gama-globina, demonstraram uma redução de expressão deste gene em relação ao controle com promotor intacto (GALLAGHER, 1999).

Finalmente, a mutação $-204\text{C}\rightarrow\text{G}$ localiza-se sobre um possível sítio de ligação a PEA-1 (fig. 2 - trabalho 7), um fator de transcrição menos comum. A fig. 6 (trabalho 7) mostra a presença de complexos DNA-proteína com as sondas selvagem, mutante e controle PEA-1 (canaletas 2, 7 e 12). Repare que o complexo formado pela sonda controle (canaleta 12), que contém um sítio consenso para ligação de PEA-1 migra a uma altura diferente daqueles formados pelas sondas -204 selvagem e mutante (canaletas 2 e 7), indicando que o complexo formado com estas sondas não está relacionado à interação com PEA-1. Outras evidências contribuem para esta conclusão. Os complexos formados com as sondas selvagem e mutante não desaparecem quando utilizou-se a sonda controle de PEA-1 como competidora (canaletas 5 e 10), indicando que ela é incapaz de seqüestrar a proteína envolvida na formação do complexo e que, portanto, esta proteína não deve se tratar da PEA-1.

Da mesma forma que com a deleção TG $-72/73$, os complexos DNA-proteína formados pelas sondas -204 selvagem e mutante desaparecem, quando adicionadas como competidoras à reação, as próprias sondas não marcadas radioativamente (canaletas 3, 4, 8 e 9). Isto indica que ambas as sondas têm a capacidade de seqüestrar a proteína envolvida e, portanto, que a mutação $-204\text{C}\rightarrow\text{G}$ não altera a capacidade desta região do DNA de interagir com esta proteína desconhecida.

O desaparecimento do complexo formado pela sonda controle PEA-1 na presença da própria sonda controle não marcada e da sonda -204 selvagem não marcada (canaletas 13 e 14), sugere que a sonda -204 selvagem tem a capacidade de seqüestrar PEA-1, provavelmente devido à presença, nesta sonda, de um sítio potencial para ligação de PEA-1. A sonda mutante, por sua vez se mostrou

incapaz de seqüestrar PEA-1 (canaleta 15), provavelmente porque a mutação -204 C→G descaracteriza este sítio potencial. Entretanto, como os complexos DNA-proteína observados com as sondas selvagem e mutante aparentemente não estão relacionados a PEA-1, supõe-se que esta mutação não altera essencialmente a capacidade desta região do promotor de interagir com proteínas regulatórias e, pode, também constituir um polimorfismo ou mutação silenciosa.

Não se pode, entretanto, descartar a hipótese de que *in vivo* o fator de transcrição PEA-1 interaja com esta região do DNA. Se este for o caso, claramente a mutação -204 C→G altera esta interação e pode ser um fator importante no desencadeamento da EsH. Ensaio de expressão poderiam contribuir para o esclarecimento do papel funcional desta mutação.

Além disso, a realização de estudos de todas estas mutações *in vivo*, como a realização de “*footprinting*” *in vivo* e a análise do efeito destas mutações em animais transgênicos deverá ser realizada, uma vez que alguns possíveis efeitos destas mutações sobre a expressão gênica não são verificados por estas técnicas *in vitro*, como os efeitos sobre a compactação da cromatina ou sobre o padrão de metilação desta região do DNA. A troca de uma timina por uma citosina, como a que ocorre na posição -108 por exemplo, pode aumentar a metilação desta região do DNA, já que as citosinas podem ser metiladas, e levar a uma redução na expressão gênica.

Capítulo 6

Conclusões

A ElH parece ser uma doença comum no Brasil e está associada em boa parte a indivíduos de origem étnica africana. A duplicação da leucina 154 no gene da alfa-espectrina foi detectada em todos os casos de sp α I/65, confirmando a alta prevalência desta mutação neste subtipo de ElH e a origem africana deste subtipo de ElH no Brasil. A substituição L260P foi detectada em todos os casos de ElH do subtipo sp α I/50, sugerindo que esta mutação, originada na África Centro-Occidental, possa ser comum no Brasil. A mutação R28H foi detectada em três dos quatro casos de ElH do subtipo sp α I/74. Ela foi detectada em dois grupos étnicos diferentes, sugerindo que esta mutação possa ter uma origem múltipla. Estudos de haplótipos do gene da alfa-espectrina apóiam esta teoria. Finalmente, em um caso isolado de ElH do subtipo sp α I/74, a mutação responsável residia no gene da beta-espectrina (IVS30 –1 G→A). A proteína mutante foi denominada beta-espectrina Campinas. As conseqüências desta mutação sobre o processo de clivagem apóiam o modelo de definição de éxon, que postula que o reconhecimento de éxons é essencial para o processamento correto do transcrito primário.

O alelo α^{LELY} mostrou-se capaz de causar uma piora da expressão da ElH, quando associado *in trans* às mutações eliptocitogênicas. Entretanto, esta piora foi proporcional à gravidade clínica do defeito molecular específico. Uma associação *in cis* do alelo α^{LELY} com a mutação R28H foi observada e determinou a ausência de sintomas no paciente. A presença do alelo α^{LELY} em homozigose foi detectada associada à mutação R28H e a expressão clínica, ao contrário do esperado,

mostrou-se ligeiramente diferente daquela demonstrada por indivíduos portadores da mutação R28H na ausência deste polimorfismo.

Três novas mutações nulas (M1V, 638delC e 1392delC) e duas potenciais novas mutações missense (G1408R e A1884V) foram detectadas em 13 pacientes portadores de EsH. Estes resultados sugerem que mutações no gene da beta-espectrina podem ter um papel importante na etiopatogenia da EsH no Brasil. Por outro lado, defeitos no promotor do gene da anquirina (-108 T→C e -153 G→A) foram detectados em uma porcentagem pequena de 41 pacientes portadores de EsH, tendo sido observados também em indivíduos controle. Estas alterações não afetam a transcrição do gene da anquirina *in vitro* e não parecem, portanto, ser uma causa importante de EsH.

Ao contrário da maioria das mutações responsáveis pela ElH, que são freqüentes, as mutações que levam ao desencadeamento da EsH são esporádicas e detectadas em pacientes individuais.

APÊNDICES

Apêndice A

Tabela 1: Alterações moleculares no gene da alfa-espectrina na EIH:

Nome da Variante	Digestão Triptica	Alteração Molecular	Éxon Afetado	Íntron Afetado	Consequência	Referências
Lograno	$\alpha I/74$	71 T→G, missense	2	-	I24S	PARQUET <i>et al.</i> 1994
Sem nome	$\alpha I/74$	82 C→A, missense	2	-	R28S	COETZER <i>et al.</i> 1991; FLOYD <i>et al.</i> 1991
Sem nome	$\alpha I/74$	82 C→T, missense	2	-	R28C	COETZER <i>et al.</i> 1991
Corbeil	$\alpha I/74$	83 G→A, missense	2	-	R28H	GARBARZ <i>et al.</i> 1990
Sem nome	$\alpha I/74$	83 G→T, missense	2	-	R28L	COETZER <i>et al.</i> 1991; FLOYD <i>et al.</i> 1991
Merseille	$\alpha I/74$	92 T→C, missense	2	-	V31A	LECOMTE <i>et al.</i> 1993
Genova	$\alpha I/74$	100 C→T, missense	2	-	R34W	PERROTA <i>et al.</i> 1994
Tunis	$\alpha I/78$	121 C→T, missense	2	-	R41W	MORLÉ <i>et al.</i> 1989
Anastasia	$\alpha I/78$	134 G→C, missense	2	-	R45T	PERROTA <i>et al.</i> 1995
Clichy	$\alpha I/78$	135 G→T, missense	2	-	R45S	LECOMTE <i>et al.</i> 1989
Culoz	$\alpha I/74$	137 G→T, missense	2	-	G46V	MORLÉ <i>et al.</i> 1990
Sem nome	$\alpha I/74$	143 A→G, missense	2	-	K48R	FLOYD <i>et al.</i> 1991
Lyon	$\alpha I/74$	145 C→T, missense	2	-	L49F	MORLÉ <i>et al.</i> 1990
Ponte de Sôr	$\alpha I/65$	452 G→A, missense	4	-	G151D	BOULANGER <i>et al.</i> 1994
Sem Nome	$\alpha I/65$	459insTTG, inserção	4	-	InsL154	ROUX <i>et al.</i> 1989
Dayton	$\alpha I/50a$	IVS4ins1 Kb, inserção	-	4	Perda do éxon 5, deleção <i>in-frame</i> 178-226	HASSOUN <i>et al.</i> 1994
Saint Louis	$\alpha I/50a$	620 T→C, missense	5	-	L207P	GALLAGHER <i>et al.</i> 1992a
Nigerian	$\alpha I/50a$	779 T→C, missense	6	-	L260P	SAHR <i>et al.</i> 1989
Sem nome	$\alpha I/50a$	781 T→C, missense	6	-	S261P	SAHR <i>et al.</i> 1989

Tabela 1: Alterações moleculares no gene da alfa-espectrina na EIH (continuação):

Nome da Variante	Digestão triptica	Alteração Molecular	Éxon Afetado	Íntron Afetado	Consequências	Referências
Sfax	$\alpha I/36$	1086 A→G, clivagem	8	-	clivagem aberrante do éxon 8, deleção <i>in-frame</i> 363-371	BAKLOUTI <i>et al.</i> , 1992
Alexandria	$\alpha I/50b$	1405delCAT, deleção	11	-	DelH469	GALLAGHER <i>et al.</i> , 1993
Barcelona	$\alpha I/50b$	1406 A→C, missense	11	-	H469P	DALLA VENEZIA <i>et al.</i> , 1993
Sem nome	$\alpha I/50b$	1412 A→C, missense	11	-	Q471P	SAHR <i>et al.</i> , 1989
Jendouba	$\alpha II/31$	2373 C→A, missense	17	-	D791E	ALLOISIO <i>et al.</i> , 1992
Oran	$\alpha II/21$	IVS17 -1 G→A, clivagem	-	17	Perda do éxon 18, deleção <i>in-frame</i> 822-863	ALLOISIO <i>et al.</i> , 1993

in-frame: sem desvio de leitura**Tabela 2:** Alterações moleculares no gene da beta-espectrina na EIH/PPH:

Nome da Variante	Digestão Triptica	Alteração Molecular	Éxon Afetado	Íntron Afetado	Consequência	Referências
Prague	$\alpha I/74$	IVS29 -1 G→C, clivagem	-	29	Perda do éxon 30, <i>frameshift</i>	JAROLIM <i>et al.</i> , 1995d
Cagliari	$\alpha I/74$	6053 C→G, missense	30	-	A2018G	SAHR <i>et al.</i> , 1993
Kuwaitino	$\alpha I/74$	6053 C→G, missense	30	-	A2018D	DHERMY <i>et al.</i> , 1998b
Providence	$\alpha I/74$	6055 T→C, missense	30	-	S2019P	GALLAGHER <i>et al.</i> , 1995
Paris	$\alpha I/74$	6068 C→T, missense	30	-	A2023V	PARQUET <i>et al.</i> , 1994
Linguere	$\alpha I/74$	6070T→A, missense	30	-	W2024R	PARQUET <i>et al.</i> , 1994
Buffalo	$\alpha I/74$	6074 T→G, missense	30	-	L2025R	GALLAGHER <i>et al.</i> , 1997a
Tandil	$\alpha I/74$	6124delGAC AGTG, deleção	30	-	<i>frameshift</i>	GARBARZ <i>et al.</i> , 1992
Nice	$\alpha I/74$	6136insGA, inserção	30	-	<i>frameshift</i>	TSE <i>et al.</i> , 1991
Kayes	$\alpha I/74$	6157 G→C, missense	30	-	A2053P	TSE <i>et al.</i> , 1990

Tabela 2: Alterações moleculares no gene da beta-espectrina na EI/PPH (continuação):

