Η μοριακή βάση των Μεσογειακών Συνδρόμων

Joanne Traeger-Συνοδινού[1], Χριστίνα Βρεττού[1,2], Μανούσος Παπαδάκης[3], Εμμανουήλ Καναβάκης[1,2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Τα μεσογειακά σύνδρομα αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα με 270 εκατομμύρια φορείς (ετεροζυγώτες) παγκοσμίως και περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών. Τα γονίδια των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης εντοπίζονται σε δυο γονιδιακά συγκροτήματα (συμπλέγματα - clusters). Το σύμπλεγμα των α γονιδίων βρίσκεται κοντά στο τελομερικό άκρο του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 16 και το σύμπλεγμα των β γονιδίων στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11. Τα γονίδια αυτά συναντώνται στα γονιδιακά συμπλέγματα με τη σειρά της οντολογικής τους έκφρασης. Περισσότερες από 1000 μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στα α και β γονίδια οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο τη σύνθεση των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να εντοπίζονται μέσα στα ίδια τα γονίδια των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης ή έξω από αυτά μέσα στο σύμπλεγμα και συγκεκριμένα σε ρυθμιστικές αλληλουχίες που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων. Είναι γνωστό επίσης ότι η σύνθεση των γονιδίων αιμοσφαιρίνης επηρεάζεται από μεταλλάξεις σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες είτε εμπλέκονται στον ερυθροειδικό μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων είτε στο μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων γενικά. Έχουν περιγραφεί επίσης και σπάνια περιστατικά επίκτητης μορφής α ΜΑ, που σχεδόν πάντα συνοδεύονται από μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS).

Haema 2011; 2(3): 225-234 Copyright ΕΑΕ

Τα μεσογειακά σύνδρομα αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα[1] με 270 εκατομμύρια φορείς παγκοσμίως. Η εξάπλωση των παθολογικών αλληλομόρφων ευνοήθηκε στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, εξ' αιτίας της ανθεκτικότητας των φορέων στην ελονοσία. Η μετακίνηση των πληθυσμών όμως, καθώς και η εφαρμογή αποτελεσματικών προγραμμάτων πρόληψης έχουν αλλάξει τον επιδημιολογικό χάρτη της γης για τα μεσογειακά σύνδρομα.

Τα μεσογειακά σύνδρομα περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από μειωμένη σύνθεση μιας ή περισσοτέρων αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, οι οποίες σχηματίζουν το μόριο της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών κυττάρων. Οι αιμοσφαιρίνες είναι τετραμερή μόρια που αποτελούνται τα 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Οι δύο προέρχονται από τα γονίδια του συμπλέγματος των α αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και οι άλλες δύο από τα γονίδια των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης. Η κάθε μια αλυσίδα συνδέεται με μια ομάδα αίμης. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της ενηλίκου ζωής παρατηρείται μια αλλαγή στους τύπους της αιμοσφαιρίνης που συντίθενται εξ' αιτίας της αλλαγής στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων κατά την ανάπτυξη. Στους φυσιολογικούς ενήλικες η αιμοσφαιρίνη A (Hb A ($\alpha_2\beta_2$)) αναλογεί περίπου στο 97.5% της ολικής αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων, ενώ δυο άλλες αιμοσφαιρίνες η A_2 (Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$)) και η F (Hb F ($\alpha_2\gamma_2$)) περιορίζονται περίπου σε ποσοστά <2.5% και 1-2% αντίστοιχα.

Τα μεσογειακά σύνδρομα κατατάσσονται σύμφωνα με το είδος της αλυσίδας της οποίας η σύνθεση υπολείπεται. Οι βασικές κατηγορίες περιλαμβάνουν την α-Μεσογειακή Αναιμία (α-ΜΑ) που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των α αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και τη β Μεσογειακή Αναιμία (β-ΜΑ) που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των β. Συχνή επίσης είναι και η δβ Μεσογειακή Αναιμία (δβ-ΜΑ), που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των β και δ αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, ενώ σπανιότερα συναντώνται οι: γ-ΜΑ, γδβ-ΜΑ, δ-ΜΑ, και εγδβ-ΜΑ.

[1]Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα
[2]Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Μελέτης και Αντιμετώπισης Γενετικών και Κακοήθων Νοσημάτων της Παιδικής Ηλικίας, Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα
[3]Εργαστήριο Προγεννητικής Διάγνωσης, Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών
Συγγραφέας υπεύθυνη για επικοινωνία: Χριστίνα Βρεττού, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Τ.Κ. 115 27, Αθήνα, Τηλ.: 210 7467461, Fax: 210 7795553, E-mail: cvrettou@med.uoa.gr

Η Δομή των γονιδίων αιμοσφαιρίνης

Όλα τα λειτουργικά ανθρώπινα γονίδια των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης έχουν παρόμοια βασική δομή. Αποτελούνται από περίπου 1500 νουκλεοτίδια και έχουν 3 εξώνια και 2 ιντρόνια (IVS). Οι περιοχές των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης που συμμετέχουν στη σύνδεση με την αίμη, ή στην σύνδεση μεταξύ α/β αλυσίδων κυρίως κωδικοποιούνται στο εξώνιο 2. Οι συντηρημένες αλληλουχίες οι οποίες είναι πολύ σημαντικές στη λειτουργικότητα των γονιδίων βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις στα γονίδια αιμοσφαιρίνης. Υπάρχουν τουλάχιστο τρεις θέσεις που λειτουργούν ρυθμιστικά στην έκφραση των γονιδίων και βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή 200-300bp πριν από τη «θέση κάλυψης» (CAP site). Οι αλληλουχίες αυτές είναι οι: «TATA box» (περίπου 30bp), «CCAAT box» (μεταξύ 70-90bp), με τις CACCC ή/και CCGCCC ακόμα μακρύτερα.

Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5'UTR) του mRNA, των γονιδίων αιμοσφαιρίνης εντοπίζεται στα νουκλεοτίδια μεταξύ του CAP site και του κωδικονίου έναρξης (ATG) και περιλαμβάνει τις συντηρημένες αλληλουχίες που υποστηρίζουν την αντιγραφή του γονιδίου[2]. Η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR), εντοπίζεται μεταξύ του κωδικονίου τερματισμού (TAA) και της πολύ A ουράς (poly (A) tail). Περιέχει την υψηλά συντηρημένη αλληλουχία βάσεων AATAAA που βρίσκεται 20 νουκλεοτίδια πριν την πολύ (A) ουρά, η οποία κατά τη μεταγραφή της σηματοδοτεί την έναρξη της αποκοπής του 3' άκρου του πρωτογενούς μεταγράφου και την προσθήκη της πολυ (A) επέκτασης, προσφέροντας σταθεροποίηση στο μόριο του mRNA. Άλλες αλληλουχίες επίσης που βρίσκονται στην περιοχή 3' UTR φαίνεται ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό του πρώιμου mRNA, όπως η αλληλουχία των πολυπυριμιδινών αμέσως μετά το κωδικόνιο τερματισμού.

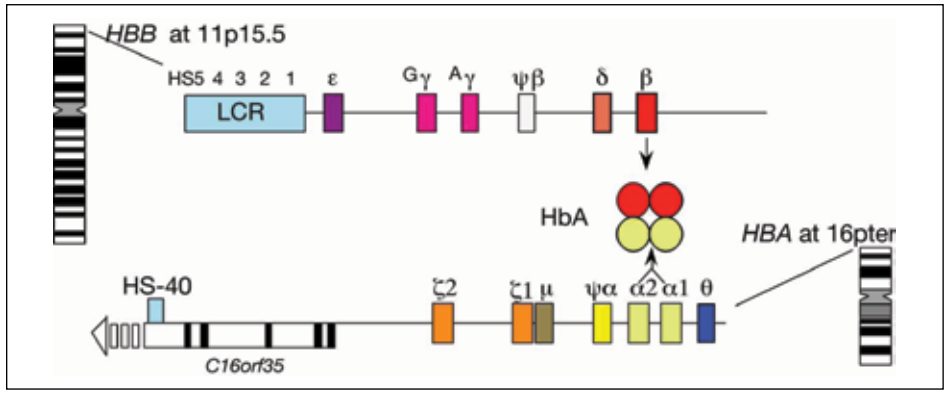
Τέλος η σωστή αποκοπή και επανασυγκόλληση του mRNA καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία συγκεκριμένων δινουκλεοτιδίων στις θέσεις εξώνιου/ιντρονίου (GT στο 5' άκρο και AG στο 3' άκρο του κάθε ιντρονίου) αλλά και από την αλληλουχία των γειτονικών βάσεων.

