

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav biologie



**MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÁ CHARAKTERIZACE TALASEMIÍ A
HEMOGLOBINOVÝCH VARIANT V ČESKÉ A SLOVENSKÉ POPULACI**

Dizertační práce

RNDr. Martina Divoká

Olomouc 2016

Lékařská biologie

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

Práce byla podpořena granty MŠMT MSM6198959205, IGA MZ ČR NS10281, NT11208, NT13587, LF_2010_004, LF_2011_006, LF_2012_007, LF_2013_004, IGA_LF_2014_001, IGA_LF_2015_001, IGA_LF_2016_001.

V Olomouci dne 27.6.2016

.....

Martina Divoká

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří mým školitelkám Mgr. Monice Horvátové, Ph.D. a prof. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D. a odbornému konzultantovi prof. MUDr. Karlu Indrákovi, DrSc. za vedení a cenné připomínky při zpracování dizertační práce.

Dále chci poděkovat doc. RNDr. Vladimíru Divokému, Ph.D. za odborné konzultace a rady a za pomoc při interpretaci výsledků a při zpracování finální verze dizertační práce.

Děkuji paní Anně Lapčíkové za pomoc při morfologickém hodnocení krevních nátěrů.

Na závěr děkuji kolektivu Laboratoře molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za vytvoření příjemné pracovní atmosféry, za technickou pomoc při zpracování dizertační práce a za podporu během práce na uvedených analýzách.

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
TEORETICKÝ ÚVOD	7
1. HEMATOPOÉZA A ERYTROPOÉZA.....	7
2. REGULACE ERYTROPOÉZY.....	10
3. HEMOGLOBIN	12
4. GENETICKÁ PODSTATA SYNTÉZY HEMOGLOBINU.....	14
5. HEMOGLOBINOPATIE	19
PRAKTICKÁ ČÁST.....	26
6. CÍLE PRÁCE.....	26
7. MATERIÁL A METODY.....	27
8. VÝSLEDKY A DISKUZE	33
8.1 Molekulárně-genetická charakteristika strukturních hemoglobinových variant	33
8.2 Molekulárně-genetická charakterizace β - a $\delta\beta$ -talasemických alel	46
8.3 Molekulárně-genetická charakteristika α -talasemií u českých rodin a u rodin cizinců žijících v České republice	49
8.4 Komentáře k publikacím a diskuse	58
9. SHRNUÍ A ZÁVĚR.....	70
10. POUŽITÁ LITERATURA.....	72
11. SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ	78
12. PŘÍLOHY	80
Příloha č. 1: Seznam použitých zkratk	80
Příloha č. 2: Sekvence použitých primerů	81
Příloha č. 3: Divoká et al, 2016	83
Příloha č. 4: Lanikova et al, 2013.....	84
Příloha č. 5: Divoká et al, 2016	85
Příloha č. 6: Sulovska et al, 2015	86
Příloha č. 7: Konferenční příspěvky (abstrakta a postery).....	87

ABSTRAKT

Hemoglobinopatie jsou nejrozšířenější monogenně dědičná onemocnění na světě. Jedná se o vrozené anémie s autozomálně recesivní dědičností charakterizované kvantitativní redukcí syntézy globinových řetězců molekuly hemoglobinu (u talasemií) nebo poruchou struktury molekuly hemoglobinu (u hemoglobinových variant). Talasemie a endemické hemoglobinové varianty byly selektovány v průběhu evoluce v malarických oblastech, neboť heterozygotům přinášejí výhodu v protekci proti malarickému parazitu. Talasemie i hemoglobinové varianty se ovšem mohou vyskytnout v každé etnické skupině díky historické i současné migraci. V České republice a na Slovensku jsou talasemie nejčastější příčinou vrozené mikrocytární anemie.

Tato dizertační práce se věnuje objasňování genetického podkladu talasemií a abnormálních hemoglobinových variant v české a slovenské populaci. V naší laboratoři se tomuto tématu věnujeme již od roku 1991. V této disertační práci jsou prezentovány výsledky molekulárně-genetických analýz talasemií a abnormálních hemoglobinových variant za období od roku 2002 do roku 2015. Molekulární podstatu β -talasemie nebo $\delta\beta$ -talasemie jsme odhalili u 383 jedinců z 235 rodin. Molekulární podstatu α -talasemie jsme odhalili u 98 jedinců z 82 rodin. Abnormální hemoglobinovou variantu jsme na molekulární úrovni diagnostikovali u 52 jedinců. Popsali jsme několik nových mutací v globinových genech, včetně unikátního epigenetického mechanismu vzniku β -talasemie vedoucímu k zeslabení exprese β -globinového genu v důsledku inserce funkčního retrotranspozonu L1 do β -globinového genu.

Naše výsledky přispěly k odhalení molekulárně-genetické podstaty studovaných nemocí v České republice i na Slovensku a umožnily jejich včasnou diagnostiku, která je nezbytná pro iniciaci vhodné léčby.

Klíčová slova: hemoglobinopatie, talasemie, molekulárně-genetická diagnostika

ABSTRACT

Hemoglobinopathies are the most common monogenic hereditary diseases in the world. It is a congenital anemia with autosomal recessive inheritance characterized by the quantitative reduction of the synthesis of the globin chains of the hemoglobin molecule (in thalassemias) or by a defect in the molecular structure of hemoglobin (in hemoglobin variants). Thalassemias and endemic hemoglobin variants were selected during evolution in malaria areas, as heterozygosity for the mutant alleles confers a selective advantage against the malaria parasite. Thalassemias and hemoglobin variants, however, can occur in any ethnic group because of historical and current migration. In the Czech Republic and Slovakia, thalassemias are the most common cause of congenital microcytic anemia.

The aim of this thesis was to investigate the genetic background of thalassemia and abnormal hemoglobin variants in the Czech and Slovak population. Our laboratories at University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University have been focused on this topic since 1991. In this dissertation thesis I present the results of molecular genetic analyses of thalassemias and abnormal hemoglobin variants obtained from 2002 to 2015. The molecular nature of β -thalassemia or $\delta\beta$ -thalassemia was uncovered in 383 individuals from 235 families. Molecular basis of α -thalassemia was characterized in 98 individuals from 82 families. Abnormal hemoglobin variants were diagnosed at the molecular level in 52 individuals. We have described several new mutations in the globin genes, including an insertion of a transposable L1 element into the β -globin gene resulting in a unique epigenetic etiology of β -thalassemia due to the silencing effect of repressive chromatin associated with retrotransposon insertion.

Our results improve knowledge of molecular-genetic basis of studied diseases in the Czech Republic and Slovakia and enable their early diagnosis, which is necessary for initiation of appropriate therapy.

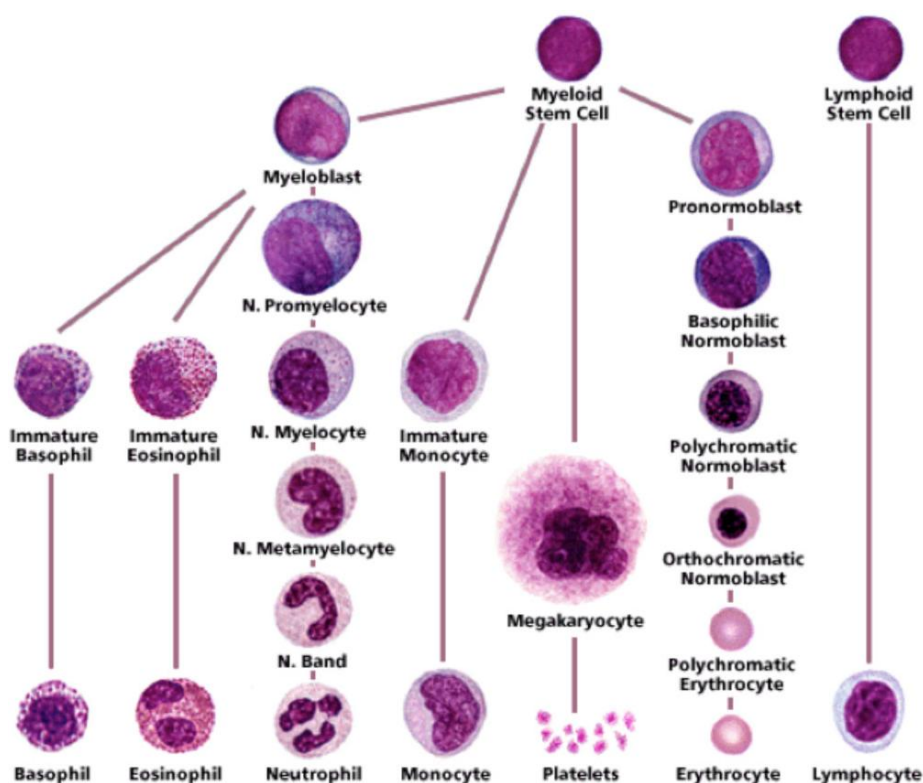
Key words: hemoglobinopathies, thalassemias, molecular-genetic diagnosis

TEORETICKÝ ÚVOD

1. HEMATOPOÉZA A ERYTROPOÉZA

Hematopoéza je fyziologický proces tvorby a obnovy krevních buněk v jednotlivých krevních řadách (erytrocyty, trombocyty a leukocyty), které diferencují z hematopoetické kmenové buňky (Obr. 1). Hematopoetická kmenová buňka je pluripotentní a má schopnost sebeobnovy, vytváří všechny buněčné populace krve po celý život organismu. K proliferaci hematopoetické kmenové buňky jsou zapotřebí kromě působení růstových faktorů (např. hormony, interleukiny) také jiné fyzikální a chemické interakce s podpůrnými stromálními buňkami (Weissman et al, 2001).

Primitivní hematopoéza, resp. primitivní erytropoéza, jako první hematopoetický systém, vzniká extraembryonálně ve žloutkovém váčku. Prvními hematopoetickými buňkami jsou primitivní erytroblasty. Definitivní hematopoéza probíhá intraembryonálně ve fetálních játrech a v dospělosti v kostní dřeni. V průběhu formování definitivní hematopoézy dochází k jejímu rozrůznění do všech krevních řad. (Obr. 1).



Obr. 1: Hierarchie hematopoézy (zdroj: <http://tbl.med.yale.edu>)

Erytropoéza je fyziologický proces tvorby a obnovy červených krvinek (erytrocytů) v erytroidní vývojové řadě. Časná produkce erytroidních buněk probíhá ve žloutkovém váčku jako v přechodné extraembryonální tkáni. Tyto primitivní erytroidní buňky jsou jaderné, odvozené z mezodermálních buněk formovaných z ektodermu (Kinder et al, 1999). Nově formované mezodermální buňky migrují a prostupují žloutkovým váčkem a dostávají se do těsného kontaktu s endodermem. Interakce mezi těmito dvěma buněčnými vrstvami zahajuje erytropoézu (Belaoussoff et al, 1998). Mezodermální buňky, které migrují do žloutkového váčku, formují krevní ostrůvky, které obsahují nejen červené krevní buňky, ale také buňky endotelové. Obecný mezodermální prekursor – hemangioblast – má bilineární potenciál, může diferencovat do hematopoetických i endotelových buněk (Jagannathan-Bogdan a Zon, 2013). V dospělém věku erytroidní linie v kostní dřeni diferencuje z hematopoetické kmenové buňky.

Prvním místem intraembryonální hematopoetické aktivity je oblast AGM (aorta-gonad-mesonefros), ve které je možné detekovat definitivní hematopoetické buňky 10. den myšího embryonálního vývoje. Tato oblast je pravděpodobně hlavním zdrojem hematopoetických kmenových buněk, které kolonizují fetální játra, a jelikož kmenové buňky definitivní hematopoézy vznikají i ve žloutkovém váčku, předpokládá se migrace hematopoetických prekursorů mezi žloutkovým váčkem a AGM (Medvinsky a Dzierzak 1996).

Prvními detekovatelnými, liniově specifickými hematopoetickými buňkami jsou tedy primitivní erytroblasty (primitivní hematopoéza), krvetvorba je v tomto období výhradně erytroidní. Játra (a v menší míře i slezina) jsou hlavním místem krvetvorby ve druhém, hepatolienálním období. V tomto období opět převažuje erytropoéza. Hematopoéza začíná v kostní dřeni od 10. týdne intrauterinního vývoje (Jagannathan-Bogdan a Zon, 2013).

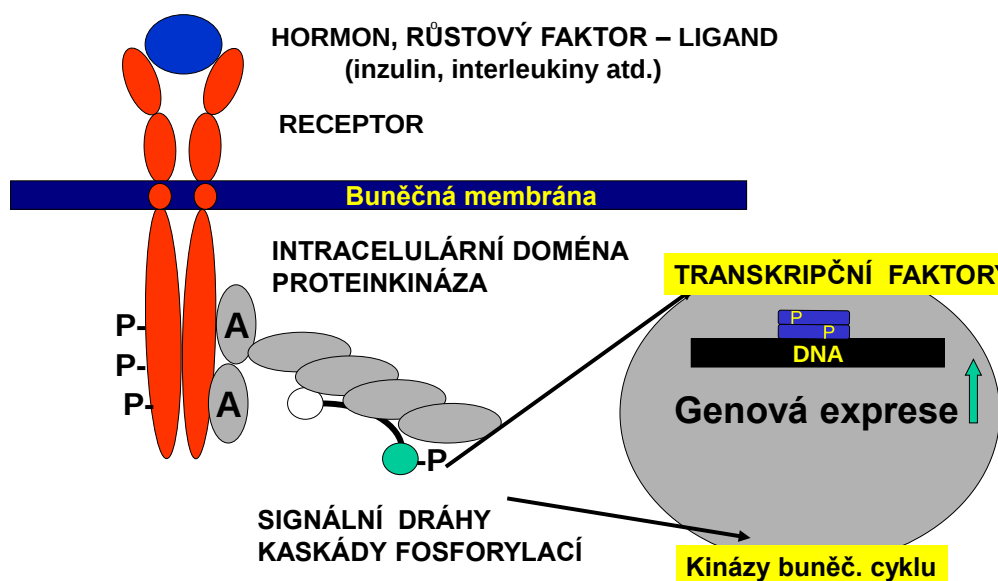
Primitivní a definitivní erytropoéza jsou dva odlišné procesy, které se vzájemně prolínají. Primitivní erytropoéza je přechodná se specifickou morfologií červených krvinek - relativně velké jaderné buňky charakteristické expresí embryonálních globinů: Gower1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) a Portland1 ($\zeta_2\gamma_2$). Definitivní erytropoéza vzniká jako součást liniového rozrůznění definitivní hematopoézy a je charakteristická expresí fetálních globinů a globinů dospělého typu (Tab. I).

Tab. I: Přehled jednotlivých hemoglobinů během ontogeneze

ERYTROPOETICKÝ ORGÁN	GLOBINOVÉ ŘETĚZCE	OZNAČENÍ HEMOGLOBINU
Žloutkový váček	$\zeta_2\varepsilon_2$	Hb Gower 1
	$\zeta_2\gamma_2$	Hb Portland
	$\alpha_2\varepsilon_2$	Hb Gower 2
Fetální játra	$\alpha_2\gamma_2$	HbF
Kostní dřeň	$\alpha_2\delta_2$	HbA ₂
	$\alpha_2\beta_2$	HbA

Hematopoetická liniová specifikace je výsledkem kombinovaného účinku různých transkripčních faktorů (TF). Jsou to regulační proteiny, které vazbou na promotory nebo zesilovače transkripce zahajují nebo zvyšují genovou expresi.

Hematopoetické buňky jsou ve svém přirozeném prostředí (žloutkový váček, fetální játra, kostní dřeň) vystaveny působení celé řady biochemických, chemických a fyzikálních interakcí. Z nich nejdůležitější jsou hematopoetické růstové faktory. Patří sem některé hormony (např. erythropoetin, EPO) a cytokiny (např. interleukiny, interferony). Působení hematopoetických růstových faktorů stimuluje buněčnou proliferaci (spouštějí se buněčné děje vedoucí k progresi buněčného cyklu), reguluje přežívání buněk (regulace apoptózy) a spouští signální dráhy diferenciací (dochází k regulaci exprese liniově-specifických TF a jiných specifických genů důležitých pro určité stádium maturace (upraveno podle Nečase, 2003) (Obr. 2).



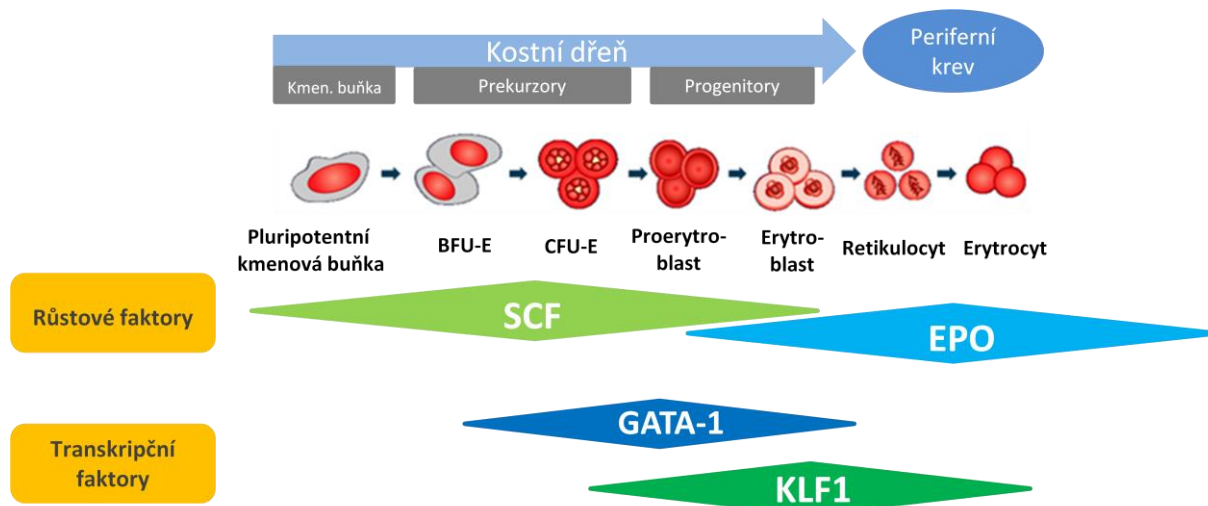
Obr. 2: Schéma buněčné signální dráhy. Extracelulární signální molekuly jsou hormony a růstové faktory reagující se svými receptory. Konečnými akceptory signálů v jádře jsou transkripční faktory, aktivující genovou expresi. Při liniové specifikaci, stejně jako při diferenciaci hematopoetických progenitorů, hrají důležitou roli interakce liniově-specifických transkripčních faktorů (převzato z Divoký, 2002).

2. REGULACE ERYTROPOÉZY

Erytrocyty jsou nejpočetnější skupinou buněk v krvi dospělého jedince. Lidská krev obsahuje asi 5×10^{12} /L erytrocytů (u mužů bývají počty vyšší než u žen). Délka života červené krvinky je zhruba 120 dní. Nové erytrocyty jsou neustále produkovány v kostní dřeni za podpory mikroprostředí skládající se z endotelových buněk cévního systému, osteoblastů, stromálních buněk, hematopoetických buněk a extracelulární matrix. Toto prostředí umožňuje přímý kontakt mezi buňkami navzájem a umožňuje vyvíjejícím se hematopoetickým buňkám kontakt s adhezními molekulami, růstovými faktory a cytokiny.

Erytroidní progenitory jsou schopné vytvářet v podmínkách tkáňových kultur na methylcelulóze „*in-vitro*“ erytroidní kolonie nazývané „burst forming unit-erythroid“ (BFU-E) a „colony forming unit-erythroid“ (CFU-E) (Gregory a Eaves, 1978). BFU-E vyžadují pro svůj růst a diferenciaci především „stem cell factor“ (SCF) (Wu et al, 1995) a mnoho dalších hematopoetických růstových faktorů, CFU-E jsou naopak vysoce závislé na erythropoetinu

(EPO) (Lin et al, 1996), následně diferencují do prvních stádií morfologicky identifikovaných buněk erytrocytární linie – proerytroblastů, dále do erytroblastů (bazofilní, polychromatofilní a ortochromní), následuje stádium retikulocyty, které již neobsahuje jádro, pouze zbytky organel a RNA, a který vyvráží v konečné stádium – erytrocyt (Obr. 3).



Obr. 3: Schéma erythropoézy – proces, během kterého pluripotentní kmenová buňka diferencuje a vyvráží do erytrocytu. Znázorněny jsou vybrané faktory nezbytné v procesu erythropoézy v jednotlivých erytroidních stádiích. Upraveno podle Hermine a Roméo, 2006.

Během diferenciace erytroidních buněk dochází k expresi erytroidně-specifických genů, která je přesně načasovaná a striktně regulovaná na úrovni transkripce (Obr. 3). V regulačních oblastech všech erytroidně-specifických genů se nachází nukleotidová sekvence 5'A/T GATA A/G 3'(tzv. GATA motiv), na kterou se váží TF rodiny GATA (GATA1-GATA6). Esenciální pro normální erythropoézu je TF GATA1 (Pevny et al, 1991). Jeho exprese je omezena na erytroidní, megakaryocytární, eozinofilní linii a na linii mastocytů. Myši s chybějící expresí GATA1 umírají 10. – 12. den z důvodu anemie a zablokování erythropoézy ve stádiu proerytroblastu (Pevny et al, 1991).

Další specifický erytroidní faktor KLF1 (Erytroid Kruppel-like factor) nasedá s vysokou afinitou na CACCC motiv nacházející se v promotorové oblasti β -globinového genu (*HBB*) (Miller a Bieker, 1993). Mutace v této oblasti je asociovaná s β -talasemií. Jeho role spočívá v aktivaci globinových genů, je důležitý při přepnutí exprese fetálních globinů na globiny dospělého typu a je nutný v posledních stádiích erytroidní diferenciace a přímo reguluje geny zapojené do metabolismu hemoglobinu a membránové stability. Ukázalo se, že KLF1 je přímý

aktivátor *BCL11A* exprese (Bourg et al, 2010; Zhou et al, 2010). Tento gen mimo jiné hraje důležitou roli v potlačení exprese γ -globinového genu (*HBG*) a tím snižuje produkci fetálního hemoglobinu (HbF) po narození. Některé léčebné strategie vyžadující zvýšení hladiny HbF (β -talasemie, srpkovité anemie) se zaměřují na inhibici *BCL11A* aktivity.

Proces zrání červených krvinek je tedy komplexně řízen působením TF, z nichž kriticky nejdůležitější je GATA-1, protože reguluje ne jen geny zahrnuté v erytroidní diferenciaci, ale také geny důležité pro progresi buněčného cyklu a přežití. Tento celý program erytroidní diferenciace musí být regulovaný pozitivně i negativně a musí zajistit pozvolnou, ale kontrolovanou produkci červených krvinek.

Zralé erytrocyty jsou bezjaderné, nemají endoplazmatické retikulum ani mitochondrie a nejsou schopné další proliferace. Nové buňky se do periferní krve dostávají z kostní dřeně ve formě retikulocytů – toto stádium má ještě funkční proteinovou translaci.

Za normálních podmínek je v organismu denně nahrazeno asi 1 % erytrocytů. Zvýšená produkce erytrocytů je primární odpovědí na hypoxický stres, který nastává v případě nedostatku kyslíku pro organismus. Produkce EPO v ledvinách je přímo regulována tlakem tkáňového kyslíku pomocí aktivity hypoxií-indukovaného transkripčního faktoru HIF (Bunn, 2013). Kromě EPO, který je přímý regulátor produkce erytrocytů, tak existují další faktory, které přispívají k expanzi erytroidních progenitorů: kostní morfogenetický protein 4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4), který aktivuje SMAD5 signální dráhu (Lenox et al, 2005), transkripční faktor STAT5, který je aktivován drahou EPO a jeho receptoru EPOR (Sokolovsky et al, 2001), již zmíněný SCF a jeho receptor c-KIT (Menon et al, 2006) a glukokortikoidní receptor (Bauer et al, 1999). Ke zvýšené produkci erytrocytů může docházet také následkem snížené apoptózy erytroidních progenitorů.

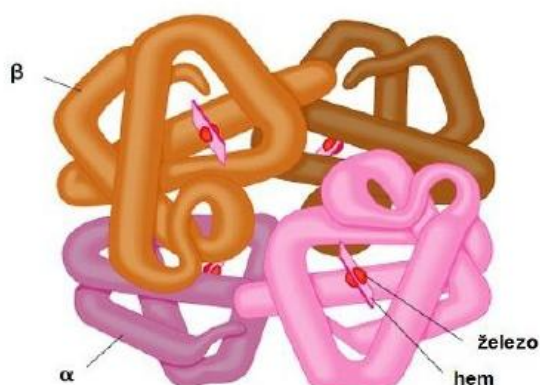
3. HEMOGLOBIN

Hemoglobin (Hb), červené krevní barvivo, je z funkčního hlediska nejdůležitější bílkovina obsažená v erytrocytech. Jeho hlavní funkcí je přenos kyslíku (O_2) z plic do tkání a oxidu uhličitého (CO_2) z tkání zpět do plic. Další funkce je pufrovací – redukuje změny v pH, které by mohly nastat při působení kyseliny nebo zásady v erytrocytech.

Molekula Hb (Obr. 4) je tvořena bílkovinnou složkou globinem a prostetickou skupinou hemem. Lidské Hb jsou tetramery tvořené dvěma páry polypeptidových řetězců, každý z řetězců obepíná hem v hemové kapse. Hem je protoporfyrin, jehož základem je čtveřice

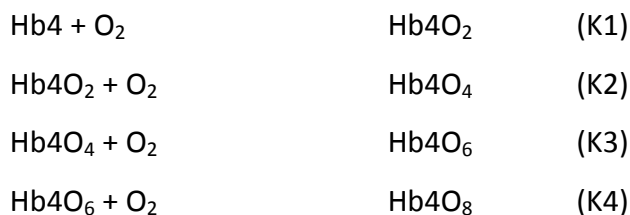
pyrolových jader (tetrapyrrol). Ve středu tetrapyrrolového jádra je šestivazný a dvojmocný iont železa.

Čtyřmi vazbami je iont železa vázán v tetrapyrrolovém kruhu, jednou vazbou na globinový řetězec a poslední šestá vazba je určena pro kovalentní interakci s molekulou kyslíku. Každý ze čtyř atomů Fe^{2+} v molekule hemoglobinu je schopen reverzibilně vázat jednu molekulu kyslíku (tzv. proces oxygenace hemoglobinu - při této vazbě zůstává železo ve dvojmocné formě a nedochází tak k oxidaci). Každý ze čtyř globinových řetězců vytváří hydrofobní hemovou kapsu, ve které se hem nachází a je tak chráněn před průnikem vody a ionty železa před autooxidací. Vnější povrch Hb molekuly tvoří nabitě aminokyseliny.



Obr. 4: Molekula hemoglobinu. Zdroj: <http://fikus.omska.cz>

Železo v molekule hemoglobinu je obvykle ve dvojmocné formě (Fe^{2+}). Hem, který je schopný vratné vazby s kyslíkem způsobuje, že molekula hemoglobinu může fungovat jako transportní protein pro kyslík. Oxidace železa na trojmocnou formu (Fe^{3+}) je méně vratná reakce, kdy dochází k přeměně hemoglobinu na methemoglobin, který nemůže vázat kyslík. Jedna molekula hemoglobinu může vázat až čtyři molekuly kyslíku (oxyhemoglobin). Formace oxyhemoglobinu může být znázorněna těmito čtyřmi kroky:



Afinitu ke kyslíku ovlivňuje kvarterní struktura Hb. Konstanty K1 až K4 vyjadřují skutečnost, že zcela deoxygenovaný Hb má nízkou afinitu pro první molekulu kyslíku. Po

vazbě prvního kyslíku se však afinita Hb ke kyslíku značně zvýší a vazba dalších molekul kyslíku je mnohem snazší. Je to způsobeno alosterickými změnami celé Hb molekuly. Proto má disociační křivka oxyhemoglobinu za normálních fyziologických podmínek sigmoidní tvar. Díky tomuto faktu jsou molekuly Hb v erytrocytech buď jen plně sycené kyslíkem (oxygenované) nebo zcela deoxygenované s minimálním zastoupením molekul Hb, které jsou nasycené jen částečně. Znamená to tedy, že i malý pokles tlaku kyslíku (jako je tomu mezi plicemi a tkáňovými kapilárami) vede k uvolnění dostatečného množství kyslíku z krve. Hb tedy může existovat jen ve dvou stabilních stavech; tzv. deoxy (T – tenzní konfigurace), kdy jsou globinové jednotky pevně vázané a nebo oxy (R – relaxovaná konfigurace) (podle Huisman, 1993).

Disociační křivka oxyhemoglobinu vyjadřuje závislost saturace a parciálního tlaku O_2 . Její sigmoidní tvar vyjadřuje přechody mezi tenzní a relaxovanou konfigurací Hb. Pro vyjádření afinity Hb k O_2 se v praxi používá hodnota PO_2-50 , která udává parciální tlak kyslíku, při kterém je Hb satureován z 50 %.

Nejdůležitějšími fyziologickými faktory, které ovlivňují afinitu Hb ke kyslíku jsou pH, koncentrace CO_2 a hladina 2,3-bisfosfoglycerátu (2,3-BPG). Afinita ke kyslíku se snižuje se zvyšujícím se tlakem CO_2 (tzv. Bohrův efekt). To napomáhá vstupu kyslíku do tkání, ve kterých pokles pH způsobený vzestupem koncentrace CO_2 snižuje afinitu Hb ke kyslíku (podle Huisman, 1993).

4. GENETICKÁ PODSTATA SYNTÉZY HEMOGLOBINU

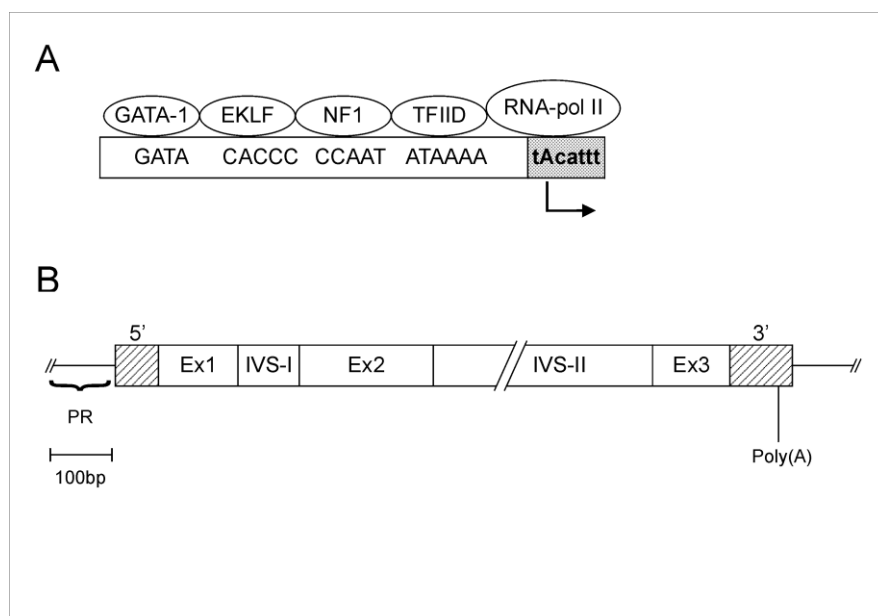
Syntéza hemu probíhá v erytroidních prekurzorech (proerytroblast až stádium retikulocyty) za podpory osmi nezbytných enzymů, které jsou kódovány rozdílnými geny (Ponka, 1997). Železo se dostává do erytroidních progenitorů z transferinu přes navázání na transferinové receptory pomocí endocytózy.

Syntéza α a β globinových řetězců probíhá také v erytroidních prekurzorech (stádium proerytroblastu až retikulocyty); δ globinová syntéza je ukončena před stádiem retikulocyty v cytoplazmě na ribosomech (Steinberg a Adams, 1991).

Geny kódující globinové řetězce se nacházejí na dvou lokusech na chromozomech 11 a 16. HBA lokus (α -globinový lokus) je lokalizovaný v blízkosti telomery na chromozomu 16 (16p13.3). HBB lokus (β -globinový lokus) je umístěn na chromozomu 11 v pozici 11p15.5.

Kromě funkčních genů se na obou lokusech nachází tzv. „pseudogeny“, které jsou nefunkčními homology globinových genů.

Všechny funkční lidské globinové geny mají podobnou základní strukturu. Skládají se ze tří exonů oddělených dvěma introny. Netraslatovaná oblast (5'UTR) mRNA globinového genu je kódovaná sekvencí ležící mezi CAP oblastí a iniciačním kodonem (ATG) zahrnující konzervované sekvence zodpovědné za transkripci genu (Sgourou et al, 2004). Oblast 3'UTR je kódovaná sekvencí mezi terminačním kodonem (TAA) a poly(A) koncem, kde se nachází sekvence zodpovědná za signál pro sestřih 3' konce primárního transkriptu a přidání poly(A) konce a udržení stability výsledné RNA molekuly (Obr. 5).



Obr. 5: Struktura β -globinového genu. (A) Promotor β -globinového genu s konvenčními sekvencemi elementů, ke kterým se vážou TF nezbytné pro zahájení transkripce. Šipkou je označen startovací nukleotid. (B) β -globinový gen sestávající z promotorové oblasti (PR), 5' a 3' nepřekládané oblasti (UTR, šrafovaně), tří exonů (Ex) a dvou intronů (IVS). Upraveno podle Divoký et al, 2005.

Organizace globinových lokusů

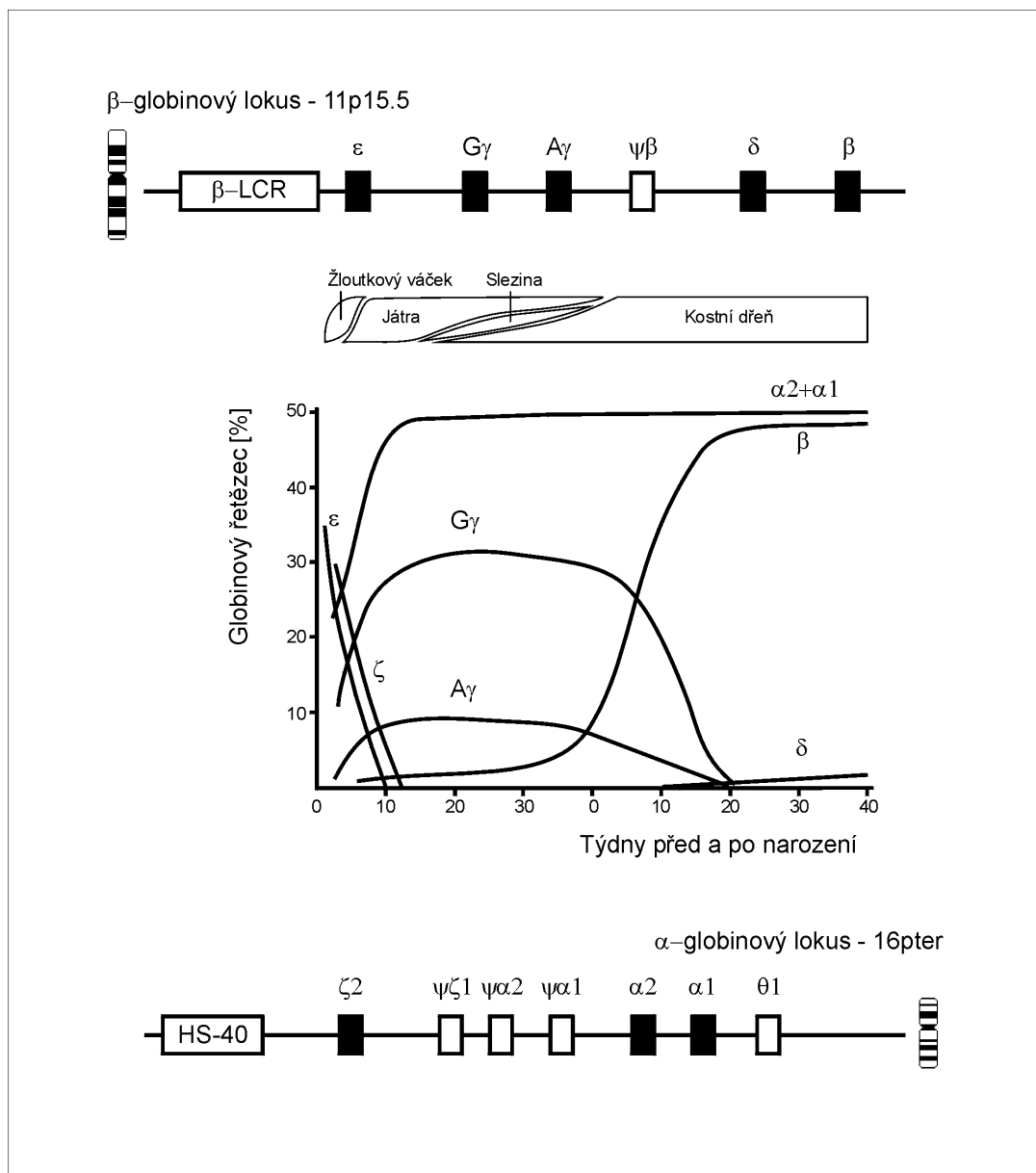
Globinové geny jsou lokalizovány ve dvou lokusech. HBA lokus ležící na chromozomu 16 je dlouhý přes 28 kb a nachází se na něm geny v následujícím pořadí $\zeta 2$, pseudogen $\zeta 1$, dva pseudogeny α a dva α geny pojmenované jako $\alpha 2$ a $\alpha 1$. Na konci lokusu se nachází gen θ s neznámou funkcí (Obr. 6). Globinové geny $\alpha 2$ a $\alpha 1$ (označované *HBA2* a *HBA1*) jsou vysoce

homologní (98,5 %), *HBA2* gen za normálních okolností produkuje 2-3krát více α -globinových řetězců než gen *HBA1* (Higgs, 2009).

Na HBB lokusu na chromozomu 11 se nachází: ϵ gen, dva γ geny ($G\gamma$ a $A\gamma$), pseudogen β , δ gen a β gen (označovaný *HBB*). Jednotlivé geny na obou lokusech leží v pořadí, ve kterém se postupně, během ontogeneze, exprimují (Obr. 6). Existuje široká variabilita α a β globinových lokusů mezi jednotlivci a skupinami, s mnoha polymorfizmy a alelickými variantami.

Transkripce globinových genů na obou lokusech se spouští po interaci TF s promotory a vzdálenými tkáňově specifickými zesilovači genové exprese: „ β -locus control region“ (β -LCR) pro HBB lokus a „hypersensitive site 40“ (HS-40) oblast pro HBA lokus.

Během hemoglobinového přepínání se erytrocyty, které obsahují převážně jeden typ hemoglobinu, nahrazeny červenými krvinkami obsahujícími jiný typ hemoglobinu. Postupný přechod exprese jednotlivých globinových genů ukazuje obrázek 6.



Obr. 6: Schematické znázornění β-globinového lokusu na chromosomu 11 a α-globinového lokusu na chromosomu 16. β-LCR a HS-40 jsou regulační oblasti globinových genových rodin, působící v poloze *cis*. Funkční geny na lokusech jsou vyznačeny černě, nevybarvené obdélníky jsou pseudogeny (psi). Jednotlivé globinové řetězce syntetizované ve žloutkovém váčku, játrech, slezině a kostní dřeni během ontogenetického vývoje, vyjádřené v procentu celkového Hb. Přepnutí z embryonálních Hb na HbF je ukončeno v 10. týdnu; přepnutí z HbF na Hb dospělého typu probíhá v období těsně po narození. Upraveno podle Divoký et al, 2005.

U zdravých jedinců je exprese globinových genů balancovaná a to tak, že množství nasyntetizovaných α-globinových řetězců ze 4 funkčních *HBA* genů odpovídá produkci β-globinových řetězců ze dvou *HBB* genů. Při transkripci globinových genů vzniká asi 2,5krát více α mRNA než β (mimo jiné je to dáno i rozdílnou stabilitou mRNA), ale syntéza β řetězců je translačně více efektivní, což kompenzuje nadbytek α globinových řetězců (Voon a

Vadolas, 2008). Kontrola syntézy globinových řetězců probíhá z větší části na úrovni transkripce, translace je závislá na přítomnosti hemu. Snížená hladina železa vede ve finále k inaktivaci iniciačního faktoru translace a vede tak k redukci syntézy globinových řetězců (Hermine a Roméo, 2006).

Normální hemoglobiny

Majoritním hemoglobinem v dospělosti je hemoglobin A ($\alpha_2\beta_2$). Spolu s minoritními hemoglobiny A₂ a F vytváří celkové Hb spektrum u dospělého jedince. HbA tvoří asi 97 % všech hemoglobinů v erytrocytu dospělého jedince. HbA₂ tvoří u dospělých asi 1,5 – 3 % z celkového Hb spektra. Ihned po narození je procento podstatně nižší (0,2 – 0,3 %) s postupným zvyšováním do prvních dvou let života. Molekula HbA₂ je tvořena dvěma řetězci α a dvěma řetězci δ ($\alpha_2\delta_2$). Jeho funkce je velmi podobná HbA (Steinberg a Adams, 1991) (podobná interakce s 2,3-BPG), ale na rozdíl od HbA inhibuje polymerizaci HbS (Steinberg, 1998) a má vyšší afinitu ke kyslíku (Nagel a Steinberg, 2001). Redukovaná syntéza HbA₂ v dospělosti v porovnání s HbA je dána sníženou expresí δ genu. Snížená hladina HbA₂ se vyskytuje u deficitu nebo funkčních poruch metabolismu železa a u nosičů α , δ nebo $\delta\beta$ talasemické alely. Zvýšená hladina HbA₂ je typickým nálezem u velké většiny nosičů β talasemické alely.

Hemoglobin F

HbF je majoritní Hb v prenatalní době. Jeho afinita ke kyslíku je vyšší než u HbA, což usnadňuje přenos kyslíku z matky na dítě; umožňuje vyvíjejícímu se plodu efektivněji získávat kyslík z krve matky. Molekula HbF je tvořena dvěma řetězci α a dvěma řetězci γ ($\alpha_2\gamma_2$). Během prvního roku života se hladina HbF rapidně snižuje na hodnotu obvykle měřenou u dospělých jedinců (do 1 %). Procento HbF se může pohybovat v době narození v rozmezí 60 – 95 %. V HBB lokusu produkují γ -globinové transkripty dva geny G γ (označovaný jako *HBG2*) a A γ (označovaný jako *HBG1*). Během prenatalního období a ihned po narození je poměr G γ a A γ mezi 2:1 až 3:1. Během několika prvních měsíců života se poměr přiblíží poměru v dospělé populaci 2:3 (Rochette et al, 1994).

U zdravých dospělých jedinců je HbF heterogenně distribuován do erytrocytů, které označujeme F buňky (Thein a Craig, 1998). Množství F buněk je značně variabilní, uvádí se od

0,6 % do 22 % (Garner et al, 2000). Procento HbF je ovlivněno věkem, pohlavím (mírně vyšší bývá u žen). U některých jedinců přetrvává zvýšená hladina HbF i v dospělosti, důvodem může být hereditární perzistence fetálního hemoglobinu (HPFH). Ve většině případů je příčinou delece v lokusu HBB, méně často bodová mutace v promotoru γ -globinového genu (Stomatoyanopoulos, 2005).

5. HEMOGLOBINOPATIE

Hemoglobinopatie jsou nejčastější monogenně dědičné choroby na světě, postihují asi 7 % světové populace (Weatherall, 2008). Největší výskyt tohoto onemocnění je v malarických oblastech - v oblasti Středomoří, jihovýchodní Asii, Africe, Středním východě a v Indii. Během posledních let se incidence hemoglobinopatií zvýšila ve státech severní a střední Evropy a také v severní Americe v důsledku demografických změn. Mezi hemoglobinopatie se řadí všechna genetická onemocnění hemoglobinu rozdělena do tří hlavních skupin: talasemie, strukturní hemoglobinové varianty (abnormální hemoglobiny) a HPFH (dědičné přetrvávání produkce fetálního hemoglobinu). Všechny jsou způsobené mutací a/nebo delecí v genech kódujících pro globinové řetězce. Mutace, která způsobí poruchu některého z globinů, jejímž důsledkem je nerovnováhu v poměru α a β globinových řetězců v erytrocytech, se nazývá talasemie (kvantitativní globinová porucha). Mutace, které vedou k syntéze strukturně abnormálních globinových řetězců se řadí ke kvalitativním globinovým defektům. Syntéza některých abnormálních globinových řetězců může být kombinovaná s redukcí jejich tvorby a mohou tak vznikat hemoglobinové varianty s nerovnováhou α a β řetězců s talasemickým klinickým obrazem. Hemoglobinopatie mají variabilní klinickou manifestaci od mírných hypochromních anemií až po závažné stavy se závislostí na transfúzích s multiorgánovým postižením (upraveno podle Divoký et al, 2013).

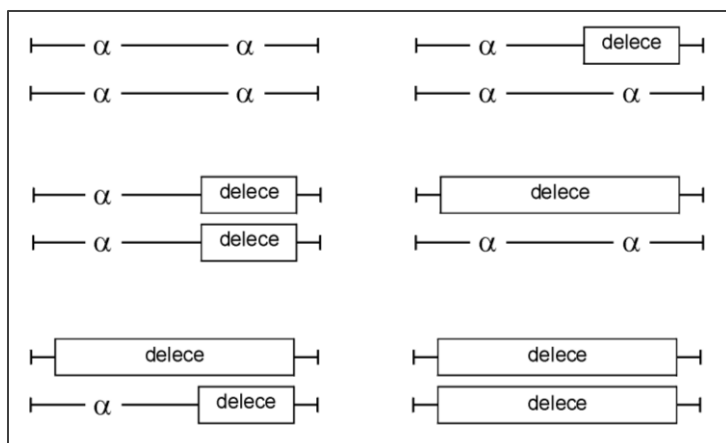
Na hemoglobinopatii třeba pomýšlet, když je u pacienta zjištěna mikrocytární hypochromní anemie po vyloučení příčiny nedostatku železa, při chronické hemolytické anemii, při erytrocytóze a/nebo cyanóze způsobené hematologickými faktory a v prenatální diagnostice.

Talasemie

Mezi talasemie řadíme všechny talasemické poruchy syntézy hemoglobinu. Jedná se o autozomálně recesivně dědičné choroby, největší klinický význam mají α a β talasemie. Přenašeči talasemické alely (heterozygoti) trpí symptomy, které nejsou závažné, ale vyžadují pozornost – mírná mikrocytární hypochromní anemie refrakterní na příjmy železa. Pro homozygoty jsou typické vážné hypochromní hemolytické anemie a komplexní onemocnění. Obecně patofyziologie a klinické projevy talasemií závisí na míře nerovnováhy α a ne- α -globinových řetězců. Mezi α a β -talasemiemi je však zásadní rozdíl; při srovnatelné nerovnováze syntézy řetězců jsou β -talasemie vždy klinicky a morfologicky závažnější (větší mikrocytóza); volné α -globiny jsou více toxické k erytroidním progenitorům. Na rozdíl od beta-talasemií jsou totiž u alfa-talasemií volné beta a gamma-globinové řetězce schopné tvořit solubilní tetramery (ty jsou ale nestabilní a nemohou přenášet kyslík).

Alfa-talasemie

Jsou většinou způsobeny delecí funkčních α -globinových genů. Haploidní lidský genom má dva α -globinové geny, to znamená, že normální genotyp je $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (Obr. 7). Tak zvaný α -tal-2 genotyp se vyznačuje delecí jednoho ze dvou α -globinových genů lokusu a je nejčastější u černochů a v některých oblastech Středomoří a Asie. Patří sem světově nejrozšířenější delece, které jsou časté i v české populaci. Tak zvaný α -tal-1 genotyp je způsoben rozsáhlými delecemi postihujícími oba α -globinové geny a je častý v jihovýchodní Asii, Středomoří a na Filipínách. V těchto populacích je proto zvýšené riziko výskytu »hydrops fetalis«, vznikajícího důsledkem delece 4 α -globinových genů. V české populaci se genotyp α -tal-1 vyskytuje vzácněji než α -tal-2 genotyp, ale je relativně častý u imigrantů z Asie.