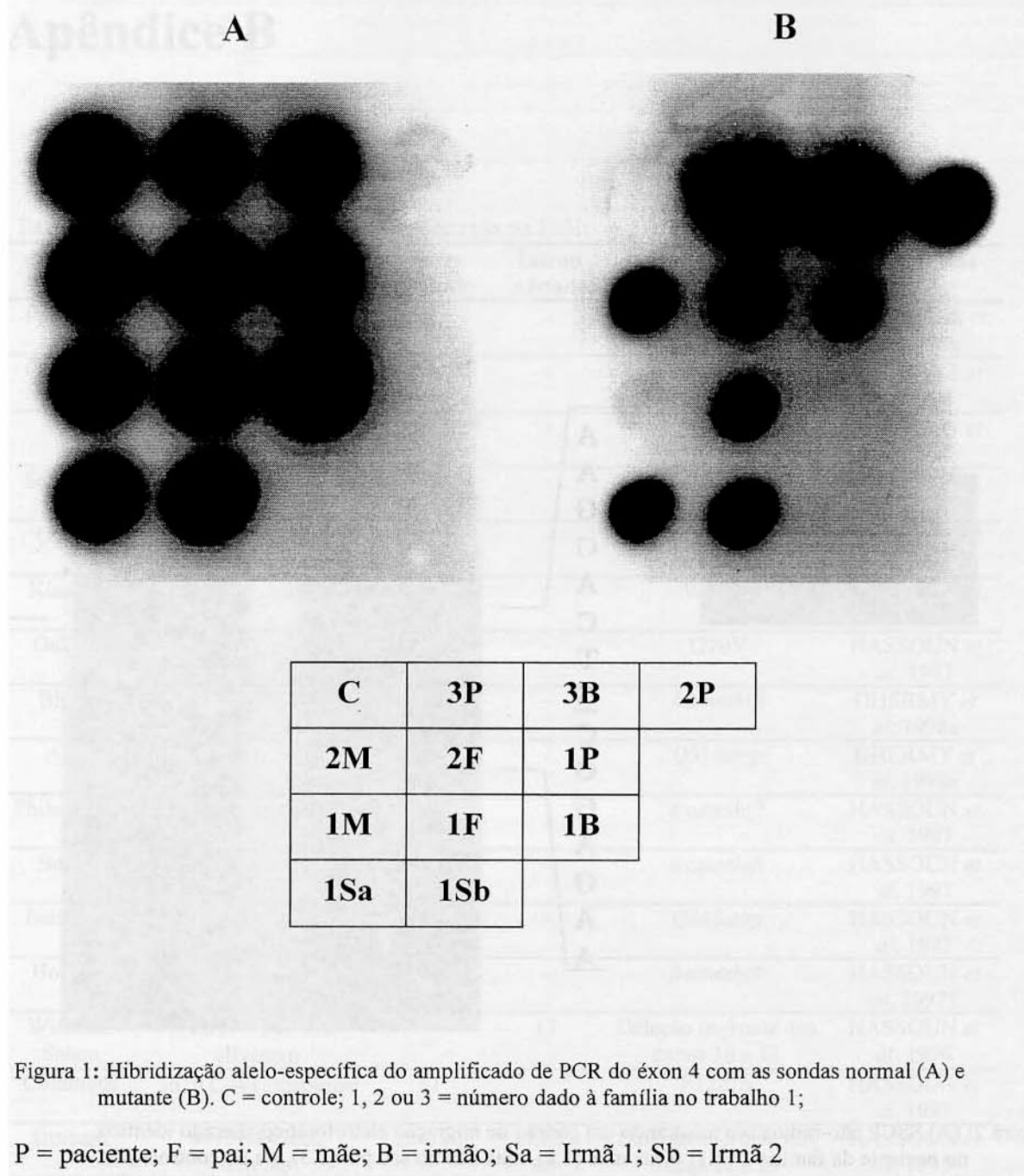
Nome da Variante	Digestão Triptica	Alteração Molecular	Éxon Afetado	Intron Afetado	Consequência	Referências
Napoli	$\alpha I/74$	6160delTTTG AGAA, deleção	30	-	<i>frameshift</i>	WILMOTTE <i>et al.</i> 1994
Tokyo	$\alpha I/74$	6177delC, deleção	30	-	<i>frameshift</i>	KANZAKI <i>et al.</i> 1992
Cotonou	$\alpha I/74$	6181T→A, missense	30	-	W2061R	GLELE-KAKAI <i>et al.</i> 1996
Cosenza	$\alpha I/74$	6190C→G, missense	30	-	R2064G	QUALTIERI <i>et al.</i> 1997
Nagoya	$\alpha I/74$	6205G→T, nonsense	30	-	E2069stop	MAILLET <i>et al.</i> 1996
Campinas	$\alpha I/74$	IVS30 +1 G→A, clivagem	-	30	Perda do éxon 30. <i>frameshift</i>	BASSÈRES <i>et al.</i> 1997a
Göttingen	$\alpha I/74$	IVS30 +2 T→A, clivagem	-	30	Perda do éxon 30. <i>frameshift</i>	YOON <i>et al.</i> 1991
Le Puy	$\alpha I/74$	IVS30 +4 A→G, clivagem	-	30	Perda do éxon 30. <i>frameshift</i>	GALLAGHER <i>et al.</i> 1991a
Rouen	$\alpha I/74$	IVS31 +3 G→T, clivagem	-	31	Perda do éxon 31. <i>frameshift</i>	GARBARZ <i>et al.</i> 1991

frameshift: desvio de leitura; *stop*: códon de terminação

Tabela 3: Correlação das alterações moleculares no gene da alfa-espectrina, detectadas nas famílias portadoras de EIH analisadas neste trabalho, com a manifestação clínica e com a presença do alelo α^{LELY} .

Famílias	Alteração Molecular	Alelo α^{LELY}	Hb g/dl	Retics (%)	SpD/SpT + SpD (%)	$\alpha I\alpha n/\alpha I\alpha n$ + $\alpha I80$ (%)	elipto
SpαI/65							
Paciente 1	duplL154	+/- (<i>trans</i>)	10,3	2,5	18	69	++++
Pai	duplL154	-/-	14,1	1,5	20	48	++
Paciente 2	duplL154	-/-	7,9	7,9	33,9	100	++++
	(homozigose)						
Paciente 3	duplL154	+/- (?)	13,6	1,0	35	66	++++
SpαI/50							
Paciente 4	L260P	+/- (<i>trans</i>)	14,1	1,1	33,3	ND	++++
Mãe	L260P	-/-	13,2	1,0	35	ND	++
Paciente 5	L260P	+/- (<i>trans</i>)	11,7	3,7	29	ND	++++
Paciente 6	L260P	+/- (<i>trans</i>)	12,2	0,5	30	ND	++++
SpαI/74							
Paciente 7	R28H	+/- (<i>trans</i>)	3,8	20,5	35,5	61	PPH
Mãe	R28H	-/-	12,9	5,2	33	48	++
Paciente 8	R28H	+/+	10,1	3,5	32	44	++++
Paciente 9	R28H	+/+	7,2	15,3	31,2	46	++++
Mãe	R28H	+/- (<i>cis</i>)	12,3	1,9	17,5	24	+

Hb: hemoglobina; **Retics:** reticulócitos; **SpD:** dímeros de espectrina; **SpT:** tetrâmeros de espectrina; **an:** anormal; **elipto:** eliptócitos; **homo:** homozigose; **trans:** associação *in trans* do alelo α^{LELY} com a mutação eliptocitogênica; **cis:** associação *in cis* do alelo α^{LELY} com a mutação eliptocitogênica; **?:** associação do alelo α^{LELY} com a mutação eliptocitogênica desconhecida; **ND:** não determinado; **PPH:** piropoiquilocitose hereditária



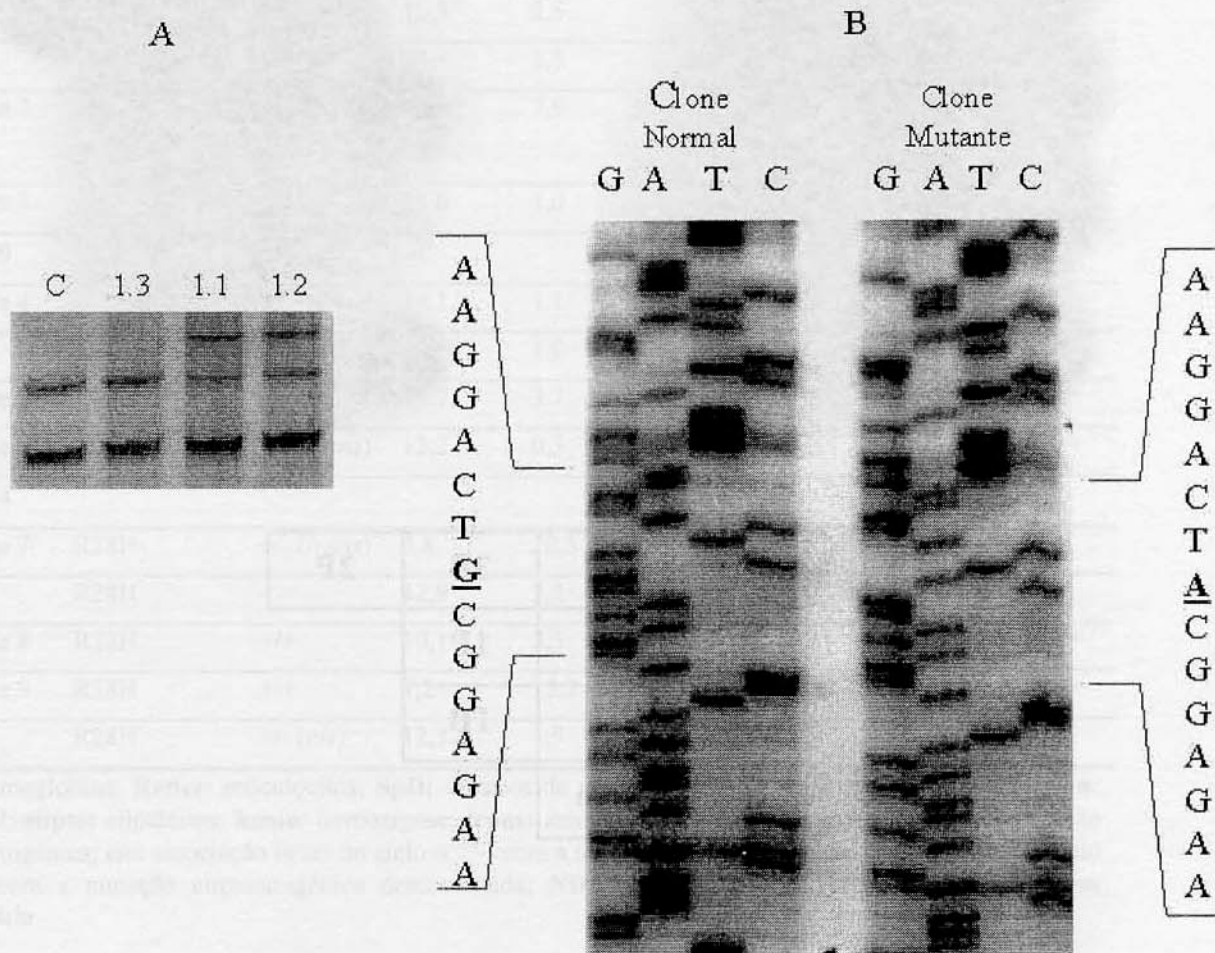


Figura 2: (A) SSCP não-radioativo mostrando um padrão de migração eletroforético alterado idêntico no paciente da família 1 (1.1) e sua mãe (1.2), mas não no seu pai (1.3), ou no controle (C). O mesmo padrão eletroforético alterado foi observado nos pacientes das famílias 2 e 3 e todos os indivíduos afetados. (B) Seqüenciamento de um clone normal e de um clone mutante derivados do produto de PCR do éxon 2 do gene da alfa-espectrina do paciente 1, mostrando a troca G→A (Arg→His) no códon 28, característica da mutação R28H. A mesma alteração molecular foi observada nos outros dois pacientes do trabalho 3.

Apêndice B

Tabela 1: Mutações no gene da beta-espectrina na EsH:

Nome da Variante	Alteração Molecular	Éxon Afetado	Íntron Afetado	Consequência	Referências
Promissão	1 A→G, missense	1	-	M1V	BASSÈRES <i>et al.</i> 1998b
Guemene-Penfao	IVS3 -1 G→C, clivagem	3	-	Retenção do íntron 3, <i>frameshift</i>	GARBARZ <i>et al.</i> 1998
Atlanta	544 T→G, missense	5	-	W182G	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Sem nome	567 G→T, missense	5	-	G189A	DHERMY <i>et al.</i> 1998a
Ostrava	604delT, deleção	6	-	<i>frameshift</i>	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Kissimee	604 T→C, missense	6	-	W202R	BECKER <i>et al.</i> 1993
Oakland	658 A→G, missense	7	-	I220V	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Bicetre	1328del8pb ou 1330del8pb, deleção	11	-	<i>frameshift</i>	DHERMY <i>et al.</i> 1998a
Alger	1540 C→T, nonsense	12	-	Q514stop	DHERMY <i>et al.</i> 1998a
Philadelphia	1766insA, inserção	13	-	<i>frameshift</i>	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Bergen	2351insA, inserção	14	-	<i>frameshift</i>	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Baltimore	2533 C→T, nonsense	14	-	Q845stop	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Houston	2777delA, deleção	15	-	<i>frameshift</i>	HASSOUN <i>et al.</i> 1997?
Winston-Salem	IVS17 +1 G→A, clivagem	-	17	Deleção <i>in-frame</i> dos éxons 16 e 17	HASSOUN <i>et al.</i> 1996
Columbus	3679 C→T, missense	17	-	P1227S	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Durham	4473-4842del, deleção	22 e 23	21,22 e 23	Deleção <i>in-frame</i> dos éxons 22 e 23	HASSOUN <i>et al.</i> 1995
Birmingham	5050 C→T, missense	25	-	R1684C	HASSOUN <i>et al.</i> 1997
Tabor	5836 C→T, nonsense	28	-	Q1946stop	HASSOUN <i>et al.</i> 1997

frameshift: desvio de leitura; *in-frame*: sem desvio de leitura; *stop*: códon de terminação

Tabela 2: Mutações no gene da anquirina na EsH:

Nome da Variante	Alteração Molecular	Exon Afetado	Intron Afetado	Consequência	Referências
Sem Nome	-204C→G, promotor	-	-	?	EBER <i>et al.</i> , 1996
Sem Nome	-108T→C, promotor	-	-	?	EBER <i>et al.</i> , 1996
Sem Nome	-72/-73Tgdel, promotor	-	-	?	EBER <i>et al.</i> , 1993
Bugey	437delC, deleção	6	-	<i>frameshift</i>	MORLÉ <i>et al.</i> , 1997
Osterholtz	520del 20nt, deleção	6	-	<i>frameshift</i>	EBER <i>et al.</i> , 1996
Stuttgart	985delGC, deleção	10	-	<i>frameshift</i>	EBER <i>et al.</i> , 1996
Bari	1277delG, deleção	12	-	<i>frameshift</i>	RANDON <i>et al.</i> , 1997
Walsrode	1387 G→A, missense	13	-	V463I	EBER <i>et al.</i> , 1996
Florianópolis	1519insC, inserção	14	-	<i>frameshift</i>	GALLAGHER <i>et al.</i> , 1996
Laguna	1605delA, deleção	15	-	<i>frameshift</i>	GALLAGHER <i>et al.</i> , 1996
Einbeck	1717insC, inserção	16	-	<i>frameshift</i>	EBER <i>et al.</i> , 1996
Napoli	1718delT, deleção	16	-	<i>frameshift</i>	MIRAGLIA DEL GIUDICE <i>et al.</i> , 1996
Sem Nome	1788delC, deleção	16	-	<i>frameshift</i>	OZCAN <i>et al.</i> , 1997
Duisburg	1VS16 -18 C→A, clivagem	-	16	<i>frameshift</i>	EBER <i>et al.</i> , 1996
Sem Nome	1890 G→T, nonsense	17	-	E631stop	OZCAN <i>et al.</i> , 1996
Sem Nome	2294C→A, nonsense	20	-	S765stop	OZCAN <i>et al.</i> , 1996
Marburg	2389delTTAG, deleção	22	-	<i>frameshift</i>	EBER <i>et al.</i> , 1996
Sem Nome	2720delG, deleção	25	-	<i>frameshift</i>	OZCAN <i>et al.</i> , 1996
Napoli II	2799delC, deleção	26	-	<i>frameshift</i>	RANDON <i>et al.</i> , 1997
Anzio	2948delCA, deleção	26	-	<i>frameshift</i>	RANDON <i>et al.</i> , 1997
Nara	3137T→C, missense	28	-	L1046P	KANZAKI <i>et al.</i> , 1997
Sem Nome	3157C→T, nonsense	28	-	R1053stop	OZCAN <i>et al.</i> , 1996
Tubarao	3223T→C, missense	28	-	I1075T	GALLAGHER <i>et al.</i> , 1996
Porta Westfalica	3380delC, deleção	29	-	<i>frameshift</i>	EBER <i>et al.</i> , 1996
Bovendem	4306C→T, nonsense	36	-	R1436stop	EBER <i>et al.</i> , 1996
Sem Nome	4462C→T, nonsense	37	-	R1488stop	OZCAN <i>et al.</i> , 1996
Prague	4537ins 201nt, inserção	37	-	Inserção <i>in-frame</i> de 67 AA	JAROLIM <i>et al.</i> , 1990abs
Dusseldorf	4774G→A, missense	38	-	D1592N	EBER <i>et al.</i> , 1996
Rakovnik	5005G→T, nonsense	38	-	E1669stop	JAROLIM <i>et al.</i> , 1995c
Sem Nome	IVS38 -34 C→T, clivagem	-	38	<i>frameshift</i>	EBER <i>et al.</i> , 1996
Saint-Etienne I	5163G→A, nonsense	39	-	W1721stop	HAYETTE <i>et al.</i> , 1998
Saint-Etienne II	5497C→T, nonsense	41	-	R1833stop	HAYETTE <i>et al.</i> , 1998
Bocholt	5635C→T, missense ou clivagem	41	-	R1879W ou ?	EBER <i>et al.</i> , 1996