Οργάνωση των γονιδίων αιμοσφαιρίνης

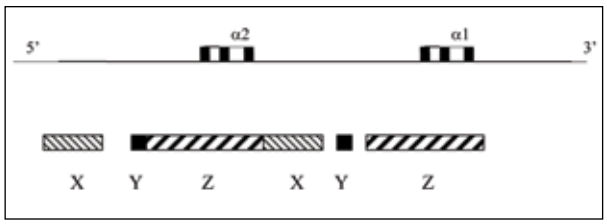
Τα γονίδια των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης εντοπίζονται σε δυο γονιδιακά συγκροτήματα (συμπλέγματα). Το σύμπλεγμα των α γονιδίων αιμοσφαιρίνης, βρίσκεται κοντά στο τελομερικό άκρο του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 16 (16p13.3, GenBank NG 000006) και περιέχει ένα εμβρυονικό γονίδιο ζ αλυσίδας (*HBZ* ή ζ2), δύο γονίδια α αλυσίδας (*HBA2, HBA1*, ή α2, α1), τρία ψευδογονίδια (*HBZps, HBD, HBA1PS ή* $\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$) και το γονίδιο θ αλυσίδας του οποίου η λειτουργικότητα δεν είναι γνωστή. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το ψευδογονίδιο $\psi\alpha_2$ παράγει ένα μετάγραφο το οποίο έχει μετονομαστεί σε μ-αλυσίδα, χωρίς όμως να έχει ανιχνευτεί πρωτεϊνικό παράγωγο[3] (Σχήμα 1).

Τα γονίδια α1 και α2 (*HBA1* και *HBA2*) είναι σχεδόν όμοια και διαφέρουν στην προσθήκη επτά νουκλεοτιδίων κοντά στο τέλος του ιντρονίου 2 στο α2 γονίδιο, δύο αντικαταστάσεις στο ιντρονιο 2 (+509 και +573 από τη θέση κάλυψης) και αρκετές νουκλεοτιδικές αλλαγές μετά το 3' άκρο του εξωνίου 3. Επί πλέον τα δύο α γονίδια είναι τοποθετημένα μέσα σε 3 μεγαλύτερες ομόλογες αλληλουχίες γνωστές ως περιοχές X, Y και Z, οι οποίες παίζουν μεγάλο ρόλο στο μηχανισμό για τη δημιουργία των πιο κοινών α^+ ελλειμμάτων (Σχήμα 2). Αν και τα δύο α γονίδια παρουσιάζουν υψηλή ομολογία (98.5%), το γονίδιο α2 παράγει από μόνο του δύο με τρεις φορές περισσότερη α αλυσίδα αιμοσφαιρίνης από το γονίδιο α1[4].

Το γονίδιο της β αλυσίδας αιμοσφαιρίνης (*HBB*) βρίσκεται στο σύμπλεγμα των β γονιδίων στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 (11p15.5, GenBank: NM_000518), μαζί με το εμβρυονικό γονίδιο της ε αλυσίδας (*HBE*), τα δύο εμβρυϊκά γονίδια των γ αλυσίδων (*HBG2* και *HBG1* ή Gγ και Aγ), το γονίδιο της δ αλυσίδας (*HBD*) που εκ-



Σχήμα 1. Η οργάνωση των συμπλεγμάτων των α και β γονιδίων αιμοσφαιρίνης (http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html).



Σχήμα 2. Τα δυο a γονίδια αιμοσφαιρίνης και η θέση των X, Y και Z ομόλογων περιοχών (boxes).

φράζεται περιορισμένα στην ενήλικο ζωή και ένα ψευδογονίδιο.

Τα γονίδια των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης συναντώνται στα γονιδιακά συμπλέγματα με τη σειρά της οντολογικής τους έκφρασης. Στο σύμπλεγμα των α αλυσίδων η σειρά των γονιδίων είναι 5' ζ2-ψζ1-μ- ψα- α2- α1- θ 3' και στο σύμπλεγμα των β αλυσίδων είναι 5' ε - Gγ - Aγ - ψβ - δ - β 3' (Σχήμα 1).

Η έκφραση των γονιδίων και στα δύο συμπλέγματα εξαρτάται από την παρουσία ρυθμιστικών περιοχών που βρίσκονται σε θέση cis. Στο σύμπλεγμα των α γονιδίων, οι ρυθμιστικές αυτές περιοχές (cis-acting sequences ή elements) αναφέρονται ως HS-40 και χαρακτηρίζονται από υπερευαίσθητες θέσεις (hypersensitive site, HS) για το ερυθροειδικό ένζυμο DNαση I. Το HS-40 εντοπίζεται 40kb προς το 5' άκρο του εμβρυονικού γονιδίου της ζ αλυσίδας. Η βασική ρυθμιστική περιοχή στο σύμπλεγμα των β γονιδίων (locus control region, LCR) περιλαμβάνει 5 υπερευαίσθητες θέσεις (HS) στην DNάση 1 (με ονόματα HS1-5) που εντοπίζονται μεταξύ 6 και 20 Kb προς το 5' άκρο του γονιδίου της ε αλυσίδας. Μια ακόμα ρυθμιστική περιοχή με 6 HS εντοπίζεται περίπου 20 Kb προς το 3' άκρο του γονιδίου της β αλυσίδας. Οι σημαντικές διαφορές στη δομή και τη λειτουργία των α και β γονιδίων αιμοσφαιρίνης συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Στους φυσιολογικούς ενήλικες η σύνθεση των τεσσάρων α γονιδίων αιμοσφαιρίνης είναι σχεδόν ίση με τη σύνθεση των δύο β γονιδίων ώστε να συντίθεται η αιμοσφαιρίνη, να γεμίζουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και να διατηρούν σταθερή ποσότητα αιμοσφαιρίνης (MCH) και σταθερό μέγεθος (MCV)[5].

Περισσότερες από 1000 μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στα α και β γονίδια οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο τη σύνθεση των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης (http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html, προσβάσιμες επίσης στη HbVar στη ηλεκτρονική διεύθυνση http://www.bx.psu.edu). Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων εντοπίζεται στα ίδια τα γονίδια ή στις γειτονικές τους περιοχές. Υπάρχουν όμως και μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις ρυθμιστικές αλληλουχίες της έκφρασης των γονιδίων μέσα στο σύμπλεγμα. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η σύνθεση των γονιδίων αιμοσφαιρίνης μπορεί να επηρεάζεται από μεταλλάξεις σε άλλες περιοχές στο γονιδίωμα οι οποίες είτε εμπλέκονται στον ερυθροειδικό μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων είτε στο μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων γενικά (trans-acting factors).