Obr. 7: Genotypové varianty delečních forem α -talasemií. Bližší charakteristika je uvedena v publikaci Divoká et al (příloha č. 5).

Další charakteristika α -talasemií, včetně genotypové a fenotypové variability, klinických forem, molekulární podstaty delečních i nedelečních forem a diagnostických metod je uvedena jako součást vlastní přiložené publikace (příloha č. 5).

Beta-talasemie

Beta-talasemie je dědičné onemocnění charakterizované redukovanou nebo chybějící syntézou β -globinového řetězce, která vede k různým fenotypovým projevům od těžkých anemických stavů až po klinicky asymptomatické jedince. Většina β -talasemií je dědičná autozomálně recesivně.

Z klinického hlediska dělíme β -talasemie na tři základní formy: talasemie major, známá také jako Cooley's anemia, talasemie intermedia a talasemie minor, dále na β -talasemie asociované s abnormální Hb variantou a autozomálně dominantní formy onemocnění. Jedinci s β -talasemií major jsou homozygoti nebo složení heterozygoti pro β^0 nebo β^+ -talasemii, jedinci s β -talasemií intermedia jsou většinou homozygoti nebo složení heterozygoti a postižení s β -talasemií minor jsou vesměs heterozygoti, nosiči talasemické alely.

Beta-talasemie (stejně jako α -talasemie) se vyskytuje nejčastěji v malarických oblastech. Pacienti s talasemií major obvykle vyžadují pravidelné krevní transfúze. V dospělosti je detekován pouze HbF a HbA₂ a žádný HbA. Neléčení nemocní s β -talasemií major trpí deformitami kostí vznikajícími v důsledku expanze krvetvorby z dřevných prostor, retardací růstu, hepatosplenomegalií a jsou trvale závislí na transfúzích, což u nich

vede k projevům přetížení organismu železem. Jednotlivci s talasemií intermedia představují heterogenní skupinu stran fenotypových projevů, obecně se u nich vyskytuje středně těžká anemie s občasnou potřebou krevní transfúze. I tak mohou být ohroženi syndromem přetížení organismu železem. Molekulární mechanismus tohoto jevu souvisí s nízkou hladinou hepcidinu, který je negativním regulátorem absorpce železa v tenkém střevě a uvolňování železa ze zásobních makrofágů. Tyto poznatky mají velký význam pro rozvoj nových terapeutických přístupů v léčbě sekundárních stavů přetížení organismu železem u β -talasemií (Sankaran a Weiss, 2015). Většina heterozygotů pro β -talasemické mutace je klinicky asymptomatických jen s mírnou mikrycytární, hypochromní anemií (Divoký et al, 2013).

Molekulární podstata β -talasemií

Většina mutací způsobujících β -talasemii je bodových (záměna jednoho nukleotidu v molekule DNA) nebo delece či inserce nukleotidů vedoucích k posunovým mutacím. Méně často je příčinou β -talasemie dlouhá delece v rámci *HBB* genu nebo celého lokusu. K dnešnímu dni bylo identifikováno více než 200 mutací způsobujících β -talasemii. Kompletní seznam všech mutací je dostupný na stránkách Globin Gene Server Web (<http://www.globin.cse.psu.edu>), případně dalších databázích. Mutace, které jen částečně zablokuje syntézu β -globinových řetězců se nazývají β^+ -talasemické mutace, ty které zcela zastaví syntézu β -globinových řetězců, jsou uváděny jako β^0 -talasemické mutace. Většina mutací pro β^0 a pro β^+ talasemii vedou k odlišným hematologickým fenotypům; u nosičů talasemické alely je charakteristická relativní erytrocytóza s redukováným středním objemem erytrocytů (MCV 60 -70 fl) a se zvýšenou hladinou HbA₂ (3 – 6 %). Existují výjimky s netypickým fenotypem zahrnující tzv. „silent“ β -talasemické nosiče s hraničními nebo normálními hematologickými hodnotami nebo nosiče – heterozygoty s redukováným MCV, ale s normální hladinou HbA₂ nebo naopak s neobvykle vysokou hladinou HbA₂ nad 6 %. Někteří jedinci mohou mít zvýšenou hladinu HbF (nad 2 %) (Kanavakis a Traeger-Sinodinos, 2006).

Vznik hybridních δ/β genů vede ke vzniku talasemických hemoglobinových variant, např. Hb Lepore, kdy dochází k fúzi N-terminální aminokyselinové sekvence normálního δ -globinového řetězce s C-terminální částí normální sekvence β -globinového řetězce (Steinberg a Adams, 1983).

Hypernestabilní β -globinové řetězce náleží do skupiny β -globinových mutantů vedoucích k produkci Hb variant, které jsou extrémně nestabilní a precipitují ještě před spojením s α -globinovými řetězci do molekuly Hb. Dochází tak k hromadění volných α -globinových řetězců a to vede k fenotypu talasemie intermedia. Do této skupiny patří i Hb Hradec Králové (β 115 Ala-Asp), popsáný u matky a dcery z Čech (Divoky et al, 1993).

Vzácně se vyskytují dominantní formy β -talasemií. Heterozygoti mají fenotyp talasemie intermedia s Heinzovými tělísky v erythrocytech i v prekurzorech a hemolýzu. Bylo popsáno více než 30 dominantně vrozených β -talasemických mutací, mnoho v jednotlivých rodinách nebo izolovaných případech a často vznikají jako „*de novo*“ mutace. Často jsou v důsledku mutace syntetizovány vysoce nestabilní β -globinové řetězce, které nelze detekovat na proteinové úrovni. Spektrum fenotypové závažnosti dominantních β -talasemií je spojený se stupněm nestability abnormálních β -globinových řetězců (Thein, 1999).

V některých vzácných případech se mohou mutace, které způsobují β -talasemií, nacházet mimo oblast *HBB* genu nebo celého *HBB* lokusu. Bylo popsáno, že u jedinců s klinickým obrazem vrozené mikrocytární hypochromní anémie a se zvýšeným HbA₂ nebo HbF, u kterých analýzy vyloučily postižení globinových genů, mohou být mutovány geny kódující faktory tzv. Hb přepínání (*KLF1* a *BCL11A*) (Cao a Galanello, 2010; Rivella, 2015).

Diagnostika β -talasemií

Velká část nosičů β -talasemické alely má zvýšenou hladinu HbA₂ nad normální hranici 3 % (3–6 %). Asi jedna třetina heterozygotů má zvýšenou i hladinu HbF nad 1 %. U homozygotů pro β^0 -talasemii detekujeme jen HbF a minoritní frakci HbA₂. Na molekulární úrovni detekujeme bodové mutace v rámci *HBB* genu pomocí Sangerova sekvenování a deleční formy β -talasemií analyzujeme pomocí metody MLPA.

Při **diferenciální diagnostice β -talasemie minor, získané sideropenické anémie a vrozených poruch transportu iontů železa**, které bývají také asociovány s hypochromní mikrocytární anémií, se v první řadě opíráme o stanovení hladiny HbA₂ a HbF:

- β -talasemie minor: HbA₂ zvýšený nad 3-5 %
- sideropenická anémie a vrozené poruchy transportu iontů železa: normální hladina HbA₂ (pod 3 %)
- 1/3 nosičů β -talasemické alely má i mírně zvýšenou hladinu HbF (nad 1 %)

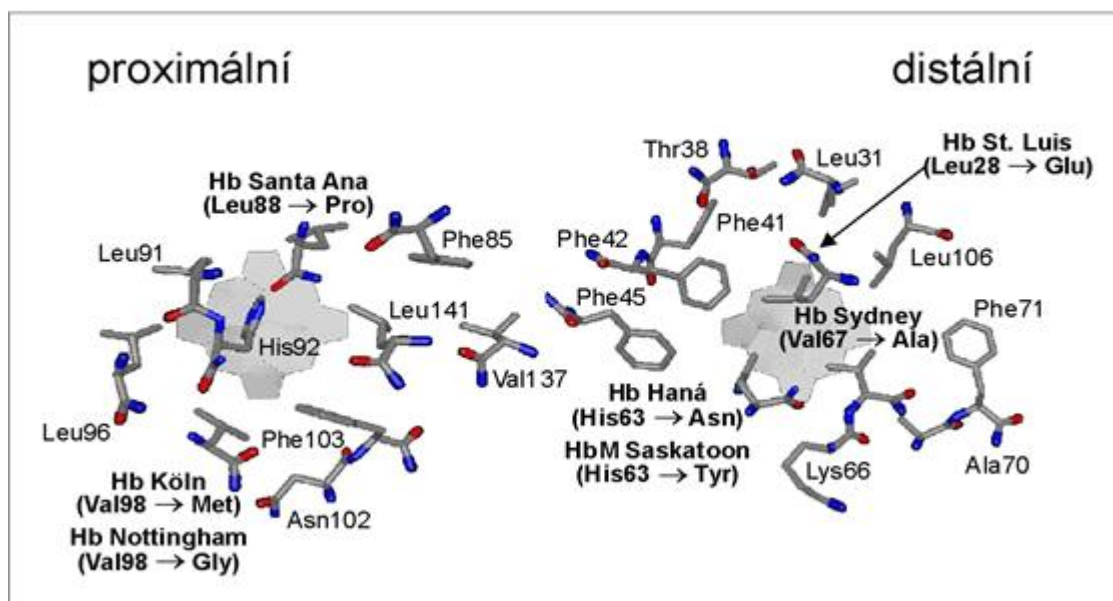
Správná diagnóza je důležitá především pro správnou volbu terapie, protože neopodstatněné podávání preparátů železa pacientům s β -talasemií nebo s vrozenými poruchami transportu iontů železa může vést k přetížení organismu železem.

Klinický obraz heterozygotů pro $\delta\beta$ -talasemii připomíná β -talasemii minor; produkce HbF je však u nich zvýšena až na 5-20 %. Homozygoti pro $\delta\beta$ -talasemii tvoří jen HbF a hematologicky připomínají β -talasemii intermedia. Při diferenciální diagnostice nám pomáhá určení hladiny HbA₂, která je u pacientů s $\delta\beta$ -talasemií normální.

Strukturní hemoglobinové varianty

Jedná se o skupinu onemocnění způsobenou strukturní změnou v molekule Hb vznikající v důsledku aminokyselinové záměny v globinovém řetězci. Nejčastější příčinou na genové úrovni jsou bodové mutace v kódujících sekvencích globinových genů, ale mohou to být i krátké delecce. Fenotypové projevy postižených jedinců mohou být různé, od závažných forem s těžkou anémií či hemolýzou po téměř bezpříznakové projevy. Toto závisí na funkci a stabilitě výsledné Hb molekuly.

Hb abnormality můžeme rozdělit do několika skupin: 1. Varianty s tendencí agregovat a formovat srpkovité krvinky; 2. Varianty s abnormální Hb syntézou – tzv. talasemické Hb, např. HbE; 3. Abnormální varianty s hemolýzou a tendencí precipitovat (nestabilní hemoglobiny), např. Hb Köln (Obr. 8) a 4. Hemoglobinové varianty s abnormálním transportem kyslíku (např. Hb Olomouc) a kongenitální polycytemie nebo varianty s kongenitální cyanózou (abnormální methemoglobiny) (Indrák et al, 1995). Třetí a čtvrtá skupina způsobuje vážná onemocnění u heterozygotů, homozygotní postižení je fatální.



Obr. 8: Proximální a distální strana hemové kapsy se schematickým znázorněním několika aminokyselinových záměn v β -podjednotce hemoglobinu zjištěných v české a slovenské populaci (převzato z Divoký et al, 2005). Substituce hem-kontaktních (proximální a distální His) nebo vnitřních nepolárních aminokyselin (Leu, Val) polárními aminokyselinovými zbytky způsobují změnu hydrofobních vlastností hemové kapsy, snadnější průnik vody a jiných oxidačních látek do hemové kapsy a následnou oxidativní denaturaci Hb.

K dnešnímu dni bylo popsáno více než tisíc Hb variant, z nichž dvě třetiny jsou varianty β -globinového řetězce (Globin Gene Server; <http://globin.cse.psu.edu>). Nejčastější Hb varianty po celém světě jsou endemické hemoglobiny HbS, HbC a HbE.

Diagnostika strukturních hemoglobinových variant

Pro zjištění strukturní hemoglobinové varianty je důležitá elektroforéza Hb, která odhalí abnormální frakci mimo standardní Hb spektrum. Nestabilní Hb varianty ovšem nemusí být na elektroforéze zachytitelné, pro tyto případy se provádějí tzv. testy stability: izopropanolový test, test tepelné stability a test na Heinzova tělíska. Mutace na DNA úrovni se detekují pomocí klasického Sangerova sekvenování.

PRAKTICKÁ ČÁST

6. CÍLE PRÁCE

Tato disertační práce si stanovuje následující specifické cíle

1. Molekulárně-genetická charakteristika hemoglobinopatií vedoucích k vrozeným hemolytickým anemiím a dalších strukturních hemoglobinových variant
2. Molekulárně-genetická charakterizace poruch globinové syntézy u nemocných z České republiky, se zaměřením na talasemické syndromy

7. MATERIÁL A METODY

V této kapitole se zaměřuji pouze na ty metodické postupy, na kterých jsem se aktivně podílela.

Soubor pacientů

Analyzovaný soubor tvořilo 579 jedinců s podezřením na hemoglobinopatii s nálezem mikrocytární hypochromní anemie a s pozitivní rodinnou anamnézou. Jednalo se o pacienty a jejich rodinné příslušníky, kteří byli sledováni na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci nebo na hematologických pracovištích v České republice a na Slovensku.

Biologický materiál

Periferní krev pacientů byla odebrána do K₃EDTA odběrových zkumavek. Ze vzorku krve byly prováděny základní bioanalytické testy, zhotoven hemolyzát a z leukocytů byla získána DNA pro genetickou analýzu.

Bioanalytické testy

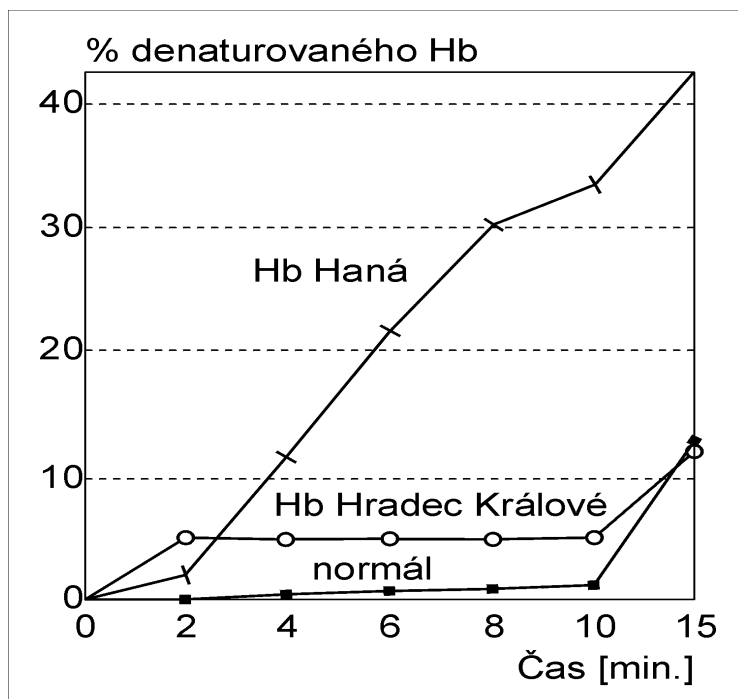
Hemolyzát byl připraven z erytrocytů periferní krve metodou vytřepání chloridem uhličitým s následnou centrifugací. Výsledný hemolyzát byl uchováván při teplotě -80 °C (Kutlar a Huisman, 1991).

Stanovení **hladiny HbA₂ a HbS** bylo provedeno ionexovou chromatografií pomocí kitu Sickel-Thal Quik Column (Helena BioSciences Europe; Velká Británie) dle postupu doporučeného výrobcem.

Hladina **HbF** byla stanovena metodou alkalické denaturace ve vzorku hemolyzátu (Kutlar a Huisman, 1991).

Elektroforéza hemoglobinu byla provedena v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Separovaný vzorek hemolyzátu byl poté obarven Coomassie Brilliant Blue a bylo vyhodnoceno hemoglobinové spektrum.

Izopropanolový test byl proveden inkubací hemolyzátu pacienta se 17% roztokem izopropanolu (Kutlar a Huisman, 1991) a vyhodnocen zákal nebo precipitace svědčící pro přítomnost nestabilní hemoglobinové varianty. V některých případech byl použit test tepelné stability hemoglobinu (Kutlar a Huisman, 1991) (Obr. 9).



Obr. 9: Poměr denaturovaného Hb v závislosti na délce inkubace v testu tepelné stability (TTS). Srovnání vysoce nestabilního Hb Hradec Králové s nestabilním Hb Haná. Hb Hradec Králové je rozkládán již v erythroblastech a v erytrocytárním lyzátu je ho jen malé množství, které se rozloží v TTS během 2 minut. Vzestup křivky po 10 minutách značí denaturaci HbA (převzato z Divoký, 2002).

Heinzova tělíska byla detekována v nátěrech periferní krve u pacientů s nestabilní hemoglobinovou variantou nebo HbH, které byly pořízeny po inkubaci krve pacienta s 1% roztokem Brilliant kresylové modři (Huisman THJ, 1990).

Molekulárně-genetické testy

Izolace DNA

Pro izolaci genomické DNA z periferní krve pacientů byla použita metoda fenol/chloroform/isoamylalkohol s následnou etanolovou precipitací, PureGene® Blood Core Kit B (Qiagen, Valencia, CA) nebo automatický izolátor nukleových kyselin DNA MagNA Pure (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Izolace retikulocytární RNA

Retikulocyty byly izolovány z periferní krve pomocí sacharózového gradientu (1,5M sacharóza a 0,15M KCl). Následně byla izolována retikulocytární RNA pomocí guanidinium thiocyanat/fenol/chloroformové extrakce (Chomczynski a Sacchi, 1987).

Reverzní transkripce

Retikulocytární RNA (1 µg) byla přepsána do molekuly komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptázy AMV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, USA).

Southern blot

Southern blot analýza probíhala po naštěpení genomické DNA restričními endonukleázami EcoRI, BglII, NcoI, EcoRI, PstI and BamHI (Promega Corporation, Madison, USA). Fragmenty naštěpené DNA byly separovány v 0,8% agarózovém gelu a následně přeneseny na nylonovou membránu Hybond+ (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membrána byla hybridizována s probami zahrnující oblast 5'β, β-globin IVS-II a 3'β oblasti *HBB* genu, které byly značeny radioaktivním fosforem ³²P (Hartmann analytics, Germany). Naznačené specifické fragmenty byly vyzářeny na X-Ray film, (Kodak, USA).

Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) probíhala v 50 µl nebo 25 µl objemech v 1krát PCR pufru s 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs mix a 1 U Taq polymerázy (AmpliTaq Gold®, Applied Biosystems by Life Technologies, USA) s přidáním 20 pmol primerů (viz. tabulka primerů příloha č. 2). Jako templát bylo použito 100 ng DNA nebo cDNA (1/10 objemu reverzní transkripce). Amplifikace proběhla v termocycleru po úvodní denaturaci (95°C, 10 min) v 35 cyklech při teplotách 95°C (45 s), 56°C (45 s) a 72°C (1 min), závěrečná polymerace trvala 10 min při 72°C.

Inverzní polymerázová řetězová reakce

Inverzní PCR probíhala v 50 µl objemech v 1krát PCR pufru s 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs mix a 1 U Taq polymerázy (AmpliTaq Gold®, Applied Biosystems by Life Technologies, USA) s přidáním 20 pmol primerů. K amplifikaci fragmentu a sekvenaci místa spojení byly použity dvojice primerů: β-Ex2-R; β-IVS-II-F a β-Ex3-F; β-Ex3-R (viz. tabulka primerů příloha č. 2). Jako templát bylo použita DNA po ligaci a následné linearizaci restriční endonukleázou. Amplifikace proběhla v termocycleru po úvodní denaturaci (95°C, 10 min) v 35 cyklech při teplotách 95°C (45 s), 59°C (45 s) a 72°C (1 min), závěrečná polymerace trvala 10 min při 72°C.

Klonování

PCR produkty byly ligovány do pZErO® vektoru (Zero Background™ Cloning Kit, Invitrogen by life technologies, USA) s kanamycinou rezistencí po linearizaci vektoru Eco RV restriční endonukleázou (Promega Corporation, Madison, USA). Cirkulární plasmid s fragmenty DNA byl transformován do kompetentních buněk *Escherichia coli* (New England BioLabs, UK), které byly následně kultivovány na LB agarových miskách s přidavkem kanamycinu ve výsledné koncentraci 50 µg/ml. Narostlé kolonie byly vypichovány a rozkultivovány jednotlivě v LB médiu s přidavkem baktoagaru a kvasnicového extraktu.

Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byl použit Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Německo) a postup izolace doporučený výrobcem.

Příprava PCR produktů pro sekvenační reakci

PCR produkty získané v rámci *HBB* genu byly vyřezány z agarózového gelu a přečištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (QIAGEN, Německo) dle postupu určeného výrobcem.

Sekvenační analýza

Klasické Sangerovo sekvenování bylo provedeno pomocí kitu T7 Sequenase vision 2.0 DNA sequencing kit (Amersham LIFE SCIENCE, USA). Sekvenační produkty byly značené radioaktivní sírou ³⁵S, následně byly separovány v polyakrylamidovém denaturačním gelu (s přidavkem 6 M močoviny) a vyzářeny na X-Ray film, (Kodak, USA). Novější sekvenační analýzy byly provedeny pomocí kitu BigDye terminator v1.1 (Applied biosystems by Life technologies, USA) a separovány v kapilární elektroforéze (Genetický analyzátor ABI PRISM™ 3100, Applied biosystems, USA). Výsledný chromatogram byl vyhodnocován v programu Chromas V1.5 (Technelysium Pty Ltd, Austrálie).

Alelově-specifická polymerázová řetězová reakce

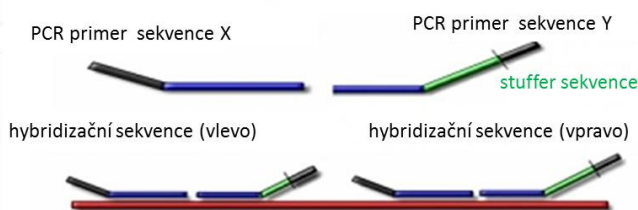
Alelově-specifická polymerázová řetězová reakce (ASO-PCR) pro identifikaci 6-ti nejběžnějších typů delecí v rámci HBA lokusu (Chong et al, 2000) byla provedena v 50 µl objemech pomocí LA DNA Polymerases Mix (Top-Bio, Česká republika). Amplifikace proběhla v termocycleru po úvodní denaturaci (95°C, 10 min) v 30 cyklech při teplotách 97°C

(45 s), 60°C (1 min 15 s) a 72°C (2 min 30 s), závěrečná polymerace trvala 10 min při 72°C. PCR produkty byly separovány v 1% agarozovém gelu obarveným ethidium bromidem. Pro detekci sedmi nejčastějších α -talasemických delecí bylo vytvořeno multiplexní PCR). Tato metoda se používá pro určení dvou nejčastějších α^+ -talasemických delecí ($-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$) a dalších 5 α^0 -talasemických delecí, mezi nimi $--^{MED}$ a $--^{SEA}$. Novější MLPA (viz dále) je založena na ligaci více párů prób (obvykle dlouhých), které hybridizují napříč k analyzované oblasti. Následuje semi-kvantitativní amplifikace s použitím univerzálních tag PCR primerů a poté fragmentační analýza.

Multiplex ligation-dependent probe amplification

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) metoda je založena na ligaci dvou sond s následující amplifikací. MLPA slouží k detekci změn počtu kopií genových sekvencí – od malých (nukleotidových) delecí až po rozsáhlé delecce celého lokusu, ale i duplikací a amplifikací (Obr. 10). Pro hybridizaci byly použity panely P140 HBA a P102 HBB (MRC-Holland, Holandsko) a byl dodržen postup doporučený výrobcem. Následně byly produkty MLPA reakce separovány v kapilární elektroforéze (Genetický analyzátor ABI PRISMTM 3100, Applied biosystems, USA). Výsledky byly vyhodnoceny v programu GeneMarker[®] v1.85 (SoftGenetics, USA).

1. Denaturace a hybridizace



2. Ligace



3. PCR pomocí univerzálních primerů X a Y



4. Fragmentační analýza



Obr. 10: MLPA využívá až několik desítek sond, z nichž každá je specifická pro různé sekvenční DNA. Každá sonda je složena ze dvou 5' a 3' polovičních sond sestávajících z cílové a specifické sekvenční a z univerzálního primeru, který umožňuje PCR amplifikaci všech sond. Kromě toho jedna nebo obě dvě poloviční sondy obsahují ucpávací sekvenci, který umožňuje diferenciaci v průběhu elektroforézy. Průběh MLPA lze rozdělit do čtyř kroků (viz Obr.). V prvním kroku je DNA denaturována a inkubována se směsí sond MLPA. Každá sonda MLPA se skládá ze dvou oligonukleotidů, které se nahybridizují na sousední cílovou sekvenci DNA, a v dalším kroku dochází k jejich ligaci. Ve třetím kroku dochází k PCR amplifikaci, která se provádí za použití pouze jednoho páru PCR primerů, z nichž jeden je fluorescenčně značený. Během PCR reakce jsou amplifikovány pouze ligované sondy. PCR produkty jsou v dalším kroku odděleny na základě velikosti pomocí kapilární elektroforézy. Rozdíly mezi různými vzorky DNA jsou zjišťovány porovnáním výsledných píků. Měří se výška nebo plocha získaných píků. Klíčovým bodem v reakci MLPA je to, že nedochází k PCR amplifikaci cílové sekvenční, ale dochází k hybridizaci a ligaci sond na cílové sekvenční DNA. Upraveno podle: www.mrc-holland.com.

8. VÝSLEDKY A DISKUZE

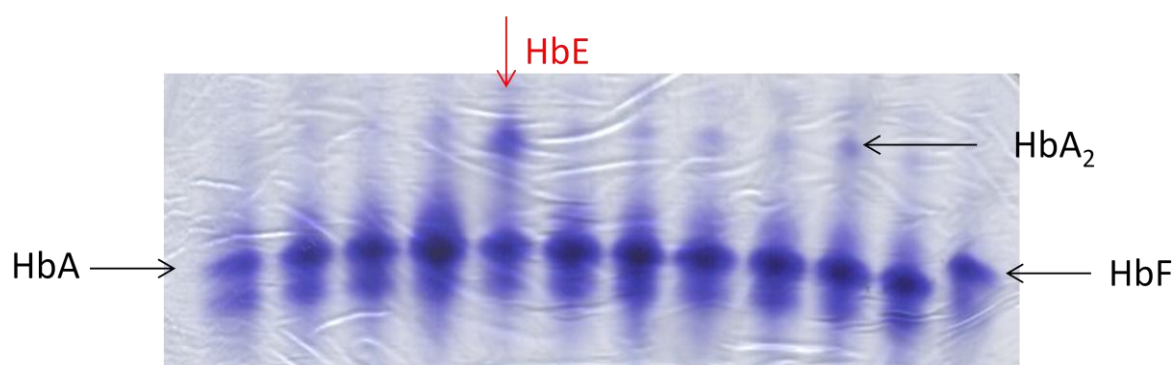
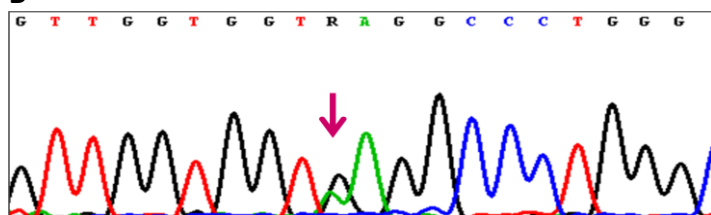
8.1 Molekulárně-genetická charakteristika strukturních hemoglobinových variant

Hypotézy. Při řešení cíle spojeného s molekulárně-genetickou charakterizací strukturních hemoglobinových (Hb) variant jsme vycházeli z předpokladu, že nejčastějšími Hb variantami budou ve vyšetřovaném souboru již dříve v ČR diagnostikované HbE a Hb Lepore (Indrák et al, 1995; Divoký et al, 2005). Dále jsme očekávali, že se stoupající migrací budou (u imigrantů a jejich potomků) diagnostikovány i endemické hemoglobinové varianty, jako jsou HbS a HbC. Také jsme vycházeli z hypotézy, že u části nemocných s vrozenou hemolytickou anémií bude odhalena nestabilní hemoglobinopatie.

Vyšetřovaný soubor, výsledky bioanalytických testů a molekulárně-genetických analýz

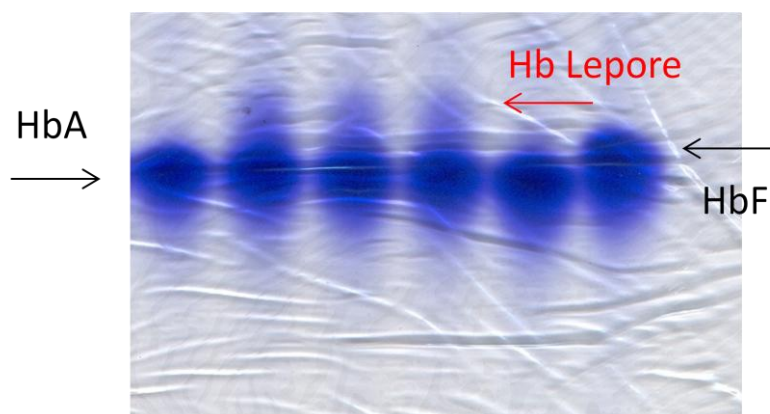
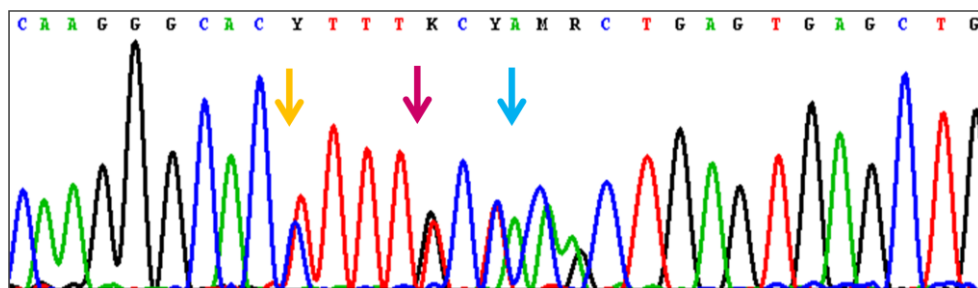
Vyšetřovaný soubor tvořilo 52 jedinců z 37 rodin s podezřením na hemoglobinopatii - pacienti s normální nebo zvýšenou hladinou HbA₂ a HbF a zároveň s nálezem v krevním obraze, který spolu s rodinnou anamnézou a dalšími vyšetřeními podporoval diagnózu hemoglobinopatie, a u kterých byla již dříve vyloučena α nebo β -talasemie. Jednalo se o analýzu vzorků vyšetřovaných v Laboratoři molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky FNOL v letech 2008 – 2015. Pomocí bioanalytických testů a sekvenční analýzy *HBB* genu byla u nemocných potvrzena strukturní hemoglobinová varianta.

HbE β 26 (Glu→Lys) (HbVar ID 277; *HBB*: c.79G>A) byl detekován v našem souboru u 14 jedinců z 11 rodin. Všichni byli nosiči alely pro HbE, ve dvou případech se jednalo o dvojité heterozygoty v kombinaci s β -talasemickou mutací IVS-I-1 (G→A) a CD37 (TGG→TGA). HbE patří mezi tzv. talasemické hemoglobiny, většina heterozygotů jsou bezpříznakoví nebo s mírnou mikrocytární anémií (Indrák et al, 1995). HbE byl ve všech případech detekován na proteinové elektroforéze (Obr. 11A) - vykazuje jen velmi mírnou nestabilitu a pomocí ionexové chromatografie při měření HbA₂ (HbE putuje ve stejném pruhu jako HbA₂). U všech jedinců byla potvrzena mutace v kodonu 26 *HBB* genu (β 26 Glu→Lys) pomocí Sangerova sekvenování (Obr. 11B).

A**B**

Obr. 11: Proteinová a DNA diagnostika HbE. (A) Proteinová elektroforéza, polyakrylamidový gel barvený Coomasie blue. Na obrázku zobrazené jednotlivé frakce hemoglobinového spektra. HbE putuje stejně jako frakce HbA₂, u některých vzorků je patrná výrazněji frakce HbA₂, jedná se o nosiče β -talasemické mutace. Potvrzení HbE a odlišení tak od frakce HbA₂ bylo pomocí molekulárně genetického vyšetření - sekvenační analýzou. (B) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s HbE, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 26 *HBB* genu GAG→AAG a zároveň nukleotid standardní alely ve stejné pozici.

U 6 rodin (10 členů) jsme v našem souboru diagnostikovali nosičství pro Hb Lepore (HbVar ID 743-744). Jedná se o hybridní hemoglobin vznikající v meioze nerovnoměrným překřížením (nerovnoměrný „crossingover“) mezi δ - a β -globinovými geny. Tento proces vede ke genové fúzi, zachovává čtecí rámec, ale celý gen je pod vlivem slabého δ -globinového promotoru. Vzniká tak hybridní globinový řetězec, který v kombinaci s α -globinovými řetězci vytváří skupinu Hb Lepore s talasemickým fenotypem (Divoký et al, 2013). Heterozygoti mají mírnou mikrocytární hypochromní anemii s normální hladinou HbA₂ a se zvýšenou hladinou HbF. Hb Lepore je stabilní, lze jej detekovat na proteinové elektroforéze (Obr. 12A). Pomocí sekvenační analýzy lze detekovat místa fúze úseků δ - a β -globinových genů (Obr. 12B).

A**B**

Obr. 12: Proteinová a DNA diagnostika Hb Lepore. (A) Proteinová elektroforéza, polyakrylamidový gel barvený Coomassie blue. Na obrázku zobrazené jednotlivé frakce hemoglobinového spektra, červenou šipkou označená frakce Hb Lepore, který putuje pomaleji než HbA i HbF. (B) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s Hb Lepore, jedná se o heterozygotní nosičství. Žlutá šipka ukazuje CD84 - polymorfismus (ACC-ACT), fialová šipka označuje CD 86, modrá šipka CD 87, kde začíná překryv δ/β globinových genů, od CD88 následuje 100% homologie. Pravděpodobně se jedná o variantu Hb Lepore-Boston-Washington (HbVar ID 744; sekvence δ -globinového genu je po CD87, sekvence β -globinového genu následuje od CD116).

Endemický HbS $\beta 6$ (Glu→Val) (HbVar ID 226; *HBB*: c.20A>T) jsme v našem souboru detekovali u 10 jedinců (ze 7 rodin). U 7 z nich jsme potvrdili heterozygotní nosičství alely pro HbS (Obr. 13A), čtyři jedinci byli čeští občané s předky z malarických oblastí, ostatní tři byli členové česko-africké rodiny, z nichž u dvou jedinců bylo současně diagnostikováno tiché nosičství α -talasemické delece $-\alpha^{3.7}$ (Tab. II). Tři jedinci našeho souboru měli potvrzenou molekulárně geneticky srpkovitou anemii (homozygotní forma HbS) (Obr. 13B), ve všech třech případech se jednalo o imigranty, africké občany.

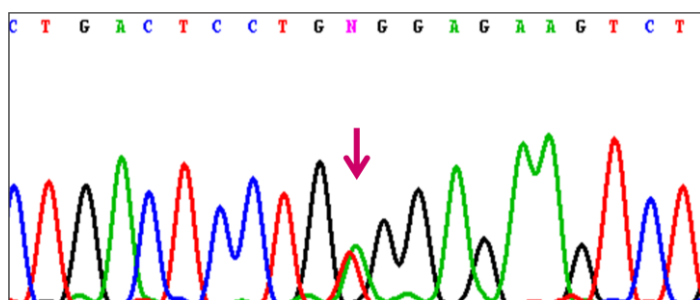
Hemoglobin S lze dobře detekovat na proteinové elektroforéze (Obr. 14A) a jeho hladinu lze dobře změřit a vyjádřit procentuálně pomocí iontové chromatografie. Nosiči alely pro HbS mají mírnou mikrocytární hypochromní anemii se zvýšenou hladinou HbA₂ a normální hladinou HbF. Hladina HbS se obvykle pohybuje mezi 25 – 45 %. Pacienti se srpkovitou anemií (homozygoti pro HbS) mají hladinu HbS mezi 70 – 90 % a 5 – 15 % HbF (obr. 14B).

Nosiči alely pro HbS v kombinaci s α -talasemií mají většinou normální hodnoty krevního obrazu, mírně zvýšenou hladinu HbA₂, normální hladinu HbF a hladina HbS se u nich pohybuje mezi 20 – 35 % (může být mírně snižena oproti nosičům HbS alely). Naměřené hodnoty u česko-afričské rodiny z našeho souboru shrnuje tabulka II.

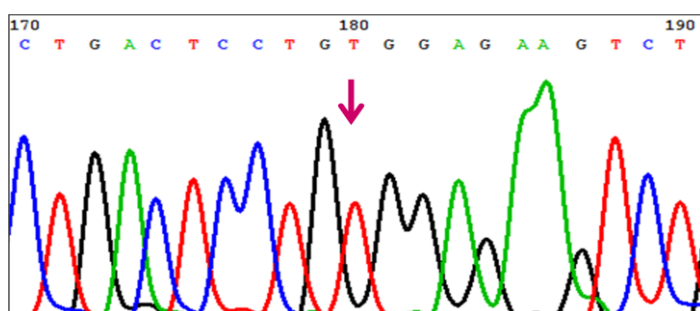
Tab. II: Tabulka uvádí přehled hematologických a molekulárně genetických dat u česko-afričské rodiny s heterozygotním nosičstvím pro HbS a α -talasemické delecí $-\alpha^{3.7}$.

	RBC	Hgb	Hct	MCV	MCH	HbA ₂ (%)	HbF (%)	HbS (%)	HbS	HBA lokus
OTEC (1966)	5,46	152	0,49	89,4	27,8	4,7	0,4	35	$\beta 6$ (Glu-Val)	delece $-\alpha^{3.7}$
SYN (2000)	5,35	148	0,46	86,5	27,7	4,8	0,2	36	$\beta 6$ (Glu-Val)	negativní
DCERA (2004)	5,28	128	0,41	77,3	24,2	4,9	0,3	31	$\beta 6$ (Glu-Val)	delece $-\alpha^{3.7}$

A

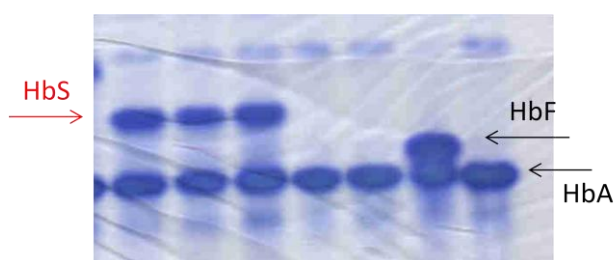


B

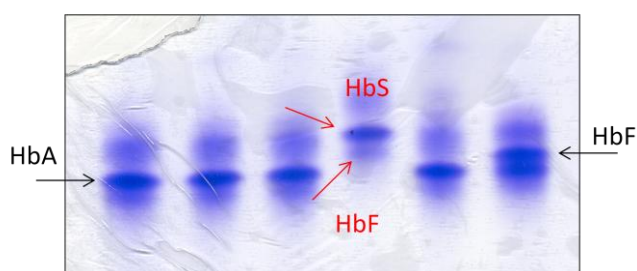


Obr. 13: Molekulárně-genetická diagnostika HbS. (A) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s HbS, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 6 *HBB* genu GAG→GTG a zároveň nukleotid standardní alely ve stejné pozici. (B) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s HbS, jedná se o homozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 6 *HBB* genu GAG→GTG bez přítomnosti standardní alely ve stejné pozici.

A



B

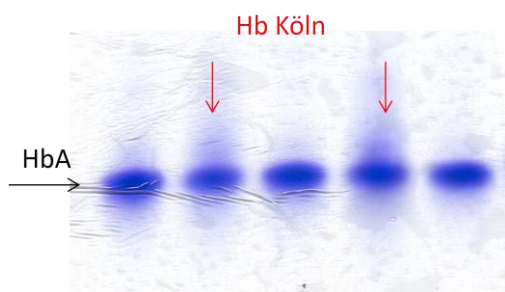


Obr. 14: Detekce HbS proteinovou elektroforézou na polyakrylamidovém gelu barveném Coomassie blue. (A) Na obrázku zobrazené jednotlivé frakce hemoglobinového spektra,

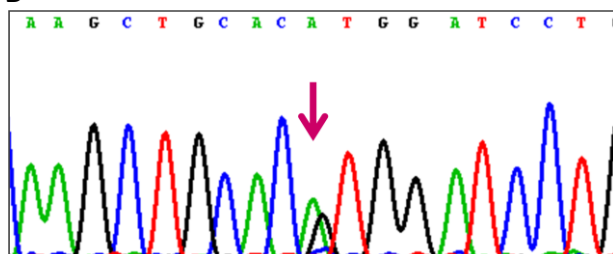
červenou šipkou označená frakce HbS, který putuje pomaleji než HbA i HbF. Na gelu jsou vidět tři vzorky od členů česko-africké rodiny. (B) Na obrázku zobrazené jednotlivé frakce hemoglobinového spektra. Červené šipky označují frakce HbS a HbF jako jediné hemoglobiny u pacienta se srpkovitou anémií (homozygot pro HbS. Hodnoty jeho krevního obrazu (Hb: 81 g/l; Ery: $3,10 \cdot 10^{12}/l$; Ht: 0,23; MCV: 74,5 fl), hladiny HbS (73 %) a hladina HbF (8 %) odpovídaly zjištěnému genotypu (Obr. 13B).

Mezi nejčastější nestabilní hemoglobinové varianty se řadí Hb Köln $\beta 98$ (Val→Met) (HbVar ID 448; *HBB*: c.295G>A) (Indrák et al, 1995). V našem souboru jsme nosičství pro tuto alelu detekovali u 3 rodin (5 členů) českého původu. Pacienti mají obvykle normální hodnoty krevního obrazu nebo mírnou hemolytickou anémií s hodnotou MCV mírně zvýšenou (95 – 99 fl), retikulózu (až 20 %) a v erytrocytech patrná Heinzova tělíska, způsobená precipitací volných globinových řetězců uvolněných z nestabilní molekuly hemoglobinu. Mutace Hb Köln se často v rodinách vyskytuje *de novo* (Indrák et al, 1991). Vzhledem ke své nestabilitě se Hb Köln obtížně detekuje na proteinové elektroforéze, u vzorku na gelu je patrný tzv. „smear“ jako neostrá přítomnost nestabilního proteinu (Obr. 15A). Na DNA úrovni jsme u všech 5 jedinců potvrdili heterozygotní nosičství pro Hb Köln ($\beta 98$ Val→Met), detekovali jsme mutaci v CD 98 *HBB* genu (GTG→ATG) (Obr. 15B).

A

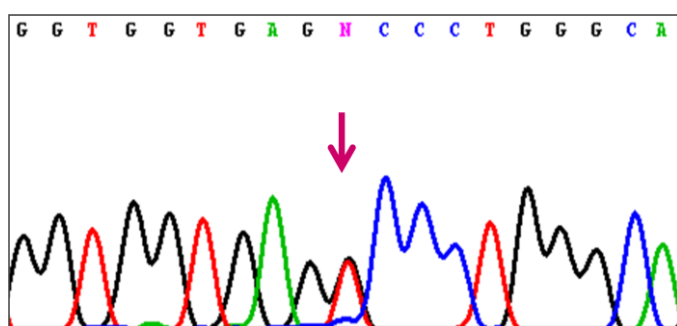


B



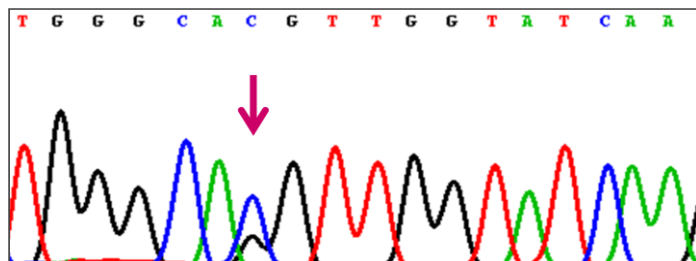
Obr. 15: Proteinová a DNA diagnostika Hb Köln. (A) Proteinová elektroforéza, polyakrylamidový gel barvený Coomassie blue. U dvou vzorků patrný „smear“ představující rozpadlý nestabilní Hb Köln u otce a syna z české rodiny. Pruh HbA je patrný. (B) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s Hb Köln, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 98 *HBB* genu (GTG→ATG) a zároveň nukleotid standardní alely ve stejné pozici.

Hemoglobin Knossos ($\beta 27$ Ala $\rightarrow$ Ser) (HbVar ID 281; *HBB*: c.82G>T) jsme v našem souboru detekovali u tří jedinců ze tří nepříbuzných českých rodin. Je to velmi běžná Hb varianta ve Středozeří (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar>). U všech se jednalo o heterozygotní nosičství, které se projevuje mírnou mikrocytární, hypochromní anemií s normální hladinou HbA₂, HbF a s normálním Hb spektrem na proteinové elektroforéze, protože Hb Knossos putuje velmi blízko frakci HbA. Oddělit tyto jednotlivé frakce lze pouze pomocí izoelektrické fokuzace nebo pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie. My jsme nosičství alely potvrdili u všech tří pacientů pomocí sekvenační analýzy (Obr. 16); detekovali jsme heterozygotní mutaci v CD 27 *HBB* genu (GCC $\rightarrow$ TCC).



Obr. 16: Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s Hb Knossos, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 27 *HBB* genu (GCC $\rightarrow$ TCC) a zároveň nukleotid standardní alely ve stejné pozici.

Další nestabilní Hb variantou, kterou jsme charakterizovali v našem souboru u tří jedinců ze dvou nepříbuzných rodin, byl Hb Monroe ($\beta 30$ Arg $\rightarrow$ Thr) (HbVar ID 290; *HBB*: c.92G>C). Jedna rodina byla afrického, druhá českého původu. Ve všech případech se jednalo o heterozygotní nosičství, které se projevuje mírnou mikrocytární hypochromní anemií se zvýšenou hladinou HbA₂. Hb Monroe je nestabilní, proto je nezachytitelný na proteinové elektroforéze (Gonzalez-Redondo et al, 1989). Mutace byla potvrzena sekvenční analýzou *HBB* genu, kde byla detekována mutace v CD 30 (AGG $\rightarrow$ ACG) (Obr. 17).