?: desconhecido; *frameshift*: desvio de leitura; *in-frame*: sem desvio de leitura; *stop*: códon de terminação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRE P, ORRINGER EP, BENNETT V: *Deficient red cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis*. **N Engl J Med** 306: 1155-1161, 1982.
- ALLOISIO N, GUETARNI D, MORLÉ L, POTHIER B, DUCLUZEAU MT, SOUN A, COLONNA P, CLERC M, PHILIPPE N, DELAUNAY, J: *Sp α 1/65 hereditary elliptocytosis in North Africa*. **Am J Haematol** 23: 113-122, 1986.
- ALLOISIO N, MAILLET P, CARRE G, TEXIER P, VALLIER A, BAKLOUTI F, PHILIPPE N, DELAUNAY J: *Hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. Association with a nonsense mutation of the band 3 gene (allele Lyon), and aggravation by a low-expression allele occurring in trans (allele Genas)*. **Blood** 88: 1062-1069, 1996.
- ALLOISIO N, MORLÉ L, MARÉCHAL J, ROUX A-F, DUCLUZEAU M-T, GUETARNI D, POTHIER B, BAKLOUTI F, GHANEM A, KASTALLY R, DELAUNAY J: *Sp α ^{V/41}: a common spectrin polymorphism at the α IV- α V domain junction*. **J Clin Invest** 87: 2169-2177, 1991.
- ALLOISIO N, TEXIER P, VALLIER A, RIBEIRO ML, MORLE L, BOZON M, BURSAUX E, MAILLET P, GONCALVES P, TANNER MJ, TAMAGNINI G, DELAUNAY J: *Modulation of clinical expression and band 3 deficiency in hereditary spherocytosis*. **Blood** 90: 414-420, 1997.
- ALLOISIO N, WILMOTTE R, MARÉCHAL J, TEXIER P, DENOROY L, FÉO C, BENHADJI-ZOUAOU Z, DELAUNAY J: *A splice site mutation of α -spectrin gene causing skipping of exon 18 in hereditary elliptocytosis*. **Blood** 81: 2791-2798, 1993.

- ALLOISIO N, WILMOTTE R, MORLÉ L, BAKLOUTI F, MARÉCHAL J, DUCLUZEAU M-T, DENOROY L, FÉO C, FORGET BG, KASTALLY R, DELAUNAY J: *Spectrin Jendouba: an $\alpha^{II/31}$ spectrin variant that is associated with elliptocytosis and carries a mutation distant from the dimer self-association site. Blood* **80**: 809-815, 1992.
- ALPER SL: *The band 3-related AE anion exchanger gene family. Cell Physiol Biochem* **4**: 265-281, 1994.
- ALPER SL, NATALE J, GLUCK S, LODISH HF, BROWN D: *Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H^+ -ATPase. Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5429-5433, 1989.
- AMIN KM, SCARPA AL, WINKELMANN JC, CURTIS PJ, FORGET BG: *The exon-intron organization of the human erythroid beta-spectrin gene. Genomics* **18**: 118-125, 1993.
- AN XL, TAKAKUWA Y, NUNOMURA W, MANNO S, MOHANDAS N: *Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties. J Biol Chem* **271**: 33187-33191, 1996.
- ANDREWS NC, KOTKOW KJ, NEY PA, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, ORKIN SH: *The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11488-11492, 1993.
- BAKLOUTI F, HUANG SC, VULLIAMY TJ, DELAUNAY J, BENZ EJ JR: *Organization of the human protein 4.1 genomic locus: new insights into the tissue-specific alternative splicing of the pre-mRNA. Genomics* **39**: 289-302, 1997.
- BAKLOUTI F, MARÉCHAL J, MORLÉ L, ALLOISIO N, WILMOTTE R, POTHIER B, DUCLUZEAU MT, KASTALLY R, DELAUNAY J: *Ocurrence of the αI 22 Arg→His (CGT→CAT) spectrin mutation in Tunisia: potential association with severe elliptopoikilocytosis. Br J Haematol* **78**: 108-113, 1991.
- BAKLOUTI F, MARÉCHAL J, WILMOTTE R, ALLOISIO N, MORLÉ L, DUCLUZEAU MT, DENOROY L, MRAD A, BEN ARIBIA MH, RASTALLY R, DELAUNAY J: *Elliptocytogenic $\alpha^{I/36}$ spectrin sfax lacks nine amino acids in helix 3 of repeat 4: Evidence for the activation of a cryptic 5'-splice site in exon 8 of spectrin α -gene. Blood* **79**: 2464-2470, 1992.

- BASSÈRES DS, PRANKE PHL, SALES TSI, COSTA FF, SAAD STO: *β -spectrin Campinas: a novel shortened β -chain variant associated with skipping of exon 30 and hereditary elliptocytosis*. **Br J Haematol** 97: 579-585, 1997a.
- BASSÈRES DS, SALLES TSI, COSTA FF, SAAD STO: *Presence of allele α^{LEY} in an Amazonian Indian population*. **Am J Hematol** 57: 212-214, 1998a.
- BASSÈRES DS, TAVARES AC, BORDIN S, VICENTIM DL, MELO MB, COSTA FF, HASSOUN H, SAAD STO: *Novel β -spectrin variants associated with hereditary spherocytosis in Brazil*. **Blood** 90 (Suppl 1): 4b, 1997b.
- BASSÈRES DS, VICENTIM DL, COSTA FF, SAAD STO, HASSOUN H: *β -spectrin Promissão: A translation initiation codon mutation of the β -spectrin gene (ATG $\rightarrow$ GTG) associated with hereditary spherocytosis and spectrin deficiency in a Brazilian family*. **Blood** 91: 368-369, 1998b.
- BAYSAL E, CARVER MFH: *The β - and δ -thalassemia repository*. **Hemoglobin** 19: 213-236, 1995.
- BEAUCHAMP-NICOUD A, MORLE L, LUTZ HU, STAMMLER P, AGULLES O, PETERMANN-KHDER R, IOLASCON A, PERROTTA S, CYNOBER T, TCHERNIA G, DELAUNAY J, BAUDIN-CREUZA V: *Heavy transfusions and presence of an anti-protein 4.2 antibody in 4.2(-) hereditary spherocytosis (949delG)*. **Haematologica** 85: 19-24, 2000.
- BECK KA, NELSON WJ: *A spectrin membrane skeleton of the golgi complex*. **Biochim Biophys Acta** 1404: 153-160, 1998.
- BECKER PS, SCHWARTZ MA, MORROW JS, LUX SE: *Radio-label transfer cross-linking demonstrates that protein 4.1 binds to the N-terminal region of β -spectrin and to actin in binary interactions*. **Eur J Biochem** 193: 827-836, 1990.
- BECKER PS, TSE WT, LUX SE, FORGET BG: *β -spectrin Kissimmee: A spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding of protein 4.1*. **J Clin Invest** 92: 612-616, 1993.
- BENNET V, STENBUCK PJ: *The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes*. **Nature** 280: 468-473, 1979.

- BENNET V, STENBUCK PJ: *Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane*. **J Biol Chem** 255: 6424-6432, 1980.
- BERGET SM: *Exon recognition in vertebrate splicing*. **Journal of Biological Chemistry** 270: 2411-2414, 1995.
- BIANCHI P, ZANELLA A, ALLOISIO N, BAROSI G, BREDI E, PELISSERO G, ZAPPA M, VERCELLATI C, BARONCIANI L, DELAUNAY J, SIRCHIA G: *A variant of the EPB3 gene of the anti-Lepore type in hereditary spherocytosis*. **Br J Haematol** 98: 283-288, 1997.
- BIRKENMEIER CS, WHITE RA, PETERS LL, HALL EJ, LUX SE, BARKER JE: *Complex patterns of sequence variation and multiple 5' and 3' ends are found among transcripts of the erythroid ankyrin gene*. **J Biol Chem** 268: 9533-9540, 1993.
- BLANK V, KOURILSKY P, ISRAEL A: *NF- κ B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats*. **Trends Biochem Sci** 17: 135-140, 1992.
- BOIVIN P, GALAND C, DEVAUX I, LECOMTE MC, GARBARZ M, DHERMY D: *Spectrin α IIa variant in dominant and non-dominant spherocytosis*. **Hum Genet** 92: 153-156, 1993.
- BOUHASSIRA EE, SCHWARTZ RS, NAGEL RL, RYBICKI AC: *Protein 4.2 mRNA splicing isoforms are tissue specific and regulated during erythroid differentiation*. **Blood** 76 (suppl 1): 5a, 1990.
- BOUHASSIRA EE, SCHWARTZ RS, YAWATA Y, ATA K, KANZAKI A, QIU JJ, NAGEL RL, RYBICKI AC: *An alanine-threonine substitution in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (Protein 4.2 Nippon)*. **Blood** 79: 1846-1854, 1992.
- BOULANGER L, DHERMY D, GARBARZ M, SILVA C, RANDON J, WILMOTTE R, DELAUNAY J: *A second allele of spectrin α -gene associated with the α I/65 phenotype (allele $\alpha^{Ponte\ de\ S\acute{o}r}$)*. **Blood** 84: 2056-2057, 1994.
- BRUCE LJ, RING SM, ANSTEE DJ, REID ME, WILKINSON S, TANNER MJA: *Changes in the blood group Wright antigens are associated with a mutation at aminoacid 658 in human erythrocyte band 3: A site of interaction between band 3 and glycophorin A under certain conditions*. **Blood** 85: 541-547, 1995.

- BYERS T, BRANDON D: *Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton*. **Proc Natl Acad Sci USA** 82: 6153-6157, 1985.
- CARTRON JP, LE VAN KIM C, COLIN Y: *Glycophorin C and related glycoproteins: Structure, function, and regulation*. **Semin Hematol** 30: 152-168, 1993.
- CHASIS JA, COULOMBEL L, CONBOY J, MCGEE S, ANDREWS K, KAN YW, MOHANDAS N: *Differentiation-associated switches in protein 4.1 expression. Synthesis of multiple structural isoforms during normal human erythropoiesis*. **J Clin Invest** 91: 329-338, 1993.
- CHASIS JA, COULOMBEL L, MCGEE S, LEE G, TCHERNIA G, CONBOY J, MOHANDAS N: *Differential use of protein 4.1 translation initiation sites during erythropoiesis: implications for a mutation-induced stage-specific deficiency of protein 4.1 during erythroid development*. **Blood** 87: 5324-5331, 1996.
- CHASIS JA, MOHANDAS M: *Red blood cell glycophorins*. **Blood** 8: 1869-1879, 1992.
- CHASIS JA, REID ME, JENSEN RH, MOHANDAS N: *Signal transduction by glycophorin A: Role of extracellular and cytoplasmic domains in a modulatable process*. **J cell Biol** 107: 1351-1357, 1988.
- CHE A, CHERRY RJ: *Loss of rotational mobility of band 3 proteins in human erythrocyte membranes induced by antibodies to glycophorin A*. **Biophys J** 68: 1881-1887, 1995.
- CHÉTRITE G, CASSOLY R: *Affinity of hemoglobin for the cytoplasmic fragment of human erythrocyte membrane band 3. Equilibrium measurements at physiological pH using matrix-bound proteins: The effects of ionic strength, deoxygenation and of 2,3-diphosphoglycerate*. **J Mol Biol** 185: 639-644, 1985.
- COETZER TL, SAHR K, PRCHAL J, BLACKLOCK H, PETERSON LA, KOLER R, DOYLE J, MANASTER J, PALEK J: *Four different mutations in codon 28 of α spectrin are associated with structurally and functionally abnormal spectrin α I⁷⁴ in hereditary elliptocytosis*. **J Clin Invest** 88: 743-749, 1991.
- COHEN CM, DOTIMAS E, KORSGREN C: *Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin)*. **Semin Hematol** 30: 119-137, 1993.
- COHEN CM, FOLEY SF: *The role of band 4.1 in the association of actin with erythrocyte membranes*. **Biochim Biophys Acta** 688: 691-701, 1982.