Πίνακας 1. Τα χαρακτηριστικά των συμπλεγμάτων των α και β γονιδίων αιμοσφαιρίνης

Χαρακτηριστικά	Σύμπλεγμα των α γονιδίων 16p13.3	Σύμπλεγμα των β γονιδίων 11p15.5
Ρυθμιστική περιοχή	Ενεργοποιητής	Locus control region (LCR)
Γονιδιακή πυκνότητα	Υψηλή	Χαμηλή
Περιεκτικότητα σε GC	54%	~40%
Νησίδες CpG	Κοινά	Δεν υπάρχουν
Επαναλήψεις Alu	25%	~5%
Επαναλήψεις LINE *	Rare	Present
Χρωματίνη	ανοιχτή	κλειστή > ανοιχτή
Χρόνος αντιγραφής	Νωρίς	Αργά > νωρίς
Συχνότερες μεταλλάξεις	Ελλείμματα	Σημειακές μεταλλάξεις

Επαναλήψεις LINE = Long interspersed repeats

Μοριακή Βάση της α Μεσογειακής Αναιμίας

Έχουν περιγραφεί, παγκοσμίως, περισσότερες από 80 διαφορετικές μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν α ΜΑ (http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html). Η πλειοψηφία των διαταραχών αυτών είναι ελλείμματα τα οποία απομακρύνουν ολόκληρο ή μέρος του συμπλέγματος των α γονιδίων. Πιο σπάνιες είναι οι σημειακές μεταλλάξεις ή τα μικρά ελλείμματα μέσα στα δυο α γονίδια αιμοσφαιρίνης. Οι μεταλλάξεις εκείνες οι οποίες αποφέρουν μερική απώλεια στη σύνθεση των α αλυσίδων από το παθολογικό χρωμόσωμα είναι γνωστές ως μεταλλάξεις α^+ (ή α ΜΑ 2), ενώ εκείνες που προκαλούν ολοκληρωτική απώλεια της σύνθεσης των α γονιδίων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις α^0 (ή α ΜΑ 1). Χρησιμοποιείται συγκεκριμένος τρόπος για το συμβολισμό των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων. Ο συμβολισμός «αα» αντιπροσωπεύει ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο με δυο α γονίδια, ο συμβολισμός «-α» αντιπροσωπεύει έλλειμμα ενός α γονιδίου, ο «--» έλλειμμα και των δύο α γονιδίων από το ίδιο αλληλόμορφο, και ο «$\alpha^T\alpha$» ή «$\alpha\alpha^T$» αντιπροσωπεύει γονίδια με σημειακή μετάλλαξη στο α2 ή στο α1 γονίδιο, αντί-

στοιχα. Χρησιμοποιείται συχνά εκθέτης για να δηλώσει το μέγεθος του ελλείμματος ή τη φύση της σημειακής μετάλλαξης ή του πληθυσμού στον οποίο πρωτοπεριγράφηκε η μετάλλαξη π.χ. $-\alpha^{3.7}$ δηλώνει ένα έλλειμμα α^{+} στο οποίο λείπουν 3.7kb, ή $--^{SEA}$, δηλώνει ένα κοινό έλλειμμα α^{0} που πρωτοπεριγράφηκε σε πληθυσμό της ΝΑ Ασίας, ή $\alpha^{PolyA}\alpha$ δηλώνει μια σημειακή μετάλλαξη στο α2 γονίδιο που επηρεάζει τη θέση πολυαδενυλίωσης.

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που ευθύνονται για α ΜΑ αφορούν ελλείμματα τα οποία αφήνουν ένα μόνο λειτουργικό α γονίδιο στο χρωμόσωμα. Η ύπαρξη διπλασιασμένων ομόλογων περιοχών εκατέρωθεν των α γονιδίων ευνοεί φαινόμενα άνισων επιχιασμών κατά τη διάρκεια της μείωσης, όταν τα ομόλογα χρωμοσώματα δεν βρίσκονται σε σωστή «ευθυγράμμιση» (αντιστοίχιση) μεταξύ τους. Αποτέλεσμα του άνισου επιχιασμού είναι η δημιουργία ελλειμμάτων. Τρεις τύποι Ελλειμμάτων, μεγέθους 3.7kb δημιουργούνται μεταξύ των γονιδίων α1 και α2, εξ αιτίας άνισου επιχιασμού (ανασυνδυασμού) μεταξύ των περιοχών Z (Σχήμα 2) και είναι τα: $-\alpha^{3,7I}$, $-\alpha^{3,7II}$, $-\alpha^{3,7III}$, με αντίστοιχη φαινοτυπική ετερογένεια. Τα δυο πρώτα έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γονιδίου που ομοιάζει με το α1 και το τρίτο σε ένα υβριδικό γονίδιο που ομοιάζει με το α2. Αντίστοιχα, άνισος επιχιασμός μεταξύ των περιοχών X (Σχήμα 2) οδηγεί στη δημιουργία ελλείμματος 4.2kb το οποίο αφαιρεί ολόκληρο το γονίδιο α2. Και στις δύο περιπτώσεις άνισου επιχιασμού προκύπτουν δύο χρωμοσώματα εκ των οποίων το ένα υπολείπεται ενός γονιδίου α και το άλλο έχει ένα επιπλέον α γονίδιο ($\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ και $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$). Υπάρχουν περισσότεροι από 250 εκατομμύρια φορείς α^{+} ΜΑ στον κόσμο, με μεγαλύτερη συχνότητα στους πληθυσμούς της Ινδίας, της ΝΑ Ασίας και της Αφρικής. Η νόσος συναντάται λιγότερο συχνά στη Μεσόγειο και τη Μέση Ανατολή.

Η πλειοψηφία των ελλειμμάτων της α ΜΑ που προκύπτουν εξ αιτίας άνισου ανασυνδυασμού συνήθως αφαιρούν και τα δύο α γονίδια στο χρωμόσωμα που πλήττεται και σε κάποιες περιπτώσεις ολόκληρο το σύμπλεγμα των α γονιδίων αιμοσφαιρίνης δημιουργώντας το γενετικό αίτιο για α^{0} ΜΑ. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 20 τέτοια ελλείμματα παγκοσμίως. Τα ελλείμματα αυτά δεν παρουσιάζουν περιοχές με εμφανή ομολογία στα σημεία κοπής τους και μπορούν να καταταγούν σε τρεις επί μέρους ομάδες που αφορούν αυτά που πρόεκυψαν από: α) επανασύνδεση μη ομόλογων θραυσμάτων, β) ανασυνδυασμό μεταξύ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών Alu, και γ) τελομερική σταθεροποίηση τμημάτων στα οποία αποκόπηκε το τελικό άκρο του χρωμοσώματος 16. Επί πλέον έχουν χαρακτηριστεί διάφορα ελλείμματα, τα οποία αφήνουν ανέπαφα τα α γονίδια αλλά αφαιρούν ρυθμιστικές περιοχές όπως την περιοχή HS-40, μαζί με διαφορετικού μεγέθους γειτονικές περιοχές. Στις περιπτώσεις αυτές, ενώ τα α γονίδια υπάρχουν, δεν εκφράζονται προκαλώντας φαινότυπο α ΜΑ.

Τέλος έχει περιγραφεί, σε ένα περιστατικό, ένα έλλειμμα περίπου 18kb, που αφαιρεί μόνο τα α1 και q γονίδια και προκαλεί α^{0} ΜΑ. Το υπόλοιπο σύμπλεγμα των α γονιδίων περιλαμβανομένου του α2 γονιδίου και των ρυθμιστικών περιοχών παραμένει ανέπαφο αλλά παραδόξως το α2 γονίδιο παραμένει, μεταγραφικά ανενεργό. Όταν υπάρχει το έλλειμμα αφαιρείται ένα τμήμα του γονιδίου *LUC7L* και ταυτόχρονα προσεγγίζει το α2 γονίδιο. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση από ότι τα α γονίδια. Το τροποποιημένο μετάγραφο του RNA από το *LUC7L* προάγει τη μεθυλίωση της νησίδας CpG του α2 γονιδίου καταστέλλοντας την έκφραση του. Ο μηχανισμός αυτός προσομοιάζει αυτόν της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X και της γονιδιακής αποτύπωσης αποκαλύπτοντας έναν καινούργιο παθογενετικό μηχανισμό[6].

Τα περισσότερα ελλείμματα που προκαλούν α^{o} ΜΑ είναι σποραδικά αν και τέσσερα είναι τα πιο συχνά: τα ελλείμματα $--^{Med}$ και $(-\alpha)^{20.5}$ που συναντώνται στους μεσογειακούς πληθυσμούς και τα $--^{SEA}$ και $--^{FIL}$ στη ΝΑ Ασία.

Υπάρχουν περισσότερες από 40 σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές που προκαλούν α ΜΑ. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται πιο συχνά στο α2 γονίδιο και λιγότερο στο α1. Περίπου οι μισές από τις διαταραχές αυτές επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA ή τη μετάφραση. Υπάρχει επίσης μια ενδιαφέρουσα ομάδα μεταλλάξεων η οποία προκαλεί μετα-μεταφραστική αστάθεια του αιμοσφαιρινικού πολυπεπτιδικού παραγώγου με φαινότυπο α ΜΑ, αφού η σύνθεση της α αλυσίδας αιμοσφαιρίνης είναι μειωμένη.