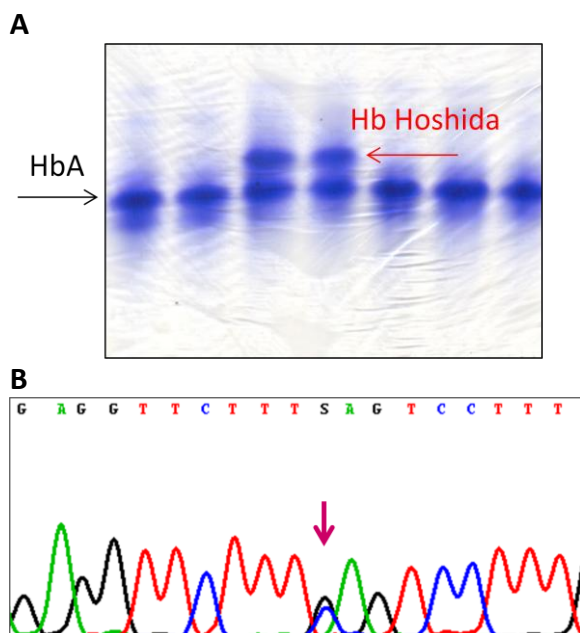


Obr. 17: Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s Hb Monroe, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 30 *HBB* genu (AGG→ACG) a zároveň nukleotid standardní alely ve stejné pozici.

Strukturní Hb variantu Hoshida $\beta 43$ (Glu→Gln) (HbVar ID 318; *HBB*: c.130G>C) jsme detekovali u matky a syna z jedné české rodiny. Zajímavostí je, že jde o Hb variantu, která nevede k žádnému abnormálnímu fenotypu. Že se jedná o nějakou patologii, bylo zjištěno náhodně při měření glykovaného hemoglobinu u syna, který trpí diabetem. Jedná se stabilní Hb variantu s normální funkcí, heterozygoti mají normální hodnoty krevního obrazu, mírně zvýšenou hladinu HbA₂ a normální hladinu HbF (Tab. III). Klinické projevy našich jedinců odpovídají původnímu popisu fenotypu z japonské rodiny (Iuchi et al, 1978). Později byla tato vzácná Hb varianta nalezena u jedné rodiny z bývalé Jugoslávie (Plaseska et al, 1991). Na proteinové elektroforéze je patrná abnormální frakce (Obr. 18A). Heterozygotní nosičství alely pro Hb Hoshida jsme potvrdili u obou jedinců pomocí sekvenční analýzy *HBB* genu (Obr. 18B).

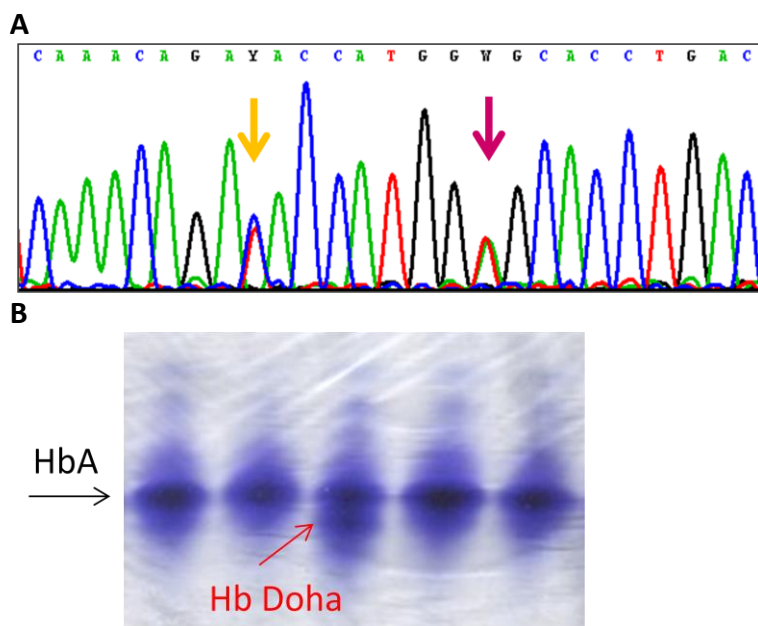
Tab. III: Hodnoty krevního obrazu a výsledky bioanalytických testů u rodiny s Hb Hoshida.

	MATKA	SYN
Hb (g/l)	148	161
ERY (10 ¹² /l)	4,8	5,2
Hematokrit	0,43	0,48
MCV (fl)	89,8	91,3
MCH (pg)	30,8	31
RET	0,020	0,020
HbA ₂ (%)	3,5	3,6
HbF (%)	0,3	0,4
ELFO Hb	abnormální frakce	abnormální frakce
Heinzova tělíska	negativní	negativní



Obr. 18: Proteinová a DNA diagnostika Hb Hoshida. (A) Proteinová elektroforéza, polyakrylamidový gel barvený Coomassie blue. Červenou šipkou označená frakce Hb Hoshida $\beta 43$ (Glu→Gln). (B) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s Hb Hoshida, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 43 *HBB* genu (GAG→CAG) a zároveň „wild type“ alelu ve stejné pozici.

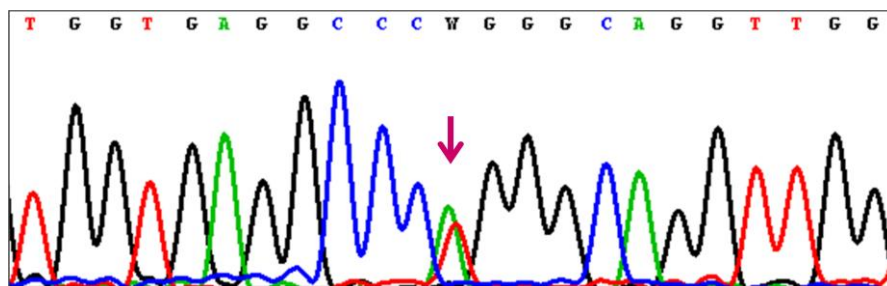
Strukturní hemoglobinovou variantu Doha $\beta 1$ (Val→Glu) (HbVar ID 712; *HBB*: c.5T>A) jsme detekovali v našem souboru u jedné české rodiny (u otce a syna). Jednalo se o heterozygotní nosičství, mutace v *HBB* genu v CD 1 (GTG→GAG) byla potvrzena sekvenční analýzou (Obr. 19A). V důsledku mutace vzniká v pozici 1 *HBB* genu aminokyselina – kyselina glutamová, která zabraňuje odnětí předchozí aminokyseliny methioninu a dochází tak k prodloužení proteinového řetězce na N-konci v pořadí aminokyselin: Met-Glu-His-Leu-Thr- (Kamel et al, 1985). Hb Doha je stabilní Hb, který putuje na proteinové elektroforéze rychleji než HbA (Obr. 19B). U heterozygotů nezpůsobuje žádný patologický fenotyp.



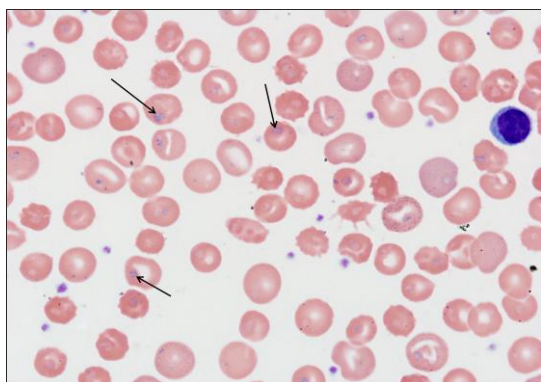
Obr. 19: DNA a proteinová diagnostika Hb Doha. (A) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s Hb Doha, jedná se o heterozygotní nosičství. Fialová šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 1 *HBB* genu (GTG→GAG) a zároveň „wild type“ alelu ve stejné pozici. Mutace je asociovaná s polymorfismem v pozici 5'UTR +47 (C-T) (*HBB*: c.-4C>T) (žlutá šipka). (B) Proteinová elektroforéza, polyakrylamidový gel barvený Coomassie blue. Červená šipka označuje frakci Hb Doha, který putuje rychleji než HbA.

V našem souboru jsme analyzovali jednoho pacienta, který byl od dvou let sledován pro hemolytickou anemii a potřeboval pravidelné transfúze. V 11 letech podstoupil splenektomii, od té doby je subjektivně bez potíží. Molekulárně geneticky byl vyšetřen v naší laboratoři až v dospělém věku a byla mu potvrzena heterozygotní mutace v *HBB* genu v pozici 28 (CTG→CAG) (Obr. 20A), která byla již dříve popsána jako mutace vedoucí k aminokyselinové záměně Hb Saint Louis (β 28 Leu→Gln) (HbVar ID 284; *HBB*: c.86T>A). Jedná se o nestabilní Hb variantu s vysokou afinitou ke kyslíku, v důsledku toho vzniká vyšší procento methemoglobinu (Wiedermann et al, 1986, Divoký et al, 2005). Pacienti trpí chronickou hemolytickou anémií asociovanou s cyanózou, methemoglobinémií a v erytrocytech lze detekovat Heinzova tělíčka (Obr. 20B,C). Vzhledem ke své nestabilitě není Hb Saint Louis vidět na proteinové elektroforéze (Obr. 20D).

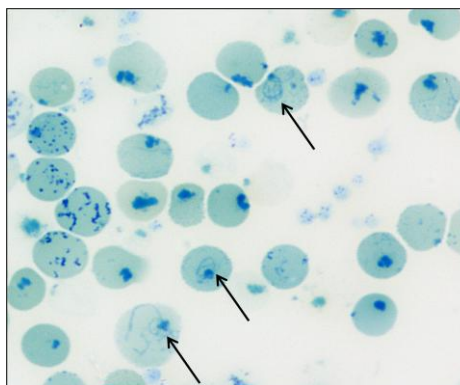
A



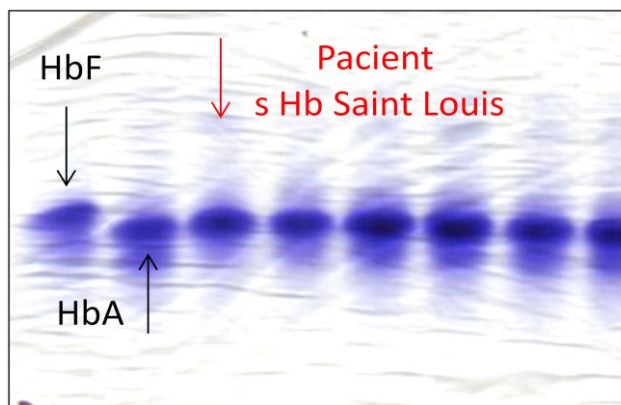
B



C



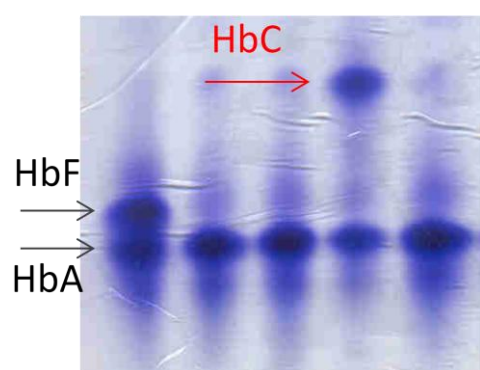
D



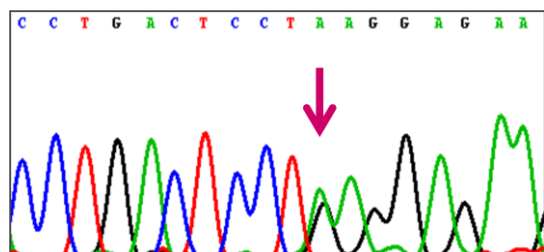
Obr. 20: Diagnostika nestabilní Hb varianty Hb Saint Louis. (A) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacienta s Hb Saint Louis, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 28 *HBB* genu (GTG→GAG) a zároveň „wild type“ alelu ve stejné pozici. (B-C) Nátěry periferní krve pacienta se strukturní variantou Hb Saint Louis. (B) panoptické barvení dle Pappenheima s nálezem akantocytů, echinocytů, stomatocytů, terčovitých erytrocytů, bazofilního tečkování erytrocytů a Heinzových tělísek (označené šipkami). (C) inkubace erytrocytů s brilliant-kresylovou modří – průkaz Heinzových tělísek (inkluze tvořené shlukem volných β -globinových řetězců v erytrocytu po rozpadu molekuly hemoglobinu – označené šipkami). (D) Proteinová elektroforéza, polyakrylamidový gel barvený Coomassie blue. Na obrázku zobrazené jednotlivé frakce hemoglobinového spektra, červenou šipkou označený vzorek pacienta s Hb variantou Saint Louis. Vzhledem ke své nestabilitě patrná pouze frakce HbA.

Jedna dětská pacientka v našem souboru byla nosičkou alely pro Hb C ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$) (HbVar ID 227; *HBB*: c.19G>A). Otec dítěte je brazilské národnosti, příbuzní z matčiny strany mají maďarský původ. HbC je stabilní hemoglobin s normální funkcí, u heterozygotů se může objevit mírná anemie a terčovité erytrocyty v nátěrech periferní krve. Naše pacientka měla normální hodnoty krevního obrazu, jen mírnou mikrocytózu (MCV 73 fl), normální hodnotu HbF. Stejně jako HbE, také Hb C putuje ve stejném pruhu jako HbA₂, lze jej detekovat v proteinové elektroforéze (Obr. 21A). Mutace byla potvrzena sekvenační analýzou *HBB* genu (Obr. 21B).

A



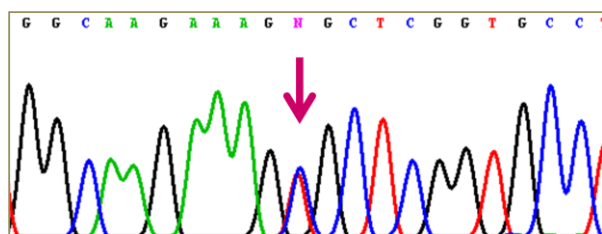
B



Obr. 21: Proteinová a DNA diagnostika Hb C. (A) Proteinová elektroforéza, polyakrylamidový gel barvený Coomasiem blue. Na obrázku zobrazené jednotlivé frakce hemoglobinového spektra. Hb C putuje stejně jako frakce HbA₂. Potvrzení Hb C a odlišení tak od frakce HbA₂ bylo pomocí molekulárně genetického vyšetření - sekvenační analýzou. (B) Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacientky s Hb C, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 6 *HBB* genu (GAG→AAG) a zároveň nukleotid standardní alely ve stejné pozici.

Poslední zastoupenou strukturní Hb variantou v našem souboru představuje Hb Sydney ($\beta 67\text{Val}\rightarrow\text{Ala}$) (HbVar ID 371; *HBB*: c.203T>C). Jedná se o nestabilní Hb variantu s projevy hemolytické anemie s Heinzovými tělísky (Indrák et al, 1998). V našem souboru byla vyšetřena jedna dětská pacientka s hemolytickou anémií (Hb: 103 g/l; Ery: $3,67 \cdot 10^{12}/l$; Ht:

0,34; MCV: 91,8 fl), s pozitivními Heinzovými tělísky a izopropanolovým testem. Nález na proteinové elektroforéze odpovídal nestabilní hemoglobinopatii, u vzorku byla patrná pouze frakce HbA. Pomocí sekvenční analýzy byla detekovaná heterozygotní mutace v pozici 67 *HBB* genu (GTG→GCG) (Obr. 22).



Obr. 22: Výsledný chromatogram části *HBB* genu pacientky s Hb Sydney, jedná se o heterozygotní nosičství. Šipka ukazuje bodovou mutaci v kodonu 67 *HBB* genu (GTG→GCG) a zároveň nukleotid standardní alely ve stejné pozici.

Shrnutí molekulárně-genetické charakterizace strukturních hemoglobinových variant

Přehled strukturních hemoglobinových variant, které jsme charakterizovali na molekulární úrovni v letech 2008 – 2015, je uveden v tabulce IV. Potvrdili jsme naše pracovní hypotézy: nejčastějšími Hb variantami v ČR zůstávají Hb E a Hb Lepore. Potvrdili jsme, že zvyšující se imigrace z malarických oblastí vede k introdukci alel endemických hemoglobinů do naší populace. Ukázali jsme, že je nutné na hematologických pracovištích v ČR počítat s nestabilními hemoglobinopatiemi jako příčinami vrozené hemolytické anemie. Navíc jsme poprvé v české populaci identifikovali dvě vzácné Hb varianty, Hb Hoshida a Hb Doha. Výsledky této části disertační práce byly prezentovány formou abstrakt a posterů na konferencích (příloha č. 7). V přípravě jsou publikace popisující zmíněné vzácné Hb varianty Hb Hoshida a Hb Doha v českých rodinách.

Tab. IV: Přehled jednotlivých strukturních hemoglobinových variant zjištěných ve vyšetřovaném souboru pacientů

HEMOGLOBINOVÁ VARIANTA		POČET RODIN	POČET ČLENŮ	STABILITA	FENOTYP (heterozygoti)
Hb E	β26 (Glu→Lys)	11	14 ^{1,2}	mírná nestabilita	mikrocytóza, talasemie minor
Hb Lepore	δβ-hybrid	6	10	normální	mikrocytóza, talasemie minor
Hb S (z toho homozygotů)	β6 (Glu→Val)	7	10* (3)	deoxy forma precipituje	normální u heterozygotů, HA u homozygotů
Hb Köln	β98 (Val→Met)	3	5	nestabilní	mírná HA
Hb Knossos	β27 (Ala→Ser)	3	3	normální	mikrocytóza, talasemie minor
Hb Monroe	β30 (Arg→Thr)	2	3	nestabilní	mikrocytóza, talasemie minor
Hb Hoshida	β43 (Glu→Gln)	1	2	normální	normální
Hb Sydney	β67 (Val→Ala)	1	1	nestabilní	HA
Hb Doha	β1 (Val→Glu)	1	2	normální	normální
Hb Saint Louis	β28 (Leu→Gln)	1	1	nestabilní, ↑ Met-Hb	HA, cyanóza
Hb C	β6 (Glu→Lys)	1	1	normální	mikrocytóza, talasemie minor, mírná HA u homozygotů
CELKEM		37	52		

¹ jeden pacient byl dvojitý heterozygot pro HbE a pro β-talasemickou mutaci IVS-I-1(G→A)

² jeden pacient byl dvojitý heterozygot pro HbE a pro β-talasemickou mutaci CD37(G→A)

* dva členové jedné rodiny afrického původu s kombinací nosičství pro HbS a tichého nosičství α-talasemické delece -α^{3,7}

8.2 Molekulárně-genetická charakterizace β- a δβ-talasemických alel

Hypotézy. Při řešení cíle spojeného s molekulárně-genetickou charakterizací β-talasemických alel jsme vycházeli z hypotézy, že v české a slovenské populaci převládají β- a δβ-talasemické alely původem ze Středozeří, jak bylo publikováno v původní práci Indráka et al (1992), a že vysoká frekvence IVS-I-1 (G→A) mediteránní alely by mohla být specifická pro českou a slovenskou populaci. Tato hypotéza se však opírala o relativně malý soubor pacientů analyzovaný v původní práci věnované molekulárně-genetické charakteristice β-talasemických alel v české a slovenské populaci (Indrák et al, 1992).

Vyšetřovaný soubor, výsledky bioanalytických testů a molekulárně-genetických analýz

Náš vyšetřovaný soubor tvořilo 400 jedinců s podezřením na β- nebo δ/β-talasemii - pacienti se zvýšenou hladinou HbA₂ a HbF a zároveň s nálezem v krevním obraze, který spolu s rodinnou anamnézou a dalšími vyšetřeními podporoval diagnózu β- nebo δ/β-talasemie. Jednalo se o analýzu vzorků vyšetřovaných v Laboratoři molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky FNOL v letech 2002 – 2015. Pomocí bioanalytických testů a sekvenční

analýzy *HBB* genu byla u 383 nemocných potvrzena konkrétní forma β - nebo δ/β -talasemie. Vzhledem k tomu, že studie popisující molekulárně-genetickou charakterizaci β - a $\delta\beta$ -talasemických alel byla publikována, a publikace je i s komentářem přiložena (příloha č. 3), uvádím zde jen shrnutí výsledků v tabulce V.

Tab. V: Incidence β -talasemických a $\delta\beta$ -talasemických mutací v české a slovenské populaci detekovaných v období 2002 – 2015.

β-talasemická mutace	Mutace^a	Počty rodin/členů	Typ talasemie^{b/} etnický původ mutace^b (haplotyp pokud je známý^c)
IVS-I-1 (G->A)	<i>HBB</i> :c.92+1G>A	53/97	β^0 /Středozeří (Va)
IVS-I-110 (G->A)	<i>HBB</i> :c.93–21G>A	40/61	β^+ / Středozeří (I; IX)
IVS-I-6 (T->C)	<i>HBB</i> :c.92+6T>C	27/32	β^{++} / Středozeří (VI nebo X)
CD 39 (C->T)	<i>HBB</i> :c.118C>T; p.Gln40*	23/37 ^d	β^0 / Středozeří (I)
IVS-II-1 (G->A)	<i>HBB</i> :c.315+1G>A	15/25	β^0 / Středozeří
CD 38/39 (–C)	<i>HBB</i> :c.118delC; p.Gln40Argfs*22	7/17	β^0 /český (II)
CD 8 (–AA)	<i>HBB</i> :c.25_26delAA; p.Lys9Valfs*14	7/12 ^d	β^0 / Středozeří
IVS-II-745 (C->G)	<i>HBB</i> :c.316–106C>G	7/10	β^+ / Středozeří (VIIa)
–87 (C->T)	<i>HBB</i> :c. –137C>T	6/7	β^{++} /středoevropský
CD 121 (G->T)	<i>HBB</i> :c.364G>T; p.Glu122*	4/12	β^0 /slovenský/český (Va) ⁱ
CD 41/42 (–TTCT)	<i>HBB</i> :c.126_129delCTTT; p.Phe42Leufs*19	4/4	β^0 /asijský (čínský)
CD 82/83 (–G)	<i>HBB</i> :c.251delG; p.Gly84Alafs*6	3/8	β^0 /azerbajdžánský/evropský?
Poly A (A->G)	<i>HBB</i> :c.*111A>G	3/4	β^{++} / Středozeří
–87 (C->G)	<i>HBB</i> :c. –137C>G	2/3	β^{++} / Středozeří
CD 17 (A->T)	<i>HBB</i> :c.52A>T; p.Lys18*	2/2	β^0 /asijský (čínský)
-86 (C->A)	<i>HBB</i> :c. –136C>A	2/2	β^{++} /italský
CD 46/47 (+G)	<i>HBB</i> : c.142_142dupG; p.Asp48Glyfs*6	1/3	β^0 /italský

IVS-I-5 (G->C)	<i>HBB</i> :c.92+5G>C	1/3	β^+ / Středozeří
CD 52 (–A) ^e	<i>HBB</i> : c.158delA; p.Asp53Valfs*9	1/3	β^0 /český (nová mutace)
CD 112 (T->A)	<i>HBB</i> :c.339T>A; p.Cys113*	1/2	β^0 /slovenský ⁱ
CD 7/8 (+G)	<i>HBB</i> : c.24_24dupG; p.Lys9Glu fs*15	1/2	β^0 /slovenský (IX)
44 bp deletion	<i>HBB</i> :c.76_92+27del	1/2	β^0 /řecký
CD 5 (–CT)	<i>HBB</i> :c.17_18delCT; p.Pro6Argfs*17	1/2	β^0 / Středozeří
IVS-II-765 L1	L1 insertion between <i>HBB</i> :c.316-86_316-85	1/2	β^+ /ukrajinský
CD 45 (–T)	<i>HBB</i> :c.138delT; p.Phe46Leufs*16	1/2	β^0 /asijský (pákistánský)
CD37 (TGG->TGA)	<i>HBB</i> :c.114 G>A; p.Trp38*	1/1	β^0 /asijský (saudsko arabský)
619 bp deletion	<i>HBB</i> :c.316-149_*342delinsAAGTAGA ^g	1/1	β^0 /indický
CD 6 (–A)	<i>HBB</i> :c.20delA; p.Glu7Glyfs*13	1/1	β^0 / Středozeří
CD 71/72 (+A)	<i>HBB</i> :c.216_217insA; p.Ser73Lysfs*2	1/1	β^0 /asijský (čínský)
$\delta\beta$-thalassemická mutace			
Hb Lepore	<i>HBD</i> : <i>HBB</i> : fusion	11/18	$\delta\beta$ fúzní Hb
Sicilská	NG_000007.3:g.64336_77738del13403	4/7	($\delta\beta$) ⁰ -talasemie
Macedonská/Turecká	<i>HBB</i> : <i>HBD</i> complex rearrangement	1/1	($\delta\beta$) ⁰ -talasemie

^a*HBB* dle NM_000518.4

^bpodle Thein, 2013

^cdle haplotypové studie publikované dříve (Kynčlová et al, 1998). Haplotypy byly číslovány podle Antonarakis et al. (1985)

^djeden pacient moldavské národnosti byl dvojitý heterozygot pro CD 8 (–AA)/CD 39 (C >T) s β -talasemií major

^enově popsaná mutace

Vyhodnocení testovaných hypotéz týkajících se β - a $\delta\beta$ -thalassemických alel v české a slovenské populaci

Na rozsáhlém souboru 382 případů nosičů β - nebo δ/β -talasemie z celkem 234 nepříbuzných rodin a jednoho složeného heterozygota pro dvě β -talassemické mutace jsme potvrdili hypotézu, že v naší populaci převažují β - a δ/β -talassemické alely původem ze

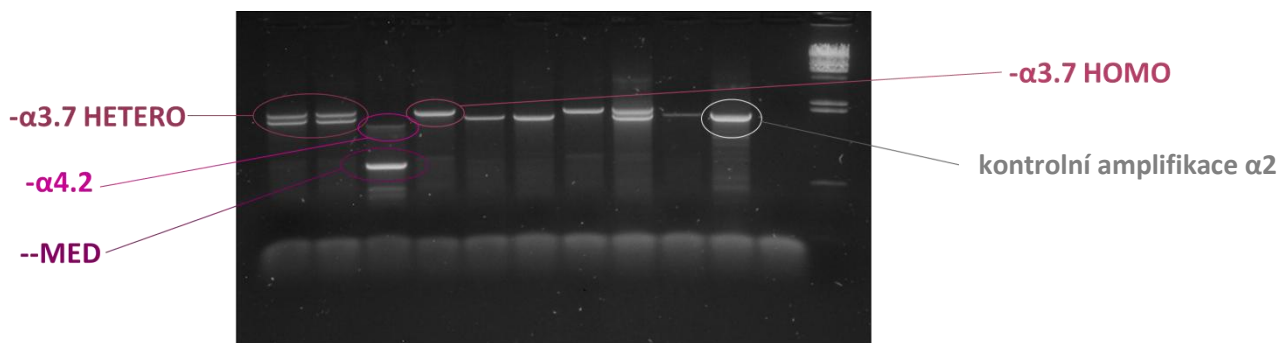
Středozeří. Nepotvrdili jsme ovšem druhou hypotézu původně vyslovenou Indrákem et al (1992), že vysoká incidence IVS-I-1 (G→A) mediteránní alely je specifická pro českou a slovenskou populaci a odlišuje naše populace od jiných populací s výskytem talasemií. Ukázalo se, že původně vysoké relativní zastoupení této alely (45.2 % všech β -talasemických alel) v české a slovenské populaci publikované Indrákem et al (1992) bylo ovlivněno malým souborem nemocných. Námi zjištěná relativní frekvence 27.1 % v rozsáhlém souboru pacientů odpovídá zastoupení této alely i v jiných populacích, např. v některých částech Iberijského poloostrova, v některých oblastech Itálie a Řecka a v některých oblastech Malé Asie (zdroj: <http://www.ithanet.eu>).

8.3 Molekulárně-genetická charakteristika α -talasemií u českých rodin a u rodin cizinců žijících v České republice

Hypotéza. Při řešení cíle spojeného s molekulárně-genetickou charakterizací α -talasemických alel jsme vycházeli z hypotézy, že v české a slovenské populaci se vyskytují α -talasemie daleko častěji, než bylo dosud publikováno, a to z důvodu dříve nedostatečné (nedostupné) diagnostiky. Předpokládali jsme, že nové molekulárně-genetické přístupy, umožňující přesnou charakterizaci mutací α -globinových genů daleko snadněji než dřívější genetické mapování s použitím izotopem-značených sond, povedou k daleko většímu zachytu α -talasemií jak u českých rodin, tak u rodin cizinců žijících v České republice

Wyšetřovaný soubor, výsledky bioanalytických testů a molekulárně-genetických analýz

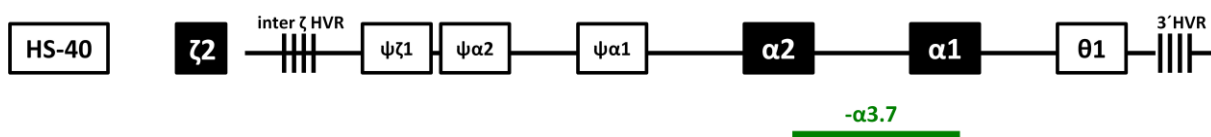
Soubor tvořilo 127 jedinců ze 108 nepříbuzných rodin s podezřením na α -talasemii - pacienti s normální nebo sníženou hladinou HbA₂ a s normální hladinou HbF a zároveň s nálezem v krevním obraze, který spolu s rodinnou anamnézou a dalšími vyšetřeními podporoval diagnózu talasemie, a u kterých byla již dříve vyloučena β -talasemie nebo abnormální hemoglobinová varianta. Jednalo se o retrospektivní analýzu vzorků nasbíraných a vyšetřovaných v Laboratoři molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky FNOL v letech 1992 – 2015. Pomocí metod multiplexní ASO-PCR (Obr. 23) a MLPA, které jsme zavedli do laboratorní praxe, byly detekovány delece v HBA lokusu vedoucí k diagnóze α -talasemie u 97 jedinců z 81 rodin.



Obr. 23: Ukázka agarózového gelu (1%) s výsledky multiplexní alelově-specifické PCR (ASO-PCR). Jsou vyznačeny vzorky nemocných s delecí $-\alpha^{3.7}$ (hetero a homozygotní genotyp), s delecí $-\alpha^{4.2}$ a s delecí $--^{MED}$. Více k jednotlivým typům těchto α -talasemických delecí viz níže.

Diagnostika α -talasemických delecí

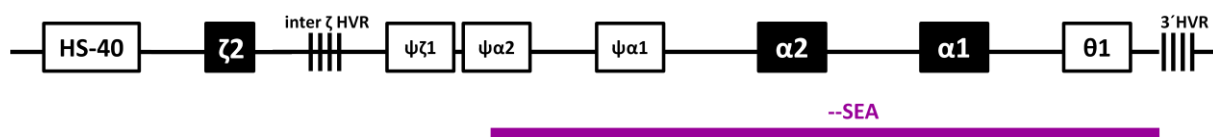
Nejčastější typ α -talasemické delecce je 3.7 kb dlouhá delecce zahrnující část $\alpha 2$ i $\alpha 1$ globinových genů ($-\alpha^{3.7}$) (Obr. 24). Je typická pro různé populace, nejvíce je zastoupena v populaci indické, africké a středozevní a v populacích zemí Dálného východu. Tento typ delecce má predispozici vzniknout díky duplikované homologní oblasti v blízkosti obou α -globinových genů, což může v průběhu meiozy, během párování chromozomů, vést k reciproké rekombinaci mezi tzv. Z segmenty (Higgs, 2009). V našem souboru byla tato přestavba detekována u celkem 47 rodin (52 členů) z toho u 11 nemocných se jednalo o homozygotní postižení. Českých rodin pozitivních pro tuto delecí bylo 30 (34 členů), kdy u šesti z nich se jednalo o homozygotní formu (Tab. VI).



Obr. 24: Struktura *HBA* lokusu na chromozomu 16 s označením deletované oblasti $-\alpha^{3.7}$ vedoucí k α^+ -talasemii.

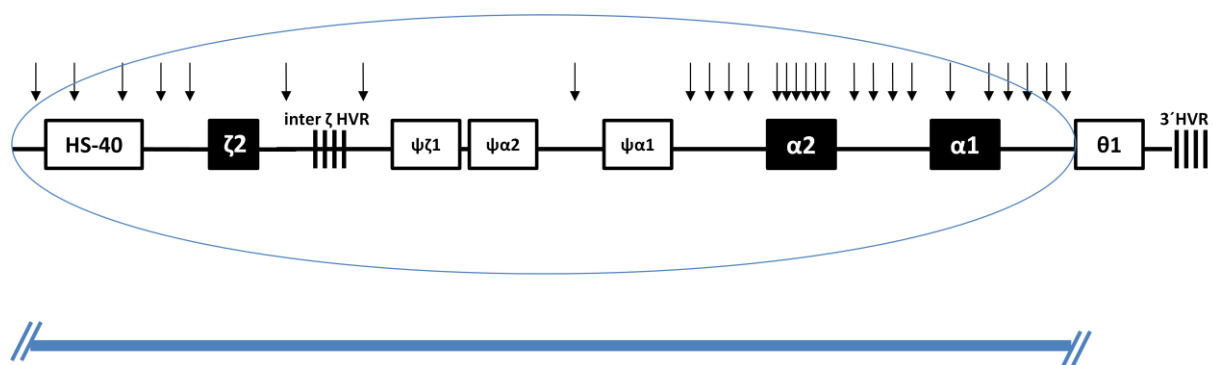
Druhá nejčastější přestavba detekovaná v našem souboru je delecce označovaná jako $--^{SEA}$ zahrnující celé geny $\alpha 2$ i $\alpha 1$, ale i pseudogeny $\psi\alpha 2$ a $\psi\alpha 1$ (Obr. 25). Heterozygoti mívají mírnou mikrocytární hypochromní anemii (MCV 60-70 fl). Tato delecce je velice častá v populaci jihovýchodní Asie. V našem souboru tuto delecí neslo 17 rodin (19 členů), 15

z těchto rodin (16 členů) bylo prokazatelně asijského původu. Jeden pacient v souboru pocházel z české rodiny (Tab. VI).

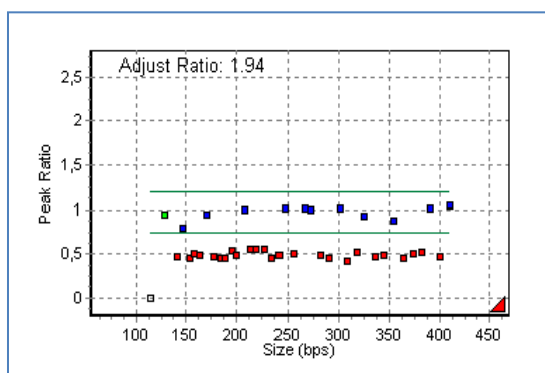


Obr. 25: Struktura *HBA* lokusu na chromozomu 16 s označením deletované části lokusu --SEA vedoucí k α^0 -talasemii.

Vzácně bývají v různých populacích (včetně evropských) diagnostikovány rozsáhlé delece celého *HBA* lokusu. Rozsáhlá delece jedné alely celého lokusu *HBA*, včetně regulační oblasti HS40 (Obr. 26A), byla v našem souboru detekována u 6 rodin (11 členů) českého původu s α -talasemií (Tab. VI). Jedná se o prioritní zjištění v rámci české populace; tyto typy delecí jsou vesměs jen velmi vzácně detekovány, bylo možné je odhalit jen díky použití MLPA technologie; výsledek tohoto vyšetření u jednoho z nemocných je zobrazen na obrázku 26B.



Obr. 26A: Struktura *HBA* lokusu na chromozomu 16 s označením deletovaného úseku včetně regulační oblasti HS-40 vedoucí k α^0 -talasemii. Vertikální šipky nad lokusem značí polohy MLPA prób použitých pro mapování delecí.



	Probe Name	Bin Size	2012_04_25_MLPA
1	Ctrl-01	115.0	0
2	Ctrl-02	146.0	2
3	Ctrl-03	170.0	2
4	Ctrl-04	208.0	2
5	Ctrl-05	247.0	2
6	Ctrl-06	266.0	2
7	Ctrl-07	272.0	2
8	Ctrl-08	301.0	2
9	Ctrl-09	325.0	2
10	Ctrl-10	354.0	2
11	Ctrl-11	391.0	2
12	Ctrl-12	410.0	2
13	HBA1_HBA2_ex	141.0	1
14	HBA1_HBA2_ex	164.0	1
15	HBA2_intron-2a	158.0	1
16	HBA2_intron-2b	241.0	1
17	HBA_4622_L400	345.0	1
18	HBA_4624_L400	291.0	1
19	HBA_4625_L400	318.0	1
20	HBA_4626_L474	189.0	1
21	HBA_4627_L400	200.0	1
22	HBA_4628_L400	228.0	1
23	HBA_4637_L401	184.0	1
24	HBA_4638_L401	282.0	1
25	HBA_4639_L402	309.0	1
26	HBA_4926_L401	364.0	1
27	HBA_6707_L629	401.0	1
28	HBA_8488_L841	374.0	1
29	HBA_8491_L841	195.0	1
30	HBA_8492_L841	213.0	1
31	HBA_8493_L841	219.0	1
32	HBA_8494_L841	256.0	1
33	HBA_8497_L842	337.0	1
34	HBA_8499_L842	153.0	1
35	HBA_ConSpringM	128.0	2
36	HS-40	177.0	1
37	HS40_4800_L41	383.0	1
38	POLR3K	235.0	1

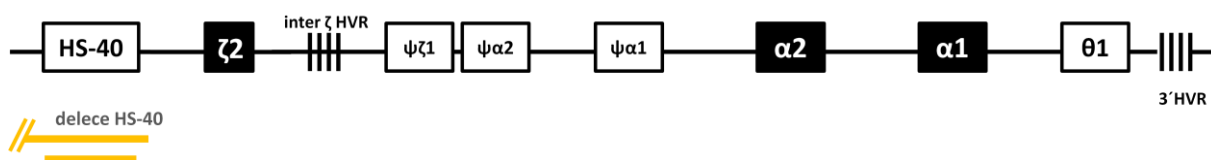
i

ii

Obr. 26B: Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P140_HBA) u pacienta prokazující delecí celého lokusu. i: počítačové grafické vyznačení počtu genových kopií jednotlivých cílových sekvencí použitých prób, po normalizaci s kontrolními DNA úseky (modře), červené body označují deletované úseky, zeleně jsou vyznačeny úseky, které po normalizaci nevykazují rozdíly v počtu detekovaných DNA kopií ve srovnání s kontrolním vzorkem. ii: tabulka – číslo 1 u úseků DNA detekovaných jednotlivými specifickými próbami značí heterozygotní delecí (redukce počtu genových kopií na polovinu).

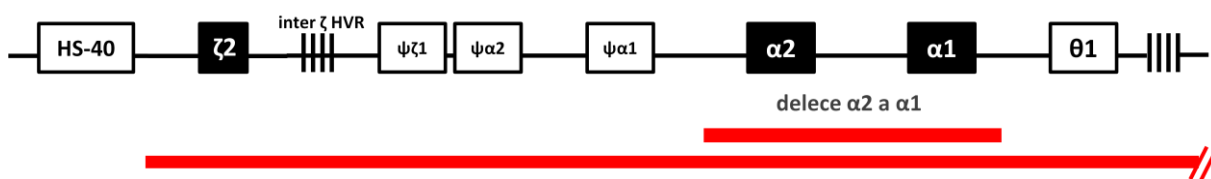
Delece regulační oblasti HS-40 byla detekována u 4 rodin (6 členů) s α -talasemií, z nichž českého původu byly 3 rodiny (4 jedinci) (Tab. VI). HS-40 region je nezbytný pro erytroidně-specifickou expresi genů α -globinového lokusu. Podobné typy delecí, které jsou velmi sporadicky detekovány v různých populacích, vedou k úplnému utlumení exprese α -

globinových genů daného lokusu. V literatuře jsou popsány různé typy těchto delecí, postihující oblast HS-40 a různě velké úseky směrem 5' od HS-40. Dva různé typy delecce HS-40 jsme detekovali i u nemocných z našeho souboru (Obr. 27).



Obr. 27: Struktura HBA lokusu na chromozomu 16 s označením dvou typů delecí zahrnující regulační oblast HS-40 vedoucí k α^0 -talasemii.

Dále jsme v souboru nemocných diagnostikovali dvě unikátní delecce, v tomto případě zahrnující α2 i α1 globinové geny (regulační oblast HS-40 byla zachována) u 3 rodin (3 členů) (Tab. VI), všichni byli českého původu (Obr. 28). Přesná charakteristika těchto delecí bude vyžadovat další analýzy, včetně sekvenace příslušných zlomových míst HBA lokusu.

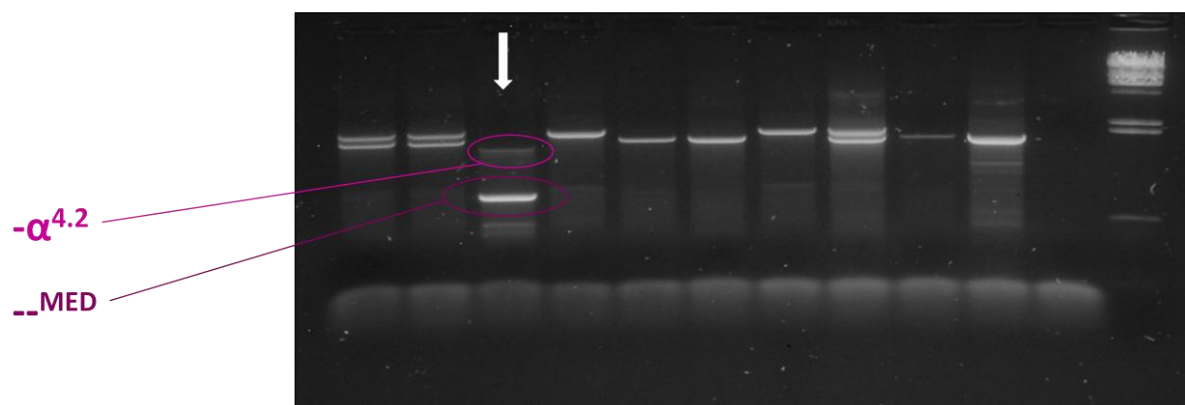


Obr. 28: Struktura HBA lokusu na chromozomu 16 s označením dvou typů unikátních delecí zahrnujících α2 i α1 globinové geny vedoucí k α^0 -talasemii.

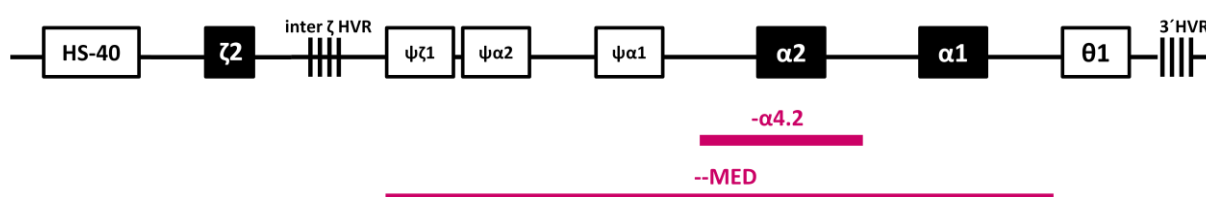
Diagnostika onemocnění HbH

U jedné pacientky (původem z Afriky) bylo diagnostikováno na molekulární úrovni onemocnění HbH. Pomocí multiplexní ASO-PCR a MLPA byla zjištěna delecce tří α-globinových genů (genotyp $-\alpha^{4.2}/--^{MED}$, Obr. 29A a B) vedoucí k HbH onemocnění. Hodnoty krevního obrazu (Hb: 83 g/l; Ery: 4,42.10¹²; Ht: 0,28; MCV: 62,7 fl) odpovídaly zjištěnému genotypu. Typickým nálezem pro HbH onemocnění je průkaz inkluzí v erytrocytech pacientů. Volné β-globinové řetězce vytváří tetrametry, které precipitují na membránách erytrocytů. Po obarvení brilliant kresylovou modří byly inkluze viditelné i v krevním nátěru námi vyšetřované nemocné (Obr. 29C).

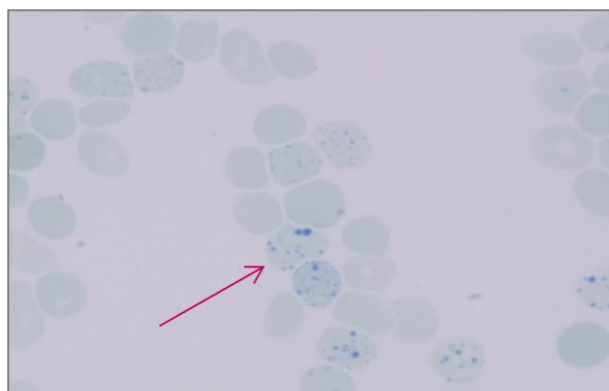
A



B



C

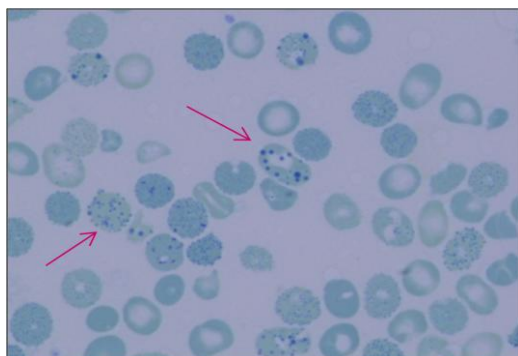


Obr. 29: Diagnostika onemocnění HbH – pacient z Afriky. (A) Výsledek multiplexní ASO-PCR na 1% agarózovém gelu. (B) Schematické znázornění výsledku mapování delecí u pacientky s onemocněním HbH. Oba typy delecí, tj. $-\alpha^{4.2}/--^{MED}$, byly potvrzeny i multiplexní alelově-specifickou PCR (viz A). (C) Průkaz inkluzí HbH u nemocné s genotypem $-\alpha^{4.2}/--^{MED}$.

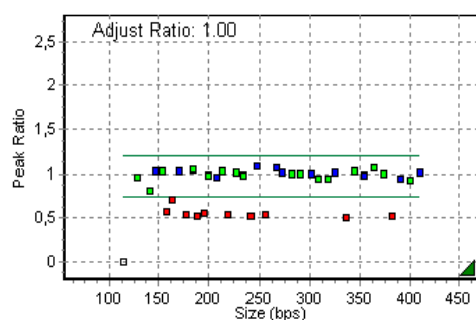
HbH onemocnění jsme na molekulární úrovni detekovali u další pacientky, její předkové pochází z Itálie. Hodnoty krevního obrazu korespondovaly s nálezem (Hb: 87 g/l; Ery: $4,96 \cdot 10^{12}/l$; Ht: 0,29; MCV: 59,3 fl), hladina HbA₂ byla na spodní hranici (1,3 %), hladina HbF normální (0,5 %). Elektroforéza Hb ukazovala standardní hemoglobinové spektrum (HbH nelze detekovat elektroforeticky), test na Heinzova tělíska byl pozitivní, byly prokázány inkluze HbH (Obr. 30A). Pomocí MLPA (Obr. 30B) byly zjištěny dvě různé delece *HBA* lokusu

vedoucí k inaktivaci tří α -globinových genů a způsobující HbH onemocnění (delece regulační oblasti HS-40 na jednom chromozomu, na druhém chromozomu delece $-\alpha^{3.7}$) (Obr. 30C).