- COHEN CM, FOLEY SF: *Biochemical characterization of complex formation by human erythrocyte spectrin protein 4.1, and actin.* **Biochemistry** 23: 6091-6098, 1984.
- COHEN CM, FOLEY SF, KORSGREN C: *A protein immunologically related to erythrocyte band 4.1 is found on stress fibers of nonerythroid cells.* **Nature** 299: 648-650, 1982.
- COLIN Y: *Gerbich blood groups and minor glycoporphins of human erythrocytes.* **Transfus Clin Biol** 2: 259-268, 1995.
- CONBOY J: *The role of alternative pre-mRNA splicing in regulating the structure and function of skeletal protein 4.1.* **Proc Soc Exp Biol Med** 220: 73-78, 1999.
- CONBOY J, KAN YW, SHOHET SB, MOHANDAS N: *Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton.* **Proc Natl Acad Sci USA** 83: 9512-9516, 1986.
- CONBOY J, MARCHESI S, KIM R, AGRE P, KAN YW, MOHANDAS N: *Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis: II. Determination of the molecular genetic origins of rearrangements.* **J Clin Invest** 86: 524-530, 1990.
- CONBOY JG: *Structure, function, and molecular genetics of erythroid membrane skeletal protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells.* **Semin Hematol** 30(1): 58-73, 1993.
- CONBOY JG, CHASIS JA, WINARDI R, TCHERNIA G, KAN YW, MOHANDAS N: *An isoform-specific mutation in the protein 4.1 gene results in hereditary elliptocytosis and complete deficiency of protein 4.1 in erythrocytes but not in nonerythroid cells.* **J Clin Invest** 91: 77-82, 1993.
- CONBOY JG, SHITAMOTO R, PARRA M, WINARDI R, KABRA A, SMITH J, MOHANDAS N: *Hereditary elliptocytosis due to both qualitative and quantitative defects in membrane skeletal protein 4.1.* **Blood** 78: 2438-2443, 1991.
- CORBETT JD, AGRE P, PALEK J, GOLAN DE: *Differential control of band 3 lateral and rotational mobility in intact red cells.* **J Clin Invest** 94: 683-688, 1994.
- CORREAS I, LETO TL, SPEICHER DW, MARCHESI VT: *Identification of the functional site of erythrocyte protein 4.1 involved in spectrin-actin associations.* **J Biol Chem** 261: 3310-3315, 1986a.
- CORREAS I, SPEICHER DW, MARCHESI VT: *Structure of the spectrin-actin binding site of erythrocyte protein 4.1.* **J Biol Chem** 261: 13362-13366, 1986b.

- COSTA FF, ARRUDA VR, GONÇALVES MG, MIRANDA SRP, CARVALHO MH, SONATI MF, SAAD STO, GESTEIRA F, FERNANDES D, NASCIMENTO ML, QUEIROZ IL: *β s-Gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil*. **Am J Hematol** 45: 96-97, 1994.
- DALLA VENEZIA N, ALLOISIO N, FORISSIER A, DENOROY L, AYMERICH M, VIVES-CORRONS JL, BESALDUCH J, BESSON I, DELAUNAY J: *Elliptopoikilocytosis associated with the α 469 His→Pro mutation in spectrin Barcelona ($\alpha^{I/50a-46b}$)*. **Blood** 82: 1661-1665, 1993.
- DALLA VENEZIA N, GILSANZ F, ALLOISIO N, DUCLUZEAU M-T, BENZ EJ, JR., DELAUNAY J: *Homozygous 4.1(-) hereditary elliptocytosis associated with a point mutation in the downstream initiation codon of protein 4.1 gene*. **J Clin Invest** 90: 1713-1717, 1992.
- DALLA VENEZIA N, MAILLET P, MORLE L, RODA L, DELAUNAY J, BAKLOUTI F: *A large deletion within the protein 4.1 gene associated with a stable truncated mRNA and an unaltered tissue-specific alternative splicing*. **Blood** 91: 4361-4367, 1998.
- DANILOV YN, FENNELL R, LING E, COHEN MC: *Selective modulation of band 4.1 binding to erythrocyte membranes by protein kinase C*. **J Biol Chem** 265: 2556-2562, 1990.
- DAVIS L, LUX SE, BENNETT V: *Mapping the ankyrin-binding site of the human erythrocyte anion exchanger*. **J Biol Chem** 264: 9665-9672, 1989.
- DAVIS LH, DAVIS JQ, BENNET V: *Ankyrin regulation: an alternatively spliced segment of the regulatory domain functions as an intramolecular modulator*. **J Biol Chem** 267: 18966-18972, 1992.
- DAVIS LH, OTTO E, BENNETT V: *Specific 33-residue repeat(s) of erythrocyte ankyrin associate with the anion exchanger*. **J Biol Chem** 266: 11163-11169, 1991.
- DE BK, KIRTLEY ME: *Interaction of phosphoglycerate kinase with human erythrocyte membranes*. **J Biol Chem** 252: 6715-6720, 1977.
- DE FRANCESCHI L, OLIVIERI O, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, PERROTTA S, SABATO V, CORROCHER R, IOLASCON A: *Membrane cation and anion transport activities in erythrocytes of hereditary spherocytosis: effects of different membrane protein defects*. **Am J Hematol** 55: 121-128, 1997.

- DELAUNAY J, ALLOISIO N, MORLE L, BAKLOUTI F, DALLA VENEZIA N, MAILLET P, WILMOTTE R: *Molecular genetics of hereditary elliptocytosis and hereditary spherocytosis*. **Ann Genet** 39: 209-221, 1996.
- DELAUNAY J, ALLOISIO N, MORLÉ L, POTHIER B: *The red cell skeleton and its genetic disorders*. **Mol Asp Med** 11: 161-241, 1990.
- DELAUNAY J, DHERMY D: *Mutations involving the spectrin heterodimer contact site: clinical expression and alterations in specific function*. **Semin Hematol** 30: 21-33, 1993.
- DEVAUX PF: *Lipid transmembrane asymmetry and flip-flip in biological membranes and in lipid bilayers*. **Curr Opin Struct Biol** 3: 489-494, 1993.
- DHERMY D: *The spectrin super-family*. **Biol Cell** 71: 249-254, 1991.
- DHERMY D, GALAND C, BOURNIER O, BOULANGER L, CYNOBER T, SCHISMANOFF PO, BURSAUX E, TCHERNIA G, BOIVIN P, GARBARZ M: *Heterogenous band 3 deficiency in hereditary spherocytosis related to different band 3 gene defects*. **Br J Haematol** 98: 32-40, 1997.
- DHERMY D, GALAND C, BOURNIER O, CYNOBER T, MECHINAUD F, TCHERNIA G, GARBARZ M: *Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency related to null mutations of the beta-spectrin gene*. **Blood Cells Mol Dis** 24: 251-261, 1998a.
- DHERMY D, GALAND C, BOURNIER O, KING MJ, CYNOBER T, ROBERTS I, KANYIKE F, ADEKILE A: *Coinheritance of alpha-and beta-spectrin gene mutations in a case of hereditary elliptocytosis*. **Blood** 92: 4481-4482, 1998b.
- DISCHER D, PARRA M, CONBOY JG, MOHANDAS N: *Mechanochemistry of the alternatively spliced spectrin-actin binding domain in membrane skeletal protein 4.1*. **J Biol Chem** 268: 7186-7195, 1993.
- DRENCKHAHN D, SCHLUTER K, ALLEN DP, BENNETT V: *Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney*. **Science** 230: 1287-1289, 1985.
- DRESSLER V, HAEST CWM, PLASA G, DEUTICKE B, ERUSALIMSKY JD: *Stabilizing factors of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane*. **Biochim Biophys Acta** 775: 189-196, 1984.
- EBER SW, GONZALEZ JM, LUX ML, SCARPA AL, TSE WT, DORNWELL M, HERBERS J, KUGLER W, OZCAN R, PEKRUN A, GALLAGHER PG, SCHROTER W, FORGET

- BG, LUX SE: *Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis*. **Nat Genet** 13: 214-218, 1996.
- EBER SW, LUX ML, GONZALEZ JM, SCARPA A, TSE WT, GALLAGHER PG, PEKRUN A, FORGET BG, LUX SE: *Discovery of 8 ankyrin mutations in hereditary spherocytosis (HS) indicates that ankyrin defects are a major cause of dominant and recessive HS*. **Blood** 82 (suppl.1): 308a, 1993.
- EDER PS, SOONG C-J, TAO M: *Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin*. **Biochem** 25: 1764-1770, 1986.
- FLOYD PB, GALLAGHER PG, VALENTINO LA, DAVIS M, MARCHESI SL, FORGET BG: *Heterogeneity of the molecular basis of hereditary pyropoikilocytosis and hereditary elliptocytosis associated with increased levels of the spectrin α I/74-kilodalton tryptic peptide*. **Blood** 78: 1364-1372, 1991.
- FOURNIER CM, NICOLAS G, GALLAGHER PG, DHERMY D, GRANDCHAMP B, LECOMTE MC: *Spectrin St Claude, a splicing mutation of the human alpha-spectrin gene associated with severe poikilocytic anemia*. **Blood** 89: 4584-4590, 1997.
- FUKUSHIMA Y, BYERS MG, WATKINS PC, WINKELMANN JC, FORGET BG, SHOWS TB: *Assignment of the gene for β -spectrin (SPTB) to chromosome 14q23 $\rightarrow$ q24.2 by in situ hybridization*. **Cytogenet Cell Genet** 53: 232-233, 1990.
- FUNAYAMA N, NAGAFUCHI A, SATO N, TSUKITA S, TSUKITA S: *Radixin is a novel member of the band 4.1 family*. **J Cell Biol** 115: 1039-1048, 1991.
- GALLAGHER PG: *comunicação pessoal*, 1999.
- GALLAGHER PG, FERREIRA JDS: *Molecular basis of erythrocyte membrane disorders*. **Curr Opin Hematol** 4: 128-135, 1997.
- GALLAGHER PG, FORGET BG: *Spectrin genes in health and disease*. **Semin Hematol** 30: 4-20, 1993a.
- GALLAGHER PG, FORGET BG: *Spectrin St Louis and the α LELY allele*. **Blood** 84: 1684-1686, 1994.
- GALLAGHER PG, FORGET BG: *Hematologically important mutations: spectrin variants in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis*. **Blood Cells Mol Dis** 22: 254-258, 1996.

- GALLAGHER PG, FORGET BG: *Hematologically important mutations: band 3 and protein 4.2 variants in hereditary spherocytosis*. **Blood Cells Mol Dis** 23: 417-421, 1997.
- GALLAGHER PG, FORGET BG: *Hematologically important mutations: Spectrin and ankyrin variants in hereditary spherocytosis*. **Blood Cells Mol Dis** 24: 539-543, 1998.
- GALLAGHER PG, FORGET BG, LUX SE: *Disorders of the erythrocyte membrane*. In: Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood (ed. by DG Nathan and SH Orkin), 5th edn, Vol 1, WB Saunders, Philadelphia, pp544-664, 1998a.
- GALLAGHER PG, KOTULA L, WANG Y, MARCHESI SL, CURTIS PJ, SPEICHER DW, FORGET BG: *Molecular basis and haplotyping of the α II domain polymorphisms of spectrin: Application to the study of hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis*. **Am J Hum Genet** 59: 351-359, 1996.
- GALLAGHER PG, PETRUZZI MJ, WEED SA, ZHANG Z, CHESI SL, MOHANDAS N, MORROW JS, FORGET BG: *Mutation of a highly conserved residue of betaI spectrin associated with fatal and near-fatal neonatal hemolytic anemia*. **J Clin Invest** 99: 267-277, 1997a.
- GALLAGHER PG, ROBERTS WE, BENOIT L, SPEICHER DW, MARCHESI L, FORGET BG: *Poikilocytic hereditary elliptocytosis associated with spectrin Alexandria: an α I/50b Kd variant that is caused by a single aminoacid deletion*. **Blood** 82: 2210-2215, 1993.
- GALLAGHER PG, ROMANA M, WONG C, FORGET BG: *Genetic basis of the polymorphisms of the α I domain of spectrin*. **Am J Hematol** 56: 107-111, 1997b.
- GALLAGHER PG, SABATINO DE, GARRETT LJ, BODINE DM, FORGET BG: *expression of the human ankyrin 1 (Ank 1) gene in vitro and in vivo is mediated by a promoter that requires GATA-1 and CACCC-binding proteins for its activity*. **Blood** 92 (suppl1): 7a, 1998b.
- GALLAGHER PG, SABATINO DE, ROMANA M, CLINE AP, GARRETT LJ, BODINE DM, FORGET BG: *A human beta-spectrin gene promoter directs high level expression in erythroid but not muscle or neural cells*. **J Biol Chem** 274: 6062-6073, 1999.
- GALLAGHER PG, TSE WT, COETZER T, LECOMTE M-C, GARBARZ M, ZARKOWSKY HS, BARUCHEL A, BALLAS SK, DHERMY D, PALEK J, FORGET BG: *A common type of the spectrin α I 46-50a-kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and*

- pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from the proteolytic cleavage site. J Clin Invest* **89**: 892-898, 1992a.
- GALLAGHER PG, TSE WT, COSTA FF, SCARPA A, BOIVIN P, DELAUNAY J, FORGET BG: *A splice site mutation of the β -spectrin gene causing exon skipping in hereditary elliptocytosis associated with a truncated β -spectrin chain. J Biol Chem* **266**: 15154-15159, 1991a.
- GALLAGHER PG, TSE WT, SCARPA AL, LUX SE, FORGET BG: *Structure and organization of the human ankyrin-1 gene. Basis for complexity of pre-mRNA processing. J Biol Chem* **272**: 19220-19228, 1997c.
- GALLAGHER PG, TSE WT, SCARPA AL, LUX SE, FORGET BG: . *Large numbers of alternatively spliced isoforms of the regulatory region of human erythrocyte ankyrin. Trans Assoc Am Physicians* **105**: 268-277, 1992b.
- GALLAGHER PG, TSE WT, SCARPA AL, LUX SE, FORGET BG: . *A defect in α -spectrin mRNA accumulation in hereditary pyropoikilocytosis. Trans Assoc Am Physicians* **104**: 32-39, 1991b.
- GALLAGHER PG, WEED SA, TSE WT, BENOIT L, MORROW JS, CHESI SL, MOHANDAS N, FORGET BG: *Recurrent fatal hydrops fetalis associated with a nucleotide substitution in the erythrocyte beta-spectrin gene. J Clin Invest* **95**: 1174-1182, 1995.
- GALLAGHER PG, WONG E, WONG C: *A novel isoform of ankyrin 1 expressed in brain, heart and skeletal muscle is directed by an alternative promoter. Blood* **92 (suppl1)**: 300 a, 1998c.
- GARBARZ M, BOULANGER L, PEDRONI S, LECOMTE MC, GAUTERO H, GALAND C, BOIVIN P, FELDMAN L, DHERMY D: *Spectrin β Tandil, a novel shortened β -chain variant associated with hereditary elliptocytosis is due to a deletional frameshift mutation in the β -spectrin gene. Blood* **80**: 1066-1073, 1992.
- GARBARZ M, DEVAUX I, BOURNIER O, GRANDCHAMP B, DHERMY D: *Protein 4.1 Lille, a novel mutation in the downstream initiation codon of the protein 4.1 gene associated with heterozygous protein 4.1(-) hereditary elliptocytosis. Hum Mutat* **5**: 339-340, 1995.
- GARBARZ M, GALAND C, BIBAS D, BOURNIER O, DEVAUX I, HAROUSSEAU JL, GRANDCHAMP B, DHERMY D: *A 5' splice region G-->C mutation in exon 3 of the*

human beta-spectrin gene leads to raised levels of beta-spectrin mRNA and is responsible for dominant hereditary spherocytosis (spectrin Guemene-Penfao). **Br J Haematol** 100: 90-98, 1998.