Πολλές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις συντηρημένες αλληλουχίες στις περιοχές αποκοπής και επανασυγκόλλησης του mRNA έχουν περιγραφεί τόσο στο α1 όσο και στο α2 γονίδιο, και όλες έχουν σαν αποτέλεσμα την ολοκληρωτική καταστολή της παραγωγής της α αλυσίδας από το παθολογικό γονίδιο. Ένα κοινό παράδειγμα περιλαμβάνει το έλλειμμα πέντε νουκλεοτιδίων που αφαιρεί το δινουκλεοτίδιο GT (θέση δότη κατά την επεξεργασία του mRNA) στο 5΄ άκρο του ιντρονίου 1 του α2 γονιδίου (α2 IVS1 GAGG<u>GT</u>GAGG>GAGG, γνωστό ως $\alpha^{Hph}\alpha$).

Υπάρχουν ωστόσο τουλάχιστο τέσσερεις γνωστές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA στις οποίες περιλαμβάνονται νουκλεοτιδικές αλλαγές στην ουρά πολυαδενυλίωσης του α2 γονιδίου (π.χ. AATAAA>AATAAG και AATAAA> AATGAA). Οι αλλαγές αυτές φαίνεται να συνοδεύονται με έναν σχετικά βαρύ φαινότυπο α ΜΑ, προφανώς εξ αιτίας της καταστολής της μεταγραφής και από το α1 γονίδιο που είναι αποτέλεσμα του μηχανισμού της μεταγραφικής αλληλεπίδρασης των δύο γονιδίων[7].

Οι διαταραχές κατά τη μετάφραση του RNA προκαλούνται από μεταλλάξεις: στο κωδικώνιο έναρξης, στο κωδικώνιο τερματισμού, σε μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου ή μη νοηματικές μεταλλάξεις. Μεταλλάξεις στο

κωδικώνιο έναρξης έχουν βρεθεί και στα δύο α γονίδια, ενώ έχει περιγραφεί και στο μοναδικό α γονίδιο που είχε παραμείνει σε ένα χρωμόσωμα με έλλειμμα που προκαλεί α^+ ΜΑ. Πέντε διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί στο κωδικώνιο τερματισμού οι οποίες όλες πλήττουν το α2 γονίδιο. Όλες οι μεταλλάξεις στο κωδικώνιο τερματισμού έχουν σαν αποτέλεσμα αντί για τον τερματισμό της μεταγραφής, την ενσωμάτωση ενός αμινοξέος και την παραγωγή μιας παθολογικής α αλυσίδας αιμοσφαιρίνης (από 31 αμινοξέα). Αυτές οι επιμηκυμένες α αλυσίδες συντίθενται σε χαμηλότερα επίπεδα αλλά έχουν την τάση να κατακρημνίζονται στα ερυθροκύτταρα προκαλώντας διαταραχές στη λειτουργία των ερυθροκυττάρων και των κυτταρικών μεμβρανών. Οι πιο κοινές παθολογικές αιμοσφαιρίνες που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο κωδικώνιο λήξης του α2 γονιδίου είναι: η Hb Constant Spring (α2 cd142 TAA>CAA) η οποία συναντάται συχνά στη ΝΑ Ασία, Η Hb Icaria (α2cd142 TAA>AAA) η οποία δεν είναι σπάνια στην Ελλάδα. Άλλες μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην μετάφραση του RNA είναι μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου ή μη νοηματικές μεταλλάξεις που συναντώνται κυρίως στο α2 γονίδιο και κάποιες φορές στο α1.

Υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός μεταλλάξεων που αφορούν σημειακές αντικαταστάσεις ή μικρά ελλείμματα και προκαλούν τη σύνθεση ασταθών α αλυσίδων αιμοσφαιρίνης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτές οι παθολογικές αλυσίδες είναι τόσο ασταθείς που δεν ανιχνεύονται καν σε πρωτεϊνικό επίπεδο και γίνονται αντιληπτές μόνο στην αλληλουχία του DNA του γονιδίου. Οι παθολογικές αυτές αλυσίδες είναι αιματολογικά «σιωπηρές» στους φορείς, όταν όμως συνδυαστούν με άλλες μεταλλάξεις α ΜΑ μπορεί να προκαλέσουν ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων όπως αιμοσφαιρινοπάθεια Η ή ενδιάμεση ΜΑ[8-10]. Σε σπάνιες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις αυτές σε ομόζυγη κατάσταση ή σε συνδυασμό με ελλείμματα α^0 μπορεί να προκαλέσουν εμβρυϊκό ύδρωπα[11,12]. Τυπικά παραδείγματα τέτοιων μεταλλάξεων είναι οι: Hb Quong Sze (α2 cd125 CTG>CCG, Leu>Pro), Hb Agrinio (α2 cd29 CTG>CCG, Leu>Pro) και η Hb Taybe (α1 cd38 ή cd39 delACC, Thr).

Στην περίπτωση του ελληνικού πληθυσμού η ανάλυση των γονοτύπων σε περιστατικά με HbH αποκάλυψε ότι το πιο συχνό έλλειμμα που συναντάται σε ποσοστό >50% των παθολογικών αλληλομόρφων είναι το $-\alpha^{3.7}$. Ακολουθούν τα $-^{MED}$ και $-\alpha^{20.5}$ ενώ σπανιότερα είναι τα $-\alpha^{4.2}$ και $-\alpha^{5.2}$. Οι συχνότερες σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές που προκαλούν α ΜΑ στην Ελλάδα είναι η α^{TSAUDI}, που εντοπίζεται στην ουρά πολυαδενυλίωσης του α2 (AATAAA>AATAAG), και η α^{Hph}. Σε μικρότερη συχνότητα συναντώνται η α^{TPA} στην ουρά πολυαδενυλίωσης του α2 (AATAAA>AATAAA) καθώς και οι μεταλλάξεις που προκαλούν τις υπερασταθείς αιμοφαιρίνες Hb Agrinio, και Hb Icaria[9]. Σπανιότερα συναντώνται μεταλλάξεις στο α1 ή το α2 γονίδιο που προκαλούν τη σύνθεση των υπερασταθών αιμοσφαιρινών και συνοδεύονται με εικόνα α ΜΑ όπως η Hb Taybe, η Hb Heraklion (α1, cd36/37 delCCC, Pro), η Hb Adana (α1 ή α2, cd59 GGC>GAC, Gly>Asp)[13-15].

Παραλλαγές της α Μεσογειακής Αναιμίας

Υπάρχουν δύο είδη α ΜΑ που συνοδεύονται από πνευματική καθυστέρηση, γνωστές ως σύνδρομα ATR-16 και ATR-X (OMIM #141750 και OMIM #301040, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο ATR-16 είναι φορείς μεγάλων ελλειμμάτων (1-2 Mb) στο τελομερικό άκρο του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 16, στο οποίο περιλαμβάνεται και το σύμπλεγμα των α γονιδίων. Το σύνδρομο έχει εκδήλωση α ΜΑ με ποικίλης βαρύτητας επιπτώσεις τόσο σε επίπεδο ανάπτυξης όσο και νοητικής υστέρησης. Οι ανωμαλίες που παρατηρούνται στο σύνδρομο αυτό οφείλονται προφανώς στην έλλειψη γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορους μηχανισμούς που σχετίζονται με την ανάπτυξη[5].

Το σύνδρομο ATR-X είναι ένα φυλοσύνδετο νόσημα που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο ATR-X που βρίσκεται στη θέση Xq13.3. Οι άρρενες ασθενείς παρουσιάζουν ήπιας βαρύτητας α ΜΑ με βαρύτατη πνευματική καθυστέρηση, χαρακτηριστικό προσωπείο και άλλες συγγενείς ανωμαλίες. Η πρωτεΐνη ATRX είναι μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (chromatin-associated remodelling), που επιδρά στην έκφραση πολλών άλλων γονιδίων κατά την ανάπτυξη. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την έκφραση των α γονιδίων αιμοσφαιρίνης αλλά όχι για την έκφραση των β [16].