A



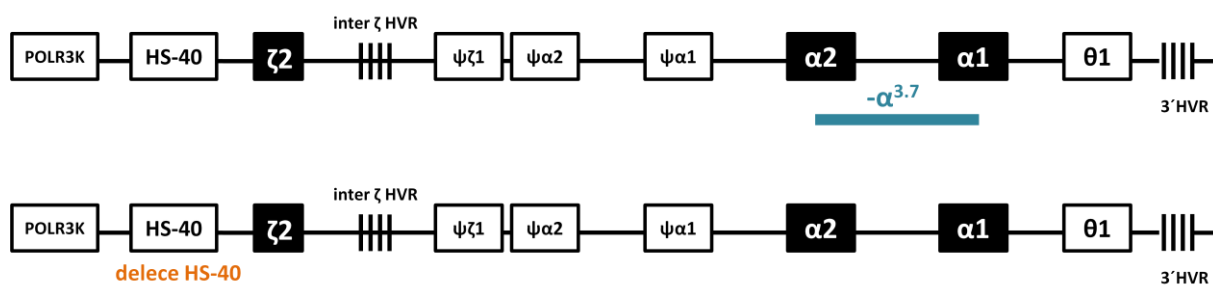
B



ii

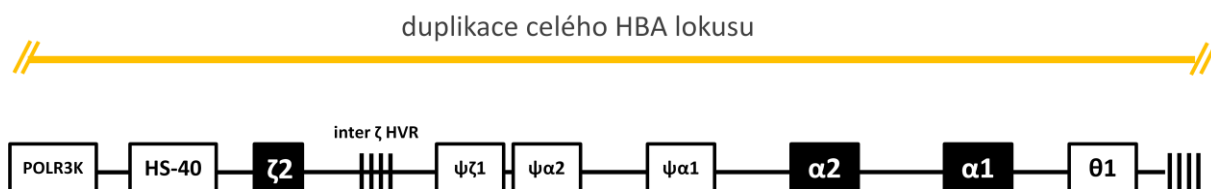
	Probe Name	Bin Size	
1	Ctrl-01	115.0	0
2	Ctrl-02	146.0	2
3	Ctrl-03	170.0	2
4	Ctrl-04	208.0	2
5	Ctrl-05	247.0	2
6	Ctrl-06	266.0	2
7	Ctrl-07	272.0	2
8	Ctrl-08	301.0	2
9	Ctrl-09	325.0	2
10	Ctrl-10	354.0	2
11	Ctrl-11	391.0	2
12	Ctrl-12	410.0	2
13	HBA1_HBA2_ex	141.0	2
14	HBA1_HBA2_ex	164.0	1
15	HBA2_intron-2a	158.0	1
16	HBA2_intron-2b	241.0	1
17	HBA_4622_L400	345.0	2
18	HBA_4624_L400	291.0	2
19	HBA_4625_L400	318.0	2
20	HBA_4626_L474	189.0	1
21	HBA_4627_L400	200.0	2
22	HBA_4628_L400	228.0	2
23	HBA_4637_L401	184.0	2
24	HBA_4638_L401	282.0	2
25	HBA_4639_L402	309.0	2
26	HBA_4926_L401	364.0	2
27	HBA_6707_L625	401.0	2
28	HBA_8488_L841	374.0	2
29	HBA_8491_L841	195.0	1
30	HBA_8492_L841	213.0	2
31	HBA_8493_L841	219.0	1
32	HBA_8494_L841	256.0	1
33	HBA_8497_L842	337.0	1
34	HBA_8499_L842	153.0	2
35	HBA_ConSpring	128.0	2
36	HS-40	177.0	1
37	HS40_4800_L41	383.0	1
38	POLR3K	235.0	2

C



Obr. 30: Diagnostika onemocnění HbH – pacientka italského původu. (A) Průkaz Heinzových tělísek (HbH inkluzí) u pacientky původem z Itálie s HbH onemocněním. (B) Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P140_HBA) u pacientky prokazující dvě delece: HS-40 a $-\alpha^{3.7}$ v pozici *trans*. i: počítačové grafické vyznačení počtu genových kopií jednotlivých cílových sekvencí použitých prób, po normalizaci s kontrolními DNA úseky (modře), červené body označují deletované úseky, zeleně jsou vyznačeny úseky, které po normalizaci nevykazují rozdíly v počtu detekovaných DNA kopií ve srovnání s kontrolním vzorkem. ii: tabulka – číslo 1 u úseků DNA detekovaných jednotlivými specifickými próbami značí heterozygotní delecii (redukce počtu genových kopií na polovinu). (C) Mapování delecí u pacientky s onemocněním HbH, na schématickém obrázku jsou zobrazeny deletované úseky DNA v rámci lokusu HBA v pozici *trans* vedoucí i inaktivaci tří α -globinových genů.

U jedné pacientky v našem souboru jsme pomocí metody MLPA detekovali duplikaci celého HBA lokusu (Obr. 31), což vede k tzv. kvadruplikaci α -globinových genů v poloze *cis*, tzn., že pacientka má celkem 6 α -globinových genů. Tato změna (bez přítomnosti dalšího defektu globinové syntézy) nemá vliv na fenotyp jednatelce, tomu odpovídal i její krevní obraz, měla jen mírnou makrocytózu erytrocytů (Hb: 140 g/l; ERY: $5,57 \cdot 10^{12}/l$; Ht: 0,40; MCV: 72,4 fl). Další měřené hodnoty (HbA₂ a HbF) a elektroforéza hemoglobinu byly v normě. Multiplikace α -globinových genů může někdy vést ke zhoršení klinického průběhu β -talasemie.



Obr. 31: Schématické znázornění HBA lokusu s vyznačením duplikované části lokusu dle výsledků MLPA

Shrnutí molekulárně-genetické charakteristiky α -talasemií

Výsledky molekulárně-genetických analýz α -talasemií jsou shrnuty v tabulce. VI. Studie popisující molekulárně-genetickou charakterizaci α -talasemických alel českých rodin a rodin cizinců žijících v České republice byla přijata k publikaci v recenzovaném časopise a publikace je i s komentářem přiložena níže (příloha č. 5). Potvrdili jsme naši pracovní hypotézu, že α -talasemie nejsou v naší populaci tak vzácné, jak jsme původně publikovali (Indrák et al, 1993), ale že zřejmě budou stejně rozšířené jako β -talasemie. Také heterogenita α -talasemií je v ČR zřejmě daleko větší než se dosud soudilo. Navíc, α -talasemické alely budou se

stupňující se migrací v ČR postupně přibývat, a s tím bude stoupat i nutnost jejich přesné diagnostiky založené na molekulárně-genetických analýzách.

Tab. VI: Přehled delečních forem α -talasemií a multiplikací α -globinových genů zjištěných ve vyšetřovaném souboru pacientů

TYPY DELECÍ	POČET RODIN	POČET ČLENŮ
$-\alpha^{3.7}$ (z toho homozygotů)	47	52 (11)
$--^{SEA}$	17	19
delece celého HBA lokusu	6	11
delece HS-40	4	6
delece $\alpha 2/\alpha 1$ (blíže nespecifikovaná)	3	3
kombinace delece HS-40/ $-\alpha^{3.7}$ (HbH)	1	1
kombinace $-\alpha^{4.2}/--^{MED}$ (HbH)	1	1
duplikace celého HBA lokusu	1	1
Kvadruplikace <i>HBA2</i> genu	1	3
CELKEM	81	97

8.4 Komentáře k publikacím a diskuse

1. Komentář k práci: Divoka M, Partschova M, Kucerova J, Mojzikova R, Cermak J, Pospisilova J, Fabryova V, Prochazkova D, Indrak K, Divoky V. Molecular characterization of β -thalassemia in the Czech and Slovak populations: Mediterranean, Asian and unique mutations. **Hemoglobin**. 2016; 40(3):156-162.
2. Komentář k práci: Lanikova L, Kucerova J, Indrak K, Divoka M, Issa JP, Papayannopoulou T, Prchal JT, Divoky V. β -Thalassemia due to intronic LINE-1 insertion in the β -globin gene (HBB): molecular mechanisms underlying reduced transcript levels of the β -globin_(L1) allele. **Hum Mutat**. 2013; 34(10):1361-5.
3. Komentář k práci: Divoká M, Partschová M, Pospíšilová D, Orviská M, Lapčíková A, Indrák K., Čermák J, Divoký V: Alfa-talasemie u 45 českých rodin a 37 rodin cizinců žijících v České republice: přehled literatury a molekulárně-genetická diagnostika. **Transfuze Hematol. Dnes**. 2016. Přijato k publikaci.
4. Komentář k práci: Sulovska L, Holub D, Zidova Z, Divoka M, Hajdich M, Mihal V, Vrbkova J, Horvathova M, Pospisilova D. Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**. 2015 Oct 27. doi: 10.5507/bp.2015.054. [Epub ahead of print]

Ad 1) Divoka M, Partschova M, Kucerova J, Mojzikova R, Cermak J, Pospisilova J, Fabryova V, Prochazkova D, Indrak K, Divoky V. Molecular characterization of β -thalassemia in the Czech and Slovak populations: Mediterranean, Asian and unique mutations. **Hemoglobin**. 2016; 40(3):156-162.

Během let 2002 – 2015 bylo vyšetřeno v Laboratoři molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky FNOL 400 jedinců s podezřením na β - nebo δ/β -talasemii. Bylo diagnostikováno 382 případů nosičství β - nebo δ/β -talasemie z celkem 234 nepříbuzných rodin. Jeden pacient byl složený heterozygot pro dvě β -talasemické mutace. Shrnutí výsledků jednotlivých mutací a jejich incidenci uvádí Tab. V v podkapitole 8.2.

Analýzou našeho souboru bylo potvrzeno, že mutace IVS-I-1 (G→A), která patří do skupiny mediteránních mutací, je nejčastější β -talasemickou mutací v české a slovenské

populaci (Indrak et al, 1992). Již dříve bylo popsáno, že mutace je asociována se sub-haplotypem Va (ve čtyřech rodinách, u kterých byla provedena haplotypová analýza) (Indrak et al, 1992; Kynčlová et al, 1998) což napovídá středozevnímu původu této mutantní alely v postižených českých a slovenských rodinách (sub-haplotyp Va je typický mediteránní sub-haplotyp) (Antonarakis et al, 1985). K dalším častým mutacím pocházejícím ze stejné oblasti patří: IVS-I-110 (G→A), IVS-I-6 (T→C), CD 39 (C→T) a IVS-II-1 (G→A). Z celkového počtu pacientů z našeho vyšetřené souboru bylo 285 jedinců ze 180 rodin (80 % pacientů; 82,6 % rodin), kteří byli nosiči β -talasemické alely původem ze Středozeví. Podobně, všechny námi zjištěné δ/β -talasemické alely pocházejí z této oblasti.

Druhou nejpočetnější skupinu mutací zjištěnou v našem souboru tvoří unikátní mutace lokálního (českého, slovenského, ukrajinského) původu. Relativně častá je mutace CD 38/39 (-C), která byla dosud detekována pouze v české populaci (Indrak et al, 1991). Další unikátní mutace v CD 112 (T→A), byla v našem souboru zjištěna u jedné slovenské rodiny, pravděpodobně příbuzné s rodinou, u které byla mutace dříve popsána (Divoky et al, 1993). Inzerce L1 transpozony způsobující β^+ -talasemii u ukrajinské rodiny žijící na území Slovenska byla popsána v práci Lanikova et al, 2013 (viz komentář k práci ad2).

Dále jsme ve dvou rodinách zjistili dvě unikátní β^0 -talasemické mutace. Mutace v CD 7/8 (+G) byla již dříve publikována v českém písemnictví (Kynčlová et al, 1999), další mutace v CD 52 (-A) byla zde v tomto článku popsána poprvé. U jiné rodiny jsme diagnostikovali vzácnou mutaci CD 46/47 (+G), dosud známou jen u jednoho italského pacienta ze Sicílie (Giambona et al, 2011). Hodnoty krevního obrazu u tří členů rodiny s mutací CD 46/47 (+G) byly závažnější než by se očekávalo v případě heterozygotního nosičství β^0 -talasemie. Proto jsme u těchto nemocných vyšetřili i HBA lokus a zjistili jsme kvadruplikaci α -globinového genu u všech tří jedinců, což způsobilo větší posun v nepoměru $\alpha:\beta$ globinových řetězců a to bylo příčinou závažnějšího fenotypu. Ovšem kromě výraznější mikrocytární anemie nebyly zjištěny u těchto pacientů žádné jiné klinické symptomy (jako známky hemolytické anemie se splenomegálií) a tito nemocní nevyžadují transfúze krve.

Závěrem tedy lze konstatovat, že tato práce přináší dosud nejkomplexnější molekulárně-genetickou charakterizaci β -talasemických alel v české a slovenské populaci. Ukázali jsme, že zde převažují β -talasemické alely původem ze Středozeví, nicméně důležité zastoupení mají lokální unikátní mutace i mutantní alely asijského původu. Předpokládáme, že tato naše práce bude sloužit široké lékařské veřejnosti k základní orientaci v alelické

heterogenitě β -talasemií v české a slovenské populaci i jako podklad pro diagnostické postupy u nemocných s β -talasemií v ČR a na Slovensku. V souboru pacientů s podezřením na β - nebo δ/β -talasemii zůstalo 18 jedinců, u kterých jsme doposud nedetekovali žádnou mutaci v *HBB* genu a budeme pokračovat v podrobnějších analýzách jednak genu *HBB*, ale i *KLF1* nebo *BCL11A*.

Vymezení mého podílu práce:

V této práci jsem prováděla většinu mutačních analýz na DNA úrovni (sekvenční analýzy, MLPA analýzy, PCR detekce a jejich vyhodnocení) a částečně jsem prováděla i diagnostické testy (elektroforézy Hb, stanovení hladin HbA₂ a HbF), a napsala jsem první draft manuskriptu.

Ad 2) Lanikova L, Kucerova J, Indrak K, Divoka M, Issa JP, Papayannopoulou T, Prchal JT, Divoky V. β -Thalassemia due to intronic LINE-1 insertion in the β -globin gene (*HBB*): molecular mechanisms underlying reduced transcript levels of the β -globin(L1) allele. ***Hum Mutat.*** 2013; 34(10):1361-5.

U členů ukrajinské rodiny (matka a dcera) žijící v ČR jsme detekovali transkripčně aktivní retrotranspozon LINE 1 (L1, nazvaný L1 β -thal) inzertovaný do 2. intronu *HBB* genu. V průběhu několika let molekulárních analýz této unikátní mutace jsme zjistili, že inzerce vede k výrazné redukci β -globinové exprese (fenotyp β^+ -talasemie). Jednalo se tedy o nový mechanismus patologického utlumení genové exprese a o novou etiologii β -talasemie.

Proposita byla 25letá žena ukrajinského původu s typickými laboratorními znaky β -talasemie minor; stejné laboratorní výsledky byly opakovaně zjištěny i u její 50leté matky (Hb 110-120 g/l, MCV 60-70 fl, MCH 19-20 pg). V krevním nátěru jsme pozorovali mikrocytózu, hypochromázii, terčovité erytrocyty a poikilocyty. Obě ženy měly mírnou retikulocytózu (0,3 až 1,5 % retikulocytů), zvýšenou hladinu HbA₂ (5,3 %) a mírně zvýšený HbF (těsně nad 1 %). Vzhledem k tomu, že iniciální analýza *HBB* genu neodhalila žádnou mutaci (tuto analýzu provedl prof. K. Indrák v laboratoři prof. Huismana, MCG, Augusta, GA, USA), byla genomická DNA proposity podrobena genetickému mapování pro přítomnost možné přestavby v rámci *HBB* genu. Také iniciální genetické mapování provedl prof. Indrák v USA a odhalil neobvyklou přestavbu, pravděpodobnou inzerci neznámé sekvence do *HBB* genu proposity a její matky.

Pokračovali jsme v mapování inserce s použitím restriční mapování genomické DNA (Southern blotting) a hybridizace s 5'β, β-globin IVS-II a 3'β próbami (Obr. 32A, B a C). Zjistili jsme, že ve 2. intronu *HBB* genu se nachází přibližně 6 kb dlouhá inserce neznámé DNA.

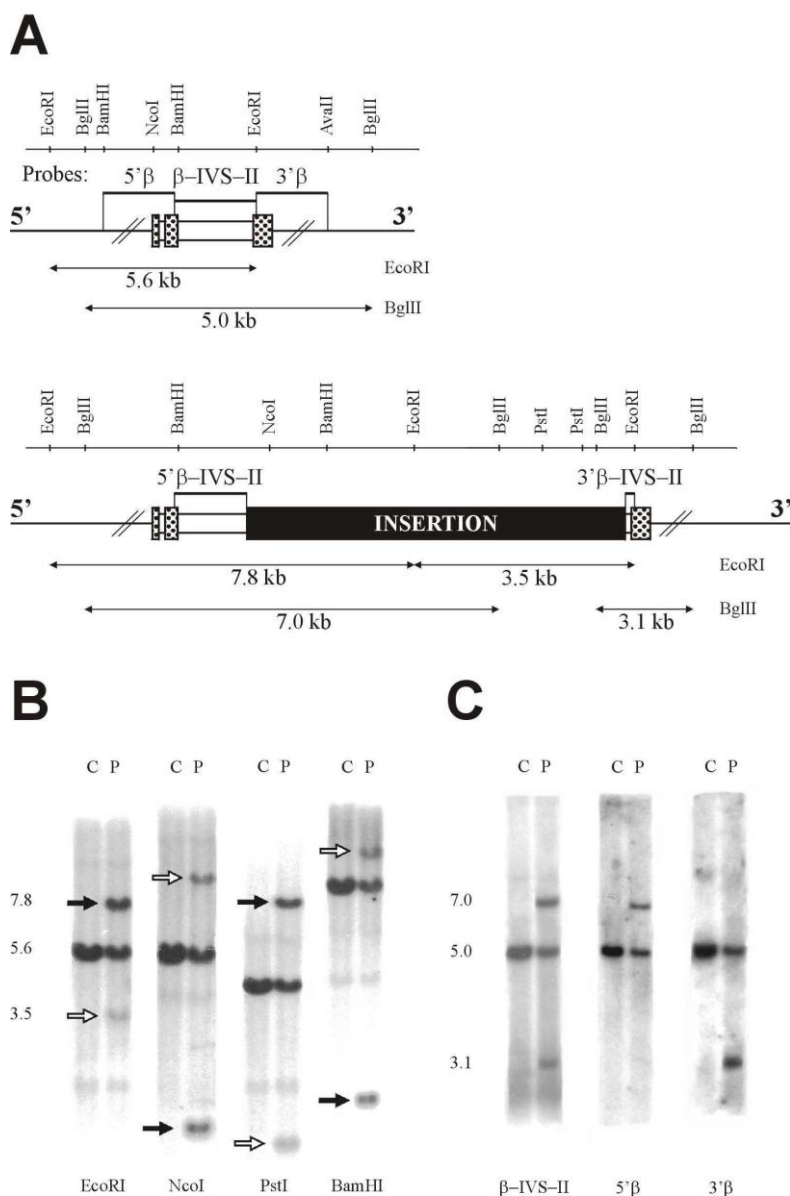
Pro analýzu zlomových míst inserce ve 2. intronu *HBB* genu jsme použili strategii inverzní PCR. Dva restriční fragmenty obsahující 5' a 3' zlomová místa inserce a 2. intronu *HBB* genu byly cirkularizovány ligací a následně linearizovány (Obr. 33A a B), amplifikovány pomocí PCR, a PCR produkty byly subklonovány a sekvenovány (Obr. 33C a D). Již analýza zlomových míst naznačila, že inzertovanou sekvencí v *HBB* genu je L1 retrotranspozon. Odhalili jsme ve zlomovém místě inserce 9-13 bp dlouhou duplikaci (tzv. zdvojení cílového místa) s 9 nukleotidy (T/AAAATAAAA) tvořícími tzv. konvenční místo štěpené L1 endonukleázou (Feng et al, 1996, Obr. 33D). Následná sekvenační analýza celé inserce odhalila, že se jedná o nezkrácený L1 element s 99,5% homologií s retrotranskripčně aktivní L1 sekvencí z databáze GenBank (sekvence se lišila ve 33 nukleotidech) (Kimberland et al, 1999); jednalo se tedy o nově popsany L1 retrotranspozon (GenBank přístupový kód: AF149422.1). Na obrázku 34 u struktury β-globin-L1 alely šipka inserce ukazuje orientaci L1 inserce vůči *HBB* genu a směr L1 transkripce, která byla vůči *HBB* transkripci protismyslná.

Následně jsme zjišťovali, jestli inserce L1 do 2. intronu *HBB* genu ovlivňuje správné vystřížení intronů *HBB* genu při posttranskripční modifikaci β-globinové RNA. Domnívali jsme se, že inserce může vést k narušení sestřihu a ke snížení produkce funkčního transkriptu z β-globin-L1 alely. Pro analýzy transkriptů jsme použili retikulocytární RNA, izolovanou z retikulocytů periferní krve obou pacientek. Jak je znázorněno na obrázku 34, pomocí RT-PCR (s použitím primerů jak jsou specifikovány v příloze č. 2) a následnou sekvenací RT-PCR produktů byly detekovány čtyři transkripční varianty β-globin-L1 alely: správný transkript (s normálním sestřihem) a tři abnormální sestřihové varianty vzniklé aktivací kryptických míst sestřihu. U těchto abnormálních variant došlo ke změně čtecího rámce a k zařazení předčasného STOP kodonu do β-globinové mRNA (Obr. 34). Zjistili jsme tedy, že jedním z mechanismů výrazné redukce β-globinové exprese (fenotyp β⁺-talasemie) u propozity a její matky je narušení normálního sestřihu *HBB* genu z β-globin-L1 alely a vznik abnormálních sestřihových variant s předčasným STOP kodonem. Takové transkripty s předčasným STOP kodonem jsou v buňce eliminovány, nejčastěji mechanismem, který se nazývá „nonsense-mediated mRNA decay“ (NMD, Hentze et al, 1999).

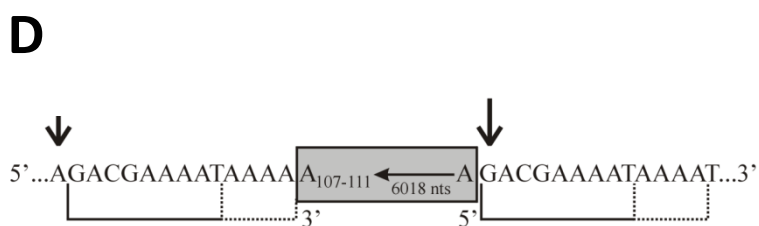
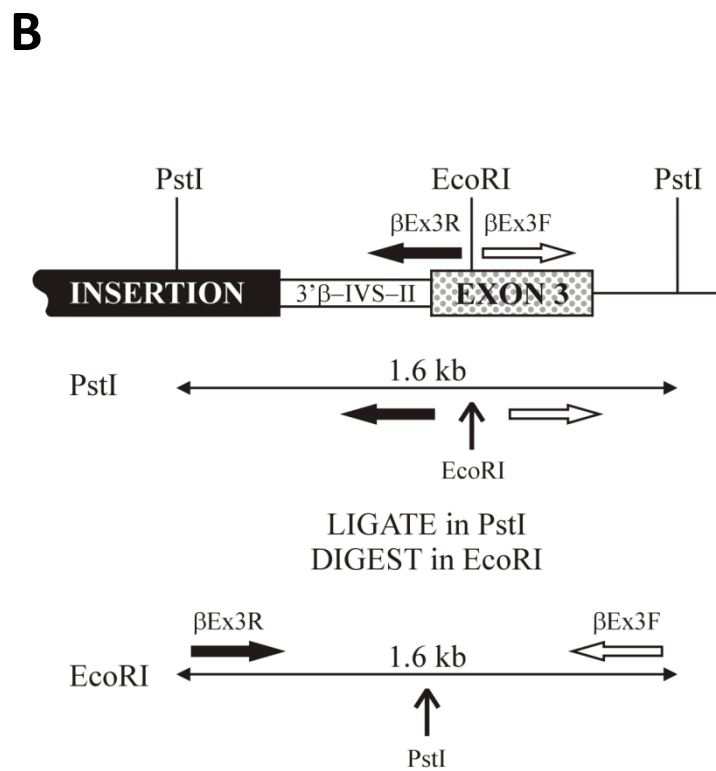
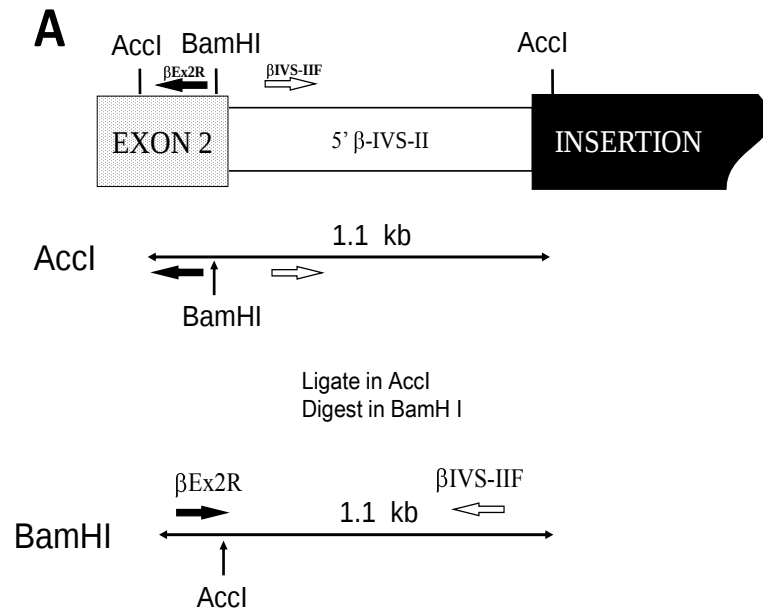
Shrnutí tohoto projektu: Transpozice aktivních mobilních elementů jsou považovány za důležitý mechanismus vzniku nemocí. U členů ukrajinské rodiny žijící v ČR jsme detekovali transkripčně aktivní retrotranspozon L1 (nazvaný L1 β -thal) inzertovaný do 2. intronu β -globinového genu. Inzerce vedla k výrazné redukci β -globinové exprese (fenotyp β^+ -talasemie). Jednalo se tedy o nový mechanismus patologické *cis*-regulace genové exprese. V průběhu řešení tohoto projektu jsme analyzovali hybridy konstruované z myších erytroleukemických buněk a talasemických chromozomů získaných z pacientů s touto transpozónovou inzercí do β -globinového genu a také retikulocytární RNA získanou přímo z krve pacientů. Zjistili jsme, že abnormální sestřih β -globinového transkriptu pocházejícího z alely s inzercí L1 je z části zodpovědný za β -talasemický fenotyp. Dále jsme popsali unikátní epigenetický mechanismus zeslabení exprese β -globinového genu, kdy k utlumení exprese β -globinového genu došlo z důvodu hypermetylace DNA a deacetylace chromatinu v oblasti β -globin-L1 promotoru.

Vymezení mého podílu práce:

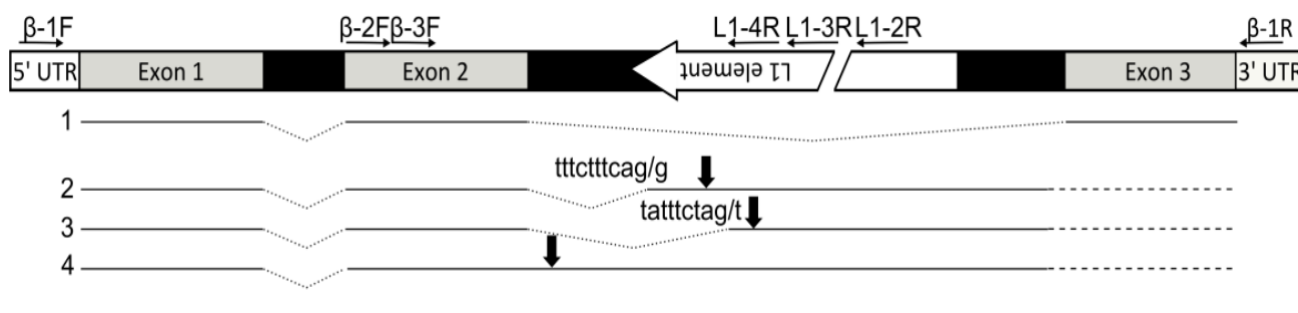
Můj podíl na tomto projektu byl: genetické mapování inzerce metodou Southern blotting a hybridizace, sekvenační analýzy zlomových míst inzerce, analýza abnormálního sestřihu β -globinové alely s inzercí L1. K mé práci na tomto projektu se vztahují také Obr. 32, 33 a 34.



Obr. 32: Genetické mapování inserce. (A) Restrikční mapa HBB genu (horní schéma nemutovaná, standardní alela, dolní schéma alela s insercí) s vyznačením délky EcoRI a BglII restrikčních fragmentů, které byly detekovány 5'β, β-globin IVS-II a 3'β próbami (pozice prób je vyznačena). Pro jednotlivé EcoRI a BglII restrikty jsou uvedeny délky v kilobázích. (B) NcoI, EcoRI, PstI and BamHI restrikční štěpy genomické DNA propozity (P) a normální kontroly (C), které byly hybridizovány s β-globin IVS-II próbou. Po Southernově přenosu a hybridizaci byly na autoradiografickém filmu detekovány silnější (černá šipka) a slabší (otevřená šipka) abnormální pruhy. (C) Výsledek hybridizace BglII-štěpené genomické DNA propozity (P) a normální kontroly (C) s β-globin IVS-II, 5'β a 3'β próbami.



Obr. 33: Sekvenační analýza zlomových míst inserce L1 elementu ve 2. intronu HBB genu. (A a B) Schéma strategie inverzní PCR, která byla použita pro klonování 5' and 3' zlomových míst. (A) *AccI* genomický fragment (1.1 kb) obsahující 5' spojení 2. intronu HBB a L1 elementu byl cirkularizován ligací a následně linearizován *Bam*HI restriktázou. Primery β -Ex2-R and β -IVS-II-F pak byly použity k amplifikaci fragmentu a sekvenaci místa spojení. (B) *Pst*I genomický fragment (1.6 kb) obsahující 3' spojení L1 elementu a 2. intronu HBB byl cirkularizován ligací v *Pst*I místě a následně linearizován *Eco*RI restriktázou. Primery β -Ex3-F a β -Ex3-R pak byly použity k amplifikaci fragmentu a sekvenaci místa spojení. (C) Ukázka sekvenačního gelu se sekvencí 5' zlomového místa, zřetelný je dlouhý poly(A) úsek odpovídající 3' konci inzertovaného transkriptu L1 elementu. (D) Znárodnění sekvence obou zlomových míst. Zmíněný poly(A) úsek inserce fúzoval v místě krátkého motivu čtyř „A“ v sekvenci 2. intronu HBB. Nelze přesně určit, kolik „A“ nukleotidů v místě této fúze patří poly(A) konci inzertované sekvence, proto je u posledního „A“ inserce rozpětí 107-111. Šipky nad sekvencí ukazují nukleotidy v pozicích 97 and 98 bp 5' k 3' konci 2. intronu HBB genu. L1 inserce je tedy v místě zlomu ohraničena duplikací 9-13 bp cílové sekvence (tzv. zdvojení cílového místa), která vzniká při integraci L1 elementu do hostitelské sekvence.



Obr. 34: Sekvenační analýza alternativních sestřihových variant vzniklých z β -globin-L1 alely. Nahoře je vyznačena struktura β -globin-L1 alely. Čísly jsou označeny exony HBB genu, introny jsou vyznačeny černě; 2. intron HBB genu je rozdělen L1 inzercí na dvě části. Na 5'a 3' konci genu jsou vyznačeny nepřekládané oblasti ("untranslated regions", UTR) HBB genu. Transkripty β -globin-L1 alely byly charakterizovány sekvenační analýzou RT-PCR produktů. Je vyznačena lokalizace primerů použitých pro RT-PCR a pro sekvenaci transkriptů (tři "forward" β -1F, β -2F, β -3F a čtyři "reverse" β -1R, L1-2R, L1-3R, L1-4R primery). Byly detekovány správně sestřižený β -globinový transkript (1) a tři abnormální sestřihové varianty (2-4). Plnou čarou jsou označeny detekované sekvence transkriptů, tečkovaně jsou vyznačeny vystřižené sekvence, čárkovaně jsou vyznačeny úseky, které nebyly dále sekvenovány. Alternativní sestřih u sestřihových variant 2 a 3 probíhá s využitím dvou kryptických míst sestřihu; u varianty 2 je to kryptické akceptorové místo sestřihu v rámci 2. intronu HBB genu a u varianty 3 je to kryptické akceptorové místo sestřihu v rámci sekvence L1 elementu. Varianta 3 se vyznačuje nevystřiženým 2. intronem HBB genu obsahujícím L1 element. Alternativní sestřih vede ke změně čtecího rámce a k zařazení předčasného STOP kodonu do alternativních sestřihových variant. Šipky (↓) vyznačují pozice stop kodonů.

Ad 3) Divoká M, Partschová M, Pospíšilová D, Orviská M, Lapčíková A, Indrák K., Čermák J, Divoký V: Alfa-talasemie u 45 českých rodin a 37 rodin cizinců žijících v České republice: přehled literatury a molekulárně-genetická diagnostika. *Transfuze Hematol. Dnes*. 2016. Přijato k publikaci.

Jedná se o článek na pomezí původního vědeckého a přehledového článku o molekulárně genetické charakterizaci α -talasemií v České republice. Popisuje genotypovou a fenotypovou variabilitu α -talasemií, jednotlivé typy delecí a mutací, které onemocnění způsobují, a důraz je kladen na diagnostické metody na molekulární úrovni. Článek přináší nejen přehled literárních údajů, ale také nové výsledky v diagnostice α -talasemií v České republice, kdy v průběhu posledních 10 let došlo k významnému rozšíření spektra α -talasemických mutací i počtu molekulárně-geneticky diagnostikovaných jedinců v ČR. Využití nových molekulárně-genetických přístupů pomohlo zlepšit diagnostiku α -talasemií – multiplexní ASO-PCR a MLPA pro diagnostiku delečních forem α -talasemií a sekvenční analýzy *HBA* genů pro nedeleční formy α -talasemií se staly základními diagnostickými přístupy. V souboru 82 rodin (98 členů) s podezřením na α -talasemii jsme odhalili u 78 rodin (92 jedinců) různé delece v rámci *HBA* lokusu; 45 rodin (53 jedinců) bylo českých, bez předků z malarických oblastí nejméně ve třech generacích rodu, ostatní byli cizinci žijící v ČR. U dvou jiných českých rodin (4 jedinců) jsme odhalili multiplikaci α -globinových genů a u dalších dvou imigrantů jsme odhalili nedeleční α -talasemickou mutaci. Ve většině případů se jednalo o tiché nosičství nebo nosičství α -talasemie, s běžnými typy delecí jednoho nebo dvou α -globinových genů, které jsou známé ze Středozeří nebo z jihovýchodní Asie. Rozsáhlé delece celého *HBA* lokusu, včetně regulační oblasti HS-40, byly detekovány u 6 českých rodin (11 členů) s klinickými projevy odpovídajícími nosičství α -talasemie (jednalo se vesměs o heterozygoty). U 4 rodin (z nich 3 českého původu) jsme detekovali různě dlouhé delece regulační oblasti HS-40, ale s intaktními α -globinovými geny, s fenotypem odpovídajícím ztrátě dvou α -globinových genů (nosičství α -talasemie) u 5 jedinců, a u 1 pacientky jedné rodiny s klinickými projevy odpovídajícími ztrátě tří α -globinových genů (choroba HbH). Molekulární analýzou této pacientky s italskými předky jsme zjistili, že fenotyp HbH onemocnění je u ní způsoben inaktivací dvou α -globinových genů zmíněnou delecí HS-40 na jednom chromozomu v kombinaci s delecí jednoho α -globinového genu ($-\alpha^{3.7}$) na druhém

chromozomu. Stejně závažný fenotyp, tj. chorobu HbH, jsme detekovali u imigranta ze severní Afriky, u kterého byl příčinný genotyp kombinací dvou častých delecí ze Středozeří $-\alpha^{4.2}/--^{MED}$).

Byla tak provedena první systematická molekulárně-genetická analýza α -talasemií v České republice na selektovaném souboru 82 rodin. Tato práce přináší první komplexní molekulárně-genetickou charakterizaci α -talasemických alel v ČR. Ukázali jsme, že zde převažují α -talasemické alely původem ze Středomoří a z JV Asie, nicméně u českých rodin jsme nacházeli i vzácné typy delecí *HBA* lokusu. Předpokládáme, že tato naše práce bude sloužit široké lékařské veřejnosti k základní orientaci v alelické heterogenitě α -talasemií v ČR i na Slovensku.

Vymezení mého podílu práce:

V této práci jsem prováděla většinu mutačních analýz na DNA úrovni (MLPA analýzy, multiplexní ASO-PCR detekce a jejich vyhodnocení) a částečně jsem prováděla i diagnostické testy (elektroforézy Hb), a napsala jsem první draft manuskriptu.

Ad 4) Sulovska L, Holub D, Zidova Z, Divoka M, Hajduch M, Mihal V, Vrbkova J, Horvathova M, Pospisilova D. Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits. ***Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub***. 2015 Oct 27. doi: 10.5507/bp.2015.054. [Epub ahead of print]

V rámci této studie byly u dvou skupin dětských pacientů s anemií měřeny vybrané parametry metabolismu železa (sérové železo, ferritin, hepcidin) a aktivity erytropoézy (EPO, solubilní transferinový receptor - sTfR, růstový diferenciační faktor 15 – GDF15). První skupina pacientů byli jedinci s defektem erytrocytární membrány, druhou skupinu tvořili pacienti s talasemií. V práci byly srovnány jednotlivé naměřené parametry v obou skupinách a statisticky vyhodnoceny.

Do skupiny pacientů s talasemií bylo zařazeno 13 dětí s talasemií minor (10 nosičů β -talasemické alely a 3 nosiči α -talasemické alely). Do souboru byl zařazen také jeden pacient s β -talasemií major (imigrant žijící v České republice). Kontrolní skupinu tvořilo 47 dětí, které byly vyšetřeny z důvodu podstoupení minoritního chirurgického zákroku.

Prvně byly srovnávány hodnoty krevního obrazu, pacienti s α -talasemií i β -talasemií byli hodnoceni společně vzhledem k podobnému klinickému obrazu. Byla u nich zjištěna mírná až závažnější anemie v porovnání s kontrolní skupinou. Při měření stanovení aktivity erytropoézy byly v talasemické skupině statisticky signifikantní výsledky pouze u měření hladiny GDF15, kde byly naměřené hodnoty 3krát vyšší než u kontrolní skupiny. Pacient s talasemií major měl jako jediný výraznou anemii (Hb 82 g/l) a měl zvýšené všechny tři měřené parametry. Při měření parametrů metabolismu železa byl počítán poměr hepcidin/ferritin, který byl u jedinců s talasemií snížený, nicméně hodnoty nebyly statisticky signifikantní. Tyto výsledky ukazují neadekvátní potlačení syntézy hepcidinu.

Ze sledování vyplývá, že erytroidní signály dominují nad signály zásob železa. Pacienti s inefektivní erytropoézou a zvýšenou hladinou zásobního železa mají překvapivě nízkou hladinu hepcidinu s ohledem na zásobu železa vedoucí k jeho nadměrnému ukládání v parenchymálních tkáních. Tato relativně snížená hladina hepcidinu vysvětluje přetížení železem u pacientů s β -talasemií intermedia bez nutnosti transfúze. Naopak, u pacientů s β -talasemií major je primární příčinou vysoké hladiny železa opakovaná transfúzní terapie; hladina hepcidinu je vyšší než u pacientů s β -talasemií intermedia díky sníženému efektu transfúzí na vlastní neefektivní erytropoézu. Je známo, že nosiči talasemie (α - i β -) mají pozměněné parametry metabolismu železa navzdory klinickým symptomům.

Sledování potvrdilo výsledky publikované Gumimaraes et al. (2015), že poměr (hepcidin/ferritin)/sTfR poměr rozlišuje nosiče talasemické alely od zdravých jedinců a také dokáže oddělit skupinu pacientů s defektem erytrocytární membrány. Měření poměru (hepcidin/ferritin)/sTfR může sloužit pro sledování pacientů s defektem erytrocytární membrány a vývoji jejich onemocnění a také ukazovat na potenciální risk přetížení železem.

Závěrem lze konstatovat, že i nosiči talasemické alely můžou vykazovat vyšší riziko přetížení organismu železem než zdravá populace. Je důležité také zmínit, že jsme mezi talasemickými nosiči pozorovali interindividuální rozdíly v míře alterace studovaných parametrů, která pravděpodobně odráží jak heterogenitu talasemických mutací na molekulární úrovni, tak přítomnost dalších modifikujících genů. Vhodným markrem reflektujícím závažnost porušené rovnováhy mezi metabolismem železa a erytropoézou se zdá být index (hepcidin/ferritin)/solubilní TfR, který by pomohl odlišit pacienty nejvíce ohrožené možným rizikem pozvolné orgánové akumulace železa.

Vymezení mého podílu práce:

Na práci jsem se podílela diagnostikou (bioanalytické testy, molekulární metody) všech analyzovaných jedinců s talasemií.

9. SHRNUTÍ A ZÁVĚR

Talasemie a hemoglobinové varianty jsou monogenně dědičné choroby s velmi rozmanitým fenotypem. Jejich výskyt je soustředěn především do malarických oblastí, ale díky historické i současné imigraci se talasemie i hemoglobinové varianty stále častěji objevují i v naší populaci. V České republice a na Slovensku jsou talasemie nejčastější příčinou vrozené mikrocytární anemie. Podobně jako v jiných ne-malarických regionech, přítomnost talasemií a strukturních hemoglobinových variant ve střední Evropě odráží historické přesuny populací a demografické změny, které následně ovlivnily genetickou variabilitu populace žijící v současnosti na tomto území.

Molekulárně-genetickou diagnostiku hemoglobinopatií a výzkum poruch globinové syntézy založil v Olomouci prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc., emeritní přednosta HOK FNOL. Výsledky, které předkládáme v této dizertační práci, navazují na iniciální studie prof. Indráka a rozšiřují naše znalosti o molekulárně-genetické charakteristice hemoglobinopatií vyskytujících se v České republice a na Slovensku.

Testovali jsme několik pracovních hypotéz. Potvrdili jsme, že nejčastějšími Hb variantami v ČR zůstávají Hb E a Hb Lepore. Potvrdili jsme hypotézu, že zvyšující se imigrace z malarických oblastí vede k introdukci alel endemických hemoglobinů do naší populace. Ukázali jsme, že je nutné na hematologických pracovištích v ČR počítat s nestabilními hemoglobinopatiemi jako příčinami vrozené hemolytické anemie. Potvrdili jsme, že v naší populaci převažují β - a δ/β -talasemické alely původem ze Středozeří. Nepotvrdili jsme ovšem hypotézu původně vyslovenou prof. Indrákem (a později převzatou i jinými autory), že vysoká incidence IVS-I-1 (G→A) mediteránní alely je specifická pro českou, slovenskou a případně maďarskou populaci a odlišuje tyto populace od jiných populací s výskytem talasemií. Ukázalo se, že původně vysoké relativní zastoupení této alely v české a slovenské populaci bylo ovlivněno malým souborem nemocných. Námi zjištěná relativní frekvence IVS-I-1 (G→A) β -talasemické alely v rozsáhlém souboru β -talasemických pacientů odpovídá zastoupení této alely v některých oblastech Středozeří. Dále jsme potvrdili náš předpoklad, že nové molekulárně-genetické přístupy, umožňující přesnou a rychlou charakterizaci mutací α -globinových genů, povedou k daleko většímu zachytu α -talasemií jak u českých rodin, tak u rodin cizinců žijících v České republice. Ukázali jsme, že α -talasemie nejsou v naší populaci

tak vzácné, jak jsme před lety publikovali, a že i heterogenita α -talasemií je v ČR zřejmě daleko větší, než se dosud soudilo.

Určení správné diagnózy hemoglobinopatie je z klinického hlediska klíčové. Ukázali jsme, že i nosiči talasemických alel mají neadekvátně utlumenou produkci hepcidinu vzhledem k zásobám železa a vykazují tak vyšší riziko přetížení organismu železem. U pacientů s mikrocytární anemií, u kterých byla detekována talasemická mutace, nesmí být použita nesprávná léčba pomocí preparátů železa. Ta je naopak důležitá u sideropenické anemie, která se projevuje podobně jako talasemie mikrocytózou a hypochromázií. Navíc, talasemické alely i alely hemoglobinových variant budou se stupňující se migrací v ČR postupně přibývat a s tím bude stoupat i nutnost jejich prenatální diagnostiky založené na molekulárně-genetických analýzách.

Kromě molekulárně-genetické charakteristiky hemoglobinopatií jsme se ve vědeckých projektech zaměřili i na detailní výzkum nových molekulárních mechanismů vedoucích k talasemickému fenotypu u některých našich nemocných. Popsali jsme unikátní inzerci transkripčně aktivního retrotranspozonu LINE 1 do 2. intronu *HBB* genu. Zjistili jsme, že inserce vede k výrazné redukci β -globinové exprese (fenotyp β^+ -talasemie), a že se na β -talasemickém fenotypu podílí abnormální sestřih β -globinového transkriptu pocházejícího z alely s inzercí L1. Jednalo se o novou etiologii β -talasemie.

Naše pracoviště HOK FNOL a LF UP, spolu s Ústavem biologie LF UP Olomouc a Dětskou klinikou FNOL a LF UP Olomouc jsou Centrem vysoce specializované péče pro dospělé pacienty a děti se vzácnými vrozenými a získanými poruchami krve tvorby v ČR. Tato dizertační práce reprezentuje výsledky tohoto Centra jako celku a věříme, že výsledky předkládané v této práci budou sloužit k dalšímu rozvoji výzkumu hemoglobinopatií v Olomouci.

10. POUŽITÁ LITERATURA

Antonarakis SE, Kazazian HH, Orkin SH: DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet.* 1985;69(1):1-14.

Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schütz G, Beug H: The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev.* 1999; 13(22): 2996–3002.

Belaousoff M, Farrington SM, Baron MH: Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. *Development.* 1998;125:5009-5018.

Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, Phylactides M, Verkerk AJ, van der Spek PJ, Scerri CA, Cassar W, Galdies R, van Ijcken W, Özgür Z, Gillemans N, Hou J, Bugeja M, Grosveld FG, von Lindern M, Felice AE, Patrinos GP, Philipson S: Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet.* 2010;42(9):801-5.

Bunn HF: Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(3):a011619.

Cao A, Galanello R: β -Thalassemia. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2010;12(2):61-76.

Divoky V, Svobodova M, Indrak K, Chrobak L, Molchanova TP, Huisman TH: Hb Hradec Kralove (Hb HK) or $\alpha 2\beta 2$ 115 (G17) Ala→Asp, a severely unstable hemoglobin variant resulting in a dominant beta-thalassemia trait in a Czech family. *Hemoglobin.* 1993; 17:319–328.

Divoky V, Gu LH, Indrak K, Mocikova K, Zarnovicanova M, Huisman TH: A new beta zero-thalassaemia nonsense mutation (codon 112, T→A) not associated with a dominant type of thalassaemia in the heterozygote. *Br J Haematol.* 1993;83(3):523-524.

Divoký V. Molekulární patofyziologie vybraných dědičných poruch erytropoézy, habilitační práce. Lékařská fakulta UP v Olomouci, 2002, 81 stran a přílohy.

Divoký V, Walczysková S, Pospíšilová D, Kostecká I, Divoká M, Vlachová Š, Jarošová M, Čermák J, Indrák K, Česko-slovenská kooperativní skupina pro diagnostiku hemoglobinopatií: Některé vzácnější formy hereditárních anémií vyskytující se v dospělé populaci v ČR - β -talasemie a nestabilní hemoglobinové varianty. *Vnitř Lék.* 2005;91(7-8):886-893.

Divoký V, Indrák K, Mojžíková R. Hemoglobinopatie: talasémie a strukturní Hb varianty. In: Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J (Eds.) *Molekulární hematologie*. Galén Praha, 2013, s. 270-283.

Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, Boeke JD: Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell.* 1996;87:905-916.

Garner C, Tatu T, Reittie JE, Littlewood T, Darley J, Cervino S, Farrall M, Kelly P, Spector TD, Thein SL: Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood*. 2000;95(1):342-6.

Giambona A, Vinciguerra M, Cannata M, et al: The genetic heterogeneity of β -globin gene defects in Sicily reflects the historic population migrations of the island. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;46(4):282-287.