GARBARZ M, LECOMTE MC, FÉO C, DEVAUX I, PICAT C, LEFEBVRE C, GALIBERT F, GAUTERO H, BOURNIER O, GALAND C, FORGET BG, BOIVIN P, DHERMY D: *Hereditary pyropoikilocytosis and elliptocytosis in a white French family with the spectrin $\alpha^{I/74}$ variant related to a CGT to CAT codon change (Arg to His) at position 22 of the spectrin αI domain.* **Blood** 75: 1691-1698, 1990.

GARBARZ M, LECOMTE M C, DHERMY D, FÉO C, CHAVEROCHE I, GAUTERO H, BOURNIER O, PICAT C, GOEPP A, BOIVIN P: *Double inheritance of an $\alpha^{I/65}$ spectrin variant in a child with homozygous elliptocytosis.* **Blood** 67: 1661-1667, 1986.

GARBARZ M, TSE WT, GALLAGHER PG, PICAT C, LECOMTE MC, GALIBERT F, DHERMY D, FORGET BG: *Spectrin Rouen (β 220/218), a novel shortened β -chain variant in a kindred with hereditary elliptocytosis.* **J Clin Invest** 88: 76-81, 1991.

GASCARD P, COHEN CM: . **Blood** 83: 1102-1108, 1994.

GIMSA J, RIED C: *Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes?* **Mol Membr Biol** 12: 247-254, 1995.

GLELE-KAKAI C, GARBARZ M, LECOMTE MC, LEBORGNE S, GALAND C, BOURNIER O, DEVAUX I, GAUTERO H, ZOHOUN I, GALLAGHER PG, FORGET BG, DHERMY D: *Epidemiological studies of spectrin mutations related to hereditary elliptocytosis and spectrin polymorphisms in Benin.* **Br J Haematol** 95: 57-66, 1996.

GOLAN DE, CORBETT JD, KORSGREN C, THATTE HS, HAYETTE S, YAWATA Y, COHEN CM: *Control of band 3 lateral and rotational mobility by band 4.2 in intact erythrocytes: release of band 3 oligomers from low-affinity binding sites.* **Biophys J** 70: 1534-1542, 1996.

GONÇALVES MS, NECHTMAN JF, FIGUEIREDO MS, KERBAUY J, ARRUDA VR, SONATI MF, SAAD STO, COSTA FF, STORNING TA: *Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the β s haplotypes.* **Human Heredity** 44: 322-327, 1994.

- GOODMAN SR, ZIMMER WE, CLARCK MB, ZAGON IS, BARKER JE, BLOOM ML: *Brain spectrin: Of mice and men*. **Brain Res Bulletin** 36: 593-606, 1995.
- GROVES JD, TANNER MJ: *Glycophorin A facilitates the expression of human band 3-mediated anion transport in Xenopus oocytes*. **J Biol Chem** 267: 2163-2170, 1992.
- GROVES JD, TANNER MJ: *The effects of glycophorin A on the expression of the human red cell anion transporter (band 3) in Xenopus oocytes*. **J Membr Biol** 140: 81-88, 1994.
- GROVES JD, TANNER MJ: *Structural model for the organization of the transmembrane spans of the human red-cell anion exchanger (band 3: AE1)*. **Biochem J** 344: 699-711, 1999a.
- GROVES JD, TANNER MJ: *Topology studies with biosynthetic fragments identify interacting transmembrane regions of the human red-cell anion exchanger (band 3: AE1)*. **Biochem J** 344: 687-697, 1999b.
- GUETARNI D, ROUX A-F, ALLOISIO N, MORLÉ F, DUCLUZEAU M T, FORGET B G, COLONNA P, DELAUNAY J, GODET J: *Evidence that expression of $sp\alpha^{J/65}$ hereditary elliptocytosis is compounded by a genetic factor that is linked to the homologous α -spectrin allele*. **Hum Genet** 85: 627-630, 1990.
- GUO W, TANG WJ, BU X, BERMUDEZ V, MARTIN M, FOLK WR: *AP1 enhances Polyomavirus DNA replication by promoting T-antigen-mediated unwinding of DNA*. **J Virol** 70: 4914-4918, 1996.
- HALL TG, BENNETT V: *Regulatory domains of erythrocyte ankyrin*. **J Biol Chem** 262: 10537-10545, 1987.
- HANSPAL M, HANSPAL JS, KALRAIYA R, PALEK J: *The expression and synthesis of the band 3 protein initiates the formation of a stable membrane skeleton in murine Rauscher-transformed erythroid cells*. **Eur J Cell Biol** 58: 313-318, 1992.
- HANSPAL M, HANSPAL JS, SAHR KE, FIBACH E, NACHMAN J, PALEK J: *Molecular basis of spectrin deficiency in hereditary pyropoikilocytosis*. **Blood** 82: 1652-1660, 1993.
- HANSPAL M, PALEK J: *Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors*. **J Cell Biol** 105: 1417-1424, 1987.
- HARTZ JW, BUSS DH, WHITT DR, BOND MG, SCHARYJ M: *Marked elliptocytosis and schistocytosis in hematopoietic dysplasia*. **Am J Clin Pathol** 82: 354-359, 1984.

- HASSOUN H, COETZER TL, VASSILIADIS JN, SAHR KE, MAALOUF GJ, SAAD STO, CATANZARITI L, PALEK J: *A novel mobile element inserted in the α spectrin gene: spectrin Dayton. A truncated α spectrin associated with hereditary elliptocytosis. J Clin Invest* 94: 643-648, 1994.
- HASSOUN H, HANADA T, LUTCHMAN M, SAHR KE, PALEK J, HANSPAL M, CHISHTI AH: *Complete deficiency of glycophorin A in red blood cells from mice with targeted inactivation of the band 3 (AE1) gene. Blood* 91: 2146-2151, 1998.
- HASSOUN H, PALEK J: *Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. Blood Rev* 10: 129-147, 1996.
- HASSOUN H, VASSILIADIS JN, MURRAY J, NJOLSTAD PR, ROGUS JJ, BALLAS SK, SCHAFFER F, JAROLIM P, BRABEC V, PALEK J: *Characterization of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency. Blood* 90: 398-406, 1997.
- HASSOUN H, VASSILIADIS JN, MURRAY J, YI SJ, HANSPAL M, JOHNSON CA, PALEK J: *Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency due to an unstable truncated β spectrin. Blood* 87: 2538-2545, 1996.
- HASSOUN H, VASSILIADIS JN, MURRAY J, YI SJ, HANSPAL M, WARE RE, WINTER SS, CHIOU SS, PALEK J: *Molecular basis of spectrin deficiency in beta spectrin Durham. A deletion within beta spectrin adjacent to the ankyrin-binding site precludes spectrin attachment to the membrane in hereditary spherocytosis. J Clin Invest* 96: 2623-2629, 1995.
- HAYETTE S, CARRE G, BOZON M, ALLOISIO N, MAILLET P, WILMOTTE R, PASCAL O, REYNAUD J, REMAN O, STEPHAN JL, MORLE L, DELAUNAY J: *Two distinct truncated variants of ankyrin associated with hereditary spherocytosis. Am J Hematol* 58(1): 36-41, 1998.
- HAYETTE S, DHERMY D, DOS SANTOS ME, BOZON M, DRENCKHAHN D, ALLOISIO N, TEXIER P, DELAUNAY J, MORLE L: *A deletional frameshift mutation in protein 4.2 gene (allele 4.2 Lisboa) associated with hereditary hemolytic anemia. Blood* 85: 250-256, 1995a.

- HAYETTE S, MORLE L, BOZON M: *A point mutation in the protein 4.2 gene (allele 4.2 Tozeur) associated with hereditary hemolytic anaemia. Br J Haematol* **89**: 762-770, 1995b.
- HEMMING NJ, ANSTEE DJ, STARICOFF MA, TANNER MJA, MOHANDAS N: . *Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte J Biol Chem*: **270**, 5360-5366, 1995.
- HO MK, GUIDOTTI G: *A membrane protein from human erythrocytes involved in anion exchange. J Biol Chem* **250**: 675-683, 1975.
- HORNE WC, HUANG SC, BECKER PS, TANG TK, BENZ EJ JR: *Tissue-specific alternative splicing of protein 4.1 inserts an exon necessary for formation of the ternary complex with erythrocyte spectrin and F-actin. Blood* **82**: 2558-63, 1993.
- HUANG C-H, REID ME, XIE S-S, BLUMENFELD OO: *Human red cell Wright antigens: a genetic and evolutionary perspective on glycophorin A-band 3 interaction. Blood* **87**: 3942-3947, 1996.
- HUANG JP, TANG CJ, KOU GH, CHESI VT, BENZ EJ JR, TANG TK: *Genomic structure of the locus encoding protein 4.1. Structural basis for complex combinational patterns of tissue-specific alternative RNA splicing. J Biol Chem* **268**: 3758-3766, 1993.
- HUEBNER K, PALUMBO AP, ISOBE M, KOZAK CA, MONACO S, ROVERA G, CROCE CM, CURTIS PJ: *The α -spectrin gene is on chromosome 1 in mouse and man. Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3790-3793, 1985.
- INOUE T, KANZAKI A, YAWATA A, TSUJI A, ATA K, OKAMOTO N, WADA H, HIGO I, SUGIHARA T, YAMADA O, YAWATA Y: *Electron microscopic and physicochemical studies on disorganization of cytoskeletal network and integral protein (band 3) in red cells of band 4.2 deficiency with a mutation (codon 142 GCT→ACT). Int J Hematol* **59**: 157-175, 1994.
- IOLASCON A, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, PERROTTA S, ALLOISIO N, MORLE L, DELAUNAY J: *Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects. Haematologica* **83**: 240-257, 1998.
- IWASE S, IDEGUCHI H, TAKAO M, HORIGUCHI-YAMADA J, IWASAKI M, TAKAHARA S, SEKIKAWA T, MOCHIZUKI S, YAMADA H: *Band 3 Tokyo: Thr837→Ala837*

- substitution in erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolysis. Acta Haematol* 100: 200-203, 1998.
- JAROLIM P, BRABEC V, LAMBERT S, LIU S-C, ZHOU Z, PALEK J: *Ankyrin Prague: a dominantly inherited mutation of regulatory domain of ankyrin associated with hereditary spherocytosis. Blood* 76 (suppl1): 37a, 1990.
- JAROLIM P, MURRAY JL, RUBIN HL, TAYLOR WM, PRCHAL JT, BALLAS SK, SNYDER LM, CHROBAK L, MELROSE WD, BRABEC V, PALEK J: *Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. Blood* 88: 4366-4374, 1996.
- JAROLIM P, PALEK J, RUBIN HL, PRCHAL JT, KORSGREN C, COHEN CM: *Band 3 Tuscaloosa: PRO327-ARG327 substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein 4.2. Blood* 80: 523-529, 1992.
- JAROLIM P, RUBIN H, LIU SC: *Duplication of 10 nucleotides in the erythroid band 3 gene in a kindred with hereditary spherocytosis and band 3 protein deficiency (Band 3 Prague). J Clin Invest* 93: 121-130, 1994.
- JAROLIM P, RUBIN HL, BRABEC V, CHROBAK L, ZOLOTAREV AS, ALPER SL, BRUGNARA C, WICHTERLE H, PALEK J: *Mutations of conserved arginines in the membrane domain of erythroid band 3 lead to arease in membrane-associated band 3 and to the phenotype of hereditary spherocytosis. Blood* 85: 634-640, 1995a.
- JAROLIM P, RUBIN HL, BRABEC V, PALEK J: *Comparison of the ankyrin (AC)_n microsatellites in genomic DNA and mRNA reveals absence of one ankyrin mRNA allele in 20% of patients with hereditary spherocytosis. Blood* 85: 3278-3282, 1995b.
- JAROLIM P, RUBIN HL, BRABEC V, PALEK J: *A nonsense mutation 1669Glu-->Ter within the regulatory domain of human erythroid ankyrin leads to a selective deficiency of the major ankyrin isoform (band 2.1) and a phenotype of autosomal dominant hereditary spherocytosis. J Clin Invest* 95: 941-947, 1995c.
- JAROLIM P, WICHTERLE H, HANSPAL M, MURRAY J, RUBIN HL, PALEK J: *Beta spectrin PRAGUE: a truncated beta spectrin producing spectrin deficiency, defective spectrin heterodimer self-association and a phenotype of spherocytic elliptocytosis. Br J Haematol* 91: 502-510, 1995d.