Υπάρχουν επίσης πάρα πολύ σπάνια περιστατικά μιας επίκτητης μορφής α ΜΑ, που σχεδόν πάντα συνοδεύονται από μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS). Έχουν αναγνωριστεί δύο τουλάχιστον μηχανισμοί για την επίκτητη α ΜΑ: η δημιουργία επίκτητου ελλείμματος στο σύμπλεγμα των α γονιδίων αιμοσφαιρίνης που εμφανίζεται μεμονωμένα σε νεοπλασματικό κλώνο και συχνότερα ή δημιουργία σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο της ρυθμιστικής πρωτεΐνης ATRX που την απενεργοποιεί, με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης των α γονιδίων[17-19].

Τέλος περιγράφηκε μια σπάνια μορφή α ΜΑ που οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη (SNP) μεταξύ των ζ και ψζ γονιδίων και δημιουργεί έναν καινούριο υποκινητή που αναγνωρίζεται από τον ερυθροειδικό μεταγραφικό παράγοντα GATA1 έχοντας σαν αποτέλεσμα την έκφραση μιας εξωγονιδιακής περιοχής. Ο υποκινητής αυτός ανταγωνίζεται τους υποκινητές των α γονιδίων στο ίδιο χρωμόσωμα περιορίζοντας, σε μεγάλο βαθμό, την έκφρασή τους[20].

Κλινική ετερογένεια της α Μεσογειακής Αναιμίας

Σύμφωνα με τον αριθμό των α γονιδίων των οποίων έχει επηρεαστεί η λειτουργικότητα, έχουν χαρακτηριστεί τέσσερεις βασικοί διαφορετικοί αιματολογικοί και κλινικοί φαινότυποι:

α) Φορείς που παρουσιάζουν από καθόλου έως ελάχιστες διαταραχές στα ερυθροκύτταρά τους. Αυτοί έχουν ένα επηρεασμένο α γονίδιο είτε λόγω ελλείμματος είτε λόγω μιας σημειακής μετάλλαξης που προκαλεί α^+ ΜΑ (τύπος α ΜΑ 2).

β) Φορείς με αιματολογικά ευρήματα, κυρίως μικροκυτταρικά και υπόχρωμα ερυθροκύτταρα και φυσιολογικά ή σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Αυτοί είτε φέρουν μεταλλάξεις που προκαλούν α^0 ΜΑ (τύπος α ΜΑ 1), είτε είναι ομοζυγώτες για ελλείμματα που προκαλούν α^+ ΜΑ.

γ) Ασθενείς με μια ενδιάμεσης βαρύτητας κλινική συμπτωματολογία και αιματολογική εικόνα γνωστή ως αιμοσφαιρινοπάθεια Η (Hb H). Η αιμοσφαιρινοπάθεια Η είναι η σοβαρότερη, συμβατή με τη ζωή, μορφή α ΜΑ, αν και είναι κλινικά είναι μικρότερης βαρύτητας από τους περισσότερους τύπους β ΜΑ. Προκαλείται όταν μεταλλάξεις α ΜΑ συγκληρονομηθούν με αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεση των α αλυσίδων σε επίπεδο σχεδόν ισοδύναμο με αυτό που αντιστοιχεί σε ένα λειτουργικό α γονίδιο.

δ) Εμβρυϊκός ύδρωπας που οφείλεται συνήθως στην συγκληρονόμηση δύο μεταλλάξεων α^0 ΜΑ και επομένως στην ολοκληρωτική απουσία της παραγωγής της α αλυσίδας αιμοσφαιρίνης[8,21]. Έχουν αναφερθεί κάποιες σπάνιες μορφές εμβρυϊκού ύδρωπα λόγω ομόζυγης κατάστασης μιας υπερασταθούς α αλυσίδας αιμοσφαιρίνης ή συνύπαρξη υπερασταθούς αλυσίδας με έλλειμμα α^0 ΜΑ[11,12]. Το εμβρυϊκό αίμα αποτελείται κυρίως από την Hb Bart's (γ4), η οποία λειτουργικά είναι ανίκανη να μεταφέρει οξυγόνο, και μικρές ποσότητες από Hb Portland I και Portland II (ζ2γ2, ζ2β2), οι οποίες υποστηρίζουν την επιβίωση του εμβρύου στο τελευταίο στάδιο της εγκυμοσύνης. Βαριά αναιμία του εμβρύου οδηγεί σε ασφυξία, εμβρυϊκό ύδρωπα, και θάνατο αμέσως μετά τη γέννηση ή στο νεογνό. Η προγεννητική διάγνωση μπορεί να εντοπίσει και κατά συνέπεια να αποτρέψει τις σοβαρές επιπλοκές που δημιουργούνται συχνά στις εγκυμοσύνες ενός υδρωπικού εμβρύου.

Η μοριακή βάση της β Μεσογειακής Αναιμίας

Περισσότερες από 200 μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα ότι επηρεάζουν την έκφραση των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης (http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html). Σε αντίθεση με την α ΜΑ η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών είναι σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές για παράδειγμα αντικαταστάσεις μιας βάσης, ελλείμματα ή ενθέσεις λίγων νουκλεοτιδίων. Στους πληθυσμούς τους οποίους η ΜΑ είναι συχνή, την πλειοψηφία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων καλύπτουν λίγες κοινές μεταλλάξεις και στα υπόλοιπα παθολογικά αλληλόμορφα συναντάται ένας μεγαλύτερος αριθμός σπάνιων μεταλλάξεων.

Οι μεταλλάξεις οι οποίες περιορίζουν τη σύνθεση των β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης είναι γνωστές ως μεταλλάξεις β^+ ΜΑ, ενώ αυτές οι οποίες καταργούν ολοκληρωτικά τη σύνθεσή τους ως μεταλλάξεις β^0 ΜΑ. Κάποιες μεταλλάξεις που επιτρέπουν σε ένα μεγάλο βαθμό τη σύνθεση των β αλυσίδων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις β^{++}. Οι περισσότερες μεταλλάξεις β^0 και β^+ έχουν επίπτωση στον αιματολογικό φαινότυπο των φορέων όπως σχετική αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων με μειωμένο μέσο όγκο, (MCV 60-70fl) και αιμοσφαιρίνη ανά κύτταρο (MCH 19-23pg) καθώς και χαρακτηριστική αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης A_2, (Hb A_2) συνήθως μεταξύ 4-6%. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν εξαιρέσεις του φαινοτύπου αυτού όπως στις περιπτώσεις των «σιωπηρών φορέων» με φυσιολογικό ή σχεδόν φυσιολογικό φαινότυπο ή φορείς με μειωμένο MCV και MCH άλλες φορές με φυσιολογικά επίπεδα Hb A_2 (<3.4%) ή συχνά με αυξημένα επίπεδα Hb A_2 (>6%). Ορισμένοι φορείς συγκεκριμένων μεταλλάξεων β ΜΑ έχουν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα Hb F (>2% - <5%), και οι φορείς δβ ΜΑ συνήθως έχουν ελαφρώς μειωμένους ερυθροκυτταρικούς δείκτες με αξιοσημείωτη αύξηση της Hb F (>5% και <10%) και φυσιολογικά ή ελαφρώς μειωμένα επίπεδα Hb A_2. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν πολλές από τις μη τυπικές μορφές β ΜΑ συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Οι σημειακές μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη β ΜΑ ομαδοποιούνται με βάση το μηχανισμό που τροποποιούν τη σύνθεση των β αλυσίδων δηλαδή τη μεταγραφή, την επεξεργασία ή τη μετάφραση του RNA.

Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη μεταγραφή εντοπίζονται είτε στις συντηρημένες περιοχές του DNA στον υποκινητή του β γονιδίου (π.χ. στην θέση TATA, τη CCAAT ή τις αλληλουχίες CACCC) ή στην περιοχή των 50 νουκλεοτιδίων στη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου (5'UTR). Γενικά αυτές προκαλούν μια ήπια έως πολύ μικρή επίπτωση στην παραγωγή των β αλυσίδων και μερικές από αυτές σε ετερόζυγη κατάσταση δεν προκαλούν επίπτωση στον αιματολογικό φαινότυπο (βλ. Πίνακα 2).