Gonzalez-Redondo JM, Stoming TA, Kutlar F, Kutlar A, Hu H, Wilson JB, Huisman TH: Hb Monroe or $\alpha 2\beta 2$ 230(B12)Arg→Thr, a variant associated with beta-thalassemia due to a G>C substitution adjacent to the donor splice site of the first intron. *Hemoglobin*. 1989;13(1):67-74.

Gregory CJ, Eaves AC: Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*. 1978;51(3):527-37.

Guimarães JS, Cominal JG, Silva-Pinto AC, Olbina G, Ginzburg YZ, Nandi V, Westerman M, Rivella S, de Souza AM: Altered erythropoiesis and iron metabolism in carriers of thalassemia. *Eur J Haematol*. 2015;94(6):511-8.

Hentze MW, Kulozik AE: A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*. 1999;96(3):307-10.

Hermine O, Roméo PH. Regulation of erythropoiesis. In: Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C (Eds.) Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis, the handbook. *European School of Haematology*, Genoa, 2006, s. 39-70.

Higgs DR. The molecular basis of α thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. (Eds). Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2009, s. 241-265.

Huisman THJ: The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Baillieres Clin Haematol*. 1993;6(1):1-30.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.

Indrak K, Indrakova J, Kutlar F, et al: Compound heterozygosity for a beta zero-thalassemia (frameshift codons 38/39; -C) and a nondeletional Swiss type of HPFH (A→C at NT-110, Ggamma) in a Czechoslovakian family. *Ann Hematol*. 1991;63(2):111-115.

Indrak K, Brabec V, Wilson JB, Webber BB, Huisman TH: Hb Köln or $\alpha 2\beta 2$ (98)(FG5)Val→Met in a Czechoslovakian family. *Hemoglobin*. 1991;15(1-2):133-5.

Indrak K, Brabec V, Indrakova J, Chrobak L, Sakalova A, Jarosova M, Cermak J, Fei YJ, Kutlar F, Gu YC, Huisman THJ: Molecular characterization of beta-thalassemia in Czechoslovakia. *Hum Genet*. 1992;88(4):399-404.

Indrák K, Divoký V, Brabec V, Indráková J, Svobodová M, Huisman THJ: Molekulárně genetická charakteristika α , β a $\delta\beta$ thalassémií u 139 heterozygotů z 56 nepříbuzných rodin českého a slovenského původu. *Vnitř Lék*, 1993;39(10):969–978.

Indrák K, Brabec V, Divoký V, Fořtová H, Suttner J, Chrobák L, Wiedermann B, Huisman THJ: Strukturní varianty hemoglobinu nalezené v České republice. *Vnitř Lék* 1995;41:13–20.

Indrák K, Divoký V, Kynčlová E, Divoká M, Melichárková R, Indráková J: Hemoglobin Sydney $\alpha 2\beta 2$ 67 (E11) Val-Ala a hemoglobin Olomouc $\alpha 2\beta 2$ 86 (F2) Ala-Asp v českých rodinách. Přínos sekvenční analýzy DNA pro zpřesnění diagnostiky hemoglobinopatií. *Vnitř Lék*. 1998;44:347–349.

Iuchi I, Ueda S, Hidaka K, Shibata S: Hemoglobin Hoshida (beta43 (cd-2) Glu leads to Gln), a new hemoglobin variant discovered in Japan. *Hemoglobin*. 1978;2(3):235-47.

Jagannathan-Bogdan M, Zon LI: Hematopoiesis. *Development*. 2013;140(12):2463-2467.

Kamel K, el-Najjar A, Webber BB, Chen SS, Wilson JB, Kutlar A, Huisman TH: Hb Doha or alpha 2 beta 2[X-N-Met-1(NA1)Val→Glu]; a new beta-chain abnormal hemoglobin observed in a Qatari female. *Biochim Biophys Acta*. 1985;831(2):257-60.

Kanavakis E, Traeger-Sinodinos J. Molecular basis of thalassemia syndromes. In: Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C (Eds.) Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis, the handbook. *European School of Haematology*, Genoa, 2006, s. 210-227.

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.

Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, Hadjantonakis AK, Nagy A, Tam PP: The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development*. 1999;126(21):4691-701.

Kutlar A, Huisman THJ. The detection of hemoglobinopathies. In: Hommes FA (Ed.) Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: *A Laboratory Manual*. New York, NY, Wiley-Liss, 1991, s. 519-560.

Kynclova E, Kovarikova L, Fajkosova P, et al: [Haplotypes of the beta-globin locus in Czechs and Slovaks with beta-thalassemia and structurally variant hemoglobins]. *Vnitř Lék*. 1998;44(9):518-523.

Kynclova E, Divoky V, Kovarikova L, et al: [New beta0-thalassaemic insertion mutation (CD 7/8, +G) in a Slovak family, associated with the Mediterranean haplotype IX]. *Vnitř Lék*. 1999;45(3):151-154.

Lanikova L, Kucerova J, Indrak K, et al: β -Thalassemia due to intronic LINE-1 insertion in the β -globin gene (HBB): molecular mechanisms underlying reduced transcript levels of the β -globin(L1) allele. *Hum Mutat.* 2013;34(10):1361-1365.

Lenox LE, Perry JM, Paulson RF: BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood.* 2005;105(7):2741-2748.

Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F: Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev.* 1996;10(2):154-64.

Medvinsky A, Dzierzak E: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell.* 1996;86(6):897-906.

Menon MP, Karur V, Bogacheva O, Bogachev O, Cuetara B, Wojchowski DM: Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest.* 2006;116(3):683-694.

Miller IJ, Bieker JJ: A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* 1993;13(5):2776-86.

Nagel RL, Steinberg MH: Hemoglobins of the embryo and fetus and minor hemoglobins of adults. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR a Nagel RL. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambridge University Press, Cambridge, 2001, s. 197-230.

Nečas E a spolupracovníci: Patologická fyziologie orgánových systémů, část I. Praha: UK v Praze, 2003, 379 stran.

Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature.* 1991;349:257-260.

Plaseska D, Dimovski AJ, Janković L, Sukarova E, Efremov GD, Gebauer E, Jerance D: Hb Hoshida [β 43(CD2)Glu $\rightarrow$ Gln] observed in a Yugoslavian family. *Hemoglobin.* 1991;15(6):541-3.

Ponka P: Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood.* 1997;89(1):1-25.

Rivella S: β -Thalassemias: Paradigmatic diseases for scientific discoveries and development of innovative therapies. *Haematologica.* 2015;100(4):418-430.

Rochette J, Craig JE, Thein SL: Fetal hemoglobin levels in adults. *Blood Rev.* 1994;8(4):213-224.

Sankaran VG, Weiss MJ: Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. *Nat Med*. 2015;21(3):221-230.

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(6):828-835.

Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF: Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 2001;98(12):3261-3273.

Stamatoyannopoulos G: Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol*. 2005;33(3):259-271.

Steinberg MH, Adams JG: Thalassemic hemoglobinopathies. *Am J Pathol*. 1983;113(3):396-409.

Steinberg MH, Adams JG 3rd: Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. *Blood*. 1991;78(9):2165-2177.

Steinberg MH: Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1998;11(1):163-84.

Thein SL, Craig JE: Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin*. 1998;22(5-6):401-414.

Thein SL: Is it dominantly inherited beta thalassaemia or just a beta-chain variant that is highly unstable? *Br J Haematol*. 1999;107(1):12-21.

Thein SL: The molecular basis of β thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5):a011700. doi: 10.1101/cshperspect.a011700.

Voon HP, Vadolas J: Controlling α -globin: a review of α -globin expression and its impact on β -thalassemia. *Haematologica*. 2008;93(12):1868-1876.

Weatherall DJ: Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med*. 2008;8(7):592-599.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F: Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387-403.

Wiedermann BF, Indrak K, Wilson JB, Webber BB, Yang KG, Kutlar F, Kutlar A, Huisman TH: Hb Saint Louis or $\alpha 2\beta 2$ 28 (B10) Leu-Gln in a Czechoslovakian male. *Hemoglobin*. 1986;10:673-676.

Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF: Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995;377(6546):242-6.

Zhou D1, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM: KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet.* 2010;42(9):742-4.

11. SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ

Publikované články

Divoka M, Partschova M, Kucerova J, Mojzikova R, Cermak J, Pospisilova D, Fabryova V, Prochazkova D, Indrak K, Divoky V: Molecular Characterization of β -Thalassemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and Unique Mutations. *Hemoglobin*. 2016 Jun;40(3):156-62. IF 0,78. **Příloha č. 3**

Lanikova L, Kucerova J, Indrak K, **Divoka M**, Issa JP, Papayannopoulou T, Prchal JT, Divoky V: β -Thalassemia Due to Intronic LINE-1 Insertion in the β -Globin Gene (HBB): Molecular Mechanisms Underlying Reduced Transcript Levels of the β -Globin_{L1} Allele. *Hum Mutat*. 2013 Oct;34(10):1361-5. IF 5,05. **Příloha č. 4**

Divoká M, Partschová M, Pospíšilová D, Orviská M, Lapčíková A, Indrák K., Čermák J, Divoký V: Alfa-talasemie u 45 českých rodin a 37 rodin cizinců žijících v České republice: přehled literatury a molekulárně-genetická diagnostika. *Transfuzie Hematol. Dnes*. 2016. Přijato k publikaci. **Příloha č. 5**

Sulovska L, Holub D, Zidova Z, **Divoká M**, Hajduch M, Mihal V, Vrbkova J, Horvathova M, Pospisilova D: Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015. DOI: 10.5507/bp.2015.054. [Epub ahead of print]. IF 1,2. **Příloha č. 6**

Konferenční příspěvky

Divoká M, Partschová M, Mojžíková R, Piterková L, Horváthová M, Kolářčková M, Kalandrová E, Čermák J, Pospíšilová D, Fábryová V, Indrák K, Divoký V: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BETA-THALASSEMIA AND HEMOGLOBIN VARIANTS IN THE CZECH AND SLOVAK POPULATIONS: AN UPDATE. 16th Congress of EHA, United Kingdom, London, June 9-12, 2011. *Haematologica*. 2011;96, Suppl. 2: 1593. (abstrakt v časopise s IF) **Příloha č. 7**

Divoka M, Mojzikova R, Piterkova L, Pospisilova P, Partschova M, Horvathova M, Pospisilova D, Lalahova Striezencova Z, Cermak J, Indrak K, Divoky V: Molecular Characterization of Hemoglobinopathies and Red Cell Enzymopathies in the Czech and Slovak Populations: An Update. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, California, USA, December 10-13, 2011. *Blood*. (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011;118: Abstract 5307. (abstrakt v časopise s IF) **Příloha č. 7**

Divoka M, Partschova M, Mojžíková R, Piterková L, Horváthová M, Kolářčková M, Kalandrová E, Čermák J, Pospíšilová D, Fábryová V, Indrák K, Divoký V: „MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE BETA-TALASEMIÍ A HEMOGLOBINOVÝCH VARIANT V ČESKÉ A SLOVENSKÉ POPULACI“. XXV. OHD s mezinárodní účastí, Olomouc, 22.6. – 25.6.2011. *Transfuzie a Hematologie dnes* 17: 1920, 2011. (abstrakt + přednáška)

Divoká M, Kolářková M, Lapčíková A, Divoký V, Indrák K: Alfa-talasemie diagnostikované v ČR na molekulární úrovni: nové diagnostické přístupy. XXVI. OHD s mezinárodní účastí, Olomouc, 24.6. – 26.6.2012. **Sborník abstrakt** str. 63 P21/2236. (abstrakt + poster) **Příloha č. 7**

Divoká M, Kolářková M, Lipert J, Novosadová A, Orviská M, Lapčíková A, Láníková L, Partschová M, Pospíšilová D, Divoký V, Indrák K: Hemoglobinopatie v české a slovenské populaci. XXVII. OHD s mezinárodní účastí, Olomouc, 12.5. – 14.5.2013. **Sborník abstrakt** str. 85 P43/2401. (abstrakt + poster) **Příloha č. 7**

Divoká M, Pospíšilová D, Lapčíková A, Kolářková M, Orviská M, Lipert J, Novosadová A, Divoký V, Indrák K: Heterogenita alfa-talasemických delecí v české populaci: potvrzení úlohy oblasti HS-40 v regulaci exprese alfa-globinových genů. XXVIII. OHD s mezinárodní účastí, Olomouc, 1.6. – 3.6.2014. **Sborník abstrakt** str. 55 P12/2563. (abstrakt + poster) **Příloha č. 7**

Divoká M, Ptoszková H, Čermák J, Hak J, Divoký V, Pospíšilová D: Vzácné hemoglobinové varianty a alfa-talasemie u dětí v České republice. XXIV. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, Olomouc, 10. – 12.10.2014. **Sborník abstrakt** str. 32 L-01. (abstrakt + přednáška)

12. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Seznam použitých zkratk

AGM	aorta-gonad-mesonefros oblast
ASO-PCR	„allele-specific oligonucleotide“ PCR alelově specifická polymerázová řetězová reakce
β-LCR	„β-control locus region“
BFU-E	„burst forming unit-erythroid“
BMP4	„bone morphogenetic protein 4“
CFU-E	„colony forming unit-erythroid“
c-KIT	receptor pro faktor kmenových buněk
EPO	erythropoetin
EPOR	erythropoetinový receptor
Ex	exon
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
Hb	hemoglobin
HIF	„hypoxia inducible factor“ hypoxií inducibilní faktor
HOK	Hemato-onkologická klinika
HPFH	hereditary persistence of fetal hemoglobin; hereditární perzistence fetálního hemoglobinu
HS-40	„hypersensitive site 40“
IVS	intron
KLF1	„Kruppel like factor 1“
PCR	polymerázová řetězová reakce
PO ₂ -50	parciální tlak kyslíku, při kterém je hemoglobin saturován z 50 %
RT-PCR	reverzní transkripce-polymerázová řetězová reakce
STAT5	„signal transducer and activator of transcription 5“
SCF	„stem cell factor“, faktor kmenových buněk
TF	transkripční faktor
TTS	test tepelné stability
UTR 5' 3'	nepřekládaná oblast 5' 3'
2,3-BPG	2,3-bisfosfoglycerát

Příloha č. 2: Sekvence použitých primerů

Tabulka VII: Seznam použitých primerů

Primery pro analýzu L1 retrotranspozonu (RT-PCR, inverzní PCR a sekvenování)	
β-1F	5'- TGAGGAGAAGTCTGCCGTTA - 3'
β-1R	5'- CAGAATCCAGATGCTCAAGG - 3'
β-2F	5'- GTGGTCTACCCTTGGACCC - 3'
β-3F	5'- CTTTGGGGATCTGTCCACT - 3'
L1-2R	5'- TTCCCTATTTAATAAATGGT - 3'
L1-3R	5'- AATATCCAGAATCTACAATGAA - 3'
L1-4R	5'- CCAAATGTCCAACAATGATAGACTGGA - 3'
β-Ex2-R	5'- CCATAACAGCATCAGGAGTG - 3'
β-Ex3-F	5'- TGCAGGCTGCCTATCAGAAA - 3'
β-Ex3-R	5'- GCACACAGACCAGCACGTTG - 3'
β-IVS-II-F	5'- GTGGAAGTCTCAGGATCGTT - 3'
Primery pro detekci bodových mutací v <i>HBB</i> genu (PCR a sekvenování)	
HBB-662	5'- AGATCCATCTACATATCCCAAAGC - 3'
HBB-427	5'- CTATTGCTTACATTTGCTT - 3'
HBB-108	5'- GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC - 3'
HBB-16	5'- GCAGGTTGGTATCAAGGTT - 3'
HBB-18	5'- TCTCCTTAAACCTGTCTTG - 3'
HBB-109	5'- CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT - 3'
HBB-229	5'- ATACAATGTATCATGCCTCTTGCACC - 3'
HBB-58	5'- AATCCAGCTACCATTCTGC - 3'
HBB-230	5'- GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC - 3'
HBB-195	5'- GTGGTCTACCCTTGGACCC - 3'
HBB-437	5'- CTTTGGGGATCTGTCCACT - 3'
HBB-327	5'- TGCAGGCTGCCTATCAGAAA - 3'
β-Ex2-AS	5'- CCATAACAGCATCAGGAGTG - 3'
β-Ex3-AS	5'- GCACACAGACCAGCACGTTG - 3'
Primery pro detekci delecí v HBA lokusu (ASO-PCR)	
4.2_R	5'- CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC - 3'
SEA_F	5'- CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC - 3'
SEA_R	5'- AGCCACGTTGTGTTTCATGGC - 3'
LIS1_F	5'- GTCGTCACCTGGCAGCGTAGATC - 3'
LIS1_R	5'- GATTCCAGGTTGTAGACGGACTG - 3'
a2/3.7_F	5'- CCCCTCGCCAAGTCCACCC - 3'
FIL_F	5'- TGCAAATATGTTTCTCTCATTCTGTG - 3'

FIL_R	5'- ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC - 3'
20.5_F	5'- GCCCAACATCCGGAGTACATG - 3'
3.7/20.5_R	5'- AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG - 3'
a2_R	5'- AGACCAGGAAGGGCCGGTG - 3'
4.2_F	5'- GGTTTACCCATGTGGTGCCTC - 3'
MED_F	5'- TACCCTTTGCAAGCACACGTAC - 3'
MED_R	5'- TCAATCTCCGACAGCTCCGAC - 3'

Příloha č. 3: Divoká et al, 2016

Divoká M, Partschova M, Kuceroval J, Mojžíková R, Cermák J, Pospíšilová D, Fabryová V, Procházková D, Indrak K, Divoký V: Molecular Characterization of β -Thalassemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and Unique Mutations. *Hemoglobin*. 2016 Jun;40(3):156-62. IF 0,78.



Molecular Characterization of β -Thalassemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and Unique Mutations

Martina Divoka, Martina Partschova, Jana Kucerova, Renata Mojzikova, Jaroslav Cermak, Dagmar Pospisilova, Viera Fabryova, Daniela Prochazkova, Karel Indrak & Vladimir Divoky

To cite this article: Martina Divoka, Martina Partschova, Jana Kucerova, Renata Mojzikova, Jaroslav Cermak, Dagmar Pospisilova, Viera Fabryova, Daniela Prochazkova, Karel Indrak & Vladimir Divoky (2016): Molecular Characterization of β -Thalassemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and Unique Mutations, Hemoglobin, DOI: [10.3109/03630269.2016.1152581](https://doi.org/10.3109/03630269.2016.1152581)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/03630269.2016.1152581>

 View supplementary material 

 Published online: 09 Mar 2016.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 



ORIGINAL ARTICLE

Molecular Characterization of β -Thalassemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and Unique Mutations

Martina Divoká¹, Martina Partschová², Jana Kucerová², Renata Mojžíková², Jaroslav Cermák⁴, Dagmar Pospíšilová³, Viera Fabryová⁵, Daniela Procházková⁶, Karel Indrak¹, and Vladimír Divoký^{1,2}

¹Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

²Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

³Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

⁴Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁵Department of Hematology and Biochemistry, St. Michael Hospital, Bratislava, Slovak Republic and

⁶Department of Pediatrics, Masaryk Hospital, Ústí nad Labem, Czech Republic

Abstract

β -Thalassemia (β -thal) is considered rare in Central Europe. As in other malaria-free regions, the presence of β -thal in Central Europe reflects historical and recent immigration, and demographic changes that have influenced the genetic variability of the current populations living in this area. This study assesses the frequency and spectrum of mutations on the β -globin gene in Czech and Slovak subjects with clinical symptoms of thalassemia. The results of the initial part of this research were published more than two decades ago; the aim of this study was to update these original reports. During the period from 2002 to 2015, 400 cases from Czech and Slovak hematological centers were analyzed. Twenty-nine β -thal mutations, identified in 356 heterozygotes from 218 unrelated families, involve five unique mutations including a recently described insertion of a transposable L1 element into the β -globin gene. One mutation described here is reported for the first time. Most of the mutations were of Mediterranean origin and accounted for 82.0% of cases. All but one case studied were heterozygous carriers, manifesting β -thal minor, with rare exceptions represented by the rare (β^0) codons 46/47 (+G) (*HBB*: c.142_142dupG) mutation associated with an α -globin gene quadruplication and by dominantly inherited β -thal with a more severe phenotype. One double heterozygous β -thal patient was a recent immigrant from Moldavia. The list of $\delta\beta$ -thal alleles (26 carriers, 16 families) contains Hb Lepore and two types of $\delta\beta^0$ -thal deletions. In the past, genetic drift and migration as well as recent immigrations were responsible for the introduction of Mediterranean alleles, while several mutations described in single families were of local origin.

Keywords

β -Thalassemia (β -thal), genetic epidemiology, isolated unique mutations, Mediterranean alleles

History

Received 22 November 2015

Revised 17 December 2015

Accepted 20 December 2015

Published online 4 March 2016

Introduction

Hemoglobinopathies are known to occur at low frequencies in the populations of West, North and Central European countries (1). Reports describing thalassemia or hemoglobin (Hb) variants from malaria-free countries often bring novel insights into the epidemiology of these genetic disorders (2–10) and contribute to the understanding of the pathophysiology of these diseases (11,12) or might even represent novel mechanisms of these congenital defects (13–15).

In this report, we have updated the molecular analysis of β - and $\delta\beta$ -thalassemia (β - and $\delta\beta$ -thal) alleles found in the Czech and Slovak populations. Since the original report (4),

and several other previous reports describing unique mutations (16–18), the number of β -thal chromosomes has more than tripled and the spectrum of β -thal mutations has risen considerably. The relatively high frequency of β -thal alleles, mostly specific to the Mediterranean Basin, reported up to now in the Czech and Slovak populations (4,19,20) has been attributed to a long common history between Czechs and Slovaks and some Mediterranean populations in the multinational Habsburg monarchy, and later in the Austrian-Hungarian monarchy. Other historical influences such as Ottoman Turk invasions of these lands during the 16th and 17th centuries (21,22) are also a factor.

Here, we have summarized the results obtained from 2002 to 2015 for families with β - and $\delta\beta$ -thal chromosomes living in the Czech and Slovak Republics (former Czechoslovakia); the subjects were mostly of native Czech or Slovak origin. Besides the four previously described unique mutations

Address correspondence to Dr. Vladimír Divoký, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hnevotínská 3, Olomouc, CZ-775 15, Czech Republic. Tel: +420-585-632-151. Fax: +420-585-632-966. E-mail: vladimir.divoky@upol.cz

originating in local populations (15–18), one novel mutation was identified and was added to the existing HbVar database (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar>) (23).

Materials and methods

In a series of 400 cases from 240 families, hereditary hypochromic microcytic anemia and elevated Hb A₂ and/or Hb F values suggested a β - or $\delta\beta$ -thal determinant. The patients' samples were collected and referred to us for genetic analysis between 2002 and 2015. The Ethics Committee of Palacky University Hospital, Olomouc, Czech Republic approved the study and informed consent was obtained from all individuals.

Blood sample measurements (using Sysmex XE 5000 analyzer; Sysmex, Kobe, Japan), Hb electrophoresis, Hb A₂ and Hb F quantification have been described in previous reports (24,25). Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples collected into vacutainers containing EDTA, using either phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction with ethanol precipitation, the Puregene[®] Blood Core Kit B (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) or an automatic DNA analyzer MagNA Pure (Roche Diagnostics GmbH Deutschland, Mannheim, Germany). The polymerase chain reaction (PCR) primers and conditions used to amplify the β -globin gene including the 5' and 3' untranslated regions (5' and 3' UTRs) (NM_000518.4) are available upon request. The PCR products were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc.) and used for dot-blot analysis of amplified DNA using ³²P-labeled oligonucleotide probes (4) or for direct PCR product sequencing in both directions with a BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using an ABI PRISM[™] 310 or 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). In addition, several $\delta\beta$ -thal alleles were characterized through MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) (SALSA MLPA probemix P102-B2 HBB; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

Results

During the period from 2002 to 2015, 400 subjects with features of β - or $\delta\beta$ -thal traits were analyzed; the β - or $\delta\beta$ -thal alleles were detected in 382 carriers from 234 unrelated families. One patient was a double heterozygote for β -thal mutations. The cumulative results of the incidence of individual mutations together with their ethnic distribution are provided in Table 1. The Mediterranean mutation IVS-I-1 (G>A) (HBB: c.92+1G>A) was present in about one-fourth of Czech and Slovak families and thus remains the most frequent β -thal mutation in this population, as previously described (4). In earlier studies performed in Czech and Slovak families, the mutation was associated with haplotype Va [in six families, in which haplotype analysis was carried out (19,26)] suggesting this mutant allele in the affected Czech and Slovak families originated in the Mediterranean. Other common Mediterranean mutations detected previously on Mediterranean haplotypes in Czech and Slovak families (19) (Supplementary Table 1) and found in more than 10 Czech or Slovak families in this study were: IVS-I-110 (G>A) (HBB: c.93–21G>A); IVS-I-6 (T>C) (HBB:

c.92+6T>C), codon 39 (C>T) (HBB: c.118C>T) and IVS-II-1 (G>A) (HBB: c.315+1G>A). In total, 293 subjects from 184 families (82.0% of subjects, 84.4% of families) carry β -thal alleles previously reported from the endemic Mediterranean region (Figure 1). In addition, all $\delta\beta$ -thal alleles detected are common in Mediterranean countries.

The second most common subgroup of mutations (in terms of their origin) are those which originated locally (Figure 1). Of these, the codons 38/39 (–C) (HBB: c.118delC) mutation (18) is relatively frequently found only in the Czech population. Another unique mutation, codon 112 (T>A) (HBB: c.339T>A), was observed in one Slovak family in our cohort and was likely related to the original case described earlier (16). The insertion of a transposable element causing β^+ -thal in a Ukrainian mother and daughter living in Slovakia has been described separately (15). Table 2 shows a comparison of hematological data for two unique and one rare β^0 -thal mutations detected in single families, the codons 7/8 (+G) (HBB: c.24_24dupG) mutation has already been described in a Czech language journal (17), and codons 46/47 (+G) (HBB: c.142_142dupG) in one Italian patient from Sicily (27), while the codon 52 (–A) (HBB: c.158delA) mutation is reported here for the first time. The hematological values for the three family members with the codons 46/47 mutation were more severe than expected for β^0 -thal heterozygotes and a search for another determinant (responsible for this severe phenotype) revealed an α -globin gene quadruplication in all three patients (Supplementary Figure 1). However, except for more pronounced microcytic anemia and splenomegaly detected in one child (Table 2), the other affected family members did not exhibit severe clinical symptoms (signs of hemolytic anemia with splenomegaly) and none of the patients required transfusions. The molecular defects of 18 cases with suspected β - or $\delta\beta$ -thal traits (*i.e.* familiar microcytosis, hypochromia, borderline to elevated Hb A₂ and/or Hb F, normal serum ferritin level) remain unknown, despite extensive sequence analysis involving the flanking regions of the β -globin gene as well as MLPA analysis of the β -globin gene cluster.

Discussion

β -Thalassemia is considered rare in Central Europe (1). As in other non malaria regions, the presence of β -thal in Central Europe reflects the historical immigration and demographic changes that have influenced the genetic variability of the current populations living in this area (28).

The Czech Republic (Bohemia and Moravia) was originally populated by Celts and invaded by Germanic tribes. The Slavs become the dominant population from the 6th to 8th centuries, surrounded by Germans (22). The Slovaks were Slavs who settled to the east of Moravia. Early on in their history, they fell under the rule of the Magyars, or Hungarians, who were Finno-Ugric in ethnic origin rather than Slavic (21). Even though close contact between the Czechs and Slovaks came much later (from 1620 but mainly after 1918), the resulting gene-flow is likely to be responsible for a very similar thalassemia allele frequency in the Czechs and Slovaks. Despite some cultural differences, the Czechs and Slovaks shared political and historical regions that emerged in Central Europe long enough

Table 1. The incidence of β -thalassemia and $\delta\beta$ -thalassemia mutations in Czech and Slovak populations found during the 2002-2015 period.

β -Thalassemia Mutations	HbVar ID	HGVS Nomenclature ^a (<i>HBB</i> :)	Families/ Cases	Relative Frequency (% of chromosomes)	Type of Thalassemia ^b ; Ethnic Background ^b ; (possible haplotype) ^c
IVS-I-1 (G>A)	817	c.92 + 1G>A	53/97	27.1	β^0 ; Mediterranean (Va)
IVS-I-110 (G>A)	827	c.93–21G>A	40/61	17.0	β^+ ; Mediterranean (I; IX)
IVS-I-6 (T>C)	826	c.92 + 6T>C	27/32	8.9	β^{++} ; Mediterranean (VI; X)
codon 39 (C>T)	845	c.118C>T; p.Gln40*	23/37 ^d	10.3	β^0 ; Mediterranean (I)
IVS-II-1 (G>A)	884	c.315 + 1G>A	15/25	7.0	β^0 ; Mediterranean
codons 38/39 (–C)	843	c.118delC; p.Gln40Argfs*22	7/17	4.7	β^0 ; Czech (II)
codon 8 (–AA)	785	c.25_26delAA; p.Lys9Valfs*14	7/12 ^d	3.3	β^0 ; Mediterranean
IVS-II-745 (C>G)	891	c.316–106C>G	7/10	2.8	β^+ ; Mediterranean (VIIa)
–87 (C>T)	759	c.–137C>T	6/7	2.0	β^{++} ; German/Italian
codon 121 (G>T)	951	c.364G>T; p.Glu122*	4/12 ^e	3.3	β^0 ; Caucasian/ Czech-Slovak? (Va)
codons 41/42 (–TTCT)	849	c.126_129delCTTT; p.Phe42Leufs*19	4/4	1.1	β^0 ; Asian (Chinese)
codons 82/83 (–G)	875	c.251delG; p.Gly84Alafs*6	3/8	2.2	β^0 ; Azerbaijani
polyA (AATAAA>AATGAA)	969	c.*111A>G	3/4	1.1	β^{++} ; Mediterranean
–87 (C>G)	758	c.–137C>G	2/3	0.8	β^{++} ; Mediterranean
codon 17 (A>T)	800	c.52A>T; p.Lys18*	2/2	0.6	β^0 ; Asian (Chinese)
–86 (C>A)	760	c.–136C>A	2/2	0.6	β^{++} ; Italian
codons 46/47 (+G)	2974	c.142_142dupG; p.Asp48Glyfs*6	1/3	0.8	β^0 ; Italian (see also Table 2)
IVS-I-5 (G>C)	824	c.92 + 5G>C	1/3	0.8	β^+ ; Mediterranean
codon 52 (–A) ^f	2973	c.158delA; p.Asp53Valfs*9	1/3	0.8	β^0 ; Czech (see also Table 2)
codon 112 (T>A)	948	c.339T>A; p.Cys113*	1/2 ^e	0.6	β^0 ; Slovak
codons 7/8 (+G) ^{f,g}	2972	c.24_24dupG; p.Lys9Glufs*15	1/2	0.6	β^0 ; Slovak (IX; see also Table 2)
44 bp deletion	975	c.76_92 + 27del	1/2	0.6	β^0 ; Greek
codon 5 (–CT)	783	c.17_18delCT; p.Pro6Argfs*17	1/2	0.6	β^0 ; Mediterranean
IVS-II-765 L1 ^h	2892	L1 insertion between c.316–86_316–85	1/2	0.6	β^+ ; Ukrainian
codon 45 (–T)	855	c.138delT; p.Phe46Leufs*16	1/2	0.6	β^0 ; Asian (Pakistani)
codon 37 (TGG>TGA)	841	c.114G>A;p.Trp38*	1/1	0.3	β^0 ; Asian (Saudi Arabian)
619 bp deletion	979	c.316–149_*342delinsAAGTAGA ⁱ	1/1	0.3	β^0 ; Indian
codon 6 (–A)	784	c.20delA; p.Glu7Glyfs*13	1/1	0.3	β^0 ; Mediterranean
codons 71/72 (+A)	869	c.216_217insA; p.Ser73Lysfs*2	1/1	0.3	β^0 ; Asian (Chinese)
Total			218/357	100.0	
$\delta\beta$ -Thalassemia Mutations					
Hb Lepore	743–744 ^j	<i>HBD</i> : <i>HBB</i> : fusion	11/18	69.2	$\delta\beta$ fusion Hb
Sicilian	1035	NG_000007.3:g. 64336_77738del113403	4/7	27.0	($\delta\beta$) ⁰ -thalassemia
Macedonian/Turkish	1036	<i>HBB</i> : <i>HBD</i> : complex rearrangement	1/1	3.8	($\delta\beta$) ⁰ -thalassemia
Total			16/26	100.0	

^a*HBB* accession NM_000518.4.
^bFrom HbVar [http://globin.cse.psu.edu/hbvar (23)], IthaGenes [(http://www.ithanet.eu (32)) and from (54).
^cBased on haplotype studies performed on a limited number of families published in a Czech language journal (19). Haplotype analysis was performed using a PCR-RFLP method (56) at nine polymorphic sites: *Hinc*II-5' ϵ , *Xmn*I-5' γ , *Hind*III-^o γ , *Hind*III-^A γ , *Hinc*II- $\psi\beta$, *Hinc*II-3' $\psi\beta$, *Hinf*I-5' β , *Ava*II- β and *Bam*HI-3' $\psi\beta$, and the haplotypes were numbered according to (35). For more information, see the Supplementary Table 1.
^dOne patient of Moldavian origin was a compound heterozygote for codon 8/codon 39 with β -thal major.
^eLikely relatives of previously described families/cases (4,16).
^fNewly described mutation.
^gFirst described in a Czech language journal (17).
^hDescribed separately (15).
ⁱSequence verified as described (57) not as NG_000007.3:g.71609_72227del619, the current HbVar annotation of 619 bp deletion *HBB* variant.
^jPrecisely specified cases were either Hb Lepore-Baltimore (δ^{50}/β^{86} ; NG_000007.3:g.63564_70978del; HbVar ID: 743) ($n=3$) or Hb Lepore-Boston-Washington (Hb LBW, δ^{87}/β^{116} ; NG_000007.3:g.63632_71046del; HbVar ID: 744) ($n=3$).

that many families with Czech ancestry contain members of Slovak origin and *vice versa*, which makes it difficult to distinguish unique and common mutations between the Czech and Slovak populations. For this purpose we consider the Czech and Slovak Republics as one region. Formerly, the frequency of β -thal mutations in Czechoslovakia (now the Czech and Slovak Republics) was described as specifically different from that found in the Mediterranean and Balkan countries; the main difference was attributed to a seemingly high relative frequency (45.2%) of the IVS-I-1 allele among the Czech and Slovak thalassemia carriers (4), and these data were also cited in the following comparative studies (29). The IVS-I-1 mutation was even proposed to have originated in Eastern Europe (30). However, these data were based on a relatively small number of β -thal chromosomes analyzed from the former Czechoslovakia. Here, in a much larger study allowing more reliable comparison, the relative frequency of the most common β -thal mutations does not seem to differ from certain

Figure 1. Summary of frequencies of β -thal chromosomes in the Czech and Slovak populations according to their ethnic origin. The relative frequencies of β -thal chromosomes in individual ethnic categories were calculated from the β -thal chromosome frequencies as depicted in Table 1. The ethnic origin/distribution data for individual β -thal mutations were compiled from HbVar [<http://globin.cse.psu.edu/hbvar> (23)] and IthaGenes [<http://www.ithanet.eu> (32)] databases and one review article (54). The ‘Asian’ category of mutations involves rarely represented Chinese, Pakistani, Saudi Arabian and Indian mutations (see Table 1).

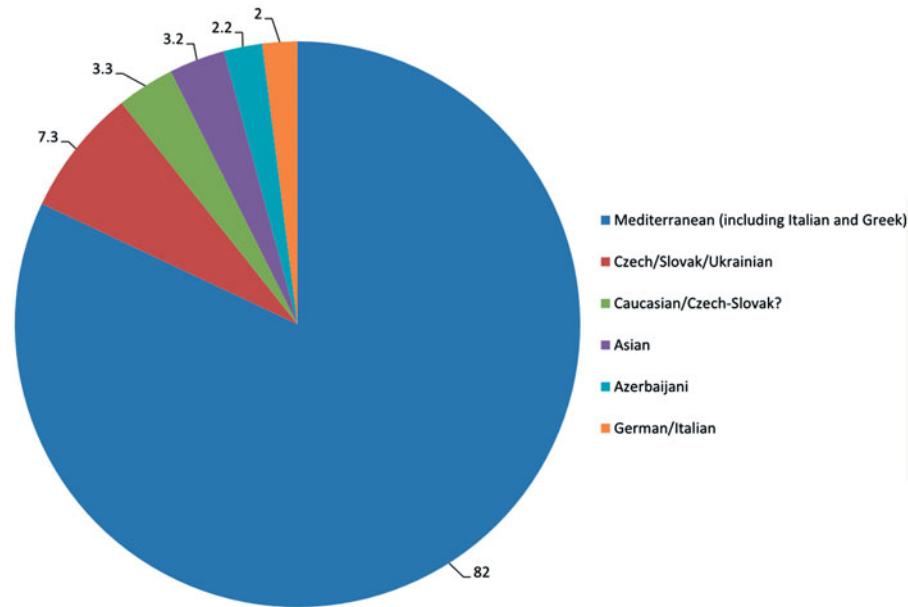


Table 2. Hematological data of one rare and two unique β -thalassemia mutations.

Mutation	Patients	Sex-Age	Hb (g/dL)	RBC ($10^{12}/L$)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Reticulocytes (%)
codons 7/8 (+G) ^a	mother	F-43	11.7	5.76	61.5	20.3	4.9	2.7	NA
	son	M-21	13.2	6.44	61.8	20.5	5.2	2.0	NA
codon 52 (–A)	four relatives ^b	F-9, F-4	10.0–12.9	5.18–5.64	58.7–71.3	19.0–22.9	4.5–5.3	1.4–2.0	NA
		M-34, M-29							
codons 46/47 (+G) ^c	mother	F-28	9.6	5.39	59.4	17.8	5.7	1.0	2.5
	son	M-4	11.3	6.96	54.9	16.2	5.3	9.1	1.4
	daughter ^d	F-1	9.0	5.01	58.9	18.0	6.6	4.8	2.0

Hb: hemoglobin; RBC: red blood cell count; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular Hb; normal control range for reticulocytes: 0.5–2.5%; NA: not analyzed.

^aFrom (17).

^bRange of values.

^cAll family members with the codon 46/47 mutation also carry the α -globin gene quadruplication (see Supplementary Figure 1).

^dThe only family member presenting with splenomegaly.

Mediterranean populations. The incidence of the IVS-I-1 allele (27.1% of molecularly characterized β -thal cases in this study) is similar to that observed in some Mediterranean regions, such as the Iberian Peninsula (31), some parts of Italy (27) or some population groups (Lebanese Christians) (30); a comparison of IVS-I-1 allele's relative frequencies for different populations/regions is available at <http://www.ithanet.eu> (32). Although found in association with different haplotypes (33,34), the vast majority of the IVS-I-1 allele observed in Mediterranean regions was linked with haplotype V [<http://globin.cse.psu.edu/hbvar>; the original haplotype designation associated with IVS-I-1 was described as the Mediterranean subhaplotype Va (35)]. As the same subhaplotype was previously identified for the Czech IVS-I-1 alleles (19,26), it is very likely that this mutation was introduced to the Czech and Slovak populations from the Mediterranean Basin as we proposed (4,20) and did not originate in Eastern Europe as ascribed (30).

The second most common mutation in our cohort, IVS-I-110 (G>A) (17% of molecularly characterized β -thal cases in this study), is the most common β -globin gene mutation in Greece (36), and is also common in several other Mediterranean populations [documented in the HbVar

database (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar>) or in the IthaGenes database (<http://www.ithanet.eu>)]. The haplotypes previously associated with this mutation in selected Czech/Slovak families were I and IX (19) (Supplementary Table 1) – the most common haplotypes associated with this mutation in the Mediterranean (35). Also, the spectrum of other β -thal determinants of Mediterranean origin reported in this study further supports our original conclusion that the majority of β -thal genes in the Czech and Slovak populations were imported from the Mediterranean (4). Similar results were published for the indigenous Hungarian and German populations (5,37). It seems likely that the occurrence of these mutations corresponds with a common history (400 years) for Czechs, Slovaks, Germans and Hungarians as well as some Mediterranean populations joined from 1526 to 1918 to the Habsburg monarchy and later to the Austrian-Hungarian monarchy.

In some subjects, namely one family with codon 39, one with codon 8 (–AA), another with the ‘Greek’ 44 bp deletion and one family carrying Hb Lepore, ancestors from the Mediterranean region were identified, suggesting the ancestors of the individuals affected had recently migrated to

the Czech Republic (e.g. a group of Greeks settled in the former Czechoslovakia after the Second World War). However, the vast majority of β -thal-affected families did not report Mediterranean relatives in the two preceding generations, indicating that the mutant genes were introduced into the Czech and Slovak populations during the Austrian-Hungarian empire or earlier. In industrialized Northern and Western European countries, β -thal and other hemoglobinopathies have recently become much more common through high immigration rates from endemic areas (10,28,38). Although immigration to the Czech and Slovak Republics is rising, it is not yet that high, and the presence of some mutations (such as the 'Turkish' codon 8 mutation) in several families without a clear Mediterranean or Turkish background may be remnants of historical rather than recent events – the regions were invaded by Huns (4th century) and Avars (6th to 8th centuries) and overrun by other Asian tribes such as the Mongols or Tartars (21,22). Two Asian mutations, codons 41/42 (–TTCT) and codon 17 (A>T), detected in six families without any obvious Asian influence on their pedigrees, may also have a historical Asian origin; both these mutations are common in the Far East (1).

From the five mutations so far found only in local (non immigrant) families, the distribution of the codons 38/39 mutation is quite interesting. Most of the affected families come from the same region, central Moravia (the eastern part of the Czech Republic). Previous haplotype analysis of three of these families showed that the mutated allele was linked to haplotype II (19). These data suggest that this mutation may have originated relatively recently and due to a single founding event it appears to be regionally specific. The other unique β -thal mutation, the insertion of a transposable L1 element into the β -globin gene (depicted in Table 1 as IVS-II-765 L1, HbVar ID: 2892), represents a novel etiology of β -thal due to the silencing effect of repressive chromatin associated with a retrotransposon insertion (15).

Similar to what was published for other non malaria countries [reviewed in (39)], β -thal mutation diversity in the Czech and Slovak populations has been increased by isolated unique mutations. One such mutation, codon 52, is described here for the first time and an additional one was described only in a Czech language journal (codons 7/8); both have now been added to the online HbVar database (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar>). In the case of the rare codons 46/47 mutation, the heterozygotes described in this study coinherited two extra α -globin genes (quadruplication of the *HBA2* gene) that resulted in a more severe β -thal phenotype (more severe than would be expected for β^0 -thal heterozygotes), as described for other β^0 -thal carriers with such an α -globin genotype (40,41). Increased β -thal severity by α -globin gene triplication has already been published for a Czech patient (26), verifying the presence of these α -globin genotypes with an increased number of functional α -globin genes in the Czech population.

Of some special interest are two other rare mutations, namely codons 82/83 (–G) (*HBB*: c.251delG) and codon 121 (G>T) (*HBB*: c.364G>T). The rare frameshift mutation at codons 82/83, originally described in Azerbaijanis (42,43), has been reported with a relatively high frequency from Germany (7). The origin of this mutation in Czech, Slovak

[this report and (4)] and German families will remain unresolved until the haplotype analyses become available. It is possible, however, that the mutation was imported to Central Europe by Azerbaijanis, as it was suggested that this mutation might be specific for the population of Azerbaijan (44). The codon 121 mutation was originally described as a cause of severe hemolytic anemia with splenomegaly, called dominantly inherited inclusion body β -thal (11,45,46). However, later the mutation was associated with a variable clinical manifestation in heterozygotes among the families affected and even among carriers from the same family (47,48); the same was true for individuals from the Czech and Slovak families; the clinical picture of most carriers resemble β -thal traits associated with recessive mutants [this report and (4)]. All the patients we studied had four α -globin genes and sequencing analysis of both $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes from two selected individuals with an asymptomatic clinical picture failed to detect any abnormality (not shown). Thus, other recently identified modifiers of the clinical severity of β -thal (12,40,49,50) might be responsible for this variable clinical manifestation. Previous haplotype analysis in one Slovak and two Czech families with a codon 121 mutation revealed restriction fragment length polymorphism (RFLP) characteristics of haplotype Va (19), however, differences in the polymorphisms were recently observed through sequencing analysis of the (AT)_X(T)_Y repeat motif 5' to the β -globin gene (unpublished data, not shown). Interestingly, two of four Dutch families with the codon 121 mutation revealed the same haplotype (or at least the same 5' subhaplotype, referred to as h2) (48). Although we cannot exclude the possibility that (at least some of) the mutations arose from the same event and that the differences of the (AT)_X(T)_Y polymorphisms may have resulted from recombination at the recombination hot-spot, the rarity of this mutation rather supports the hypothesis that the causative codon 121 mutations are of *de novo* origin in individual European populations, as suggested for this type of mutation in non malaria countries with an otherwise low thalassemia frequency (39). Based on the above mentioned clinical and genetic analyses, we conclude that the only 'true' dominantly inherited β -thal present in the Czech population is represented by the hyperunstable Hb variant described as Hb Hradec Kralove (Hb HK, *HBB*: c.347C>A) (51).

An independent study involving a cohort of 70 β -thal carriers from the Slovak Republic (20) revealed mutations also represented in a cohort of this study. However, there are a few mutations not detected by us but described by others for Czech or Slovak β -thal subjects, which further increase the diversity of β -thal mutations in the Czech/Slovak ethnicities; these were the 'Czech' 4.2 kb β -thal deletion [HbVar ID: 983 (52)] and the polyadenylation (polyA) signal AATAAA>GATAAA mutation [IthID: 271 (53)]. Eighteen cases in our cohort with clinical features of β -thal trait but with no detectable mutation in the β -globin gene suggest that mutations *in trans*-acting factors causing the β -thal phenotype (54) remain to be determined in the indigenous Czech and Slovak populations. In fact, one Krüppel-like factor 1 (*KLF1*) gene mutation associated with increased Hb F levels has recently been identified in a Slovak individual (55).

Acknowledgments

The authors are indebted to all physicians from the Czech Republic and the Slovak Republic who participated in this study.