- JENKINS JD, MADDEN DP, STECK TL: *Association of phosphofructokinase and aldolase with the membrane of the intact erythrocyte*. **J Biol Chem** 259: 9374-9378, 1984.
- JENKINS PB, ABOU-ALFA GK, DHERMY D, BURSAUX E, FEO C, SCARPA AL, LUX SE, GARBARZ M, FORGET BG, GALLAGHER PG: *A nonsense mutation in the erythrocyte band 3 gene associated with reased mRNA accumulation in a kindred with dominant hereditary spherocytosis*. **J Clin Invest** 97: 373-380, 1996.
- JENNINGS ML: *Structure and function of the red cell anion transport protein*. **Annu Rev Biophys Chem** 18: 397-430, 1989.
- KADONAGA JT, CARNER KR, MASIARZ FR, TIJAN R: *Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain*. **Cell** 51: 1079-1090, 1987.
- KANZAKI A, HAYETTE S, MORLE L, INOUE F, MATSUYAMA R, INOUE T, YAWATA A, WADA H, VALLIER A, ALLOISIO N, YAWATA Y, DELAUNAY J: *Total absence of protein 4.2 and partial deficiency of band 3 in hereditary spherocytosis*. **Br J Haematol** 99: 522-530, 1997.
- KANZAKI A, RABODONIRINA M, YAWATA Y, WILMOTTE R, WADA H, ATA K, YAMADA O, AKATSUKA J, IYORI H, HORIGUEHI M, NAKAMURA H, MISHIMA T, MORLÉ L, DELAUNAY J: *A deletional frameshift mutation of the β -spectrin gene associated with elliptocytosis in spectrin Tokyo ($\beta^{220/216}$)*. **Blood** 80: 2115-2121, 1992.
- KANZAKI A, YASUNAGA M, OKAMOTO N, INOUE T, YAWATA A, WADA H, ANDOH A, HODOHARA K, FUJIYAMA Y, BAMBA T, HARANO T, HARANO K, YAWATA Y: *Band 4.2 Shiga: 317 CGC-->TGC in compound heterozygotes with 142 GCT-->ACT results in band 4.2 deficiency and microspherocytosis*. **Br J Haematol** 91: 333-340, 1995a.
- KANZAKI A, YAWATA Y, YAWATA A: *Band 4.2 Komatsu: 523 GAT-TAT (175 Asp-Tyr) in exon 4 of the band 4.2 gene associated with ovalostomatocytosis and marked disruption of the cytoskeletal network*. **Int J Haematol** 61: 165-178, 1995b.
- KARINCH AM, ZIMMER WE, GOODMAN SR: *The identification and sequence of the actin-binding domain of human red blood cell*. **J Biol Chem** 265: 11833-11840, 1990.
- KENNEDY SP, WARREN SL, FORGET BG, MORROW JS: *Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid beta-spectrin*. **J Cell Biol** 115: 267-277, 1991.

- KIM I-G, MCBRIDE OW, WANG M, KIM S-Y, IDLER WW, STEINERT PM: *Structure and organization of the human transglutaminase 1 gene*. **J Biol Chem** 267: 7710-7717, 1992.
- KNOWLES DW, CHASIS JA, EVANS EA, MOHANDAS N: *Cooperative action between band 3 and glycophorin A in human erythrocytes: Immobilization of band 3 induced by antibodies to glycophorin A*. **Biophys J** 66: 1726-1732, 1994.
- KOCH CA, ANDERSON D, MORAN MF, ELLIS C, PAWSON T: *SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins*. **Science** 252: 668-674, 1991.
- KOLLERT-JONES A, WAGNER S, HUBNER S, APPELHANS H, DRENCKHAHN D: *Anion exchanger 1 in human kidney and oncocyoma differs from erythroid AE1 in its NH₂ terminus*. **Am J Physiol** 265: F813-F821, 1993.
- KORSGREN C, COHEN CM: *Purification and properties of human erythrocyte band 4.2: Association with the cytoplasmic domain of band 3*. **J Biol Chem** 261: 5536-5543, 1986.
- KORSGREN C, COHEN CM: *Associations of human erythrocyte band 4.2: Binding to ankyrin and to the cytoplasmic domain of band 3*. **J Biol Chem** 263: 10212-10218, 1988.
- KORSGREN C, COHEN CM: *Organization of the gene for human erythrocyte membrane protein 4.1: structural similarities with the gene for the α subunit of factor XIII*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88: 4840-4844, 1991.
- KORSGREN C, COHEN CM: *cDNA sequence, gene sequence, and properties of murine pallidin (band 4.2), the protein implicated in the murine pallid mutation*. **Genomics** 21: 478-485, 1994.
- KORSGREN C, LAWLER J, LAMBERT S, SPEICHER D, COHEN CM: *Complete amino acid sequences and homologies of human erythrocyte membrane protein 4.2*. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 613-617, 1990.
- KOTULA L, LAURY-KLEINTROP LD, SHOWE L, SAHR K, LINNENBACH AJ, FORGET B, CURTIS PJ: *The exon-intron organization of the human erythrocyte α -spectrin gene*. **Genomics** 9: 131-140, 1991.
- KUYPERS FA: *Phospholipid asymmetry in health and disease*. **Curr Opin Hematol** 5: 122-131, 1998.

- LAMBERT S, BENNETT V: *Postmitotic expression of ankyrinR and beta R-spectrin in discrete neuronal populations of the rat brain*. **J Neurosci** 13: 3725-3735, 1993.
- LAMBERT S, YU H, PRCHAL JT, LAWLER J, RUFF P, SPEICHER D, CHEUNG MC, KAN YW, PALEK J: *The cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin*. **Proc Natl Acad Sci** 87: 1730-1734, 1990.
- LANKES WT, FURTHMAYR H: *Moesin: A member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins*. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 8297-8301, 1991.
- LAWLER J, COETZER TL, PALEK J, JACOB HS, LUBAN N: *Sp alpha I/65: a new variant of the alpha subunit of spectrin in hereditary elliptocytosis*. **Blood** 66: 706-709, 1985.
- LECOMTE MC, DHERMY D, GAUTERO H, BOURNIER O, GALAND C, BOIVIN P: *L'elliptocytose héréditaire en Afrique de l'Ouest: fréquence et répartition des variants de la spectrine*. **Comptes Rendues de la Académie des Sciences** 306: 43-46, 1988.
- LECOMTE MC, DHERMY D, SOLIS C, ESTER A, FÉO C, GAUTERO H, BOURNIER O, BOIVIN P: *A new abnormal variant of spectrin in black patients with hereditary elliptocytosis*. **Blood** 65: 1208-1217, 1985.
- LECOMTE MC, GARBARZ M, GAUTERO H, BOURNIER O, GELAND C, BOIVIN P, DHERMY D: *Molecular basis of clinical and morphological heterogeneity in hereditary elliptocytosis with spectrin α I variants*. **Br J Haematol** 85: 584-595, 1993.
- LECOMTE MC, GARBARZ M, GRANDCHAMP B, FÉO C, GAUTERO H, DEVAUX I, BOURNIER O, GALAND C, D'AURIOL L, GALIBERT F, SAHR KE, FORGET BG, BOIVIN P, DHERMY D: *Sp α I/78: a mutation of the α I spectrin domain in a white kindred with HE and HPP phenotypes*. **Blood** 74: 1126-1133, 1989.
- LETO TL, MARCHESI VT: *A structural model of human erythrocyte protein 4.1*. **J Biol Chem** 259: 4603-4608, 1984.
- LIMA PR, GONTIJO JA, LOPES DE FARIA JB, COSTA FF, SAAD ST: *Band 3 Campinas: ael splicing mutation in the band 3 gene (AE1) associated with hereditary spherocytosis, hyperactivity of Na⁺/Li⁺ countertransport and an abnormal renal bicarbonate handling*. **Blood** 90: 2810-2818, 1997.

- LING E, DANILOV YN, COHEN CM: *Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation. J Biol Chem* **263**: 2209-2216, 1988.
- LIU S-C, DERICK LH, PALEK J: *Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. J Cell Biol* **104**: 527-536, 1987.
- LIU S-C, PALEK J: *Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. Nature* **285**: 586-588, 1980.
- LIU S-C, PALEK J, PRCHAL J, CASTLEBERRY RP: *Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. J Clin Invest* **68**: 597-605, 1981.
- LOMBARDO CR, WILLARDSON BM, LOW PS: *Localization of the protein 4.1-binding site on the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. J Biol Chem* **267**: 9540-9546, 1992.
- LORENZO F, DALLA VENEZIA N, MORLE L, BAKLOUTI F, ALLOISIO N, DUCLUZEAU MT, RODA L, LEFRANCOIS P, DELAUNAY J: *Protein 4.1 deficiency associated with an altered binding to the spectrin-actin complex of the red cell membrane skeleton. J Clin Invest* **94**: 1651-1656, 1994.
- LORENZO F, GIUDICE EM DEL, ALLOISIO N, MORLÉ L, FORISSIER A, PERROTTA S, SCIARRATTA G, IOLASCON A, DELAUNAY J: *Severe poikilocytosis associated with a de novo $\alpha 28$ Arg - Cys mutation in spectrin. Br J Haematol* **83**: 152-157, 1993.
- LOW PS: *Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: Center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. Biochim Biophys Acta* **864**: 145-167, 1986.
- LUX SE: *Hereditary defects in the membrane or metabolism of the red cell*. In: Cecil Textbook of Medicine 18th ed, WB Saunders Company, Philadelphia, pp909-917, 1988.
- LUX SE, JOHN KM, BENNETT V: *Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. Nature* **344**: 36-42, 1990a.
- LUX SE, JOHN KM, KOPITO RR, JOHN KM, HARRIS P, SHALEV O, CHILCOTE RR, MARCHESI SL, WATKINS PC, BENNETT V, MCINTOSH S, COLLINS FS, FRANCKE U, WARD DC, FORGET BG: *Cloning and characterization of band 3, the*

- human erythrocyte anion exchange protein (AE 1)*. **Proc Natl Acad Sci USA** 86: 9089-9093, 1989.
- LUX SE, PALEK J: *Disorders of Red Cell Membrane*. In: *Blood: Principles and Practice of Hematology* (ed. by RI Handlin, SE Lux, TP Stossel), JB Lippincott, Philadelphia, pp17021-1818, 1995.
- LUX SE, TSE WT, MENNINGER JC *et al*: *Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocytes ankyrin gene on chromosome 8*. **Nature** 345: 736-739, 1990b.
- MAILLET P, INOUE T, KANZAKI A, YAWATA A, KATO K, BAKLOUTI F, DELAUNAY J, YAWATA Y: *Stop codon in exon 30 (E2069X) of beta-spectrin gene associated with hereditary elliptocytosis in spectrin Nagoya*. **Hum Mutat** 8: 366-368, 1996.
- MAILLET P, VALLIER A, REINHART WH, WYSS EJ, OTT P, TEXIER P, BAKLOUTI F, TANNER MJ, DELAUNAY J, ALLOISIO N: *Band 3 Chur: a variant associated with band 3-deficient hereditary spherocytosis and substitution in a highly conserved position of transmembrane segment 11*. **Br J Haematol** 91: 804-810, 1995.
- MALIK S, SAMI M, WATTS A: *A role for band 4.2 in human erythrocyte band 3 mediated anion transport*. **Biochemistry** 32: 10078-10084, 1993.
- MARCHESI S, CONBOY J, AGRE P, LETSINGER JJ, MARCHESI VT, SPEICHER DW, MOHANDAS N: *Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis: I. Biochemical identification of rearrangements in the spectrin/actin binding domain and functional characterizations*. **J Clin Invest** 86: 516-523, 1990.
- MARCHESI SL, LETSINGER JT, SPEICHER DW, MARCHESI VT, AGRE P, HYUN B, GULATI G: *Mutant forms of spectrin α -subunits in hereditary elliptocytosis*. **J Clin Invest** 80: 191-198, 1987.
- MARÉCHAL J, WILMOTTE R, KANZAKI A, DHERMY D, GARBARZ M, GALAND C, TANG T K, YAWATA Y, DELAUNAY J: *Ethnic distribution of allele α^{LELY} , a low-expression allele of red cell spectrin α -gene*. **Br J Haematol** 90: 553-556, 1995.
- MARTIN ME, PIETTE J, YANIV M, TANG WJ, FOLK WR: *Activation of the polyoma virus enhancer by a murine activator protein 1 (AP-1) homolog and two contiguous proteins*. **Proc Natl Acad Sci USA** 85: 5839-5843, 1988.

- MATSUDA M, HATANO N, IDEGUCHI H, TAKAHIRA H, FUKUMAKI Y: *Ael mutation causing an aberrant splicing in the protein 4.2 gene associated with hereditary spherocytosis (protein 4.2Notame)*. **Hum Mol Genet** 4: 1187-1191, 1995.
- MATTAGAJASINGH SN, HUANG SC, BENZ EJ JR: *Direct evidence for a nuclear localization and function of protein 4.1 in the nucleus: In vivo association with mitotic apparatus proteins*. **Blood** 88 (Suppl 1): 276a, 1996.
- MCPHERSON RA, SAWYER WH, TILLEY L: *Rotational diffusion of the erythrocyte integral membrane protein band 3: Effect of hemichrome binding*. **Biochemistry** 31: 512-518, 1992.
- MICHAELY P, BENNETT V: *The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger*. **J Biol chem** 270: 22050-22057, 1995.
- MIRAGLIA DEL GIUDICE E, DUCLUZEAU MT, ALLOISIO N, WILMOTTE R, DELAUNAY J, PERROTTA S, CUTILLO S, IOLASCON A: $\alpha^{I/65}$ *hereditary elliptocytosis is in southern Italy: evidence for an African origin*. **Hum Genet** 89: 553-556, 1992.
- MIRAGLIA DEL GIUDICE E, HAYETTE S, BOZON M, PERROTTA S, ALLOISIO N, VALLIER A, IOLASCON A, DELAUNAY J, MORLE L: *Ankyrin Napoli: a deo deletional frameshift mutation in exon 16 of ankyrin gene (ANK1) associated with spherocytosis*. **Br J Haematol** 93: 828-34, 1996.
- MIRAGLIA DEL GIUDICE E, LOMBARDI C, FRANCESE M, NOBILI B, CONTE ML, AMENDOLA G, CUTILLO S, IOLASCON A, PERROTTA S: *Frequent de novo monoallelic expression of beta-spectrin gene (SPTB) in children with hereditary spherocytosis and isolated spectrin deficiency*. **Br J Haematol** 101: 251-254, 1998.
- MIRAGLIA DEL GIUDICE E, VALLIER A, MAILLET P, PERROTTA S, CUTILLO S, IOLASCON A, TANNER MJ, DELAUNAY J, ALLOISIO N: *Novel band 3 variants (bands 3 Foggia, Napoli I and Napoli II) associated with hereditary spherocytosis and band 3 deficiency: status of the D38A polymorphism within the EPB3 locus*. **Br J Haematol** 96: 70-76, 1997.
- MOON RT, NGAI J, WOLD BJ, LAZARIDES E: *Tissue-specific expression of distinct spectrin and ankyrin transcripts in erythroid and nonerythroid cells*. **J Cell Biol** 100: 152-160, 1985.