Υπάρχουν πάνω από 50 διαφορετικές μεταλλάξεις που επιδρούν σε διάφορα στάδια της επεξεργασίας του RNA, όπως μεταλλάξεις στις θέσεις κοπής και επανασυγκόλλησης (μάτισμα), μεταλλάξεις μέσα στις συντηρημένες περιοχές στα άκρα των ιντρονίων, καθώς και εκείνων που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος του RNA

Πίνακας 2. Μοριακές διαταραχές που εμφανίζουν μη τυπικό αιματολογικό φαινότυπο ετεροζυγωτών β Μεσογειακής Αναιμίας

Αιματολογικός φαινότυπος	Γενετική Διαταραχή
Οριακά ή φυσιολογικά αιματολογικά ευρήματα*	Μεταλλάξεις στις 5′ και 3′ μη μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδίου: 1) -101 (C®T), -92 (C®T), 2) +33 (C®G), IVS2-844 (C®G), 3) +1480 (C®G)
Μειωμένοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες & φυσιολογική ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρινών (περιλαμβανομένης της Hb A_2)**	1) Ετεροζυγωτία ήπιας μετάλλαξης b MA (κάποιες φορές οριακά αυξημένη A_2) π.χ. Cap+1 (A®C), IVS1-6 (T®C) 2) συγκληρονόμηση μετάλλαξης d MA με τυπική μετάλλαξη b MA (cis ή trans) π.χ. αλληλόμορφο με την IVSI-5G>A και σε θέση cis το έλλειμμα 7.2kb που αφαιρεί το d γονίδιο (διαταραχή γνωστή ως db-Corfu) 3) Ετεροζυγωτία gdb ή εgdb MA
Φυσιολογικοί ή μειωμένοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες με Hb A_2 >6,1%	Ελλείμματα ή σημειακές μεταλλάξεις στον υποκινητή του b γονιδίου
Φυσιολογικοί ή μειωμένοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες με αυξημένη Hb F και φυσιολογική HbA_2	Ετεροζυγωτία db MA (περιλαμβάνεται η μετάλλαξη db-Lepore) ή HPFH

* Μπορεί επίσης να οφείλεται σε ετεροζυγωτία αλληλομόρφου με τριπλασιασμένο α γονίδιο αιμοσφαιρίνης (ααα/αα)
**Μπορεί επίσης να οφείλεται σε σιδηροπενία ή ύπαρξη α MA σε ετερόζυγη κατάσταση

μέσα στα εξώνια ή τα ιντρόνια. Οι μεταλλάξεις που αλλάζουν τα δινουκλεοτίδια (GT στο 5’ άκρο και AG στο 3’) των ιντρονίων, αποτρέπουν τη σύνθεση του φυσιολογικού ώριμου RNA και προκαλούν β^0 MA. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η IVSI-1G>A η οποία είναι πολύ κοινή στις μεσογειακές χώρες, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Ευρώπη, ή την IVSI-1G>T που είναι κοινή στην Ινδία και την Κίνα.

Μεταλλάξεις στις συντηρημένες περιοχές στα άκρα των ιντρονίων μειώνουν την αποτελεσματικότητα του ματίσματος, σε διαφορετικό βαθμό η κάθε μια, προκαλώντας διαφορετικού βαθμού παραγωγή β αλυσίδων και δημιουργώντας φαινότυπο β^+ από ήπιο έως βαρύ. Παραδείγματα είναι η IVSI-5G>C η οποία είναι βαριά μετάλλαξη και πιο συχνή στην Ινδία, Κίνα και Μέση Ανατολή, η IVS I-5 G->A που απαντάται στο πληθυσμό μας, ενώ η IVSI-6T>C που συνήθως προκαλεί έναν φαινότυπο β^{++} MA και συναντάται σε όλα τα κράτη γύρω από τη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Ευρώπη.

Υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις β MA που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος του RNA οι οποίες ανταγωνίζονται, στην πράξη, τις φυσιολογικές κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας του πρώιμου RNA. Η βαρύτητά τους εξαρτάται από τη σχετική ποσότητα του φυσιολογικού σε σχέση με το παθολογικό RNA. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος μέσα στα ιντρόνια ευθύνονται για βαριές μεταλλάξεις β^+ MA. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η IVSI-110G>A, η οποία είναι κοινή στη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Ευρώπη ή η IVSII-654C>T που είναι κοινή στη ΝΑ Ασία και την Κίνα. Οι μεταλλάξεις που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος σε εξώνια συνήθως προκαλούν πιο ήπιο φαινότυπο β^+ ή β^{++}, ενώ αυτές που κωδικοποιούν την αλλαγή ενός αμινοξέως (παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις), προκαλούν την παραγωγή μιας παθολογικής β αλυσίδας. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μετάλλαξη στο κωδικώνιο 26 (GAG>AAG) η οποία ενεργοποιεί μια εναλλακτική περιοχή θέσης ματίσματος στο εξώνιο 1 και παράλληλα δημιουργεί την παθολογική αιμοσφαιρίνη Hb E (β26 Glu->Lys) η οποία είναι συχνή στην ΝΑ Ασία.

Άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA εντοπίζονται στην πόλυ Α ουρά του γονιδίου (AATAAA) ή στην 3’ μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου δημιουργώντας αλληλόμορφα με φαινότυπο β^+ MA. Κάποια από αυτά συνοδεύονται με φυσιολογικό φαινότυπο σε ετερόζυγη κατάσταση όπως η αντικατάσταση μιας βάσης στο έκτο νουκλεοτίδιο μετά το κωδικώνιο τερματισμού (+1480G>C)[22].

Περίπου οι μισές από τις μεταλλάξεις που ευθύνονται για β MA επηρεάζουν τη μετάφραση του RNA και όλες έχουν σαν αποτέλεσμα β^0 MA. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να προκαλούν είτε άμεσα ένα πολύ πρόωρο κωδικώνιο τερματισμού, είτε μέτατοπίζοντας το πλαίσιο ανάγνωσης να δημιουργούν κωδικώνιο τερματισμού και πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνικής αλυσίδας μέσα στο εξώνιο 1 και 2. Τέτοιες μεταλλάξεις συνοδεύονται από την παρουσία ελάχιστων επιπέδων β mRNA στα ερυθροκύτταρα, εξ αιτίας μιας επιταχυνόμενης αποδόμησης ανώμαλων mRNA, ενός φαινομένου γνωστού ως

«nonsense-mediated mRNA decay» (NMD)[23]. Στους ετεροζυγώτες τέτοιων μεταλλάξεων δεν παράγεται β αλυσίδα από το παθολογικό αλληλόμορφο και εμφανίζεται μόνο η φυσιολογική β αλυσίδα έχοντας σαν αποτέλεσμα έναν κλασσικό β θαλασσαιμικό φαινότυπο. Σε αντίθεση, μεταλλάξεις στο εξώνιο 3, που επιτρέπουν την παράταση της μετάφρασης, δημιουργούν μεγαλύτερου μήκους πρωτεϊνικά παράγωγα και δεν παρατηρείται το φαινόμενο NMD. Στις περιπτώσεις αυτές παράγεται μεγάλο ποσό παθολογικής πρωτεΐνης-αιμοσφαιρίνης. Ετεροζυγώτες τέτοιων μεταλλάξεων τείνουν να έχουν βαρύτερη φαινοτυπική εικόνα σε σχέση με τους απλούς φορείς β ΜΑ, στους οποίους υπάρχει μειωμένη σύνθεση και αποτελούν τη μορφή της β ΜΑ που κληρονομείται με επικρατητικό τρόπο. Τέλος υπάρχουν κάποιες μεταλλάξεις στο κωδικώνιο έναρξης (ATG) που επηρεάζουν την έναρξη της μεταγραφής του RNA και έχουν σαν αποτέλεσμα β^0 ΜΑ.