Declaration of interest

This study was supported by grant NT13587 (from the Ministry of Health Czech Republic), by Education for Competitiveness Operational Programme of the MSMT CR project CZ.1.07/2.3.00/30.0041 and by student projects IGA_LF_2015_015 and IGA_LF_2015_001 (from the Palacky University, Olomouc, Czech Republic). The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

References

- Loukopoulos D, Kolli P. Worldwide distribution of β thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, Eds. Disorders of Hemoglobin Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. New York, NY: Cambridge University Press. 2001:861–877.
- Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G. Mediterranean types of β -thalassemia in the German population. *Hum Genet.* 1990; 85(1):135–137.
- Hall GW, Barnetson RA, Thein SL. β Thalassemia in the indigenous British population. *Br J Haematol.* 1992;82(3):584–588.
- Indrak K, Brabec V, Indrakova J, et al. Molecular characterization of β -thalassemia in Czechoslovakia. *Hum Genet.* 1992; 88(4):399–404.
- Ringelhann B, Szelenyi JG, Horanyi M, et al. Molecular characterization of β -thalassemia in Hungary. *Hum Genet.* 1993; 92(4):385–387.
- Heusterspreute M, Derclaye I, Gala JL, et al. β -Thalassemia in indigenous Belgian families: Identification of a novel mutation. *Hum Genet.* 1996;98(1):77–79.
- Vetter B, Schwarz C, Kohne E, Kulozik AE. β -Thalassemia in the immigrant and non-immigrant German populations. *Br J Haematol.* 1997;97(2):266–272.
- Maciag M, Plochocka D, Adamowicz-Salach A, et al. Diversity of thalassemia variants in Poland – screening by real-time PCR. *Acta Haematol.* 2008;120(3):153–157.
- Van Zwieter R, Veldhuis M, Delzenne B, et al. Hemoglobin analyses in The Netherlands reveal more than 80 different variants including six novel ones. *Hemoglobin.* 2014;38(1):1–7.
- Kohne E, Kleihauer E. Hemoglobinopathies: A longitudinal study over four decades. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(5):65–71.
- Thein SL. Dominant β thalassemia: Molecular basis and pathophysiology. *Br J Haematol.* 1992;80(3):273–277.
- Mojzikova R, Dolezel P, Pavlicek J, et al. Partial glutathione reductase deficiency as a cause of diverse clinical manifestations in a family with unstable hemoglobin (Hemoglobin Hana, $\beta 63(E7)$ His-Asn). *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(3):219–222.
- Barbour VM, Tufarelli C, Sharpe JA, et al. α -Thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood.* 2000; 96(3):800–807.
- 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(2):157–165.
- Lanikova L, Kucerova J, Indrak K, et al. β -Thalassemia due to intronic LINE-1 insertion in the β -globin gene (HBB): Molecular mechanisms underlying reduced transcript levels of the β -globin(L1) allele. *Hum Mutat.* 2013;34(10):1361–1365.
- Divoky V, Gu L-H, Indrak K, et al. A new β^0 -thalassaemia nonsense mutation (codon 112, T→A) not associated with a dominant type of thalassaemia in the heterozygote. *Br J Haematol.* 1993;83(3):523–524.
- Kynclova E, Divoky V, Kovarikova L, et al. [New β^0 -thalassaemic insertion mutation (CD 7/8, +G) in a Slovak family, associated with the Mediterranean haplotype IX]. *Vnitr Lek.* 1999;45(3):151–154.
- Indrak K, Indrakova J, Kutlar F, et al. Compound heterozygosity for a β^0 -thalassaemia (frameshift codons 38/39; –C) and a nondeletional Swiss type of HPFH (A→C at NT –110, $\alpha\gamma$) in a Czechoslovakian family. *Ann Hematol.* 1991;63(2): 111–115.
- Kynclova E, Kovarikova L, Fajkosova P, et al. [Haplotypes of the β -globulin locus in Czechs and Slovaks with β -thalassaemia and structurally variant hemoglobins]. *Vnitr Lek.* 1998; 44(9):518–523.
- Fabryova V, Babusik P, Lahuova-Striezencova Z, et al. Nineteen years study of β -thalassaemia in Slovakia. *Cent Eur J Public Health.* 2012;20(4):239–243.
- Alexander J. Slovakia. In: Frucht RC, Ed. Eastern Europe: An Introduction to the People, Lands, and Culture, Vol. 2. Santa Barbara, CA: ABC-CLIO. 2005:283–328.
- Miller D. The Czech Republic. In: Frucht RC, Ed. Eastern Europe: An Introduction to the People, Lands, and Culture, Vol. 2. Santa Barbara, CA: ABC-CLIO. 2005:203–282.
- Giardine B, Borg J, Viennas E, et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D1063–D1069. (<http://globin.cse.psu.edu>).
- Kutlar A, Huisman THJ. Detection of hemoglobinopathies. In: Hommes FA, Ed. Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual. New York, NY: Wiley-Liss. 1991:519–560.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. The role of automated measurement of RBC subpopulations in differential diagnosis of microcytic anemia and β -thalassaemia screening. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(3):374–379.
- Indrak K, Fei Y-J, Li H-W, et al. A Czechoslovakian teenager with Hb E- β^0 -thalassaemia [IVS-I-1 (G→A)] complicated by the presence of an α -globin gene triplication. *Ann Hematol.* 1991; 63(1):42–44.
- Giambona A, Vinciguerra M, Cannata M, et al. The genetic heterogeneity of β -globin gene defects in Sicily reflects the historic population migrations of the island. *Blood Cells Mol Dis.* 2011; 46(4):282–287.
- Modell B, Darlison M, Birgens H, et al. Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: An overview. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67(1):39–69.
- Henderson S, Timbs A, McCarthy J, et al. Incidence of haemoglobinopathies in various populations – the impact of immigration. *Clin Biochem.* 2009;42(18):1745–1756.
- Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, et al. Genetic heterogeneity of β thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. *Ann Hum Genet.* 2005;69(Pt 1):55–66.
- Villegas A, Roperio P, Gonzalez FA, et al. The thalassemia syndromes: Molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin.* 2001;25(3):273–283.
- Kountouris P, Lederer CW, Fanis P, et al. IthaGenes: An interactive database for haemoglobin variations and epidemiology. *PLoS One.* 2014;9(7):e103020.
- Bennani C, Bouhass R, Perrin-Pecontal P, et al. Anthropological approach to the heterogeneity of β -thalassaemia mutations in northern Africa. *Hum Biol.* 1994;66(3):369–382.
- Pacheco P, Loureiro P, Faustino P, Lavinha J. Haplotypic heterogeneity of β -thalassaemia IVS I-1 (G→A) mutation in southern Portugal. *Br J Haematol.* 1996;94(4):767.
- Antonarakis SE, Kazazian HH, Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet.* 1985;69(1):1–14.
- Samara M, Chiotoglou I, Kalamaras A, et al. Large-scale population genetic analysis for hemoglobinopathies reveals different mutation spectra in central Greece compared to the rest of the country. *Am J Hematol.* 2007;82(7):634–636.
- Flatz G, Wilke K, Sygailo YV, et al. β -Thalassemia in the German population: Mediterranean, Asian and novel mutations. *Hum Mutat.* 1999;13(3):258.
- Aguilar Martinez P, Angastiniotis M, Eleftheriou A, et al. Haemoglobinopathies in Europe: Health & migration policy perspectives. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:97.

39. Thein SL. Molecular genetics of β thalassaemia. In: McArthur JR, Lee SH, Wong JEL, Ong YW, Eds. Education Programme of the 26th Congress of the International Society of Haematology, Singapore, August 25-29, 1996. Singapore: International Society of Haematology. 1996:236–240.
40. Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of β thalassaemia. *Br J Haematol*. 2004;124(3):264–274.
41. Sollaino MC, Paglietti ME, Perseu L, *et al*. Association of α globin gene quadruplication and heterozygous β thalassemia in patients with thalassemia intermedia. *Haematologica*. 2009;94(10):1445–1448.
42. Schwartz E, Goltsov AA, Kaboev OK, *et al*. A novel frameshift mutation causing β -thalassaemia in Azerbaijan. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(10):3997.
43. Solovyev GY, Goltsov AA, Surin VL, *et al*. Molecular nature of mutations causing β^0 -thalassaemia in Azerbaijan. *Biomed Sci*. 1990;1(3):300–304.
44. Çürük MA, Yüreğir GT, Asadov CD, *et al*. Molecular characterization of β -thalassemia in Azerbaijan. *Hum Genet*. 1992;90(4):417–419.
45. Fei Y-J, Stoming TA, Kutlar A, *et al*. One form of inclusion body β -thalassemia is due to a GAA→TAA mutation at codon 121 of the β chain. *Blood*. 1989;73(4):1075–1077.
46. Thein SL, Hesketh C, Taylor P, *et al*. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body β -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(10):3924–3928.
47. Yamamoto Ku, Yamamoto Ki, Hattori Y, *et al*. Two β -thalassemia mutations in Japan: Codon 121 (GAA→TAA) and IVS-I-130 (G→C). *Hemoglobin*. 1992;16(4):295–302.
48. Giordano PC, Harteveld CL, Michiels JJ, *et al*. Phenotype variability of the dominant β -thalassemia induced in four Dutch families by the rare cd121 (G→T) mutation. *Ann Hematol*. 1998;77(6):249–255.
49. Cao A, Galanello R. β -Thalassemia. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2010;12(2):61–76.
50. Rivella S. β -Thalassemias: Paradigmatic diseases for scientific discoveries and development of innovative therapies. *Haematologica*. 2015;100(4):418–430.
51. Divoky V, Svobodova M, Indrak K, *et al*. Hb Hradec Kralove (Hb HK) or $\alpha_2\beta_2115(\text{G17})\text{Ala}\rightarrow\text{Asp}$, a severely unstable hemoglobin variant resulting in a dominant β -thalassemia trait in a Czech family. *Hemoglobin*. 1993;17(4):319–328.
52. Popovich BW, Rosenblatt DS, Kendall AG, Nishioka Y. Molecular characterization of an atypical β -thalassemia caused by a large deletion in the 5' β -globin gene region. *Am J Hum Genet*. 1986;39(6):797–810.
53. Wayne JS, Eng B, Patterson M, *et al*. Novel β -thalassemia mutation in a β -thalassemia intermedia patient [poly A (AATAAA→GATAAA)]. *Hemoglobin*. 2001;25(1):103–105.
54. Thein SL. The molecular basis of β thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5):a011700.
55. Gallienne AE, Dreau HMP, Schuh A, *et al*. Ten novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults. *Haematologica*. 2012;97(3):340–343.
56. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*. 1989;32(1):66–69.
57. Pritchard CC, Tait JF, Buller-Burckle AM, Mikula M. Annotation error of a common β^0 -thalassemia mutation (619 bp-deletion) has implications for molecular diagnosis. *Am J Hematol*. 2010;85(12):978.

Supplementary material available online

Příloha č. 4: Lanikova et al, 2013

Lanikova L, Kucerova J, Indrak K, **Divoka M**, Issa JP, Papayannopoulou T, Prchal JT, Divoky V: β -Thalassemia Due to Intronic LINE-1 Insertion in the β -Globin Gene (HBB): Molecular Mechanisms Underlying Reduced Transcript Levels of the β -Globin_{L1} Allele. *Hum Mutat*. 2013 Oct;34(10):1361-5. IF 5,05.

β -Thalassemia Due to Intronic LINE-1 Insertion in the β -Globin Gene (*HBB*): Molecular Mechanisms Underlying Reduced Transcript Levels of the β -Globin_{L1} Allele

Lucie Lanikova,^{1,2} Jana Kucerova,^{1,3} Karel Indrak,³ Martina Divoka,³ Jean-Pierre Issa,⁴ Thalia Papayannopoulou,⁵ Josef T. Prchal,² and Vladimir Divoky^{1,3*}

¹Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic; ²Departments of Medicine, Pathology and Genetics, University of Utah and Medical Service, George E. Wahlen Department of Veterans Affairs Medical Center, Salt Lake City, Utah;

³Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry and University Hospital, Olomouc, Czech Republic; ⁴Fels Institute, Temple University School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania; ⁵Department of Medicine/Division of Hematology, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington

Communicated by Haig H. Kazazian

Received 15 April 2013; accepted revised manuscript 10 July 2013.

Published online 22 July 2013 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.22383

ABSTRACT: We describe the molecular etiology of β^+ -thalassemia that is caused by the insertion of the full-length transposable element LINE-1 (L1) into the intron-2 of the β -globin gene (*HBB*). The transcript level of the affected β -globin gene was severely reduced. The remaining transcripts consisted of full-length, correctly processed β -globin mRNA and a minute amount of three aberrantly spliced transcripts with a decreased half-life due to activation of the nonsense-mediated decay pathway. The lower steady-state amount of mRNA produced by the β -globin_{L1} allele also resulted from a reduced rate of transcription and decreased production of full-length β -globin primary transcripts. The promoter and enhancer sequences of the β -globin_{L1} allele were hypermethylated; however, treatment with a demethylating agent did not restore the impaired transcription. A histone deacetylase inhibitor partially reactivated the β -globin_{L1} transcription despite permanent β -globin_{L1} promoter CpG methylation. This result indicates that the decreased rate of transcription from the β -globin_{L1} allele is associated with an altered chromatin structure. Therefore, the molecular defect caused by intronic L1 insertion in the β -globin gene represents a novel etiology of β -thalassemia.

Hum Mutat 00:1–5, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: β -thalassemia; β -globin; *HBB*; LINE-1; epigenetic repression

We have previously reported that the insertion of a full-length LINE-1 (L1) element (GenBank accession: AF149422.1) in the antisense orientation into the 3'-end of intron-2 of the β -globin gene (*HBB*; MIM #141900; GenBank accession: NM_000518.4) causes β^+ -thalassemia in a mother and daughter of Ukrainian descent [Divoky et al., 1996]. The β -thalassemia trait in the proband and her mother was diagnosed in the laboratory of the late Dr. Huisman (Augusta, GA) [Indrak et al., 1992]. We have shown that this L1 element retained the capacity for high-frequency retrotransposition in cultured cells [Kimberland et al., 1999]. Here, we analyzed the molecular mechanisms that are responsible for the severe reduction in β -globin gene expression in the presence of the L1 insertion and cause the β^+ -thalassemia phenotype.

The β^+ -thalassemia nature of this mutation was investigated in the reticulocytes from the patient and in the interspecific hybrids created from the fusion of transformed lymphocytes of the proband with mouse erythroleukemia cells (MEL) containing either the affected or normal chromosome 11 [Papayannopoulou et al., 1986]. The cell line containing the mutant chromosome 11 from the proband was designated as "MEL *HBB*^{L1+}," and the control cell line with a normal chromosome 11 was designated as "MEL *HBB*^{wt}." Blood samples from the proband and her mother were obtained with the approval of the institutional review board committees of Palacky University in Olomouc and the Institute of Hematology and Blood Transfusion in Prague, Czech Republic. Informed consent was obtained as per the Declaration of Helsinki. The details of the experimental procedures and the sequences of the primers used for this study are found in the Supp. Methods and Supp. Tables.

The proband (25-year-old Caucasian female) had microcytic anemia (Hb 11.3 g/dL, red blood cells $5.5 \times 10^{12}/L$, mean corpuscular volume 63 fL, and mean corpuscular hemoglobin 20 pg) with a normal reticulocyte count. Her HbA₂ was increased to 5.3% and the HbF was just above 1%. No inclusion bodies of precipitated globin chains were detected in her erythroid cells after brilliant cresyl blue staining. Hematological indices of the patient's mother were comparable; neither patient had neurological or other systemic abnormalities. Southern blot and sequencing analyses revealed heterozygosity for the full-length retrotransposon (L1, i.e., L1 _{β -thal}) inserted in the antisense orientation into the 3'-end of intron-2 (β -IVS-II) of the β -globin gene (hereafter referred to as β -globin_{L1}; Supp. Fig. S1) deposited into the HBVar database (<http://www.lovd.nl/HBB>). The

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Vladimir Divoky, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Hnevotinska 3, CZ-77515 Olomouc, Czech Republic. E-mail: divoky@tunw.upol.cz

Contract grant sponsors: Czech Ministry of Health (NT/13587, NT/11208); EU (CZ.1.07/2.3.00/30.0041); and Palacky University (LF_2013_004, LF_2013_010).

insertion occurred at 98 bp 5'- to the 3'-end of β -IVS-II and was flanked by a 9–13-bp target site duplication [Divoky et al., 1996; Kimberland et al., 1999].

The β -globin transcripts from affected and unaffected β -globin alleles of the propositus were distinguishable by a silent codon 2 polymorphism [Antonarakis et al., 1985; Orkin et al., 1982]. This polymorphism allowed the quantification of the transcript amount and the determination of the β^+ -thalassemia phenotype (Fig. 1A). The propositus was a codon 2 CAT/CAC heterozygote, whereas the mother of the propositus, who also carried the L1 insertion, was a codon CAC homozygote. Thus, the L1-containing allele was derived from framework 1 [Antonarakis et al., 1985] with a codon 2 CAC sequence that creates a recognition site for the BsiHKAI enzyme.

To assess whether the β^+ -thalassemia is due to abnormal splicing of the β -globin message, reticulocyte and MEL HBB^{L1+} mRNAs were analyzed by RT-PCR using several primers. Sequencing of the RT-PCR products revealed both correctly processed transcripts as well as three rare messages with unusual sequences produced by the β -globin_{L1} allele (Fig. 1B). All of the aberrantly spliced β -globin transcripts contained a premature translation termination codon, which makes them susceptible to nonsense-mediated mRNA decay (NMD). To determine whether the NMD pathway degrades the β -globin_{L1} mRNA and thus is responsible for the reduction in the steady-state mRNA level produced by the mutant allele, we cultivated the induced MEL hybrids cells overnight with the NMD inhibitor emetine [Yang et al., 2007]. Quantitative real-time PCR (qPCR) showed a 2.4-fold increase ($P < 0.05$ vs. control) in the accumulation of transcripts from the β -globin_{L1} allele in the presence of emetine (Fig. 1C), whereas no increase in the amount of wild-type β -globin_{L1} transcripts was observed under the same conditions. To further confirm that the low stability of the β -globin_{L1} transcripts was due to NMD, transcription in the MEL HBB^{L1+} and MEL HBB^{wt} hybrids was blocked with actinomycin D in the presence and absence of emetine. Indeed, the decreased stability of the β -globin_{L1} mRNA was mainly due to NMD. The half-life of the β -globin_{L1} mRNA was restored almost to normal when emetine was used (Supp. Fig. S2).

In addition to a decrease in RNA stability, a decreased rate of transcription could be responsible for the reduced amount of β -globin_{L1} mRNA. This possibility was examined using a nuclear run-on assay [Yang et al., 2007]. The increase in the β -globin nuclear fraction primary transcript level during 40 min of *in vitro* transcription in the presence or absence of ribonucleotide triphosphates (rNTPs, see Supp. Methods for experimental details) was measured. The data showed that the β -globin_{L1} allele has a transcription rate that is reduced 4.7-fold versus the wild type (Fig. 1D).

Previous studies have demonstrated that L1 insertions disrupt the formation of the full-length transcript of the target gene by producing prematurely polyadenylated mRNA. These truncated transcripts form because of the use of the L1 polyadenylation signal(s). Additionally, the release of RNAPol-II from the L1 sequence causes inefficient elongation [Han et al., 2004]. We measured the relative amount of the β -globin_{L1} primary transcript using qPCR with primers flanking the insertion (Fig. 1E). The nuclear fraction RNA was collected from MEL HBB^{wt} and MEL HBB^{L1+} hybrids, and the relative amount of wild-type and β -globin_{L1} primary transcripts was measured at exon-2 and exon-3 and expressed as the exon-3/exon-2 ratio normalized to the control as described [Pfaffl, 2001] (see Supp. Methods). The ratio was 0.805, which suggests that 19.5% of the MEL HBB^{L1+} primary transcript is not extended beyond the L1 insertion. The truncated transcripts could result from either premature polyadenylation or incomplete elongation.

Retrotransposons are considered to be epigenetic mediators of gene expression in mammalian cells [Whitelaw and Martin, 2001].

We examined whether the decreased rate of β -globin_{L1} allele transcription is associated with the β -globin_{L1} promoter and 3'-enhancer methylation that could be reversed by a demethylating agent. The locations of the CpG dinucleotides (CpGs) within the β -globin_{L1} promoter and enhancer and also within the L1 promoter are depicted in Figure 2A. The results from bisulfite sequencing (Fig. 2B) show that the β -globin_{L1} promoter sequence was hypermethylated (65% Me-CpG vs. 35% Me-CpG in the control MEL HBB^{wt} cell line). The 3'-enhancer sequence was fully methylated in comparison with the control sequences. Treatment of the induced hybrid MEL cells with decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine, DAC, 2 μ M) for 24 hr did not change the methylation status of the β -globin_{L1} promoter, nor did it lead to an increase in expression of β -globin_{L1} mRNA (Fig. 2B and C). Different treatment conditions (treatment time 48 hr or 5 μ M DAC) gave similar results. Expression of the γ -globin gene, which was used as a treatment control, was increased after DAC exposure as expected [Mabaera et al., 2008] (Fig. 2C). The partial demethylation of the β -globin_{L1} erythroid-specific 3'-enhancer sequence [Boehringer et al., 1987] (Fig. 2B) suggested that insensitivity to DAC under these assay conditions was a feature of the β -globin_{L1} and L1 promoters. Even the more stringent DAC-treatment conditions [Qin et al., 2009] did not reactivate β -globin_{L1} expression (data not shown).

The histone deacetylation of the surrounding chromatin was implicated in the inactivation of L1 host genes [Garcia-Perez et al., 2010]. To test whether transcriptional silencing of the β -globin_{L1} allele is related to repressive chromatin modifications such as deacetylation, we treated induced MEL HBB^{L1+} cells with trichostatin A (TSA), a histone-deacetylase (HDAC) inhibitor (Fig. 2D). The TSA-induced reactivation of developmentally silenced γ -globin expression in the somatic cell hybrids was previously documented [Swank et al., 2003], and therefore, it was used as an internal treatment control (Fig. 2E). Although exposure of the induced MEL HBB^{L1+} cells to TSA (alone or in combination with DAC) did not change the densely methylated profile of the β -globin_{L1} promoter sequence (Fig. 2D), this treatment partially restored β -globin_{L1} expression (Fig. 2E). This result suggests that histone deacetylation is (in part) responsible for the β -globin_{L1} silencing that could be relieved by TSA.

L1 β -thal displays characteristics of an active retrotransposon [Kimberland et al., 1999]. Therefore, it is possible that transcripts originating from the L1 β -thal promoter could interfere with the β -globin gene that is transcribed in the opposite orientation to this L1 [Whitelaw and Martin, 2001]. The ϵ -globin gene silencing by a transcribed Alu element provides precedence for *in cis* transcriptional interference by neighboring transcripts from the antisense strand in globin gene regulation [Wu et al., 1990]. Thus, we assayed for the presence of L1 β -thal-specific transcripts in patient mRNA that was isolated from harvested BFU-E colonies and in mRNA from the interspecific hybrids (see Supp. Methods and Supp. Tables for details). No L1 β -thal-specific transcripts could be detected in the BFU-Es from the patients. Several L1 transcripts were detected in the induced MEL HBB^{L1+} cells; however, their sequence analyses revealed other than L1 β -thal origin (data not shown). Correspondingly, bisulfite sequencing revealed a highly methylated pattern along the L1 β -thal promoter region (Fig. 2B and D), suggesting that the absence of endogenous L1 transcripts is a consequence of the L1 β -thal promoter hypermethylation. We also investigated whether the L1 β -thal insertion splits the HBB gene's transcript, that is, the "gene-breaking" model [Wheeler et al., 2005]. We identified neither upstream HBB -specific transcripts that terminate in the major antisense polyadenylation signal [Han et al., 2004] nor evidence for L1 antisense promoter-derived HBB -specific transcripts (see Supp. Methods and Supp. Tables for details).

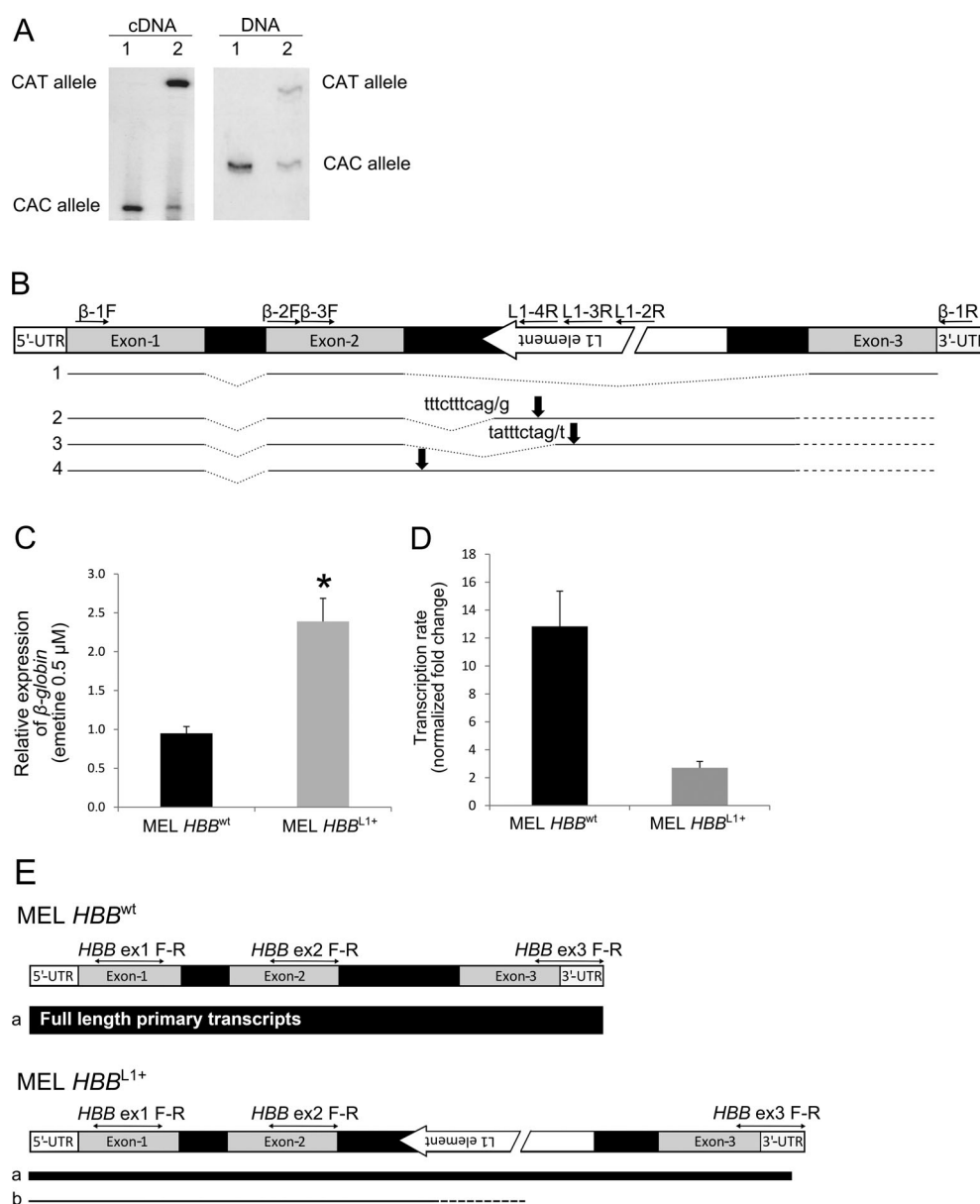


Figure 1. Analyses of transcription from the β -globin_{L1} allele. **A:** Total reticulocyte RNA of the proband (lane 2, codon 2 CAT/CAC polymorphism heterozygous) and the wild-type control (lane 1, codon 2 CAC homozygous) was subjected to RT-PCR, which amplified exons 1 and 2 of all existing mature β -globin transcripts. Aliquots of the labeled PCR products were digested with the *Bsi*HKAI enzyme, which cuts the CAC allele. The ratio of digested to undigested cDNA was 10%–15% to 90%–85% instead of the expected heterozygous ratio of 50% to 50%. Concurrent experiments performed with genomic DNA served as a control for digestion and quantification of PCR products. **B:** The structure of the β -globin_{L1} gene is depicted at the top. Gray rectangles represent the β -globin exons, black rectangles indicate the β -globin introns, and the β -IVS-II is divided by L1 insertion (white rectangle not drawn to scale). The correctly spliced β -globin message (1) and three abnormally spliced β -globin_{L1} transcripts (2–4) were detected by RT-PCR using three forward (β -1F, β -2F, and β -3F) and four reverse (β -1R, L1-2R, L1-3R, L1-4R) primers (primers are listed in Supp. Table S1, locations are delineated as arrows at the top). The solid lines indicate transcript sequences, the dotted lines are sequences eliminated by splicing, and the dashed lines represent portions of transcripts that were not sequenced. One splicing variant resulted from activation of a cryptic acceptor site within β -IVS-II (ttttttcag/g), and the second variant resulted from activation of a cryptic acceptor site within the L1 sequence (tattttcag/g). The third aberrantly processed β -globin transcript displayed retention of the globin intron including the inserted L1 sequence. The arrows (♦) denote stop codons in the aberrant β -globin reading frame. **C:** MEL HBB^{L1+} and MEL HBB^{wt} hybrids were treated with an NMD inhibitor emetine (0.5 μ M). The qPCR quantification showed no increase in wild-type β -globin mRNA in the MEL HBB^{wt} cell line versus a 2.4-fold increase (*, $P < 0.05$ vs. control) in β -globin_{L1} mRNA in MEL HBB^{L1+} cells. Data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. **D:** A PCR-based nuclear run-on assay revealed a 4.7-fold decrease in the β -globin_{L1} allele transcription rate compared with the wild-type β -globin allele. To include all transcript variants originating at the β -globin_{L1} promoter, exon-1 primers were used for quantification. The rate of transcription is displayed as the fold increase of primary β -globin/ β -globin_{L1} transcript over its basal level (not containing rNTPs) after 40 min of in vitro transcription. Data are the mean $\pm$ SD of two independent experiments. **E:** Schematic representation of the primary transcripts of the β -globin and β -globin_{L1} alleles (full-length [a, solid line] and truncated [b, partially dotted line]). The thickness of the lines represents the overall relative amount of the produced primary transcript. According to the PCR-based nuclear run-on assay, the wild-type allele creates 4.7-fold more primary transcript than the mutant β -globin_{L1} allele. Additionally, the nuclear RNA was evaluated by β -globin exon-2 and exon-3 quantification. The results indicated that a portion of the primary β -globin_{L1} transcripts (19.5%) do not contain the sequences downstream of the L1 insertion. The details of the experimental procedures are described in the Supp. Methods.

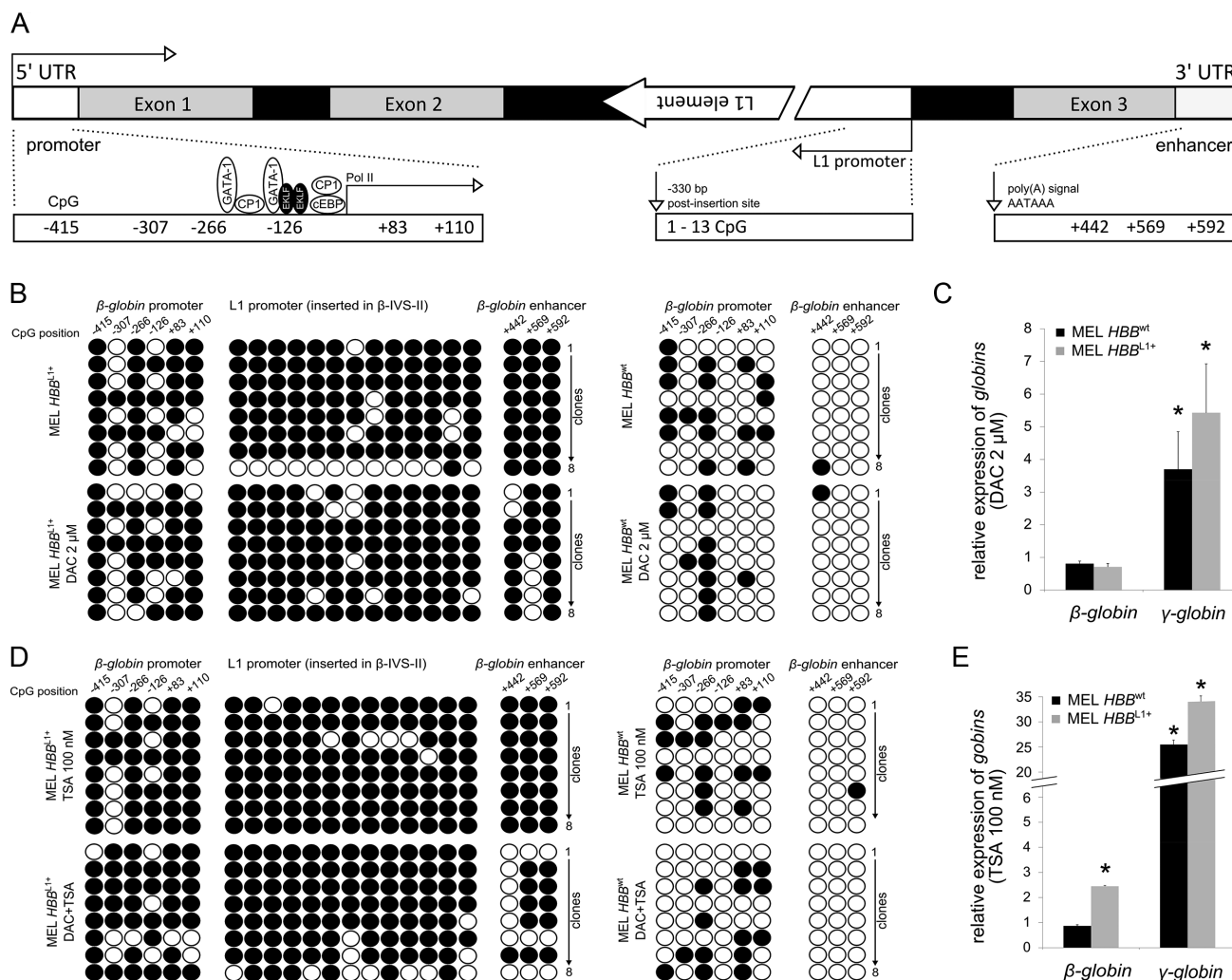


Figure 2. Analysis of epigenetic silencing of the β -globin_{L1} allele. **A:** Diagram of the human β -globin gene promoter and enhancer regions showing the locations of binding sites for transcription factors, poly(A) signal, and CpG dinucleotides [adapted from Mabaera et al., 2007]. The position of the CpGs within the L1 promoter is also shown. **B:** Genomic DNA from MEL hybrid cells was isolated and bisulfite treated to determine the methylation status of the six CpGs between -415 and +110 bp (bases downstream and upstream of the transcription start site) on the promoter region, 13 CpGs on the promoter of the inserted L1 and three CpGs between +442 and +592 bp on the enhancer region (bases upstream of the poly(A) signal) of the mutated and normal β -globin alleles (plotted horizontally). Treatment of DMSO-induced MEL HBB^{L1+} cells with a demethylating agent (DAC, 2 μ M) did not change the methylation profile of the β -globin_{L1} gene and the L1 promoters but did decrease the methylation of the enhancer. ● represents methylated sequence, ○ represents unmethylated sequence. **C:** Consequently, DAC treatment did not increase the expression of β -globin_{L1} mRNA, whereas the expression of the γ -globin gene (*HBB1*; MIM #142200, GenBank: NM_000559.2) was increased. Data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments (*, $P < 0.05$ vs. untreated cells). For the effect of DAC and TSA treatment expressed as the γ - to β -globin mRNA ratio [Swank et al., 2003], see Supp. Figure S3. **D:** Treatment of induced hybrid MEL HBB^{L1+} cells with the HDAC inhibitor TSA (100 nM) alone and in combination with the demethylating agent (DAC, 2 μ M) did not change the hypermethylation profile of the β -globin_{L1} promoter. However, the combined treatment partially reversed the methylation of the β -globin_{L1} enhancer. ● represents methylated sequence, ○ represents unmethylated sequence. **E:** Despite the permanent methylation pattern of the β -globin_{L1} promoter, TSA partially reactivated expression from the mutant β -globin_{L1} gene (see also Supp. Fig. S3) indicating that silencing is mediated by histone deacetylation. The data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments (*, $P < 0.05$ vs. untreated cells). The details of the experimental procedures are described in the Supp. Methods.

In conclusion, we report a combination of molecular events leading to β^+ -thalassemia caused by an intronic L1 insertion in the β -globin gene. In addition to the known effects of the intronic L1 sequence on mRNA processing [reviewed by Hancks and Kazazian, 2012], our data reveal that transcriptional repression of the host gene is due to regional spreading of methylation that affects both the 5'-promoter and the 3'-enhancer. Our attempts to reactivate the silenced β -globin_{L1} expression revealed that the HDAC inhibitor TSA, but not the demethylating agent DAC, leads to a partial restoration of host gene transcription. This result indicates that the decreased rate of transcription from β -globin_{L1} is associated with altered chromatin

that is likely caused by the spreading of repressive marks induced by L1 to the neighboring β -globin_{L1} gene promoter [Garcia-Perez et al., 2010; Montoya-Durango et al., 2009]. These results have therapeutic implications for diseases caused by the deleterious effects of retrotransposons.

Acknowledgments

We are indebted to the late Prof. T.H.J. Huisman (MCG, Augusta, GA) in whose laboratory this study was initiated. We thank V. Brabec and J. Cermak (Prague, Czech Republic) for providing clinical data and J. Jelinek (Temple

University, Philadelphia, PA) for preliminary analyses. We also thank the members of the V. Divoky lab and M. Mrug (UAB, Birmingham, AL) for valuable discussions.

Disclosure Statement: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Antonarakis SE, Kazazian HH Jr, Orkin SH. 1985. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* 69:1–14.
- Boehringer RR, Hammer RE, Brinster RL, Palmiter RD, Townes TM. 1987. Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human β -globin genes in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7056–7060.
- Divoky V, Indrak K, Mrug M, Brabec V, Huisman THJ, Prchal JT. 1996. A novel mechanism of β -thalassemia. The insertion of L1 retrotransposable element into β globin IVSII. *Blood* 88:148a (abstract).
- Garcia-Perez JL, Morell M, Scheys JO, Kulpa DA, Carter CC, Hammer GD, Collins KL, O'Shea KS, Menendez P, Moran JV. 2010. Epigenetic silencing of engineered L1 retrotransposition events in human embryonic carcinoma cells. *Nature* 466:769–773.
- Han JS, Szak ST, Boeke JD. 2004. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 429:268–274.
- Hancks DC, Kazazian HH Jr. 2012. Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev* 22:191–203.
- Indrak K, Brabec V, Indrakova J, Chrobak L, Sakalova A, Jarosova M, Cermak J, Fei YJ, Kutlar F, Gu YC, Baysal E, Huisman THJ, et al. 1992. Molecular characterization of β -thalassemia in Czechoslovakia. *Hum Genet* 88:399–404.
- Kimberland ML, Divoky V, Prchal JT, Schwahn U, Berger W, Kazazian HH Jr. 1999. Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet* 8:1557–1560.
- Mabaera R, Greene MR, Richardson CA, Conine SJ, Kozul CD, Lowrey CH. 2008. Neither DNA hypomethylation nor changes in the kinetics of erythroid differentiation explain 5-azacytidine's ability to induce human fetal hemoglobin. *Blood* 111:411–420.
- Mabaera R, Richardson CA, Johnson K, Hsu M, Fiering S, Lowrey CH. 2007. Developmental- and differentiation-specific patterns of human gamma- and beta-globin promoter DNA methylation. *Blood* 110:1343–1352.
- Montoya-Durango DE, Liu Y, Teneng I, Kalbfleisch T, Lacy ME, Steffen MC, Ramos KS. 2009. Epigenetic control of mammalian LINE-1 retrotransposon by retinoblastoma proteins. *Mutat Res* 665:20–28.
- Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJ. 1982. Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature* 296:627–631.
- Papayannopoulou T, Brice M, Stamatoyannopoulos G. 1986. Analysis of human hemoglobin switching in MEL x human fetal erythroid cell hybrids. *Cell* 46:469–476.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Qin T, Jelinek J, Si J, Shu J, Issa JP. 2009. Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood* 113:659–667.
- Swank RA, Skarpidi E, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. 2003. The histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, reactivates the developmentally silenced gamma globin expression in somatic cell hybrids and induces gamma gene expression in adult BFUe cultures. *Blood Cells Mol Dis* 30:254–257.
- Wheeler SJ, Aizawa Y, Han JS, Boeke JD. 2005. Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution. *Genome Res* 15:1073–1078.
- Whitelaw E, Martin DI. 2001. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet* 27:361–365.
- Wu J, Grindlay GJ, Bushel P, Mendelsohn L, Allan M. 1990. Negative regulation of the human epsilon-globin gene by transcriptional interference: role of an Alu repetitive element. *Mol Cell Biol* 10:1209–1216.
- Yang C, Feng J, Song W, Wang J, Tsai B, Zhang Y, Scaringe WA, Hill KA, Margaritis P, High KA, Sommer SS. 2007. A mouse model for nonsense mutation bypass therapy shows a dramatic multiday response to geneticin. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15394–15399.

SUPP. METHODS

Databases

The mutation has been deposited in the LOVD database and HBvar database:

LOVD: http://lovd.bx.psu.edu/variants.php?select_db=HBB&action=view&view=0002122%2C0001811%2C0

HBvar: http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display_format=page&i=2892

Diagnosis of β -thalassemia

The HbA₂ levels were measured by cation exchange high-performance liquid chromatography (HPLC) and the HbF levels by alkali denaturation and HPLC (Kutlar, et al., 1991). Analysis of the β -globin genes of the patient revealed no obvious mutation except that they were heterozygous for an unexpected rearrangement that was detected by gene mapping (not shown).

RNA quantification by primer extension of RT-PCR products

Total reticulocyte RNA from the proband and the control was subjected to RT-PCR with primers β -F and β -Ex2-R (Supp. Table S1). After 19 cycles of PCR, the amplified products were labeled with one cycle of primer extension using a [γ -³²P] ATP end-labeled primer β -Ex2-R (95°C, 2 min; 58°C, 2 min; 72°C, 8 min). Aliquots of the PCR products were then digested for 2 h at 65°C with *Bsi*HKAI (New England Biolabs, Beverly, MA), analyzed on an 8% non-denaturing polyacrylamide gel, and visualized by autoradiography. The intensities of the bands were quantified using a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Preparation of human/mouse cell hybrids

Interspecific hybrids of Epstein Barr Virus (EBV) transformed lymphocytes from the proband and mouse erythroleukemia (MEL) cells were generated. The fusions were done in the presence of polyethylene glycol (PEG, 1500, 50 % w/v) as previously described (Papayannopoulou, et al, 1996). After a period of two to three weeks, clonal outgrowths were evident in many of the wells. Hybrid cells from the clonal outgrowths that contained human chromosome 11 were selected based on reactivity to antibody 53/6, which recognizes an antigen encoded by chromosome 11 (Yagi, et al., 1987). Two lines were derived from the positive cell clones: one containing the affected chromosome 11 (designated “MEL *HBB*^{L1+}”) and one with the normal chromosome 11 (designated “MEL *HBB*^{wt}”). The hybrids were expanded and cultured in IMDM

supplemented with 10% bovine calf serum (Invitrogen, Life Technologies, NY) in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ and were induced to differentiate by adding 1.8% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 72 h.

The hybrid human/mouse cells were treated under various conditions for different experiments as follows: for 24 h with emetine (0.5 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) inhibition; for various times (1 - 12 h) with actinomycin D (Act-D, 1 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to block mRNA synthesis; and for 24 h simultaneously with DMSO or for 24 h and 48 h before the induction of differentiation by DMSO with 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC, 2 µM or 5 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and/or trichostatin A (TSA, 100 nM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to test the DNA methylation pattern/reactivation of silenced gene expression.

Subcloning and sequencing of alternatively spliced transcripts

RNA was isolated from the reticulocytes from the propositus and from the *in vitro* cultured human/mouse cell hybrids. The *β-globin* transcripts were analyzed by RT-PCR and sequencing of the subcloned PCR products. The primer pairs used to amplify and sequence the transcripts were: β-1F and β-1R, for first round PCR; β-2F with L1-4R, β-3F with L1-4R, β-2F with L1-2R and β-3F with L1-3R for nested PCR. The sequences of the PCR primers are listed in Supp. Table S1.

Human *β-globin* transcript quantification by real-time qPCR

Total RNA from the MEL *HBB*^{L1+} and MEL *HBB*^{wt} cell lines was isolated with TRI reagent (Roche Applied Science) followed by TURBO DNA-free DNase I treatment (Ambion, Life Technologies, NY). For quantification of the human *β-globin* mRNA by qPCR, RNA was reverse-transcribed using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science). cDNA was quantified on a Light Cycler 480 (Roche Applied Science). For quantification of the aberrantly spliced variants and the NMD activation assay, exon-3 primers (*HBB* ex3 F and R) and UPL (Universal Probe Library, Roche Applied Science) probe #56 were used. For the mRNA stability assay and the effect of AZA and/or TSA treatment, exon-2 primers (*HBB* ex2 F and R) were used for *β-globin* mRNA and primers *HBB* F and R for *γ-globin* mRNA quantification. The levels of the human *β-globin* and *γ-globin* transcripts were normalized to

human *LDHA* (MIM# 150000; GenBank accession: NM_005566.3) (primers *LDHA* F and R and UPL probe #47) using an efficiency corrected formula for the relative expression ratio (Pfaffl, et al., 2001). The sequences of the primers and the reaction conditions are listed in Supp. Tables S1 and S2.

PCR-based Nuclear Run-On Assay

Nuclei from the hybrid MEL *HBB*^{L1+} and MEL *HBB*^{wt} cells were isolated with the Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), according to the manufacturer's protocol. The total nuclei were split into two equal aliquots and 2x reaction buffer was added (containing 30 mM Tris, pH 8; 2.5 mM MgCl₂; 150 mM KCl; 20% glycerol; 1 mM DTT and 40 U RNasin; Promega, Madison, WI), and the reaction was performed, as previously described (Yang, et al., 2007). The *in vitro* transcription reaction was initiated by the addition of 0.5 mM of each ribonucleotide triphosphate (rATP, rCTP, rGTP, rUTP) (rNTP) (Invitrogen, Life Technologies, NY) and incubated for 40 min at 30°C. The second aliquot, which did not contain rNTPs, was incubated under the same conditions. The rate of transcription (normalized fold increase) was determined as the ratio of the nuclear fraction primary *β-globin* transcript measured in exon-1 (primers *HBB* ex1 F and R) with added rNTPs to the same fraction at basal level (without added rNTPs) after 40 min of *in vitro* transcription. *LDHA* was used as a reference gene for quantification. The sequences of primers are listed in Supp. Table S1.

Relative ratio of exon-3 to exon-2 of the human *β-globin* primary transcript

The *HBB* exon-3/exon-2 ratio of MEL *HBB*^{L1+} native primary transcript from the nuclear fraction that was prepared as mentioned above was normalized to the exon-3/exon-2 ratio of the control MEL *HBB*^{wt} native primary nuclear transcript using formula $2^{\Delta\Delta Ct}$. The method for calculating $\Delta\Delta Ct$ was similar to the method used for the relative quantification and is as follows: $(Ct_{MEL\ HBB^{L1+}\ ex2} - Ct_{MEL\ HBB^{wt}\ ex2}) - (Ct_{MEL\ HBB^{L1+}\ ex3} - Ct_{MEL\ HBB^{wt}\ ex3})$. Exon-2 primers *HBB* ex 2 F and R, exon-3 primers *HBB* ex 3 F and R, and exon-3 UPL probe #56 were used for the determination of this ratio. The efficiency of both amplicons was measured using a dilution series standard curve and was very close to 2. The sequences of PCR primers are listed in Supp. Table S1.

DNA methylation analysis

Bisulfite modification was performed on the genomic DNA from MEL *HBB*^{L1+} and MEL *HBB*^{wt} hybrids cells using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA). The promoter and enhancer regions of the *β-globin* gene and the L1_{β-thal} promoter were amplified using semi-nested PCR. The *β-globin* promoter primers were published elsewhere (Mabaera, et al., 2007); the enhancer region was amplified with *HBB*enh bis F and R primers for the first round, and then *HBB*enh bis F2 and R were used for semi-nested PCR. The L1 promoter was amplified with L1 meth F and R primers for the first round, followed by primers L1 meth F2 and R for the semi-nested round. The purified products were subcloned, and at least 8 positive clones for each region were sequenced. In the case of the *β-globin*_{L1} promoter and 3' enhancer, 10 to 20 clones were sequenced. The sequences of the PCR primers are listed in Supp. Table S1.