- MORLE L, BOZON M, ALLOISIO N, VALLIER A, HAYETTE S, PASCAL O, MONIER D, PHILIPPE N, FORGET BG, DELAUNAY J: *Ankyrin Bugey: a deo deletional frameshift variant in exon 6 of the ankyrin gene associated with spherocytosis*. **Am J Hematol** 54: 242-248, 1997.
- MORLÉ L, MORLÉ F, ROUX AF, GODET J, FORGET BG, DENOROY L, GARBARZ M, DHERMY D, KASTALLY R, DELAUNAY J: *Spectrin Tunis (Sp α I/78), an elliptocytogenic variant, is due to the CGG→TGG codon change (Arg→Trp) at position 35 of the α I domain*. **Blood** 74: 828-832, 1989.
- MORLÉ L, ROUX A-F, ALLOISIO N, POTHIER B, STARCK J, DENOROY L, MORLÉ F, RUDIGOZ R-C, FORGET BG, DELAUNAY J, GODET J: *Two elliptocytogenic α I/74 variants of the spectrin α I domain: Spectrin Culoz (GGT→GTT; α I 0 Gly→Val) and Spectrin Lyon (CTT→TTT; α I 43 Leu→Phe)*. **J Clin Invest** 86: 548-554, 1990.
- MORRIS MB, LUX SE: *Characterization of the binary interaction between human erythrocyte protein 4.1 and actin*. **Eur J Biochem** 231: 644-650, 1995.
- MURTHY SN, LIU T, KAUL RK, KOHLER H, STECK TL: *The aldolase binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH₂ terminus of band 3*. **J Biol Chem** 256: 11203-11208, 1981.
- NAJFELD V, BALLARD SG, MENNINGER J, WARD DC, BOUHASSIRA EE, SCHWARTZ RS, NAGEL RL, RYBICKI AC: *The gene for human erythrocyte protein 4.2 maps to chromosome 15q15*. **Am J Hum Genet** 50: 71-75, 1992.
- NAKASHIMA K, BEUTLER E: *Comparison of structure and function of human erythrocyte and human muscle actin*. **Proc Natl Acad Sci USA** 76: 935-938, 1979.
- NEUBERG M, ADAMKIEWICZ J, HUNTER JB, MULLER R: *A Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP1 binding site*. **Nature** 341: 243-245, 1989.
- OHANIAN V, WOLFE LW, JOHN KM, PINDER JC, LUX SE, GRATZER WB: *Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane proteins spectrin, actin, and 4.1*. **Biochemistry** 23: 4416-4420, 1984.

- ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA K, SEKIYA T: *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms*. **Proc Natl Acad Sci USA** 86: 2766-2770, 1989.
- ORLANDI PA, KLOTZ FW, HAYNES JD: *A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of Plasmodium falciparum recognizes the terminal neu5A(α 2-3)gal-sequences of glycophorin A*. **J Cell Biol** 116: 901-909, 1992.
- ORTWEIN R, OSLENDER KOHNEN A, DEUTICKE B: *Band 3, the anion exchanger of the erythrocyte membrane, is also a flippase*. **Biochim Biophys Acta** 1191: 317-323, 1994.
- OZCAN R, JAROLIM P, BRABEC V, LUX SE, EBER SW: *High frequency of frameshift/nonsense mutations of ankyrin-1 in Czech patients with dominant hereditary spherocytosis (DHS)*. **Blood** 88 (suppl1): 5a, 1996.
- OZCAN R, KUGLER W, FEURING-BUSKE M, SCHROTER W, LUX SE, EBER SW: *Parental mosaicism for ankyrin-1 mutations in two families with hereditary spherocytosis*. **Blood** 90 (suppl1): 4a, 1997.
- PALEK J: *Hereditary elliptocytosis and related disorders*. **Clin Haematol** 14: 45-87, 1985.
- PALEK J: *Hereditary elliptocytosis, spherocytosis and related disorders: consequences of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins*. **Blood Rev** 1: 147-168, 1987.
- PALEK J, LAMBERT S: *Genetics of the red cell membrane skeleton*. **Semin Hematol** 27: 290-332, 1990.
- PALEK J, SAHR KE: *Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect*. **Blood** 80: 308-330, 1992.
- PAPASSIDERI I, ANTONELOU M, KARABABA F, LOUTRADI-ANAGNOSTOU A, DELAUNAY J, GARITIS LH: *The frequency of allele alpha(LELY), a low expression allele of the gene encoding erythroid spectrin alpha-chain, in the Greek population*. **Haematologica** 84: 754-755, 1999.
- PARQUET N, DEVAUX I, BOULANGER L, GALAND C, BOIVIN P, LECOMTE MC, DHERMY D, GARBARZ M: *Identification of three novel spectrin α 1/74 mutations in hereditary elliptocytosis: further support for a triple-stranded folding unit model for the spectrin heterodimer contact site*. **Blood** 84: 303-308, 1994.

- PASCUAL J, CASTRESANA J, SARASTE M: *Evolution of the spectrin repeat*. **Bioessays** 19: 811-817, 1997.
- PASTERNAK GR, ANDERSON RA, LETO TL, MARCHESI VT: *Interactions between protein 4.1 and band 3*. **J Biol Chem** 260: 3676-3683, 1985.
- PERROTA S, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, ALLOISIO N, SCIARRATTA G, PINTO L, DELAUNAY J, CUTILLO S, IOLASCON A: *Mild elliptocytosis associated with the $\alpha 34\text{Arg}\rightarrow\text{Trp}$ mutation in spectrin Genova ($\alpha\text{I}/74$)*. **Blood** 83: 3346-3349, 1994.
- PERROTTA S, IOLASCON A, DE ANGELIS F, PAGANO L, COLONNA G, CUTILLO S, MIRAGLIA DEL GIUDICE E: *Spectrin Anastasia ($\alpha\text{I}/78$): a new spectrin variant ($\alpha\text{I} 45\text{ Arg}\rightarrow\text{Thr}$) with moderate elliptocytogenic potential*. **Br J Haematol** 89: 933-936, 1995.
- PERROTTA S, IOLASCON A, POLITO R, D'URZO G, CONTE ML, MIRAGLIA DEL GIUDICE E: *4.2 Nippon mutation in a non-Japanese patient with hereditary spherocytosis*. **Haematologica** 84: 660-662, 1999a.
- PERROTTA S, POLITO F, CONTE ML, NOBILI B, CUTILLO S, NIGRO V, IOLASCON A, AMENDOLA G: *Hereditary spherocytosis due to ael frameshift mutation in AE1 cytoplasmic COOH terminal tail: band 3 Vesuvio*. **Blood** 93: 2131-2132, 1999b.
- PETERS LL, BIRKENMEIER CS, BRONSON RT, WHITE RA, LUX SE, OTTO E, BENNETT V, HIGGINS A, BARKER JE: *Purkinje cell degeneration associated with erythroid ankyrin deficiency in nb/nb mice*. **J Cell Biol** 114: 1233-1241, 1991.
- PETERS LL, JINDEL HK, GWYNN B, KORSGREN C, JOHN KM, LUX SE, MOHANDAS N, COHEN CM, CHO MR, GOLAN DE, BRUGNARA C: *Mild spherocytosis and altered red cell ion transport in protein 4: 2-null mice*. **J Clin Invest** 103: 1527-1537, 1999.
- PETERS LL, LUX SE: *Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes*. **Semin Hematol** 30: 85-118, 1993.
- PETERS LL, SHIVDASANI RA, LIU SC, HANSPAL M, JOHN KM, GONZALEZ JM, BRUGNARA C, GWYNN B, MOHANDAS N, ALPER SL, ORKIN SH, LUX SE: *Anion exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton*. **Cell** 86: 917-927, 1996.

- PHILIPS MA, STEWART BE, QIN Q, CHAKRAVARTY R, FLOYD EE, JETTEN AM, RICE RH: *Primary structure of keratinocyte transglutaminase*. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 9333-9337, 1990.
- PHILIPS MA, STEWART BE, RICE RH: *Genomic structure of keratinocyte transglutaminase*. **J Biol Chem** 267: 2282-2286, 1992.
- PHILLIPP S, KNEUSSEL M, KONIG J, APPELHANS H: *Molecular of regulation of gene expression of the human erythroid anion exchanger (AE)1*. **FEBS Lett** 438: 315-320, 1998.
- PLATT OS, LUX SE, FALCONE JF: *A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin*. **J Biol Chem** 268: 24421-24426, 1993.
- PLUMB M, FRAMPTON J, WAINWRIGHT H, WALKER M, MACLEOD K, GOODWIN G, HARRISON P: *GATAAG: a cis-control region binding an erythroid-specific nuclear factor with a role in globin and non-globin gene expression*. **Nucleic Acids Res** 17: 73-92, 1989.
- POLAKOWSKA RR, EICKBUSH T, FALCIANO V, RAZVI F, GOLDSMITH LA: *Organization and evolution of the human epidermal keratinocyte transglutaminase 1 gene*. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 4476-4480, 1992.
- POTHIER B, MORLÉ L, ALLOISIO N, DUCLUZEAU MT, CAEDANI C, FÉO C, GARBARZ M, CHAVEROCHE I, DHERMY D, LECOMTE MC, BOIVIN P, DELAUNAY J: *Spectrin Nice (β 220/216): a shortened β -chain variant associated with an increase of the α I/74 fragment in a case of elliptocytosis*. **Blood** 69: 1759-1765, 1987.
- PRCHAL JT, MORLEY BJ, YOON S-H, COETZER TL, PALEK J, CONBOY JG, KAN YW: *Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte β -spectrin*. **Proc Nat Acad Sci USA** 84: 7468-7472, 1987.
- QUALTIERI A, BISCONTE MG, PASQUA A, BRIA M, BRANCATI C: *SP alpha I/65 hereditary elliptocytosis in Calabria (southern Italy)*. **Hum Genet** 95: 359-362, 1995.
- QUALTIERI A, PASQUA A, BISCONTE MG, LE PERA M, BRANCATI C: *Spectrin Cosenza: ael beta chain variant associated with Sp alpha I/74 hereditary elliptocytosis*. **Br J Haematol** 97: 273-278, 1997.
- RANDON J, BOULANGER L, MARÉCHAL J, GARBARZ M, VALLIER A, RIBEIRO L, TAMAGNINI G, DHERMY D, DELAUNAY J: *A variant of spectrin low-expression allele*

- alpha LELY carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. Br J Haematol* **88**: 534-540, 1994.
- RANDON J, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, BOZON M, PERROTTA S, DE VIVO M, IOLASCON A, DELAUNAY J, MORLE L: *Frequent de novo mutations of the ANK1 gene mimic a recessive mode of transmission in hereditary spherocytosis: three new ANK1 variants: ankyrins Bari, Napoli II and Anzio. Br J Haematol* **96**: 500-506, 1997.
- REID ME, TAKAKUWA Y, CONBOY J, TCHERNIA G, MOHANDAS N: *Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. Blood* **75**: 2229-2234, 1990.
- RING SM, TIPPETT P, SWALLOW DM: *Comparative immunochemical analysis of W_r^a eW_r^b red cell antigens. Vox Sang* **67**: 226-230, 1994.
- ROBBERSON BL, COTE GJ, BERGET SM: *Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. Molecular Cell Biology* **10**: 84-94, 1990.
- RODGERS W, GLASER M: *Characterization of lipid domains in erythrocyte membranes. Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1364-1368, 1991.
- ROUX A-F, MORLÉ F, GUETARNI D, COLONNA P, SAHR K, FORGET BG, DELAUNAY J, GODET J: *Molecular basis of $sp \alpha I/65$ hereditary elliptocytosis in north Africa: insertion of a TTG triplet between codons 147 and 149 in the α -spectrin gene from five unrelated families. Blood* **73**: 2196-2201, 1989.
- RYBICKI AC, HEATH R, WOLF JL, LUBIN RS, SCHWARTZ RS: *Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from patients with a Coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankyrin on the membrane. J Clin Invest* **81**: 893-901, 1988.
- RYBICKI AC, MUSTO S, SCHWARTZ RS: *Identification of band-3 binding site near the N-terminus of erythrocyte membrane protein 4.2. Biochem J* **309**: 677-681, 1995a.
- RYBICKI AC, MUSTO S, SCHWARTZ RS: *Decreased content of protein 4.2 in ankyrin-deficient normoblastosis (nb/nb) mouse red blood cells: evidence for ankyrin enhancement of protein 4.2 membrane binding. Blood* **86**: 3583-3589, 1995b.
- RYBICKI AC, QUI JJH, MUSTO S: *Human erythrocyte protein 4.2 deficiency associated with hemolytic anemia and a homozygous 40 glutamic acid-lysine substitution in the cytoplasmic domain of band 3 (band 3 Montefiore). Blood* **81**: 2155-61, 1993.