Λιγότερο συχνές είναι οι μεταλλάξεις β ΜΑ που οφείλονται σε ελλείμματα στο σύμπλεγμα των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης. Υπάρχουν ελλείμματα που αφαιρούν μέρος ή ολόκληρο το β γονίδιο, των οποίων το μέγεθος ποικίλει από 290 bp έως και περισσότερο από 60 Kb. Από τα ελλείμματα αυτά ένα κομμάτι 619 bp στο 3' άκρο του β γονιδίου είναι κοινό για όλα και εντοπίζεται κυρίως σε περιορισμένους πληθυσμούς στο Πακιστάν και στην Ινδία. Τα υπόλοιπα ελλείμματα είναι πολύ σπάνια. Τα ελλείμματα που αφαιρούν ένα μέρος του υποκινητή του β γονιδίου που περιέχει τις αλληλουχίες CACCC, CCAAT και TATA συχνά συνοδεύονται με ασυνήθιστα αυξημένα επίπεδα Hb A_2, στους ετεροζυγώτες. Ο μηχανισμός που προκαλεί την αύξηση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την αφαίρεση του υποκινητή με την οποία καταργείται ο ανταγωνισμός του β γονιδίου στην αλληλεπίδραση με την περιοχή LCR η οποία αλληλεπιδρά με τα γ και δ γονίδια που βρίσκονται σε θέση cis και κατά συνέπεια ενισχύεται η έκφραση των γονιδίων αυτών. Ο μηχανισμός αυτός προφανώς εξηγεί την αύξηση των επιπέδων της Hb F που συνήθως παρατηρείται στα ελλείμματα αυτής της ομάδας αλλά και στις μεταλλάξεις β ΜΑ στην περιοχή του υποκινητή του β γονιδίου. Αν και η αύξηση της Hb F ποικίλει στους ετεροζυγώτες, είναι συχνά ικανή να αντισταθμίσει την ολοκληρωτική έλλειψη της β αλυσίδας στους ομοζυγώτες.

Η έκφραση του β γονιδίου μπορεί επίσης να κατασταλεί από ελλείμματα στο σύμπλεγμα των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης όπως τα εγδβ^0 ΜΑ. Τα ελλείμματα αυτά διακρίνονται σε δυο ομάδες. Στη μια ομάδα ανήκουν ελλείμματα που αφαιρούν ολόκληρο ή το μεγαλύτερο μέρος του συμπλέγματος των β γονιδίων μαζί με το β γονίδιο, ενώ στην άλλη τα ελλείμματα αφαιρούν περιοχή προς το 5' άκρο του συμπλέγματος αφήνοντας ανέπαφο το β γονίδιο. Η καταστολή της έκφρασης στις περιπτώσεις αυτές οφείλεται στην απουσία της LCR περιοχής. Οι ετεροζυγώτες για εγδβ^0 ΜΑ τείνουν να είναι περισσότερο αναιμικοί με μεγαλύτερου βαθμού μικροκυττάρωση και υποχρωμία από αυτή των απλών ετεροζυγωτών β ΜΑ και επί πλέον έχουν φυσιολογικά επίπεδα Hb A_2[24].

Οι γενετικές διαταραχές που ευθύνονται για τη β ΜΑ, στον Ελληνικό χώρο, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Από μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με β ΜΑ και μεγάλο αριθμό ετεροζυγωτών έχουν καταγραφεί περίπου 35 σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο β γονίδιο αιμοσφαιρίνης από τις οποίες οι 11 εξ αυτών καλύπτουν περίπου το 98% των παθολογικών αλληλομόρφων[25-27].

Παραλλαγές της β Μεσογειακής Αναιμίας

Υπάρχουν κάποιες σπάνιες μορφές β ΜΑ που κληρονομούνται με επικρατητικό τρόπο. Σε αυτό τον τύπο κληρονομικότητας ένα και μόνο παθολογικό αλληλόμορφο προκαλεί την κλινική εκδήλωση της νόσου. Οι ετεροζυγώτες αυτοί έχουν κλινικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά ενδιάμεσης ΜΑ και εμφανίζουν συχνά έγκλειστα στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα και αιμόλυση στο περιφερικό αίμα. Έχουν αναφερθεί περισσότερα από 30 τέτοια αλληλόμορφα β ΜΑ. Πολλά από αυτά βρέθηκαν σε μεμονωμένες οικογένειες αλλά και κάποια εντοπίστηκαν σε περιστατικά όπου η αλλαγή δημιουργήθηκε «de novo». Στα αλληλόμορφα αυτά περιλαμβάνονται ένα πλήθος μοριακών βλαβών από παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις έως δημιουργία «κολοβών» β αλυσίδων σαν αποτέλεσμα μη νοηματικών μεταλλάξεων. Η νουκλεοτιδική αλλαγή που εντοπίζεται σε όλες τις περιπτώσεις προκαλεί σύνθεση ιδιαίτερα ασταθών β αλυσίδων οι οποίες είναι, συνήθως, μη ανιχνεύσιμες σε πρωτεϊνικό επίπεδο, και η ύπαρξή τους εντοπίζεται μόνο στο DNA. Η κλινική βαρύτητα αυτής της μορφής β ΜΑ εξαρτάται από την αστάθεια των παθολογικών β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης[28].

Σε πολλές οικογένειες η ανάλυση σύνδεσης απέδειξε ότι ο φαινότυπος της β ΜΑ κληρονομείται ανεξάρτητα από το σύμπλεγμα των β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, υποδεικνύοντας ότι η γενετική διαταραχή ανήκει σε παράγοντες που επιδρούν από άλλες περιοχές του γονιδιώματος (trans-acting). Περίπου το 1% των περιπτώσεων της β ΜΑ μπορεί να ανήκει σε αυτή την κατηγορία. Μεταλλάξεις στον αντιγραφικό παράγοντα *GATA 1* στο χρωμόσωμα Χ έχει αναφερθεί ότι προκαλεί β ΜΑ μαζί με θρομβοπενία. Αυτό ήταν το πρώτο παράδειγμα β ΜΑ στον άνθρωπο που οφείλονταν σε μετάλλαξη ενός ερυθροειδικού μεταγραφικού παράγοντα[29]. Πρόσφατα βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *XPD* που προκαλεί μελαχρωματική ξηροδερμία συχνά συνοδεύονται από φαινότυπο ετερόζυγης β ΜΑ, δηλαδή μειωμένη παραγωγή β αλυσίδων και μειωμένα επίπεδα β mRNA. Έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη XPD αποτελεί μια υπομονάδα του βασικού μεταγραφικού παράγοντα TF11H ο οποίος εμπλέκεται και στη διόρθωση του DNA[30].

Ένας άλλος μηχανισμός ενδιάμεσης ΜΑ, που έχει αναφερθεί, είναι η δημιουργία σωματικής μετάλλαξης στο β γονίδιο. Η διαταραχή αυτή έχει περιγραφεί σε ένα πολύ περιορισμένο αριθμό ασθενών με κλινικό φαινότυπο ενδιάμεσης ΜΑ στους οποίους εντοπίζεται ετερόζυγη μορφή β ΜΑ και φυσιολογικός γονότυπος α ΜΑ. Η διερεύνηση των περιστατικών αυτών αποκάλυψε ότι σε ένα ποσοστό των σωματικών κυττάρων τους, είχαν έλλειμμα στο χρωμόσωμα 11p15, στο οποίο περιλαμβάνονταν και το σύμπλεγμα των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης. Αυτό σημαίνει ότι στα περιστατικά αυτά κάποια σωματικά κύτταρα διέθεταν ένα β γονίδιο ενώ άλλα (με το έλλειμμα) κανένα. Σαν αποτέλεσμα, η συνολική ποσότητα του β γονιδίου που παράγονταν στον οργανισμό ήταν μικρότερη από αυτή ενός κοινού ετεροζυγώτη β ΜΑ[31,32]. Τέλος μεταθετά στοιχεία μπορούν περιστασιακά να διαταράξουν την έκφραση ανθρώπινων γονιδίων και να τα οδηγήσουν σε απενεργοποίηση. Η εισαγωγή τέτοιου στοιχείου, (retrotransposition) της οικογένειας που ονομάζεται L1, έχει αναφερθεί σε ένα περιστατικό με φαινότυπο β^+ ΜΑ[33].