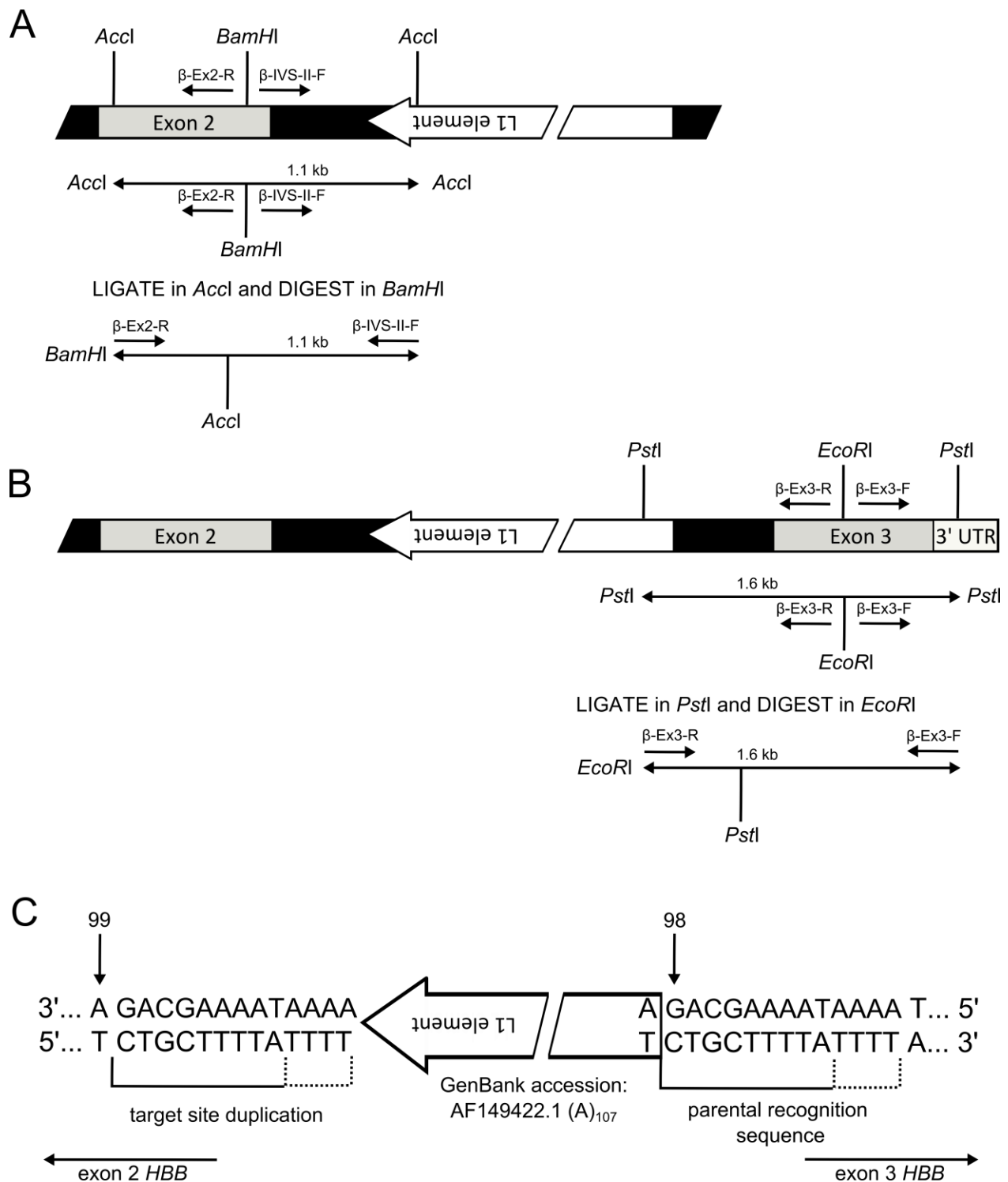
L1-specific RT-PCR and sequencing

In vitro cultures of BFU-E colonies were performed as described (Horvathova, et al., 2012). Total RNA from reticulocytes and from harvested BFU-Es was treated twice with DNase I (10 U/1 µg of RNA) at 37°C for 1 hour and then re-extracted using phenol-chloroform and precipitated with ethanol. Overall, 5 pmols of the L1-specific primer were annealed (in 45°C for 30 min) to 1 µg of total RNA (isolated from reticulocytes and from BFU-E colonies) in 1x hybridization buffer (1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA; 0.2% SDS) and were extended with reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, Life Technologies, NY) according to manufacturer's instructions. This cDNA template was amplified by semi-nested PCR using the same antisense primer as for reverse transcription and two sense primers (L1 F 1 for the first round and L1 F 2 for the second round). DNA sequencing was performed in both directions. The sequences of the primers are listed in Supp. Table S1.

Gene-breaking RT-PCR and sequencing

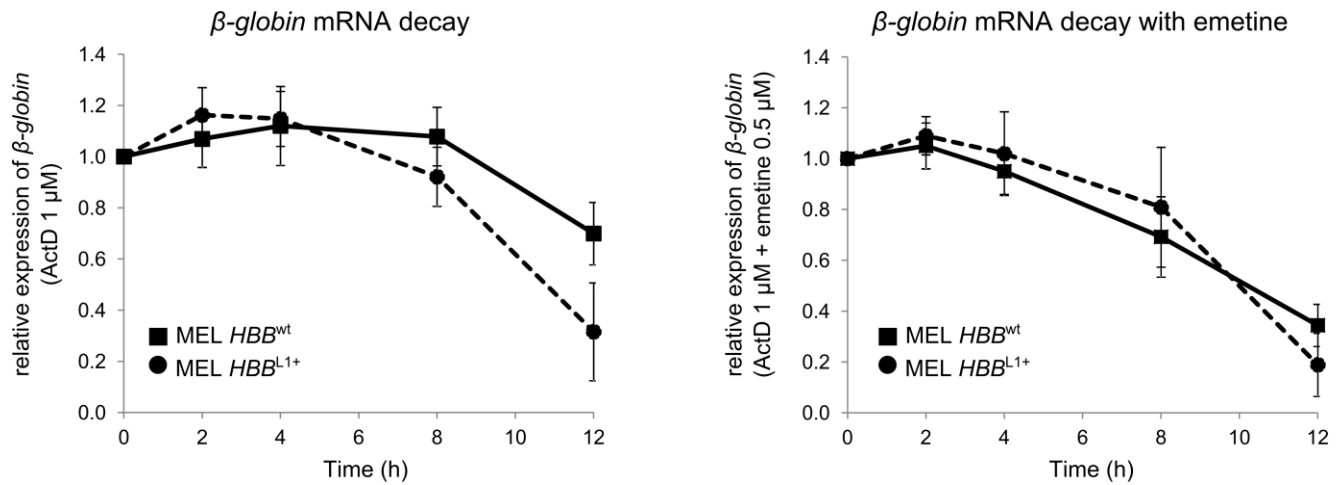
Total RNA from MEL *HBB*^{L1+} and MEL *HBB*^{wt} cell lines was isolated with TRI reagent followed by TURBO DNA-free DNase I treatment. Transcripts terminating in L1 major antisense polyadenylation site were searched by using 0.12 µM L1-polyT chimera primer and reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, Life Technologies, NY) (Wheelan, et al., 2005);

the cDNA synthesis was performed with 3 µg total RNA. 10 µL of the cDNA synthesis solution was used for PCR amplification with HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, QIAGEN Valencia, CA) and 0.5 µM primers for the first round: NRO B1 F and MAPS L1 R and second round: NRO B2 F and MAPS L1 R. In searching for transcripts starting in the L1 antisense promoter GeneRacer™ Oligo dT primer was used (GeneRacer™ Kit, Invitrogen, Life Technologies, NY) and ASP L1 F primer (Mätlik, et al., 2006) for the first round, and ASP L1 F and HBB ex3 R primers for the second round. The PCR products (major bands) were purified on agarose gels, cloned by using a TOPO TA Cloning (GeneRacer™ Kit, Invitrogen, Life Technologies, NY) and sequenced. The sequences of the primers are listed in Supp. Table S1.

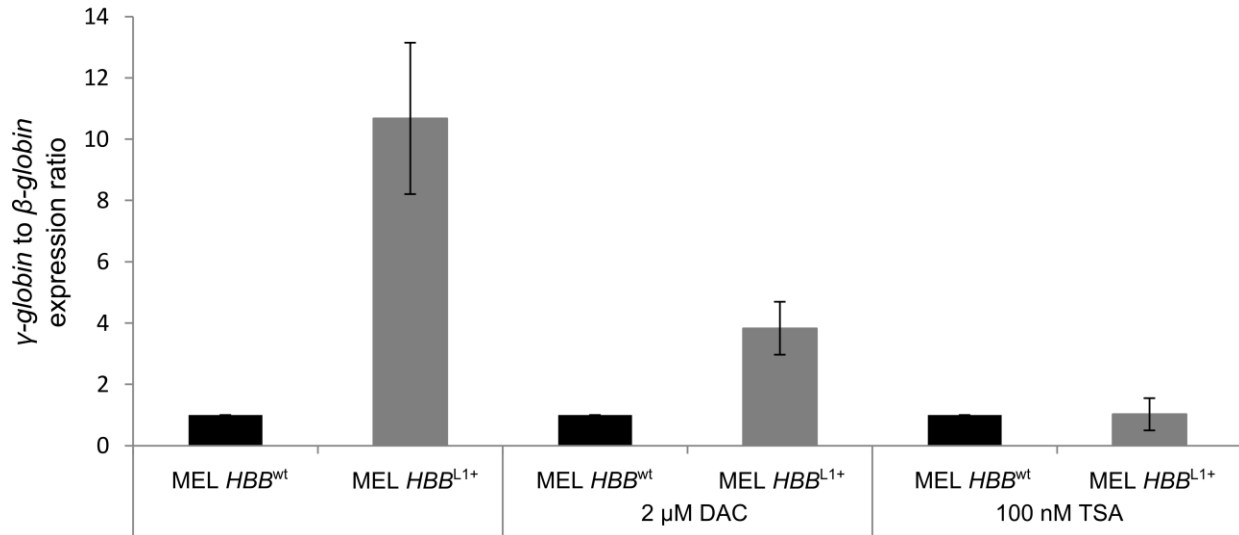


Supp. Figure S1. Schematic diagram of the L1 $_{\beta$ thal insertion and β -globin gene breakpoints. (A and B) The inverse PCR strategy used to clone the 5' and 3' breakpoints. (A) An AccI genomic fragment (1.1 kb) containing the 5' junction of the β -globin IVS-II with the insertion sequence was self-ligated in the AccI site and then linearized in the BamHI site. Primers β -Ex2-R and β -

IVS-II-F were used to amplify the junction sequence. (B) A *Pst*I genomic fragment (1.6 kb) containing the 3' junction of the insertion with *β -globin* IVS-II sequence was ligated in the *Pst*I site and then linearized in the *Eco*RI site. Primers β -Ex3-F and β -Ex3-R were used to amplify the linear fragments containing the junction. (C) Sequence of the breakpoints. The insertion occurred at 98 bp 5' to the 3' end of *β -IVS-II*. The arrows above the nucleotide sequence show the residues at positions 98 and 99 bp 5' to the 3' end of *β -globin* IVS-II. The L1 insertion was flanked by a 9-13 bp target site duplication (the run of four As, shown by the hatched bracket, could be duplicated or could be a part of the L1-poly(A) tail) (Kimberland, et al., 1999). The L1-poly(A) tail length is 107(A); the GenBank sequence database (accession AF149422.1) shows only 27(A).



Supp. Figure S2. The half-life of *β-globin* and *β-globin_{L1}* mRNA was determined after blockage of transcription for various times (1 – 12 h) with actinomycin D (ActD, 1 μM) in induced hybrid MEL cells. The half-life was calculated (Dölken, et al., 2008) from the relative amount of transcript present at each time point during ActD treatment. The half-life of the wild type *β-globin* mRNA in the control MEL *HBB*^{wt} hybrid cell line was ~11.71 h. The half-life of total mRNA from *β-globin_{L1}* allele, measured in MEL *HBB*^{L1+} cells, was only ~4.31 h. To test whether the low stability of *β-globin_{L1}* transcripts is solely a consequence of NMD, we also measured the mRNA half-life in the presence of emetine (0.5 μM). The stability of the *β-globin_{L1}* mRNA was restored almost to normal levels when emetine was used. The data are the mean ± SD of three independent experiments.



Supp. Figure S3. The ratio of γ - to β -globin mRNA in hybrid MEL cells treated with DAC (2 μ M) and TSA (100 nM) at day 3 of 1.8% DMSO-induced differentiation. The γ/β -globin transcript ratio of MEL HBB^{L1+} cells was normalized to the γ/β -globin transcript ratio of control cells MEL HBB^{wt} using the formula $2^{\Delta\Delta Ct}$ where $\Delta\Delta Ct$ was calculated as: $(Ct_{\gamma} - Ct_{\beta})_{MEL\ HBB^{wt}} - (Ct_{\gamma} - Ct_{\beta})_{MEL\ HBB^{L1+}}$. Data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. The increased γ/β -globin mRNA ratio in DMSO-induced and DAC-treated MEL HBB^{L1+} cells is consistent with the activation of γ -globin in the presence of persistent suppression of β -globin expression due to the L1 insertion. TSA treatment resulted in an equal γ/β -globin transcript ratio in MEL HBB^{wt} and MEL HBB^{L1+} cells.

Supp. Table S1. List of Primers Used

Primer name	Sequence
β -1F	5'TGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
β -1R	5'CAGAATCCAGATGCTCAAGG
β -2F	5'GTGGTCTACCCTTGGACCC
β -3F	5'CTTTGGGGATCTGTCCACT
L1-2R	5'TTCCCTATTTAATAAATGGT
L1-3R	5'AATATCCAGAATCTACAATGAA
L1-4R	5'CCAAATGTCCAACAATGATAGTCTGGA
β -F	5'CATTGTGTTCTGACACAAC
β -Ex2-R	5'CCATAACAGCATCAGGAGTG
β -Ex3-F	5' TGCAGGCTGCCTATCAGAAA
β -Ex3-R	5' GCACACAGACCAGCACGTTG
β -IVS-II-F	5' GTGGAAGTCTCAGGATCGTT
HBB ex1 F	5' TGAGGAGAAGTCTGCCGTT
HBB ex1 R	5' GGGCCTCACCACCAACTT
HBB ex2 F	5' CAAGGGCACCTTTGCCACA
HBB ex2 R	5' CCTGAAGTTCTCAGGATCCACG
HBB ex3 F	5' ACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCT
HBB ex3 R	5' TAGTTGGACTTAGGGAACAAAGG
HBB F	5' GGCAACCTGTCCTCTGCCTC
HBB R	5' GAAATGGATTGCCAAAACGG
LDHA F	5' CTGTCATGGGTGGGTCCTT
LDHA R	5' GCAACATTCATTCCACTCCA
HBBenh bis F	5'TTTGATTTTATTTAGTTTTTTTGTGTTAGAG
HBBenh bis R	5' CCAACAAACCTCTAATCTCTTCCTA
HBBenh bis F2	5' TTTTAGTTGTTTTTATGAATGTTTTT
L1 meth F	5' TTGAGTTAGGTGTGGGATATAGTTT
L1 meth F2	5'GTTTTTTTAGGTGAGGTAATGTTT
L1 meth R	5' ATATAAACATAATTAACAAAAAACCTAAC
L1-specific primer	5'TCAGTTTTAGGGTACATGTGC
L1 F 1	5'TGCTCATCATCACTGGCCAT
L1 F 2	5'AGTCAGGAAACAACAGGTGC
L1-polyT chimera primer	5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGACA
NRO B1 F	5' ACGTGGATGAAGTTGGTGGT
MAPS L1 R	5' TGTGCACATGTACCCTAAAACCTG
NRO B2 F	5' GCACGTGGATCCTGAGAAC
ASP L1 F	5' CTGCTGTGCTAGCAATCAGC

Supp. Table S2. Real-time PCR Conditions

Gene	<i>LDHA</i>	<i>HBB</i> ex1	<i>HBB</i> ex2	<i>HBB</i> ex3
Assay type	Taqman	SYBR	SYBR	Taqman
Denaturation	95 °C – 5 min	95 °C – 5 min	95 °C – 5 min	95 °C – 5 min
Cycles	45	45	45	45
Denaturation	95 °C – 10 sec	95 °C – 10 sec	95 °C – 10 sec	95 °C – 10 sec
Annealing	63 °C – 30 sec	60 °C – 10 sec	63 °C – 10 sec	60 °C – 30 sec
Elongation		72 °C – 10 sec	72 °C – 10 sec	
		<i>Melting analysis</i>	<i>Melting analysis</i>	
		95 °C – 5 sec	95 °C – 5 sec	
		55 °C – 1 min	55 °C – 1 min	
		continuous increase by 0.1 °C/sec to 97 °C	continuous increase by 0.1 °C/sec to 97 °C	

SUPP. REFERENCES

- Dölken L, Ruzsics Z, Rädle B, et al. 2008. High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *RNA* 14(9):1959-72.
- Horvathova M, Kapralova K, Zidova Z, Dolezal D, Pospisilova D, Divoky V. 2012. Erythropoietin-driven signaling ameliorates the survival defect of DMT1-mutant erythroid progenitors and erythroblasts. *Haematologica* 97(10):1480-1488.
- Kimberland ML, Divoky V, Prchal JT, Schwahn U, Berger W, Kazazian HH Jr. 1999. Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet* 8(8):1557-1560.
- Kutlar A, Huisman THJ. 1991. The detection of hemoglobinopathies. In: Hommes FA, ed. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. New York, NY: Wiley-Liss. 519-560.
- Mabaera R, Richardson CHA, Johnson K, Hsu M, Fiering S, Lowrey CH. 2007. Developmental- and differentiation-specific patterns of human γ - and β -globin promoter DNA methylation. *Blood* 110(4):1343-1352.
- Mätlik K, Redik K, Speek M. 2006. L1 Antisense Promoter Drives Tissue-Specific Transcription of Human Genes. *J Biomed Biotechnol* 2006: 71753.
- Papayannopoulou T, Brice M, Stamatoyannopoulos G. 1996. Analysis of human hemoglobin switching in MEL x human fetal erythroid cell hybrids. *Cell* 46(3):469-476.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.
- Wheelan SJ, Aizawa Y, Han JS, Boeke JD. 2005. Gene-breaking: A new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution. *Genome Res* 15:1073–1078.
- Yagi M, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T. 1987. Monoclonal antibody 53.6 recognizes a novel proliferation-associated antigen encoded on human chromosome 11. *J Immunol* 138(7):2208-2212.
- Yang Ch, Feng J, Song W, et al. 2007. A mouse model for nonsense mutation bypass therapy shows a dramatic multiday response to geneticin. *Proc Natl Acad Sci USA* 4(39):15394-15399.

Příloha č. 5: Divoká et al, 2016

Divoká M, Partschová M, Pospíšilová D, Orviská M, Lapčíková A, Indrák K., Čermák J, Divoký V: Alfa-talasemie u 45 českých rodin a 37 rodin cizinců žijících v České republice: přehled literatury a molekulárně-genetická diagnostika. *Transfuze Hematol. Dnes*. 2016. Přijato k publikaci.



TRANSFUZE A HEMATOLOGIE *dnes*



Česká hematologická
společnost ČSHJEP

Titl.

RNDr. Martina Divoká

Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a FN Olomouc

Hněvotínská 3

775 15 Olomouc

dne: 22. 6. 2016

Vážená kolegyně,

dovolujeme si Vás informovat, že Váš rukopis s titulem „**Alfa-talasemie u 45 českých rodin a 37 rodin cizinců žijících v České republice: přehled literatury a molekulárně-genetická diagnostika**“ byl na základě výsledků recenzního řízení dne 22. 6. 2016 přijat redakcí časopisu *Transfuze a hematologie dnes* a bude publikován v čísle **3/2016**. Gratulujeme.

Prosíme, abyste ve svých dalších publikacích tuto práci citovala.

Děkujeme, těšíme se na další spolupráci, přejeme Vám další neméně kvalitní publikace a doufáme, že i v budoucnu budete při rozhodování o místě prezentace Vašich rukopisů myslet na náš časopis.

S pozdravem

za redakci časopisu *Transfuze a hematologie dnes*

MUDr. Jiří Masopust

vedoucí redaktor

Alfa-talasemie u 45 českých rodin a 37 rodin cizinců žijících v České republice: přehled literatury a molekulárně-genetická diagnostika

Divoká M.¹, Partschová M.², Pospíšilová D.³, Orviská M.¹, Lapčíková A.¹, Indrák K.¹, Čermák J.⁴, Divoký V.^{1,2}

¹ Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc

² Ústav biologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

³ Dětská klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

⁴ Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Souhrn

Alfa-talasemie jsou nejrozšířenější monogenně dědičná onemocnění na světě. Jedná se o vrozené anémie s autozomálně recesivní dědičností charakterizované kvantitativní redukcí syntézy α -globinových řetězců molekuly hemoglobinu. Společně s dalšími typy talasemií a se strukturními hemoglobinovými variantami jsou řazeny do skupiny chorob s poruchou tvorby nebo struktury globinových řetězců - hemoglobinopatií. Výskyt většiny hemoglobinopatií je soustředěn především do malarických oblastí. Protože globinové mutace poskytují heterozygotním nosičům ochranu před malárií, došlo v průběhu evoluce pravděpodobně k selektivnímu zvýhodnění mutantních alel globinových genů v oblastech s vysokým výskytem malárie.

Alfa-talasemie jsou nejčastěji způsobeny delecemi úseků DNA v α -globinovém lokusu na 16. chromozomu a vyznačují se mikrocytární hypochromní anemií s různými fenotypovými stupni závažnosti, od téměř asymptomatických forem až po život ohrožující hemolytické anémie. Jsou rozšířeny zvláště v jihovýchodní Asii, ve Středomoří, v Africe a Indii, ve střední Evropě jsou vzácné. Přesto i v našich zeměpisných šířkách je na přítomnost α -talasemie nutné myslet jako na možnou příčinu vrozené mikrocytární anémie. Pro správnou diagnostiku α -talasemií je nutný soubor hematologických, biochemických a molekulárně-genetických vyšetření. Cílem tohoto sdělení je upozornit na variabilní fenotyp a genotyp těchto onemocnění v České republice u českých rodin i rodin cizinců žijících v ČR.

Klíčová slova

hemoglobinopatie, α -talasemie, onemocnění HbH, molekulárně-genetická diagnostika

Summary

Divoká M., Partschová M., Pospíšilová D., Orviská M.¹, Lapčíková A.¹, Indrák K., Čermák J., Divoký V.

Alpha-thalassemia in 45 Czech and 37 immigrant families: review of the literature and molecular diagnosis

Alpha-thalassemia is the most common monogenic gene disorder in the world. It is an inherited autosomal recessive disorder characterized by reduced production of the α -globin chains of hemoglobin. It belongs, together with other types of thalassemias and hemoglobinopathies, to common globin gene disorders widely distributed due to their natural selection through protection of carriers against severe malaria. Alpha-thalassemia most frequently results from deletions removing segments of DNA from the α -globin gene cluster on chromosome 16 and is characterized by a microcytic hypochromic anemia, with a clinical phenotype varying from almost asymptomatic to a lethal hemolytic anemia. Alpha-thalassemia is especially frequent in populations originating from the South East Asia, Mediterranean region, Africa and Indian subcontinent, with rare occurrence in Central Europe. However, also in our region the presence of α -thalassemia should be considered as a possible cause of hereditary microcytic anemia. Specialized diagnostic approaches that are needed for correct diagnosis of α -thalassemia involve molecular analysis required to confirm the hematological and biochemical observations. The aim of this study is to report the variable phenotype and genotype of these disease states in the Czech families and in immigrants living in the Czech Republic.

Key words: hemoglobinopathy, α -thalassemia, HbH disease, molecular diagnostics

Úvod

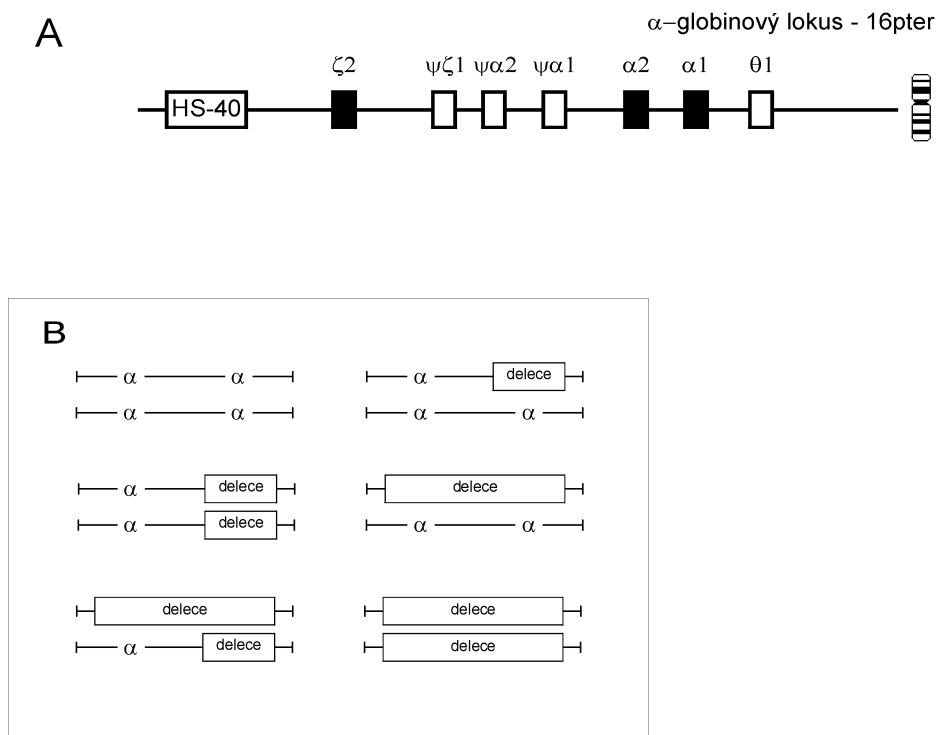
Alfa-talasemie je nejrozšířenější monogenně dědičné onemocnění na světě, asi 5 % světové populace nese některou z α -talasemických alel (1). Alfa-talasemie, spolu s dalšími typy talasemií a s endemickými hemoglobinovými variantami byly selektovány v průběhu evoluce v malarických oblastech, neboť heterozygotům přináší výhodu v protekci proti malarickému parazitu *Plasmodium falciparum* (2). Talasemie i hemoglobinové varianty se mohou ovšem vyskytnout v každé etnické skupině a vzhledem ke vzrůstající migraci obyvatel se stále častěji rozšiřují do oblastí střední a severní Evropy, do severní Ameriky a také Austrálie. Právě ve střední Evropě bylo dříve toto onemocnění lékaři opomíjeno.

Díky historické i současné imigraci se talasemie a hemoglobinové varianty objevují stále častěji i v naší populaci. V České republice a na Slovensku jsou talasemie nejčastější příčinou vrozené mikrocytární anemie (3), ale pozornost byla dosud věnována téměř výhradně β -talasemiím (3-6). Alfa-talasemie byly dosud v ČR charakterizovány na molekulární úrovni jen výjimečně (3, 4); v jednom případě se jednalo o nový unikátní molekulární mechanismus vedoucí k α -talasemii (7, 8). V tomto sdělení přinášíme přehled literatury a vlastní zkušenosti s diagnostikou α -talasemických alel. Uvádíme variabilní fenotyp a molekulárně-genetickou analýzu těchto onemocnění u 45 rodin českého původu a 37 rodin cizinců žijících v České republice.

Genotypová a fenotypová variabilita α -talasemií

Poměr α a β -globinových řetězců v molekule hemoglobinu (Hb) je fyziologicky jedna ku jedné. Nerovnováha vzájemného poměru globinových řetězců je charakteristická pro talasemie; α -talasemie se vyznačují redukovanou produkcí α -globinových řetězců. Alfa-talasemie jsou většinou způsobeny delecí funkčních α -globinových genů, méně často jsou α -globinové geny inaktivovány bodovou mutací. Haploidní lidský genom má dva α -globinové geny (obr. 1A), to znamená, že normální diploidní genotyp je $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Normální sada čtyř funkčních α -globinových genů může být snížena o 1, 2, 3 nebo o všechny 4 kopie genu a z toho následně vyplývají rozdílné klinické projevy a zvyšující se závažnost onemocnění (obr. 1B). Míru snížené produkce α -globinových řetězců z lokusu vyjadřuje označení α^+ -talasemie a α^0 -talasemie. U α^+ -talasemie je jen jeden ze dvou α -globinových genů na chromozomu deletován ($-\alpha/\alpha\alpha$) nebo inaktivován bodovou mutací ($\alpha^{\text{ND}}/\alpha\alpha$, kde ND značí „nondeletional“; dříve $\alpha^{\text{T}}/\alpha\alpha$). U α^0 -talasemie jsou oba α -globinové geny na chromozomu inaktivovány delecí nebo bodovou mutací. Stupeň mikrocytózy, hypochromázie a anemie závisí na počtu

mutovaných α -globinových genů a dobře koreluje s mírou redukce syntézy α -globinových řetězců (1).



Obr. 1. Struktura α -globinového lokusu na chromozomu 16 a genotypové varianty delečních α -talasemií. **A)** Rodina (klastr) α -globinových genů leží v lokusu v blízkosti telomery na chromozomu 16. Klastr je dlouhý 29 kb a obsahuje embryonální gen ζ a dva α -globinové geny fetálního a dospělého typu $\alpha 2$ neboli *HBA2* a $\alpha 1$ neboli *HBA1* (plné boxy), které jsou uspořádány na chromozomu ve směru jejich exprese během ontogeneze. Exprese těchto genů je řízena erytroidně-specifickou regulační oblastí, která leží 40 kb proti směru exprese ζ -globinového genu a nazývá se pozitivní regulační oblast HS-40. Prázdné boxy značí nefunkční kopie genů – pseudogeny. Alfa-globinový lokus se nachází v transkripčně-permisivní chromatinové oblasti, to znamená, že se nachází v trvale otevřené chromatinové doméně a HS-40 oblast působí jako zesilovač globinové exprese. **B)** Nahoře vlevo: normální diploidní genotyp. Nahoře vpravo: heterozygot pro α^+ -talasemii, tzv. němé (nebo tiché) nosičství. V krevním obraze a v poměru syntézy $\alpha : \beta$ globinových řetězců se prakticky neprojevuje a prokazujeme je jen při genetické analýze. Uprostřed: u homozygotů pro α^+ -

talasemii (nejčastěji delece dvou genů, $-\alpha/-\alpha$) nebo u heterozygotů pro α^0 -talasemii ($-/-\alpha\alpha$) hovoříme o nosičství α -talasemie. Projevuje se mírnou mikrocytózou, zvýšeným počtem erytrocytů a nerovnováhou v syntéze globinových řetězců. Dole vlevo: ztráta tří α -globinových genů (dvojití heterozygoti pro α^+ -talasemii a α^0 -talasemii, nejčastěji $- - /-\alpha$), vede k chorobě HbH se středně těžkou chudokrevností a s produkcí HbH (β_4). Při inkubaci s brilliant-kresylovou modří nacházíme v erytrocytech precipitovaný HbH. Dole vpravo: chybění čtyř α -globinových genů, tj. homozygotní stav pro α^0 -talasemii ($- - /- -$), není slučitelné s životem a vede ke vzniku *hydrops fetalis* nebo syndromu Hb Bart's (γ_4). Rodí se hydropicky změněné dítě s ascitem, velkými játry, erytroblastózou, retikulocytózou, terčovitými buňkami s převládajícím Hb Bart's a malým podílem HbH a Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$).
Upraveno podle Divoký, 2013 (9).

Klinické formy α -talasemií

Název α -talasemie obecně zahrnuje všechna onemocnění s deficitem tvorby α -globinových řetězců, které jsou součástí tetrametru Hb molekuly. Všechny lidské Hb molekuly jsou tetramery, sestávající ze dvou různých párů globinových řetězců. Jeden pár globinových řetězců je produkován geny α -globinového lokusu (ve fetálním období i v dospělosti jsou to α_2 neboli *HBA2* a α_1 neboli *HBA1* geny, jejichž kódující sekvence jsou identické). Druhý pár řetězců je produkován geny β -globinového lokusu (ve fetálním období jsou to γ^G neboli *HBG2* a γ^A neboli *HBG1* geny, v dospělosti β neboli *HBB* gen). Snížená produkce α -globinových řetězců vede ve fetálním období k nadbytku γ -globinových řetězců, které se formují do γ_4 tetramerů, a vzniká tak Hb Bart's, v období dospělosti k nadbytku β -globinových řetězců, které se formují do β_4 tetramerů za vzniku nestabilního HbH.

Na základě fenotypu rozlišujeme u nosičství pro α -talasemii dva typy: tiché nosičství s inaktivací (většinou delecí) jednoho α -globinového genu ($-\alpha/\alpha\alpha$), které se v krevním obraze téměř neprojevuje a prokázat jej lze jen pomocí molekulárně genetického vyšetření. Výskyt tohoto genotypu je v České republice častý. U druhého typu nazývaného nosičství α -talasemie se jedná nejčastěji o delecii dvou α -globinových genů. Řadíme sem tedy buď homozygoty pro α^+ -talasemii ($-\alpha/-\alpha$) nebo heterozygoty pro α^0 -talasemii ($- - /-\alpha\alpha$) (viz obr. 1B). Nosičství α -talasemie se projevuje mírnou mikrocytární anemií se zvýšeným počtem erytrocytů. Výskyt těchto jedinců je v České republice relativně vzácný.

HbH onemocněním (někdy označovaným jako choroba HbH) trpí jedinci se ztrátou tří α -globinových genů, v případě delecční formy α -talasemie se jedná o jedince s ($- - /-\alpha$)

genotypem, jde tedy o složené heterozygoty pro α^+ -talasemii a α^0 -talasemii. Tito nemocní většinou produkují méně než 30 % normální hladiny α -globinu, trpí středně těžkou anemií (Hb mezi 80 – 100 g/l) s různým zastoupením HbH (0,8 – 40 %), mají splenomegalii (která může být závažná). Samotný HbH má vysokou afinitu ke kyslíku a je nestabilní (10; obr. 1B). Choroba HbH výrazně neovlivňuje kvalitu života; v České republice se vyskytuje ojedinele u imigrantů resp. jejich potomků (viz dále). Hb Bart's (γ_4) syndrom nebo *hydrops fetalis* je stav neslučitelný se životem, jedná se o homozygotní stav pro α^0 -talasemii, tedy o chybění všech čtyř α -globinových genů (– /– –). Většinou se rodí novorozenci s hydropsem a ascitem, velkými játry, erytroblastózou a retikulocytózou. Nejvíce hemoglobinu v erythrocytech u novorozenců s Hb Bart's *hydrops fetalis* syndromem je tvořeno fyziologicky nefunkčními homotetramery γ_4 a β_4 . Mají také proměnlivé množství embryonálního Hb Portland, což je u těchto dětí jediný funkční hemoglobin a jediný přenašeč kyslíku, který je drží při životě do narození (11).

Vzácně jsou známy případy dlouhých delecí, které postihují kromě α -globinových genů také další geny v jejich okolí. Toto onemocnění je asociované s poruchami vývoje (zahrnující také duševní poruchy) a je označováno jako α -talasemie/syndrom mentální retardace asociovaný s chromozomem 16 (ATR-16 syndrom; 12). Byly popsány také případy vzácné formy mentální retardace spojené s α -talasemií, způsobené abnormalitami *ATRX* genu ležícím na chromosomu X (ATR-X syndrom). U těchto nemocných je duševní porucha více závažná a dysmorfické změny jsou nápadně podobné mezi jednotlivými pacienty. Gen *ATRX* kóduje protein ze skupiny helikáz/ATPáz, který ovlivňuje chromatinovou strukturu a transkripci různých genů, mezi nimi i α -globinových genů. Mutace *ATRX* vedou ke globálnímu potlačení exprese těchto genů, mezi nimi i genů důležitých pro normální rozvoj CNS. U nás (v ČR nebo na Slovensku) jsme dosud ATR syndrom nediagnostikovali. Vzácné jsou získané formy α -talasemie, asociované s myelodysplastickým syndromem (syndrom ATMDs). Ve většině případů je ATMDs syndrom asociován se získanými mutacemi v *ATRX* genu (12).

Molekulární podstata α -talasemií

Deleční α^+ -talasemie

Vzhledem k tomu, že dva α -globinové geny v lokusu vznikly v evoluci duplikací, vyznačuje se tato oblast DNA několika homologemi, které mohou vést k nerovnoměrným reciprokým rekombinacím (interchromozomálně, méně často intrachromozomálně). Výsledkem je vznik alel s jedním funkčním α -globinovým genem a alel s triplicacemi α -

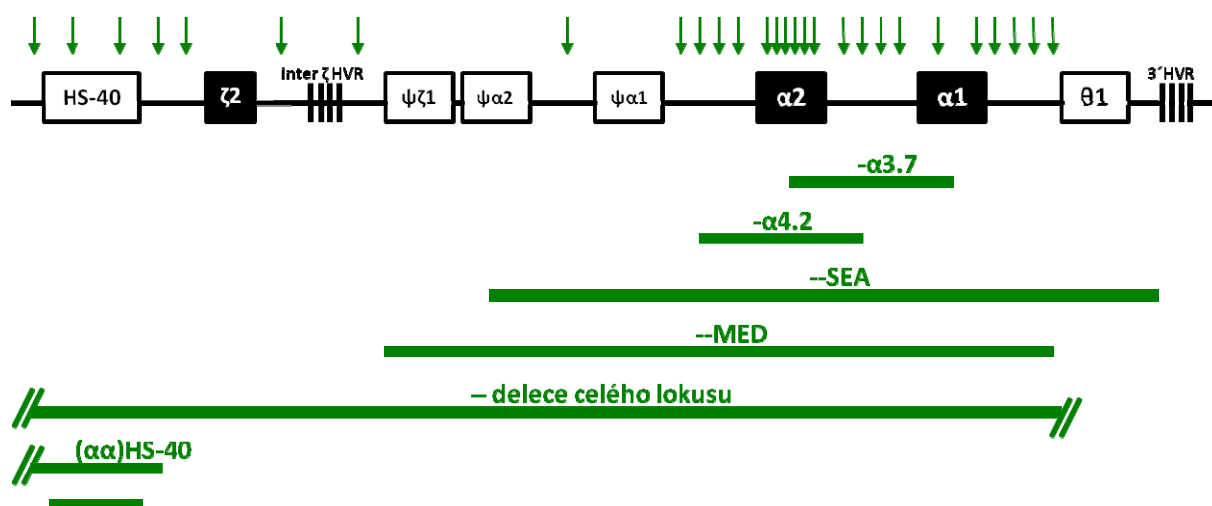
globinových genů (13). Vzniká tak velmi častá 3.7 kb dlouhá α -talasemická delece, produkující chromozom pouze s jedním funkčním α -genem ($-\alpha^{3.7}$) (obr. 2) a α -triplikovaná alela ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$) bez talasemického efektu. Stejně tak reciproká rekombinace v průběhu meiózy mezi homologními segmenty DNA způsobuje běžnou 4.2 kb dlouhou deleci ($-\alpha^{4.2}$) (obr. 2) a $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$ chromozom (13). Další případy rekombinací mezi takto vzniklými chromozomy (α , $\alpha\alpha$ a $\alpha\alpha\alpha$) pak mohou způsobit kvadruplikaci α genů ($\alpha\alpha\alpha\alpha$) nebo kvintuplikaci ($\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$) a další přeskupení (14). Na rozdíl od delecí vedoucích k talasemickému fenotypu se samotné zmnožení α -globinových genů u jinak zdravých jedinců klinicky většinou neprojevuje. Problém ovšem nastává u dvojitých heterozygotů pro alelu se zmnoženými α -globinovými geny a β -talasemickou alelu - dochází tak ke zvýšení nerovnováhy α a β řetězců a ke zvýraznění chudokrevnosti, což bylo vzácně potvrzeno i u nemocných v ČR (6, 15).

Deleční α^0 -talasemie

V současné době je známo asi 50 typů delecí *HBA* lokusu, které buď kompletně nebo částečně deletují oba α -globinové geny s následným zastavením syntézy α -globinových řetězců *in vivo* (13). Nejčastější jsou delece – $-\text{MED}$ rozšířená mezi populacemi ve Středomoří a – $-\text{SEA}$ vyskytující se převážně v jihovýchodní Asii (1; obr 2). Homozygoti pro tento typ delecí trpí Hb Bart's hydrops fetalis syndromem. Složení heterozygoti pro tento typ delece a delece pro α^+ -talasemii, která způsobí chybění jednoho α -globinového genu, mají HbH onemocnění. Tyto zatím zmíněné typy delecí postihují pouze *HBA* lokus a vyskytují se i v ČR (viz níže). Jiné delece postihují i jiné přiléhající geny, což nemusí mít výrazný vliv na zhoršení fenotypu. Některé známé delece odstraňují i ζ -gen současně s α -geny, a i když heterozygoti vykazují normální vývoj, u homozygotů je nepravděpodobné přežití období časného stádia gravidity vzhledem k tomu, že ani embryonální ($\zeta_2\gamma_2$) a ani fetální ($\alpha_2\gamma_2$) hemoglobiny nemohou být syntetizovány (13). Tyto typy delecí byly zjištěny i v české populaci (viz níže).

Vzácné delece vedoucí k α^0 -talasemii odebírají regulační oblast HS-40, která se nachází 40 kb 5' od ζ -globinového genu (obr. 1A), přičemž zanechávají α -globinové geny intaktní. HS-40 je esenciální pro α -globinovou expresi, delece této oblasti vede k úplné ztrátě exprese α -globinových genů v poloze *cis*. Fenotyp je tedy shodný jako u vzácných delecí celého *HBA* lokusu. Tyto delece se sporadicky vyskytují v různých populacích (10), vzácně i u českých rodin (viz níže, obr. 2, tab. 1).

Vznik α -talasemie způsobené zastavením transkripce neaktivním chromatinem u polské rodiny žijící v České republice byl popsán jako nový mechanismus vzniku tohoto onemocnění (16). Delece dlouhá 18 kb zahrnuje $\alpha 1$ gen a přilehlou 3'oblast a způsobí utlumení exprese $\alpha 2$ globinového genu v poloze *cis*. Díky deleci se do lokusu přemístí represivní chromatin, který zastaví $\alpha 2$ transkripci (7, 8). Heterozygoti pro tuto mutaci trpí mírnou hypochromní mikrocytární anemií, mají snížený poměr syntézy α/β globinových řetězců a HbH inkluze v erytrocytech.



Obr. 2. Schematické znázornění delecí *HBA* lokusu zjištěných v České republice u českých rodin a u rodin cizinců. Delece – $-^{MED}$, delece celého lokusu a různě dlouhé delece regulační oblasti HS-40 jsou u nás popsány poprvé v tomto sdělení. Vysvětlení genů a pseudogenů v lokusu viz obr. 1A. HVR značí tzv. hypervariabilní oblasti v *HBA* lokusu. Vertikální šipky nad lokusem značí polohy MLPA prób použitých pro mapování delecí (viz Diagnostika a diagnostické metody).

Nedeleční formy α -talasemie (α^{ND})

Alfa-talasemie jsou častěji způsobeny genovými delecemi, bodové mutace (jednonukleotidové záměny) vedoucí k α -talasemii jsou vzácnější (10, 13). Alfa-globinové geny mutované v kanonických sekvencích *HBA1* a *HBA2* ovlivňujících α -globinovou genovou expresi se označují jako (α^{ND} nebo dříve α^T); bodová talasemická mutace může postihnout $\alpha 2$ ($\alpha^{ND}\alpha$) nebo $\alpha 1$ ($\alpha\alpha^{ND}$) globinový gen. Většina těchto mutací ovlivňuje úpravu

(přepis a post-transkripční zpracování) mRNA, mRNA translaci nebo α -globinovou stabilitu. Bodové mutace mohou vést k částečnému (α^+) nebo úplnému (α^0) utlumení genové exprese, resp. produkce funkčních α -globinových řetězců. Je známo několik desítek bodových mutací způsobujících α -talasemii; mnohé z nich jsou běžné i ve Středomoří a na Blízkém východě a lze je tedy očekávat i české a slovenské populaci. Aktualizovaný seznam těchto mutací je dostupný v databázi HbVar, <http://globin.cse.psu.edu/hbvar>. Některé bodové mutace v terminačním kodonu vedou k prodlouženým Hb variantám s talasemickým fenotypem, jako např. Hb Constant Spring, nejběžnější nedeleční α -talasemická mutace častá zvláště v některých oblastech jihovýchodní Asie. Jiné mutace způsobují vysoce nestabilní α -globinové varianty, např. Hb Adana (10). Nedávno byla popsána odchylka jednoho nukleotidu v negenové oblasti globinového kladru, která vede k novému molekulárnímu mechanismu vzniku α -talasemie (17). Jedná se o záměnu v sekvenci regulačního jednonukleotidového polymorfizmu (SNP, “Single Nucleotide Polymorphism”), kterou se vytváří nový transkripčně aktivní promotor v normálně transkripčně neaktivní oblasti $\psi\zeta 1$. Tato abnormální transkripční aktivace interferuje a zeslabuje expresi α -globinových genů.

Diagnóza a diagnostické metody

Iniciální laboratorní testování by mělo zahrnovat kompletní krevní obraz s popisem červených krvinek, bioanalytické testy zahrnující měření hladiny HbA₂, HbF a elektroforézu Hb. Dříve bylo pro potvrzení α -talasemie nezbytné měření poměru syntézy α/β globinových řetězců radioaktivně značeným leucinem; redukovaný poměr na méně než ~ 0.8 svědčil pro α -talasemii (18). V současné době převažují molekulární analýzy, které potvrdí podezření na α -talasemii. Elektroforéza Hb slouží k separaci abnormálních hemoglobinových frakcí, je důležitá mimo jiné pro detekci Hb variant s α -talasemickým fenotypem. Precipitovaný HbH je v erytrocytech prokazován inkubací s brilliant-kresylovou modří (obr. 3A).