- RYBICKI AC, SCHWARTZ RS, HUSTEDT EJ, COBB CE: *Increased rotational mobility and extractability of band 3 from protein 4.2-deficient erythrocyte membranes: Evidence of a role for protein 4.2 in strengthening the band 3-cytoskeleton linkage*. **Blood** 88: 2745-2753, 1996.
- RYBICKI AC, SCHWARTZ RS, QIU JJ, GILMAN JG: *Molecular cloning of mouse erythrocyte protein 4.1: a membrane protein with strong homology with the transglutaminase supergene family*. **Mamm Genome** 5: 438-445, 1994.
- SAAD STO, COSTA FF, VICENTIM DL, SALLES TSI, PRANKE PHL: *Red cell membrane protein abnormalities in hereditary spherocytosis in Brazil*. **Brit J Haematol** 88: 295-299, 1994.
- SAHR KE, COETZER TL, MOY LS, DERICK LH, CHISHTI AH, JAROLIM P, LORENZO F, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, IOLASCON A, GALLANELLO R, CAO A, DELAUNAY J, LIU SC, PALEK J: *Spectrin Cagliari: an Ala to Gly substitution in helix 1 of β spectrin repeat 17 that severely disrupts the structure and self-association of the erythrocyte spectrin heterodimer*. **J Biol Chem** 268: 22656-22662: 1993.
- SAHR KE, DANIELS BP, HANSPAL M: *Identification of the proximal erythroid promoter region of the mouse anion exchanger gene*. **Blood** 88: 4500-4509, 1996.
- SAHR KE, LAURILA P, KOTULA L, SCARPA AL, COUPAL E, LETO TL, LINNENBACH AJ, WINKELMANN JC, SPEICHER DW, MARCHESI VT, CURTIS PJ, FORGET BG: *The complete cDNA and polypeptide sequence of human erythroid alfa spectrin*. **J Biol Chem** 265: 4434-4443, 1990.
- SAHR KE, TOBE T, SCARPA A, LAUGHINGHOUSE K, MARCHESI SL, AGRE P, LINNENBACH AJ, MARCHESI VT, FORGET BG: *Sequence and exon-intron organization of the DNA encoding the α 1 domain of human spectrin*. **J Clin Invest** 84: 1243-1252, 1989.
- SAHR KE, TAYLOR WM, DANIELS BP, RUBIN HL, JAROLIM P: *The structure and organization of the human erythroid anion exchanger (AE1) gene*. **Genomics** 24: 491-501, 1994.

- SCHISCHMANOFF PO, WINARDI R, DISCHER DE, PARRA MK, BICKNESE SE, WITKOWSKA HE, CONBOY JG, MOHANDAS N: *Defining of the minimal domain of protein 4.1 involved in spectrin-actin binding*. **J Biol Chem** 270: 21243-21250, 1995.
- SCHISCHMANOFF PO, YASWEN P, PARRA MK, LEE G, CHASIS JA, MOHANDAS N, CONBOY JG: *Cell-shape dependent regulation of protein 4.1 alternative splicing in mammary epithelial cells*. **J Biol Chem** 272: 10254-10259, 1997.
- SCHOFIELD AE, MARTIN PG, SPILLETT D, TANNER MJA: *The structure of human red blood cell anion exchanger (EPB3, AE1, band 3) gene*. **Blood** 84: 2000-2012, 1994.
- SCHRIER SL: *Red cell membrane biology- Introduction*. **Clin Haematol** 14: 1-12, 1985.
- SCHULMAN S, ROTH EFJ, CHENG B, RYBICKI AC, SUSSMAN II, WONG M, WANG W, RANNEY HM, NAGEL RL, SCHWARTZ RS: *Growth of Plasmodium falciparum in human erythrocytes containing abnormal membrane proteins*. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 7339-7343, 1990.
- SCHWARTZ RS, CHIU DT, LUBIN B: *Plasma membrane phospholipid organization in human erythrocytes*. **Curr Top Hematol** 5: 63-112, 1985.
- SHEETZ MP, SCHINDLER M, KOPPEL DE: *Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes*. **Nature** 285: 510-511, 1980.
- SINGER SJ, NICOLSON GL: *The fluid-mosaic model of the structure of cell membranes*. **Science** 175: 720-731, 1972.
- SPEICHER DW, DESILVA TM, SPEICHER KD, URSITTI JA, HEMBACH P, WEGLARZ L: *Location of the human red cell spectrin tetramer binding site and detection of a related 'closed' hairpin loop dimer using proteolytic footprinting*. **J Biol Chem** 268: 4227-4235, 1993.
- SPEICHER DW, MARCHESI VT: *Erythrocyte spectrin is composed of many homologous triple helical segments*. **Nature** 311: 177-180, 1984.
- SPEICHER DW, WEGLARZ L, DESILVA TM: *Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site*. **J Biol Chem** 267: 14775-14782, 1992.
- SUNG LA, CHIEN S, CHANG L-S, LAMBERT K, BLISS SA, BOUHASSIRA EE, NAGEL RL, SCHWARTZ RS, RYBICKI AC: *Molecular cloning of human protein 4.2: A major component of the erythrocyte membrane*. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 955-959, 1990.

- SUNG LA, CHIEN S, FAN Y-S, LIN CC, LAMBERT K, ZHU L, LAM JS, CHANG L-S: *Human erythrocyte protein 4.2: Isoform expression, differential splicing, and chromosomal assignment*. **Blood** 79: 2763-2770, 1992.
- TAKAKUWA Y, MOHANDAS N: *Modulation of erythrocyte membrane material properties by Ca^{2+} and calmodulin*. **J Clin Invest** 82: 394-400, 1988.
- TAKAOKA Y, IDEGUCHI H, MATSUDA M: *A novel mutation in the erythrocyte protein 4.2 of Japanese patients with hereditary spherocytosis (Protein 4.2 Fukuoka)*. **Br J Haematol** 88: 527-533, 1994.
- TANAKA T, KADOWAKI K, LAZARIDES E, SOBUE K: *Ca^{2+} -dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1*. **J Biol Chem** 266: 1134-1140, 1991.
- TANG TK, QIN Z, LETO T, CHESI VT, BENZ EJ JR: *Heterogeneity of mRNA and protein products arising from the protein 4.1 gene in erythroid and nonerythroid tissues*. **J Cell Biol** 110: 617-624, 1990.
- TANNER MJ: *The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review)*. **Mol Membr Biol** 14: 155-165, 1997.
- TANNER MJ, HIGH S, MARTIN PG, ANSTEE DJ, JUDSON PA, JONES TJ: *Genetic variants of human red cell membrane sialoglycoprotein β . Study of the alterations occurring in the sialoglycoprotein β gene*. **Biochem J** 250: 407-414, 1988.
- TANNER MJA: *Molecular and cellular biology of erythrocyte anion exchanger EAI*. **Semin Hematol** 30: 34-57, 1993.
- TANNER MJA: *The acid test for band 3*. **Nature** 382: 209-210, 1996.
- TELEN MJ, CHASIS JA: *Relationship of the human erythrocyte Wr^b antigen to an interaction between glycophorin A and band 3*. **Blood** 76: 842-848, 1990.
- THEVENIN BJ, LOW PS: *Kinetics and regulation of the ankyrin-band 3 interaction of the human red blood cell membrane*. **J Biol Chem** 265: 16166-16172, 1990.
- TILNEY LG, DETMERS P: *Actin in erythrocyte ghosts in its association with spectrin: evidence for a nonfilamentous form of these two molecules in situ*. **J Cell Biol** 66: 508-520, 1975.

- TOKUNAGA F, YAMADA M, MIYATA T, DING Y-L, HIRANAGA-KAWABATA M, MUTA T, IWANAGA S, ICHINOSE A, DAVIE EW: *Limulus hemocyte transglutaminase*. **J Biol Chem** 268: 252-261, 1993.
- TOMISHIGE M, SAKO Y, KUSUMI A: *Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton*. **J Cell Biol** 142: 989-1000, 1998.
- TSAI SF, MARTIN DI, ZON LI, D'ANDREA AD, WONG GG, ORKIN SH: *Cloning of cDNA of the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells*. **Nature** 339: 446-451, 1989.
- TSAI I-H, MURTHY SN, STECK TL: *Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. **J Biol Chem** 257: 1438-1442, 1982.
- TSE TW, LECOMTE M-C, COSTA FF, GARBARZ M, FÉO C, BOIVIN P, DHERMY D, FORGET BG: *Point mutation in the β -spectrin gene associated with α I/74 hereditary elliptocytosis*. **J Clin Invest** 86: 909-916, 1990.
- TSE WT, GALLAGHER PG, JENKINS PB, WANG Y, BENOIT L, SPEICHER D, WINKELMANN JC, AGRE P, FORGET BG, CHESI SL: *Amino-acid substitution in alpha-spectrin commonly coinherited with nondominant hereditary spherocytosis*. **Am J Hematol** 54: 233-241, 1997.
- TSE WT, GALLAGHER PG, POTHIER B, COSTA FF, SCARPA A, DELAUNAY J, FORGET BG: *An insertional frameshift mutation of the β -spectrin gene associated with elliptocytosis in spectrin Nice ($\beta^{220/216}$)*. **Blood** 78: 517-523, 1991.
- TSE WT, LUX SE: *Red blood cell membrane disorders*. **Br J Haematol** 104: 2-13, 1999.
- VONDENHOF A, OSLENDER A, DEUTICKE B, HAEST CW: *Band 3, an accidental flippase for anionic phospholipids?* **Biochemistry** 33: 4517-4520, 1994.
- WADA H, KANZAKI A, YAWATA A, INOUE T, KAKU M, TAKEZONO M, SUGIHARA T, YAMADA O, YAWATA Y: *Late expression of red cell membrane protein 4.2 in normal human erythroid maturation with seven isoforms of the protein 4.2 gene*. **Exp Hematol** 27: 54-62, 1999.
- WALDER JA, CHATTERJEE R, STECK TL, LOW PS, MUSSO GF, KAISER ET, ROGERS PH, ARNONE A: *The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane*. **J Biol Chem** 259: 10238-10246, 1984.

- WALENSKY LD, GASCARD P, FIELDS ME, BLACKSHAW S, CONBOY JG, MOHANDAS N, SNYDER SH: *The 13-kDa FK506 binding protein, FKBP13, interacts with a novel homologue of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1*. **J Cell Biol** 141: 143-153, 1998.
- WANG DN: *Band 3 protein: structure, flexibility and function*. **FEBS Lett** 346: 26-31, 1994.
- WAUGH SM, WALDER JA, LOW PS: *Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocyte membrane band 3 with hemichromes*. **Biochemistry** 26: 1777-1783, 1987.
- WEAARCHAKUL-BOONMARK N, JEONG J-M, MURTHY SNP, ENGEL JD, LORAND L: *Cloning and expression of chicken erythrocyte transglutaminase*. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 9804-9808, 1992.
- WICHTERLE H, HANSPAL M, PALEK J, JAROLIM P: *Combination of two mutant alpha spectrin alleles underlies a severe spherocytic hemolytic anemia*. **J Clin Invest** 98: 2300-2307, 1996.
- WIETH JO, ANDERSEN OS, BRAHM J, BJERRUM PJ, BORDERS CL: *Chloride-bicarbonate exchange in red blood cells: Physiology of transport and chemical modification of the binding sites*. **Phil Trans R Soc Lond (Biol)** 299: 383-399, 1982.
- WILLIAMS T, TIJAN R: *Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2*. **Genes Dev** 5: 670-682, 1991.
- WILLIAMS TJ, ADMON A, LUSCHER B, TIJAN R: *Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements*. **Genes Dev** 2: 1557-1569, 1988.
- WILMOTTE R, HARPER SL, URSITTI JA, ECHAL J, DELAUNAY J, SPEICHER DW: *The exon 46-encoded sequence is essential for stability of human erythroid alpha-spectrin and heterodimer formation*. **Blood** 90: 4188-4196, 1997.
- WILMOTTE R, MARECHAL J, DELAUNAY J: *Mutation at position -12 of intron 45 (c-->t) plays a prevalent role in the partial skipping of exon 46 from the transcript of allele alpha^{LELY} in erythroid cells*. **Br J Haematol** 104: 855-859, 1999.
- WILMOTTE R, MARÈCHAL J, MORLÉ L, BAKLOUTI F, PHILIPPE N, KASTALLY R, KOTULA L, DELAUNAY J, ALLOISIO N: *Low expression allele α^{LELY} of red cell*

- spectrin is associated with mutations in exon 40 ($\alpha^{V/41}$ polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. J Clin Invest* 91: 2091-2096, 1993.
- WILMOTTE R, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, MARÉCHAL J, PERROTA S, DE MATTIA D, DELAUNAY J, IOLASCON A: *A deletional frameshift mutation in spectrin β -gene associated with hereditary elliptocytosis in spectrin Napoli. Br J Haematol* 88: 437-439, 1994.
- WINARDI R, REID M, CONBOY J, MOHANDAS N: *Molecular analysis of glycophorin C deficiency in human erythrocytes. Blood* 81: 2799-2803, 1993.
- WINKELMANN JC, CHANG J-G, TSE WT, SCARPA AL, MARCHESI VT, FORGET BG: *Full-length sequence of the cDNA for human erythroid β -spectrin. J Biol Chem* 265: 11827-11832 1990a.
- WINKELMANN JC, COSTA FF, LINZIE BL, FORGET BG: *Beta spectrin in human skeletal muscle: Tissue-specific differential processing of 3' beta spectrin pre-mRNA generates a beta spectrin isoform with a unique carboxyl terminus. J Biol Chem* 265: 20449-20454, 1990b.
- WINKELMANN JC, FORGET BG: *Erythroid and nonerythroid spectrins. Blood* 81: 3173-3185, 1993.
- WORKMAN RF, LOW PS: *Biochemical analysis of potential sites for protein 4.1-mediated anchoring of the spectrin-actin skeleton to the erythrocyte membrane. J Biol Chem* 273: 6171-6176, 1998.
- YAWATA Y: *Red cell membrane protein band 4.2: phenotypic, genetic and electron microscopic aspects. Biochim Biophys Acta* 1204: 131-148, 1994.
- YOON SH, YU H, EBER S, PRCHAL JT: *Molecular defect of truncated β -spectrin associated with hereditary elliptocytosis: β -spectrin Göttingen. J Biol Chem* 266: 8490-8494, 1991.
- YU J, STECK TL: *Associations of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. J Biol Chem* 250: 9176-9184, 1975.
- ZACHOWSKY A, FAVRE E, CRIBIER S, HERVE P, DEVAUX PF: *Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. Biochemistry* 25: 2585-2590, 1986.

ZHU L, KAHWASH SB, CHANG LS: *Developmental expression of mouse erythrocyte protein 4.2 mRNA: evidence for specific expression in erythroid cells*. **Blood** 91: 695-705, 1998.