Συμπεράσματα

Ο χαρακτηρισμός περισσοτέρων από 200 μεταλλάξεων που προκαλούν β ΜΑ και των περίπου 100 που προκαλούν α ΜΑ έχει συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της μοριακής βάσης των μεσογειακών συνδρόμων που λειτούργησαν ως πρότυπο στη μελέτη άλλων νοσημάτων αλλά κυρίως αποτέλεσαν τη βάση για την εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης για την εξάλειψη ενός γενετικού νοσήματος. Παρ' όλα αυτά, τα μεσογειακά σύνδρομα παραμένουν ακόμα και σήμερα ως πρόβλημα για την υγεία σε ολόκληρο τον κόσμο. Η τεράστια κλινική ποικιλομορφία τους (κυρίως των συνδρόμων της β ΜΑ) σε συνδυασμό με την αλληλεπίδρασή τους με άλλους γενετικούς τροποποιητικούς παράγοντες καθώς και το περιβάλλον, καθιστούν την πρόληψη των συνδρόμων αυτών δύσκολη υπόθεση. Η περεταίρω κατανόηση της μοριακής βάσης των μεσογειακών συνδρόμων και των παραγόντων που τα επηρεάζουν θα επιτρέψει καλύτερα την πρόληψη, την πρόγνωση της βαρύτητας των ασθενών αλλά και τον εκσυγχρονισμό των θεραπευτικών πρωτοκόλλων που εφαρμόζονται σήμερα.

The molecular Basis of Thalassemia Syndromes

by Joanne Traeger-Synodinos[1], Christina Vrettou[1,2], Manousos Papadakis[3], Emmanuel Kanavakis[1,2]

[1]Laboratory of Medical Genetics, University of Athens, Choremeio Research Laboratory, [2]Research Institute for the Study of Genetic and Malignant Disorders in Childhood, Aghia Sophia's Children's Hospital, Athens, [3]Laboratory for Prenatal Diagnosis, Laiko Hospital, Athens, Greece

ABSTRACT: The thalassemia syndromes are the most common monogenic disorders worldwide, with an estimated 270 million heterozygotes worldwide, and are caused by a wide range of underlying defects. The globin genes are located in two multigene clusters. The α-globin gene cluster, is located near the telomere of the short arm of chromosome 16 (16p13.3) and the β-globin gene cluster is located on the short arm of chromosome 11 (11p15.5). The genes in both clusters are arranged in the order of which they are ontologically expressed. Over 1000 mutations within or around the α- and β-globin genes have been observed, affecting either the quantity or quality of the globin chains synthesized. Mutations in other regions of the genome, either in other erythroid-specific genes or in genes more generally involved in controlling gene expression, have also been observed to influence the expression of globin genes and consequently the synthesis of globin chains. Finally there are rare examples of acquired forms of α-thalassemia caused by somatic mutations in patients with myelodysplastic syndromes.

Βιβλιογραφία

1. Weatherall DJ. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. Nat Rev Genet. 2004; 5:625-631.
2. Sgourou A, Routledge S, Antoniou M, Papachatzopoulou A, Psiouri L, Athanassiadou A. Thalassaemia mutations within the 5'UTR of the human beta-globin gene disrupt transcription. Br J Haematol. 2004; 124:828-35.
3. Goh SH, Lee YT, Bhanu NV, et al. A newly discovered human alpha-globin gene. Blood. 2005 15; 106:1466-1472.
4. Bernini LF, Harteveld CL. Alpha thalassaemia. Baillieres Clin Haematol. 1998; 11:53-90.
5. Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassaemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2004;1-13.
6. Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as

a novel cause of human genetic disease. Nat Genet. 2003; 34:157-65.
7. Whitelaw E, Proudfoot NJ. Alpha-thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha 2 globin gene. EMBO J. 1986; 5:2915-22.
8. Chui DHK, Fucharoen S, Chan V. Haemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood. 2003; 101:791-800.
9. Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, et al. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. Brit J Haematol. 2000; 111:915-923.
10. Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, Metaxotou-Mavrommati A, Vrettou C, Stamoulakatou A, Kanavakis E. Distinct phenotypic expression associated with a new hyperunstable alpha globin variant (Hb Heraklion, α1cd37(C2)Pro>0): comparison to other α-thalassaemic haemoglobinopathies. Blood Cells Mol Dis. 2000; 26:276-284.
11. Arnon S, Tamary H, Dgany O, et al. Hydrops fetalis associated with homozygosity for haemoglobin Taybe (alpha 38/39 THR deletion) in newborn triplets. Am J Hematol. 2004; 76:263-266.
12. Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, et al. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. Brit J Haematol. 2001; 115:72-78.
13. Traeger-Synodinos J, Douna V, Papassotiriou I, et al. Variable and often Severe Phenotypic Expression in Patients with the α-thalassemic Variant HbAgrinio (α29 (B10) Leu→Pro (α2)). Hemoglobin. 2010; 34:430–438.
14. Douna V, Liapi D, Kampourakis D, et al. First observation of Hb Taybe [codons 38/39 (-ACC) Thr→ 0 (α1)] in Greece: clinical and hematological findings in patients with co-inherited α+-thalassemia mutations. Hemoglobin. 2008; 32:371–378;
15. Douna V, Papassotiriou I, Garoufi A, et al. A rare thalassemic syndrome caused by interaction of Hb Adana [α59(E8) GlyAsp] with an α+-thalassemia deletion: clinical aspects in two cases. Hemoglobin. 2008; 32:361–369.
16. Gibbons RJ, Higgs DR. Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. Am J Med Genet. 2000; 97:204-212.
17. Steensma DP, Higgs DR, Fisher CA, Gibbons RJ. Acquired somatic ATRX mutations in myelodysplastic syndrome associated with alpha thalassaemia (ATMDS) convey a more severe hematologic phenotype than germline ATRX mutations. Blood. 2004; 103:2019-2026.
18. Anagnou NP, Ley TJ, Chesbro B, et al. Acquired alpha-thalassemia in preleukemia is due to decreased expression of all four alpha-globin genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80:6051-6055.
19. Forget BG. De novo and acquired forms of alpha thalassemia. Curr Hematol Rep. 2006; 5:11-4.
18. De Gobbi M, Viprakasit V, Hughes JR, et al. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter, Science. 2006; 312:1215-1217.
19. Chui DHK, Waye JS. Hydrops fetalis caused by α-thalassaemia: an emerging health care problem. Blood. 1998; 91:2213-2222.
20. Maragoudaki E, Vrettou C, Kanavakis E, et al. Molecular, haematological and clinical studies of a silent beta-gene C-->G mutation at 6 bp 3' to the termination codon (+1480 C-->G) in twelve Greek families. Brit J Haematol. 1998; 103:45-51.
21. Romao L, Inacio A, Santos S, et al. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. Blood. 2000; 96:2895-2901.
22. Rooks H, Bergounioux J, Game L, et al. Heterogeneity of the epsilon gamma delta beta-thalassaemias: characterization of three novel English deletions. Br J Haematol. 2005; 128:722-729.
23. Kattamis C, Hu H, Cheng G, et al. Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. Br J Haematol. 1990; 74:342-6.
24. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. Mol Hum Reprod. 1997; 3:523-8.
25. Boussiou M, Karababa P, Sinopoulou K, Tsaftaridis P, Plata E, Loutradi-Anagnostou A. The molecular heterogeneity of beta-thalassemia in Greece. Blood Cells Mol Dis. 2008; 40:317-319.
26. Thein SL. Is it dominantly inherited beta thalassaemia or just a beta-chain variant that is highly unstable? Br J Haematol. 1999; 107:12-21.
27. Yu C, Niakan KK, Matsushita M, Stamatoyannopoulos G, Orkin SH, Raskind WH. X-linked thrombocytopenia with thalassaemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. Blood. 2002; 100:2040-2045.
28. Viprakasit V, Gibbons RJ, Broughton BC, et al. Mutations in the general transcription factor TFIIH result in beta-thalassaemia in individuals with trichothiodystrophy. Hum Mol Genet. 2001; 10:2797-2802.
29. Badens C, Mattei MG, Imbert AM, et al. A novel mechanism for thalassaemia intermedia. Lancet. 2002, 12:132-3.
30. Galanello R, Perseu L, Perra C, et al. Somatic deletion of the normal beta-globin gene leading to thalassaemia intermedia in heterozygous beta-thalassaemic patients. Br J Haematol. 2004; 12:604-606.
31. Kimberland ML, Divoky V, Prchal J, Schwahn U, Berger W, Kazazian HH Jr. Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. Hum Mol Genet. 1999; 8:1557-1560.