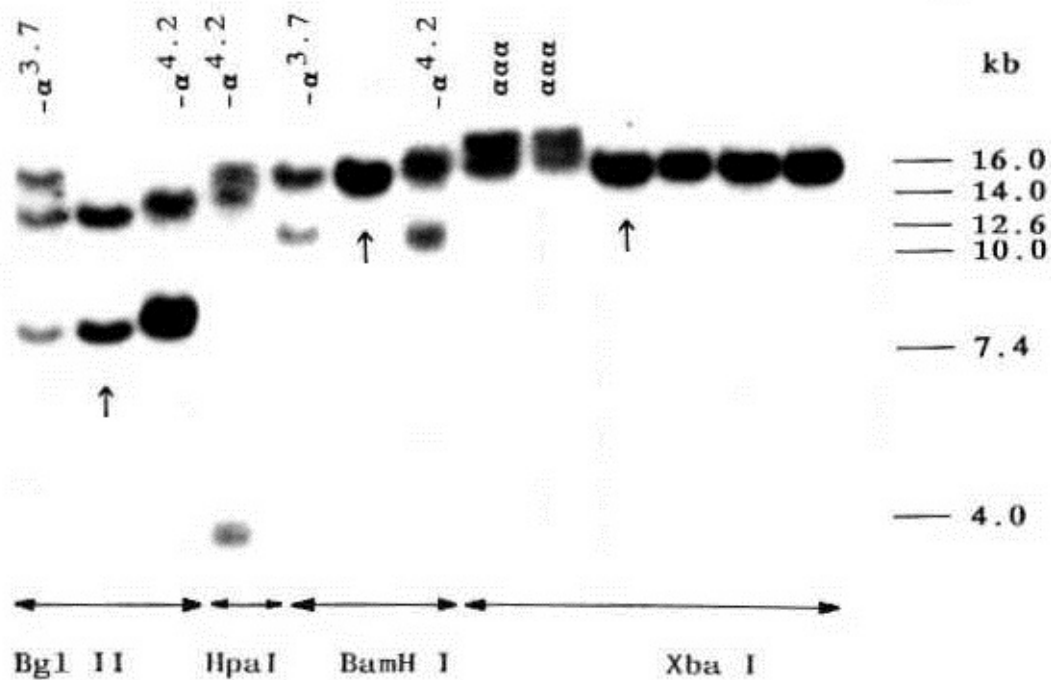
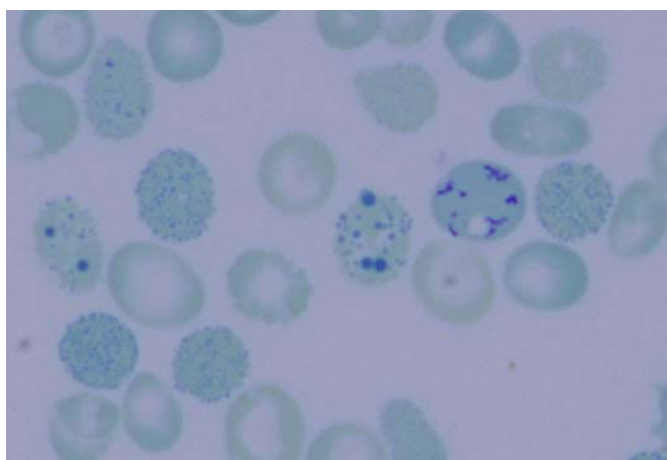
Molekulární analýza

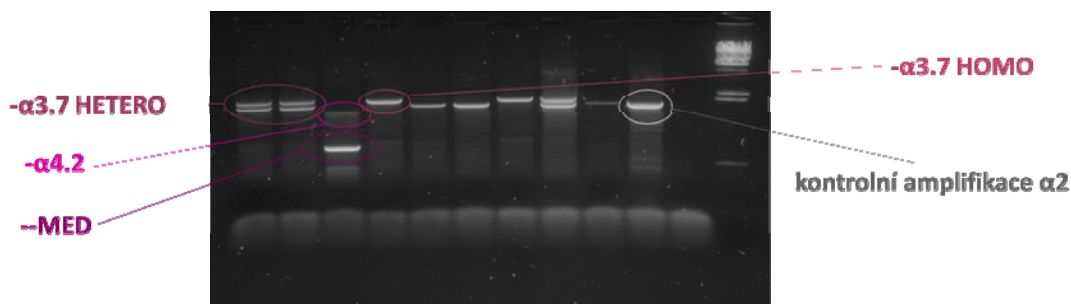
Molekulární diagnostice napomáhá etnický původ vyšetřovaných jedinců; rozdílné spektrum α -talasemických mutací bývá nalézáno v rozdílných populacích. Dříve byla většina přeskupení *HBA* genů v rámci *HBA* lokusu charakterizována pomocí Southern blotu (obr. 3B). V současné době existují rychlé skrínigové metody pro detekci delecí a jiných změn v *HBA* lokusu.

Pro detekci sedmi nejčastějších α -talasemických delecí bylo vytvořeno multiplexní PCR (19; obr. 3C). Tato metoda se používá pro určení dvou nejčastějších α^+ -talasemických delecí ($-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$) a dalších 5 α^0 -talasemických delecí, mezi nimi $-\alpha^{\text{MED}}$ a $-\alpha^{\text{SEA}}$. Novější MLPA

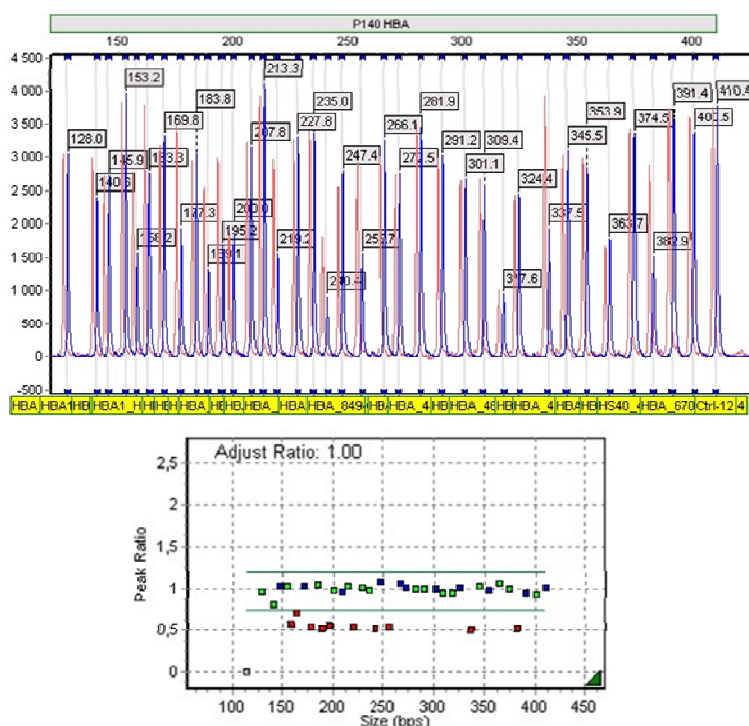
(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) je založena na ligaci více párů prób (obvykle dlouhých), které hybridizují napříč k analyzované oblasti. Následuje semi-kvantitativní amplifikace s použitím univerzálních tag PCR primerů a poté fragmentační analýza (obr. 3D). Tato metoda je hodnotnou alternativou k Southern blotu a doplňkovou k multiplexní PCR při zjišťování jak známých tak neznámých delecí způsobujících α -talasemii (20).

V případě podezření na bodovou mutaci (nedeleční mutaci) se rutinně používá sekvenování *HBA1* a *HBA2* genů.





	Probe Name	Bin Size	HBA
1	Ctrl-01	115.0	0
2	Ctrl-02	146.0	2
3	Ctrl-03	170.0	2
4	Ctrl-04	208.0	2
5	Ctrl-05	247.0	2
6	Ctrl-06	266.0	2
7	Ctrl-07	272.0	2
8	Ctrl-08	301.0	2
9	Ctrl-09	325.0	2
10	Ctrl-10	354.0	2
11	Ctrl-11	391.0	2
12	Ctrl-12	410.0	2
13	HBA1_HBA2_ex	141.0	2
14	HBA1_HBA2_ex	164.0	1
15	HBA2_intron-2a	158.0	1
16	HBA2_intron-2b	241.0	1
17	HBA_4622_L400	345.0	2
18	HBA_4624_L400	291.0	2
19	HBA_4625_L400	318.0	2
20	HBA_4626_L474	189.0	1
21	HBA_4627_L400	200.0	2
22	HBA_4628_L400	228.0	2
23	HBA_4637_L401	184.0	2
24	HBA_4638_L401	282.0	2
25	HBA_4639_L402	309.0	2
26	HBA_4926_L401	364.0	2
27	HBA_6707_L629	401.0	2
28	HBA_8488_L841	374.0	2
29	HBA_8491_L841	195.0	1
30	HBA_8492_L841	213.0	2
31	HBA_8493_L841	219.0	1
32	HBA_8494_L841	256.0	1
33	HBA_8497_L842	337.0	1
34	HBA_8499_L842	153.0	2
35	HBA_ConSpring	128.0	2
36	HS-40	177.0	1
37	HS40_4800_L41	383.0	1
38	POLR3K	235.0	2



Obr. 3. Diagnostika α -talasemických delecí.

A) Precipitovaný HbH lze v erythrocytech prokázat inkubací s brilliant-kresylovou modří, po obarvení jsou patrné inkluze tvořené shlukem volných β -globinových řetězců v erythrocytu.

B) Výsledek Southern blot analýzy prokazující dvě nejčastější α^+ -talasemické delecce ($-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$) a triplikaci α -globinových genů.

C) Výsledek multiplexního PCR v agarózovém gelu prokazující dvě nejčastější α^+ -talasemické delecce ($-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$) a α^0 -talasemickou delecí $-\text{MED}$.

D) Výsledek MLPA prokazující delecí regulační oblasti HS-40 a α^+ -talasemickou delecí $-\alpha^{3.7}$, které u složeného heterozygota vedou k chorobě HbH. Další informace k dané technologii a způsobu analýzy výsledků jsou dostupné na www.mlpa.com, produkt SALSA MLPA P140 HBA probemix.

Diferenciální diagnostika

V některých případech mají nosiči α^+ -talasemie normální hematologické výsledky, speciálně nosiči $-\alpha^{3.7}$ delecce a nosiči nedelečních mutací v $\alpha 1$ genu. Někteří jedinci mohou mít normocytózu nebo hraniční hypochromázii bez anemie. Tato skutečnost může být zjištěna pouze náhodně při rutinní molekulární analýze pro záchyt hemoglobinopatií.

Příležitostně, speciálně v zemích, kde je talasemie vzácná, mohou být nosiči α -talasemie nesprávně označení za pacienty s anemií z nedostatku železa, zvláště pokud není status železa u pacienta správně zhodnocen. Vždy je nutná molekulární analýza, zvláště u tichého nosičství nebo nosičství α -talasemie k potvrzení diagnózy, protože i nosiči α -talasemické alely mohou vykazovat vyšší riziko přetížení organismu železem (21).

Výskyt α -talasemií v České republice – přehled literárních údajů

Alfa-talasemie byly považovány v České republice za velmi vzácné; jen několik případů bylo charakterizováno na molekulární úrovni tradiční metodou Southernova přenosu a hybridizace (3, 4). Kromě $-\alpha^{3.7}$ delecce zjištěné u několika jedinců byl u jedné rodiny polského původu žijící v ČR popsán již zmíněný nový typ unikátní delecce 18 kb DNA postihující $\alpha 1$ gen a přilehlou 3'-oblast, která vedla překvapivě k utlumení exprese $\alpha 2$ globinového genu v poloze *cis*, tj. k fenotypu, který je asociován s α -tal-1 genotypem (16). Bylo zjištěno, že 18 kb delecce přemístila do klastru represivní chromatin, který spolu s protismyslnými transkripty přilehlého genu (gen, jenž je přepisován proti směru exprese α -globinových genů) zastaví $\alpha 2$ transkripci (7, 8). Vzácně byly také detekovány triplikace α -globinových genů (3, 4), někdy vedoucí ke zhoršení klinického projevu β -talasemie (22).

Diagnostika α -talasemií v České republice – nové výsledky

V průběhu posledních 10 let došlo k významnému rozšíření spektra α -talasemických mutací i počtu molekulárně-geneticky diagnostikovaných jedinců v ČR. Ke zpřesnění

diagnostiky přispělo využití nových molekulárně-genetických přístupů – multiplexní PCR a MLPA pro diagnostiku delečních forem α -talasemií a sekvenační analýzy *HBA* genů pro nedeleční formy α -talasemií. V souboru 82 rodin (98 členů) s podezřením na α -talasemii jsme odhalili u 78 rodin (92 jedinců) různé delece v rámci *HBA* lokusu; 45 rodin (53 jedinců) bylo českých, bez předků z malarických oblastí nejméně ve třech generacích rodu, ostatní byli cizinci žijící v ČR (tab. 1). U dvou jiných českých rodin (4 jedinců) jsme odhalili multiplikaci α -globinových genů (tab. 1) a u dalších dvou imigrantů jsme odhalili nedeleční α -talasemickou mutaci. Většina diagnostikovaných jedinců měla mírnou mikrocytární hypochromní anemii, s normálními hladinami HbA₂ a HbF, se standardní elektroforézou Hb a mírně zvýšeným počtem erytrocytů. Pro možnou přítomnost α -talasemické alely svědčil rodinný výskyt fenotypu, v případě rodin cizinců i etnický původ. Ve většině případů se jednalo o tiché nosičství nebo nosičství α -talasemie, s běžnými typy delecí jednoho nebo dvou α -globinových genů, které jsou známé ze Středozeří nebo z jihovýchodní Asie (obr. 2). Rozsáhlé delece celého *HBA* lokusu, včetně regulační oblasti HS-40, byly detekovány u 6 českých rodin (11 členů) s klinickými projevy odpovídajícími nosičství α -talasemie (jednalo se vesměs o heterozygoty, tab. 1). U 4 rodin (z nich 3 českého původu) jsme detekovali různé dlouhé delece regulační oblasti HS-40, ale s intaktními α -globinovými geny (viz obr. 2), s fenotypem odpovídajícím ztrátě dvou α -globinových genů (nosičství α -talasemie) u 5 jedinců, a u 1 pacientky jedné rodiny s klinickými projevy odpovídajícími ztrátě tří α -globinových genů (choroba HbH). Molekulární analýzou této pacientky s italskými předky jsme zjistili, že fenotyp HbH onemocnění je u ní způsoben inaktivací dvou α -globinových genů zmíněnou delecí HS-40 na jednom chromozomu v kombinaci s delecí jednoho α -globinového genu ($-\alpha^{3.7}$) na druhém chromozomu. Stejně závažný fenotyp, tj. chorobu HbH, jsme detekovali u imigranta ze severní Afriky, u kterého byl příčinný genotyp kombinací dvou častých delecí ze Středozeří ($-\alpha^{4.2}/- -^{MED}$) (tab. 1).

Tab. 1. Přehled delečních forem α -talasemií a multiplikací α -globinových genů zjištěných v průběhu posledních 10 let v České republice. Je uveden celkový počet rodin a jedinců, za lomítkem počet českých rodin a počet členů těchto rodin z celkového počtu diagnostikovaných rodin/jedinců.

TYPY DELECÍ	POČET RODIN	POČET ČLENŮ
$-\alpha^{3.7}$ (z toho homozygotů)	46/30	51/34 (11/6)
$--_{SEA}$	17 ^a /1	19 ^a /1
delece celého <i>HBA</i> lokusu	6/6	11/11
delece HS-40	4/3	6/4
kombinace delece HS-40/ $-\alpha^{3.7}$	1 ^b	1 ^b
kombinace $-\alpha^{4.2}/--_{MED}$	1 ^c	1 ^c
delece $\alpha 2/\alpha 1$ (blíže nespecifikována)	3/3	3/3
duplikace celého <i>HBA</i> lokusu	1/1	1/1
kvadruplikace <i>HBA2</i> genu	1/1	3/3 ^d
CELKEM	80	96

^{a)} 15 z těchto rodin (16 členů) bylo prokazatelně asijského původu; ^{b)} pacient s italskými předky; ^{c)} imigrant ze severní Afriky žijící v ČR; ^{d)} u všech členů rodiny byla kvadruplikace *HBA2* genu asociována s β^0 -talasemickou mutací, což vedlo k fenotypu talasemie intermedia u těchto nemocných (6).

Nedeleční formy α -talasemie jsme zatím diagnostikovali jen u dvou imigrantů žijících v ČR, u obou se jednalo o mutaci *HBA2*:c.95+2_95+6delTGAGG, označovanou také jako α -thal-2 (-5nt) (23), která se běžně vyskytuje ve Středomoří.

Závěr

První systematická molekulárně-genetická analýza α -talasemií v ČR provedená na selektovaném souboru 82 rodin (98 jedinců) odhalila novými diagnostickými přístupy 92 jedinců ze 78 rodin s delecemi v rámci *HBA* lokusu; 45 rodin (53 jedinců) bylo prokazatelně českého původu. Další 2 české rodiny (4 členové) měli v genotypu multiplikaci α -globinových genů a u dalších dvou imigrantů byla odhalena nedeleční α -talasemická mutace. U většiny diagnostikovaných jedinců s α -talasemií minor (37 cizinců/35 Čechů), byly nalezeny delece a u 2 cizinců bodové mutace α -globinových genů běžné v malarických

oblastech. Vzácně jsme odhalili rozsáhlé delece celého *HBA* lokusu nebo delece regulační oblasti lokusu HS-40, ale s intaktními α -globinovými geny; tyto typy delecí byly častěji zjištěny u českých rodin než u imigrantů. Podobné typy delecí jsou velmi sporadicky detekovány v různých populacích, včetně původních obyvatel západní a severní Evropy. U 3 českých rodin nebylo možné deleci *HBA* klastru blíže specifikovat. Prioritně byl v ČR charakterizován genetický podklad dvou pacientů s onemocněním HbH, první měl italské předky, druhý byl imigrant z Afriky. Heterogenita α -talasemií je v ČR zřejmě daleko větší než se dosud soudilo. Navíc, α -talasemické alely budou se stupňující se migrací v ČR postupně přibývat, a s tím bude stoupat i nutnost jejich přesné diagnostiky založené na molekulárně-genetických analýzách.

Podíl autorů na rukopisu

DM – napsání rukopisu, provádění analýz, interpretace výsledků, příprava finální verze rukopisu

PM – provádění analýz, revize rukopisu

PD – léčba pacientů, připomínkování rukopisu

OM – analýzy patientských vzorků

LA – analýzy patientských vzorků

IK – léčba pacientů, připomínkování rukopisu

ČJ – léčba pacientů, připomínkování rukopisu

DV – příprava finální verze rukopisu, interpretace výsledků

Seznam použitých zkratk

Hb hemoglobin

ND	„nondeletional“, nedeleční
kb	kilobáze
ATR	„ α -thalassemia with mental retardation“
SNP	„Single Nucleotide Polymorphism“, jednonukleotidový polymorfismus
PCR	polymerázová řetězová reakce
MLPA	„Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification“

Poděkování: Lékařům hematologických pracovišť v České republice a na Slovensku za poskytnutí patientských vzorků a za spolupráci.

Tato práce byla podpořena granty IGA_LF_2016_001 a IGA_LF_2016_014

Literatura

1. Piel FB, Weatherall DJ. The α -thalassemias. *N Engl J Med*, 2014;371(20):1908-1916.
2. Weatherall DJ, Williams TN, Allen SJ, O'Donnell A. The population genetics and dynamics of the thalassemias. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010;24(6):1021-1031.
3. Indrák K, Divoký V, Brabec V, et al. Molekulárně genetická charakteristika α , β a $\delta\beta$ thalassémií u 139 heterozygotů z 56 nepříbuzných rodin českého a slovenského původu. *Vnitř Lék*, 1993;39(10):969–978.
4. Indrak K, Brabec V, Indrakova J, et al. Molecular characterization of β -thalassemia in Czechoslovakia. *Hum Genet*, 1992;88(4):399–404.
5. Divoký V., Walczysková S, Pospíšilová D, et al. Některé vzácnější formy hereditárních anémií vyskytující se v dospělé populaci v ČR a SR - β -talasemie a nestabilní hemoglobinové varianty. *Vnitř Lék*, 2005;51:741–748.
6. Divoka M, Partschova M, Kucerovala J, et al. Molecular Characterization of β -Thalassemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and Unique Mutations. *Hemoglobin*, 2016;Mar 9:1-7. DOI: 10.3109/03630269.2016.1152581.
7. Barbour VM, Tufarelli C, Sharpe JA, et al. α -thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood*, 2000;96(3):800-807.
8. 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(2):157–165.

9. Divoký V, Indrák K, Mojžíková R. Hemoglobinopatie: talasémie a strukturální Hb varianty. In: Molekulární hematologie. Praha: Galén, 2013, s. 270- 283. ISBN 978-80-7262-942-8.
10. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*, 2010;5:13. DOI: 10.1186/1750-1172-5-13.
11. Chui DH. Alpha-thalassemia: Hb H disease and Hb Barts hydrops fetalis. *Ann N Y Acad Sci*, 2005;1054:25-32.
12. Higgs DR, Buckle VJ, Gibbons R, Steensma D. Unusual Types of α Thalassemia. In Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. (Eds). Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2009, s. 296-320.
13. Higgs DR. The molecular basis of α thalassemia. In Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. (Eds). Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2009, s. 241-265.
14. Lam KW, Jeffreys AJ. Processes of de novo duplication of human α -globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007;104(26):10950-10955.
15. Indrak K, Fei YJ, LI HW, et al. A Czechoslovakian teenager with Hb E- β^0 -thalassemia [IVS-I-1 (G $\rightarrow$ A)] complicated by the presence of an α -globin gene triplication. *Ann Hematol*, 1991; 63(1):42-44.
16. Indrak K, Gu YC, Novotny J, Huisman TH. A new alpha-thalassemia-2 deletion resulting in microcytosis and hypochromia and in vitro chain imbalance in the heterozygote. *Am J Hematol*, 1993;43(2):144-145.
17. 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(5777):1215-1217.
18. Clegg JB, Weatherall DJ: Haemoglobin synthesis in alpha-thalassaemia (haemoglobin H disease). *Nature*, 1967; 215:1241-1243.
19. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. *Blood*, 2000; 95(1):360-362.
20. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet*, 2005; 42(12):922-931.

21. Sulovska L, Holub D, Zidova Z, et al. Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015. DOI: 10.5507/bp.2015.054. [Epub ahead of print]
22. Indrak K, Fei Y-J, Li H-W, et al. A Czechoslovakian teenager with Hb E- β^0 -thalassemia [IVS-I-1 (G $\rightarrow$ A)] complicated by the presence of an α -globin gene triplication. *Ann Hematol*, 1991;63(1):42-44.
23. Orkin SH, Goff SC, Hechtman RL. Mutation in an intervening sequence splice junction in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981;78(8):5041-5045.

RNDr. Martina Divoká

Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a FN Olomouc
Hněvotínská 3

775 15 Olomouc

email: martina.divoka@fnol.cz

Čestné prohlášení autora

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

Příloha č. 6: Sulovska et al, 2015

Sulovska L, Holub D, Zidova Z, **Divoká M**, Hajduch M, Mihal V, Vrbkova J, Horvathova M, Pospisilova D: Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015. DOI: 10.5507/bp.2015.054. [Epub ahead of print]. IF 1,2.

Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits

Lucie Sulovska^{a*}, Dusan Holub^{b*}, Zuzana Zidova^c, Martina Divoka^d, Marian Hajduch^b, Vladimir Mihal^a, Jana Vrbkova^b, Monika Horvathova^c, Dagmar Pospisilova^a

Background and Aims. Erythropoiesis is closely related to iron metabolism in a balanced homeostasis. Analyses of diverse erythroid and iron metabolism disorders have shown that disrupted erythropoiesis negatively affects iron homeostasis and vice versa. The aim of this study was to characterize the relationship between erythropoietic activity and iron homeostasis in pediatric patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits.

Methods. Selected markers of erythropoietic activity (erythropoietin, soluble transferrin receptor - sTfR and growth differentiation factor 15) and iron status parameters (serum iron, ferritin and hepcidin) were evaluated in pediatric patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits.

Results. The patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits had altered iron homeostasis due to disturbed erythropoiesis. In comparison with healthy controls, they had a normal to low hepcidin/ferritin ratio and concomitantly elevated sTfR.

Conclusion. The findings suggest that pediatric patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits are more susceptible to iron overload than the general population and that the (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio can be used to monitor any worsening of the disease.

Key words: hepcidin, erythropoietic activity, erythrocyte membrane defects, thalassemia trait

Received: June 15, 2015; Accepted with revision: October 16, 2015; Available online: October 27, 2015
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2015.054>

^aDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

^bInstitute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

^cDepartment of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

^dDepartment of Hemato-oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc,

*The authors contributed equally to this manuscript

Corresponding author: Monika Horvathova, e-mail: monika.horvathova@upol.cz

INTRODUCTION

Anemia, one of the most common pathological conditions of childhood, can adversely affect development owing to inappropriate oxygen supply to developing organs and tissues. The most frequent cause is nutritional iron deficiency known as iron deficiency anemia (IDA) which results in hypochromic and microcytic red blood cells. IDA however must be distinguished from inherited microcytic anemias, especially β -thalassemia, which is characterized by imbalanced production of globin chains. Anemia can also be associated with excessive destruction of red blood cells (hemolysis); the most common causes of inherited hemolytic anemia in the Czech population are erythrocyte membrane defects, predominantly hereditary spherocytosis.

Thalassemia

Thalassemias are a heterogeneous group of inherited disorders characterized by reduced or absent synthesis of one or several globin chains which are a part of the hemoglobin (Hb) molecule¹. Under physiological conditions, the ratio of α - and non- α -globin chains (i.e. predominantly β -globins in adults) in red blood cells is balanced (1:1).

A reduced amount of α - or β -globin chain produced by a mutant allele is referred as α^+ or β^+ thalassemia while a total absence of α - or β -globin chain production is called α^0 or β^0 thalassemia. The pathophysiology and clinical symptoms of thalassemia are related to the extent of imbalance between α - and β -globin chain synthesis. Heterozygous carriers of a β -thalassemia allele are usually asymptomatic, with hypochromic and microcytic erythrocytes, mild anemia accompanied by compensatory increase in the number of red blood cells (erythrocytosis) and slightly increased erythropoiesis in bone marrow. This type of thalassemia is known as β -thalassemia minor or β -thalassemia trait and represents the most common cause of hereditary microcytic anemia in the Czech Republic. More profound imbalance in α - and β -globin chain synthesis leads to β -thalassemia intermedia; patients exhibit moderate anemia with signs of hemolysis, ineffective erythropoiesis and splenomegaly. Some patients may require occasional transfusions. The incidence of β -thalassemia intermedia in the Czech Republic is very low. The most severe form of β -thalassemia is β -thalassemia major. Hb levels at diagnosis may be below 3.0 g/dL (normal range: 12.0 – 15.0 g/dL) and patients require regular transfusion therapy¹. To date, no cases of β -thalassemia major have

been reported in the Czech population but sporadic cases have been diagnosed in immigrants. The clinical picture of α -thalassemia is dependent on the degree of reduction of α -globin chain synthesis; i.e. on total number of mutated α -globin genes. Four α -globin genes are present in the normal diploid human genome. Individuals with deletion/inactivation of one allele are asymptomatic and considered silent carriers; the incidence in the Czech Republic may be relatively high. Individuals who inherit two mutant alleles are usually clinically asymptomatic with mild hypochromic microcytic anemia and slightly increased red blood cell count. This condition, called α -thalassemia minor or α -thalassemia trait, is relatively rare in the Czech Republic (M. Divoka, unpublished data). Hemoglobin H disease results from mutation affecting three α -globin genes and presents with moderate to severe anemia. Sporadic cases may be found in the Czech population. The inactivation of all four α -globin genes is lethal and leads to hydrops fetalis and fetal death².

Erythrocyte membrane defects

Hereditary defects of erythrocyte membrane proteins manifest as clinically and genetically heterogeneous disorders. The result is large numbers of abnormally shaped erythrocytes, i.e. spherical (for hereditary spherocytosis - HS) or elliptical (for hereditary elliptocytosis - HE) rather than the normal biconcave disk shape³. These abnormal erythrocytes have a shorter than average life-span for normal red blood cells and die prematurely. This leads to a compensatory increase in reticulocyte count which is more pronounced in HS than HE. The patient may be asymptomatic or present with varying degree of hemolytic anemia, increased serum bilirubin and splenomegaly. Transfusion therapy for the most severe cases of HS and HE may lead to iron overload which can cause severe health problems³.

Hepcidin and iron metabolism

Erythropoiesis and iron metabolism reciprocate in the coordinated supply of iron and globin synthesis, essential for normal red blood cell production. Analyses of diverse erythroid and iron metabolism disorders have shown that disrupted erythropoiesis negatively affects iron homeostasis and vice versa.

Iron (Fe) is vital for a number of metabolic processes, most importantly, oxygen transport as a part of the Hb molecule. However, because of its potential toxicity, iron levels must be strictly regulated. Hepcidin, the key molecule regulating plasma iron levels, is produced by hepatocytes⁴. Hepcidin binds to an iron exporter, ferroportin expressed in the cytoplasmic membrane. This induces ferroportin internalization and degradation, resulting in blocking iron release from sites of iron absorption (duodenal enterocytes), iron recycling (macrophages) and iron storage (hepatocytes). Hepcidin synthesis is stimulated in response to increased iron stores and inflammation. It is attenuated in response to iron deficiency and accelerated erythropoiesis due to anemia, ineffective erythropoiesis and hypoxia⁵. The molecules that induce hepcidin synthesis in response to increased iron levels and inflamma-

tion are relatively well-defined^{4,5}. On the other hand, the identity of negative regulators of hepcidin is still elusive. Growth differentiation factor 15 (GDF15) was proposed as a candidate molecule in the suppression of hepcidin production in patients with β -thalassemia⁶. Later analyses showed that GDF15 was elevated in disease states associated with ineffective erythropoiesis⁷. More recent data indicate the existence of other negative erythroid regulators of hepcidin synthesis⁸. It is accepted that these signals are released by erythroid precursors in bone marrow⁹ and override the signals of iron stores⁵.

Imbalances in iron metabolism (including hepcidin levels) and their interconnection with defective erythropoiesis have been widely studied in β -thalassemia (intermedia and major) (ref.¹⁰), congenital dyserythropoietic anemia¹¹, pyruvate kinase deficiency¹² and Diamond-Blackfan anemia¹³. In this study, we investigated the relationship between iron metabolism and erythropoietic activity in pediatric patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits.

MATERIALS AND METHODS

Characterization of the cohort

The cohort consisted of 20 patients with erythrocyte membrane defect (18 with HS and 2 with HE) (age range 2-18 years), 13 with thalassemia minor: 10 with the β -thalassemia trait and 3 with the α -thalassemia trait (age range 3-17 years) and 1 patient with thalassemia major (TM) (age 7 years), an immigrant from Moldova. Thalassemia carriers did not require any treatment. The patient with TM was on regular transfusion therapy (1 transfusion unit every three weeks). A control group included 47 children examined prior to planned minor surgery (inguinal or umbilical hernia, plastic surgery). The study and informed consent as per the Declaration of Helsinki were approved by the Ethics Committee of Palacky University Hospital, Olomouc, Czech Republic. None of the subjects had signs of an inflammatory process at the time of examination as documented by normal C-reactive protein (CRP) levels (not shown).

Hematological and biochemical analysis

Blood was taken during routinely performed venous puncture; for the TM patient a pre-transfusion sample was collected. Blood counts and erythrocyte characteristics were examined on Sysmex XE-500 analyzer (Sysmex) for all subjects included in the study. Biochemical serum parameters of iron metabolism and inflammation: serum iron (Fe), ferritin, transferrin saturation (TSAT), soluble transferrin receptor (sTfR) and CRP levels were determined using standard methods; for the control group, samples from 10 to 13 children were analyzed. The serum erythropoietin (EPO) concentration was measured by a solid-phase chemiluminescent immunochemical reaction¹⁴. Laboratory reference values are given for EPO instead of direct control group measurements.

The diagnosis of HS and HE was made on the basis of elevated bilirubin levels (mean 29 μ mol/L, patients range

8–70 $\mu\text{mol/L}$, normal range 5–21 $\mu\text{mol/L}$), positive results of cryohemolysis test and blood smear assessment. Thalassemias were diagnosed on the basis of hemoglobin electrophoresis and globin gene Sanger sequencing¹⁵.

Hepcidin analysis

The serum hepcidin levels were measured by reverse-phase liquid chromatography using the UltiMate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) coupled to the QTRAP 5500 mass spectrometer (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) as we previously described¹². Hepcidin was determined for 47 healthy controls, 12 thalassemia carriers and 20 patients with erythrocyte membrane defect.

GDF15 measurements

The serum levels of growth differentiation factor 15 (GDF15) were quantified according to the manufacturer's instructions using the Human GDF15 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). GDF15 measurements were performed on 9 thalassemia carriers and 11 patients with erythrocyte membrane defect.

Statistical analysis

ANOVA and Dunnett's test for normally distributed variables or non-parametric Kruskal-Wallis test with multiple comparisons were used for the statistical evaluation. All statistical analyses were done using the STATISTICA, (StatSoft, Inc., software version 12). The significance level was set at 5% for all analyses.

RESULTS

Hematological data and erythropoietic activity

We first analyzed the hematological data. Carriers of α -thalassemia were evaluated together with β -thalassemia carriers due to similarities in clinical picture. They showed mild to severe anemia with a compensatory increase in RBC counts (Table 1). Hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were significantly lower compared to healthy controls. In the erythrocyte membrane defect group, the anemia was milder, with significantly reduced RBC count

Table 1. Hematological parameters.

	Controls	Thalassemia carriers	Erythrocyte membrane defects	Thalassemia major
RBC ($10^{12}/\text{L}$)	4.78 $\pm$ 0.60	5.55** $\pm$ 0.315	4.23* $\pm$ 0.71	2.97
Hb (g/dL)	13.0 $\pm$ 1.3	10.6*** $\pm$ 1.1	12.0 $\pm$ 1.9	8.2
MCV (fL)	82.56 $\pm$ 6.87	59.1*** $\pm$ 5.68	79.1 $\pm$ 5.73	79.8
MCH (pg)	28.29 $\pm$ 2.62	19.23*** $\pm$ 2.27	28.45 $\pm$ 1.86	27.6
MCHC (g/dL)	34.32 $\pm$ 1.22	32.46* $\pm$ 1.21	36.09** $\pm$ 0.87	34.6
Ret (ratio)	0.010 $\pm$ 0.003	0.012 $\pm$ 0.004	0.066*** $\pm$ 0.045	0.012

Values are shown as means $\pm$ SD; single values are given for the patient with thalassemia major. RBC, red blood cells count; Hb, hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration, Ret, reticulocytes count. Statistical significance relative to control group: * P value<0.05; ** P value<0.01; *** P value<0.001.

Table 2. Parameters of erythropoietic activity.

	Controls	Thalassemia carriers	Erythrocyte membrane defects	Thalassemia major
sTfR (mg/L)	3.7 $\pm$ 0.74	6.89 $\pm$ 5.02	9.58** $\pm$ 4.89	19
EPO (IU/L)	[4.3-29] ⁺	18.0 $\pm$ 22.67	34.04 $\pm$ 30.45	> 4000
GDF 15 (pg/mL)	205 $\pm$ 27	653** $\pm$ 545	387 $\pm$ 131	8316.7

Values are shown as means $\pm$ SD; single values are given for the patient with thalassemia major. sTfR, soluble transferrin receptor; EPO, erythropoietin; GDF 15, growth differentiation factor 15; + reference range. Statistical significance relative to control group: ** P value<0.01.

Table 3. Iron status parameters.

	Controls	Thalassemia carriers	Erythrocyte membrane defects	Thalassemia major
%TSAT	33.07 $\pm$ 14.09	30.9 $\pm$ 10.86	29.05 $\pm$ 10.22	59.9
Serum Fe ($\mu\text{M/L}$)	20.87 $\pm$ 8.37	16.75 $\pm$ 5.57	15.04 $\pm$ 4.57	22
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	34.62 $\pm$ 20.1	40.23 $\pm$ 39.15	99.54** $\pm$ 45.52	2872
Hepcidin (ng/mL)	25.86 $\pm$ 26.46	14.73 $\pm$ 14.27	15.34 $\pm$ 16.56	56.2
Hepcidin/ferritin	0.658 $\pm$ 0.564	0.341 $\pm$ 0.149	0.177** $\pm$ 0.173	0.02
(hepcidin/ferritin)/sTfR	0.184 $\pm$ 0.189	0.072 $\pm$ 0.050	0.023*** $\pm$ 0.021	0.001

Values are shown as means $\pm$ SD; single values are given for the patient with thalassemia major. TSAT, transferrin saturation; Fe, iron; sTfR, soluble transferrin receptor. Statistical significance relative to control group: ** P value<0.01, *** P value<0.001.

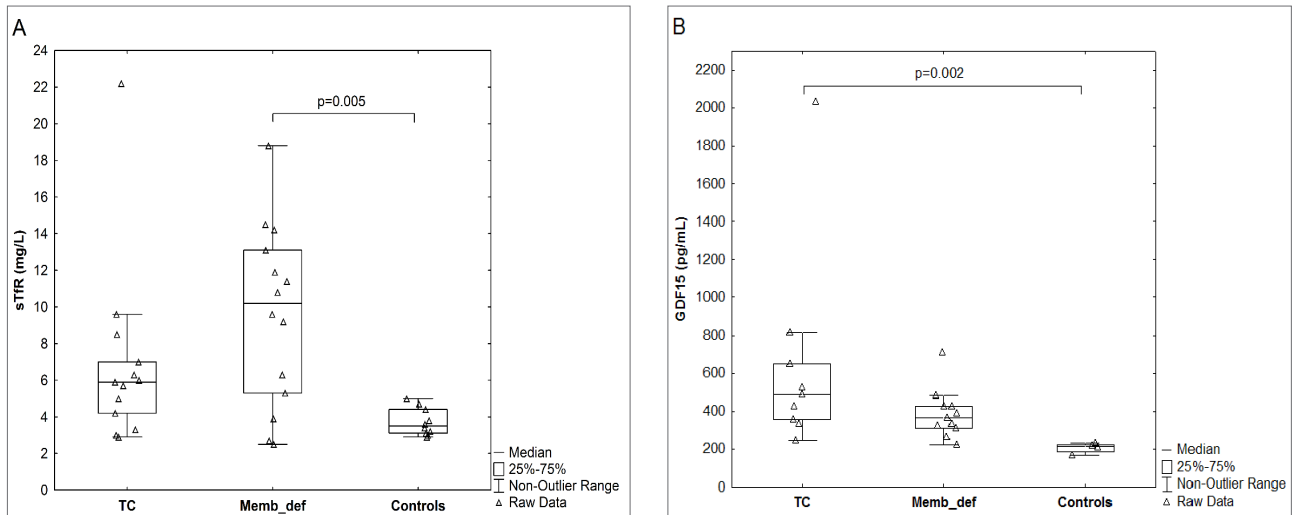


Fig. 1. Elevated markers of erythropoietic activity. (A) sTfR was increased in both patients' groups when compared to the controls (n=9), but only in patients with erythrocyte membrane defect (Memb_def; n=14) the difference reached statistical significance; thalassemia carriers (TC, n=13). (B) The elevation of GDF15 in comparison to the controls was significant for TC (n=9), but not for Memb_def (n=11). sTfR, soluble transferrin receptor; GDF15, growth differentiation factor 15. The graphs show individual values (triangles), 25-75% range with median (box and horizontal line, respectively) and the non-outlier range (the highest and the lowest whiskers, respectively).

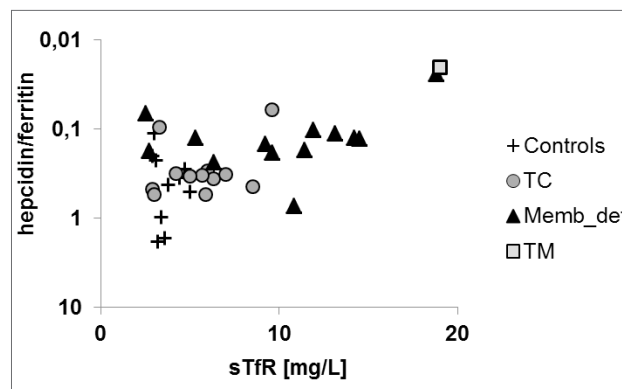


Fig. 2. Differentiation of patients based on the plot of hepcidin/ferritin ratio against sTfR¹⁵. Patients with erythrocyte membrane defect (Memb_def, n=13), thalassemia carriers (TC, n=12) and thalassemia major (TM, n=1) dislocate from healthy controls (n=9).

and moderate changes in RBC characteristics (Table 1) with the exception of MCHC, which was significantly increased. In addition, compensatory reticulocytosis in response to chronic hemolysis was observed in the majority of patients with erythrocyte membrane defect causing the number of reticulocytes to be significantly different from the control group (Table 1).

We next examined the markers of erythropoietic activity, i.e. serum erythropoietin (EPO) and soluble transferrin receptor (sTfR). EPO was elevated above the reference range (4.3 - 29 IU/L) only in the group of erythrocyte membrane defects (mean 34 IU/L, Table 2); in thalassemia carriers the mean value fell within the reference range (mean 18.0 IU/L, Table 2). sTfR was also significantly higher for patients with erythrocyte membrane defect (mean 9.58 mg/L) than in healthy controls (3.7 mg/L, Table 2 and Fig. 1A). In the thalassemia carriers' group mean sTfR (6.89 mg/L) was 1.9 times higher than mean sTfR of the controls (Table 2 and Fig. 1A).

Although the difference was not statistically significant, 10 out of 13 thalassemia carriers had sTfR above the mean control value (Fig. 1A). This indicates increased erythropoietic activity in the bone marrow of thalassemia carriers and patients with erythrocyte membrane defect. To assess the degree of ineffective erythropoiesis^{16,17}, serum growth differentiation factor 15 (GDF15) was measured using ELISA. The mean GDF15 level was increased in both groups (thalassemia carriers, 653 pg/mL; erythrocyte membrane defects, 387 pg/mL) compared to the controls (205 pg/mL), but only in thalassemia carriers did the difference reach statistical significance (Table 2 and Fig. 1B).

Our only patient with thalassemia major (TM), who is a Moldovan immigrant living in the Czech Republic,

presented with the most severe anemia (Hb of 8.2 g/dL), reduced RBC number, elevated sTfR and EPO levels and the highest GDF15 (Table 1 and 2).

Iron status and hepcidin

To assess any disturbance in iron homeostasis, selected parameters of iron metabolism were evaluated. As shown in Table 3, serum iron (sFe) and transferrin saturation (TSAT) were comparable in all groups. Patients with erythrocyte membrane defect had significantly increased levels of serum ferritin (mean 99.54 µg/L; mean for controls, 34.62 µg/L). Ferritin levels of thalassemia carriers did not differ from healthy controls (Table 3). Hepcidin levels were reduced in thalassemia carriers (mean 14.73 ng/mL) and erythrocyte membrane defects (mean 15.34 ng/mL) compared to controls (mean 25.86 ng/mL, Table 3), but this was not statistically significant. We therefore calculated the hepcidin/ferritin ratio which represents a measure of appropriate response of hepcidin to iron stores. As shown in Table 3, this ratio was significantly lower in the erythrocyte membrane defects group (0.177) compared to healthy individuals (0.658). The reduction of hepcidin/ferritin ratio in thalassemia carriers (to 0.341) reached only borderline statistical significance; even though it was twice as low as in the controls. This indicates inappropriate suppression of hepcidin synthesis.

Along with the changes in hematological parameters, alterations in iron status in our TM patient was consistent with the data published on large cohorts of TM patients^{10,18,19}. She showed normal sFe, but significant hyperferritinemia (ferritin level of 2872 µg/L, Table 3). Her serum hepcidin was twice as high (56.2 ng/mL) as in healthy controls (25.86 ng/mL). However, the hepcidin/ferritin ratio, which was 0.02 (control hepcidin/ferritin ratio is 0.658) indicated that hepcidin was disproportionately low with respect to iron loading (Table 3).

Finally, we calculated the ratio of (hepcidin/ferritin) to sTfR which combines the parameters of iron status and erythropoietic activity. Recently, it has been suggested that this formula distinguishes adult thalassemia carriers from healthy controls and reflects the severity of the anemia²⁰. As shown in Table 3, this ratio is reduced in both thalassemia carrier group (0.072) and erythrocyte membrane defects (0.023) compared to healthy individuals (0.184) confirming disordered interaction between iron metabolism and erythropoiesis. When sTfR is plotted against the hepcidin/ferritin ratio, thalassemia carriers and patients with erythrocyte membrane defect, tend to diverge from controls (Fig. 2); showing slight to moderate reduction in hepcidin/ferritin ratio and concomitant increase in sTfR that is consistent with accelerated bone marrow erythropoiesis. The TM patient had the lowest (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio (0.001) and can be found in the upper right corner on the graph plotting sTfR against hepcidin/ferritin with the lowest hepcidin/ferritin and highest sTfR (Fig. 2). This result confirms increased bone marrow erythropoiesis and inadequate suppression of hepcidin to the degree of iron loading.

DISCUSSION

A number of congenital anemias are coupled with disrupted iron balance and secondary iron overload. The molecular pathophysiology involves suppression of hepcidin; the key molecule inhibiting iron absorption and recycling²¹. An important finding is that erythroid signals dominate over iron store signals⁵. As a result, patients with ineffective erythropoiesis and concomitantly increased iron levels have inappropriately low hepcidin with respect to iron loading which leads to the accumulation of excessive iron in parenchymal tissues. These relatively suppressed hepcidin levels, explain iron overload in patients with β -thalassemia intermedia that are transfusion independent¹⁸. On the other hand, the primary cause of iron overload in β -thalassemia major is regular transfusion therapy; hepcidin is higher than in β -thalassemia intermedia due to the suppressive effect of transfusions on ineffective erythropoiesis¹⁹. Recently, it was shown that carriers of β - or α -thalassemia allele too, have altered iron metabolism parameters and erythropoiesis despite the absence of clinical symptoms^{20,22}.

In this study, we analyzed for the first time, whether and how disrupted erythropoiesis in erythrocyte membrane defects, namely HS and HE, influences iron metabolism. The anemia in these patients was hyperchromic and milder than for thalassemia carriers. Due to chronic hemolysis it was accompanied by increased reticulocyte count. However, serum EPO was higher than in thalassemia carriers and together with significantly elevated sTfR, reflected increased erythropoietic activity in the bone marrow. In addition, slightly increased levels of GDF15 indicated some degree of ineffective erythropoiesis⁷.

The evaluation of parameters of iron metabolism revealed normal serum Fe, but significantly elevated ferritin levels. As in thalassemia carriers, hepcidin and hepcidin/ferritin ratio were reduced 1.7 and 3.7 times, respectively, compared to the controls. The patients with erythrocyte membrane defects also had a significantly lower (hepcidin/ferritin)/sTfR index than controls and dislocated from them on the graph when sTfR was plotted against hepcidin/ferritin. The erythrocyte membrane defects were shifted more to the top right on the graph than thalassemia carriers indicating more pronounced disruption in the erythropoiesis-hepcidin-iron stores axis. These results also suggest that hepcidin synthesis is inappropriately attenuated in patients with HS and HE. The direct signals need to be identified because hepcidin inhibition by EPO is indirect and requires active bone marrow erythropoiesis^{13,23,24} and GDF15 is considered a marker of ineffective erythropoiesis rather than the main suppressor of hepcidin¹⁷. Very promising is the description of an erythroid regulator, named erythroferone which stimulates hepcidin synthesis in response to chronic bleeding and EPO administration⁸. The human assay for erythroferone measurements which would enable us to determine its levels under physiological and different pathological conditions, including erythrocyte membrane defects, is currently under development.

We also showed that pediatric thalassemia carriers have altered RBC parameters; raised RBC count and reduced Hb level, MCV, MCH and MCHC. Elevated sTfR and GDF15 indicate increased but ineffective erythropoiesis in the bone marrow. Similar data were recently published for schoolchildren with β -thalassemia trait from Sri Lanka²² and also for adult thalassemia carriers²⁰. However, the study on adult thalassemia carriers showed that the β -thalassemia trait is associated with more profound negative effects on erythropoiesis than the α -thalassemia trait²⁰. We were unable to make such a comparison because of only three α -thalassemia carriers included in our cohort. Although their parameters were comparable with β -thalassemia carriers, it will be important to analyze larger numbers of children with α -thalassemia trait to draw final conclusions. Alternatively, the clinical and laboratory difference between α - and β -thalassemia carriers may become more obvious over time. It is also likely that the difference reflects the heterogeneity at the molecular level; mutant alleles causing more profound imbalance in globin production would be associated with more severe alteration in erythropoiesis.

In the thalassemia carrier group, all individuals were iron replete with sFe and ferritin indistinguishable from healthy controls. However, they showed reduced hepcidin levels and reduced hepcidin/ferritin ratio (both parameters approximately twice). These results are consistent with the data obtained on pediatric β -thalassemia carriers from Sri Lanka²². On the other hand, Guimaraes et al.²⁰ found that only adult α -thalassemia carriers had significantly decreased hepcidin, while hepcidin of adult β -thalassemia carriers was insignificantly higher than in controls. Again, we cannot draw any conclusions due to the minimal number of α -thalassemia carriers we analyzed. The differences between β -thalassemia carriers may again reflect differences between pediatric age and adulthood or may eventually be also influenced by variable severity of the different β -thalassemia alleles. Nevertheless, when the hepcidin/ferritin ratio was plotted against sTfR, our thalassemia carriers dislocate from the control group like the α - and β -thalassemia carriers in Guimaraes's study²⁰. This result is consistent with the altered erythropoiesis and iron homeostasis in the thalassemia trait.

The clinical picture of anemia and the hematological and biochemical laboratory findings of our patient with TM were in agreement with the published data on TM subjects, including inappropriate suppression of hepcidin with respect to the degree of iron overload¹⁸. The low hepcidin/ferritin ratio and elevated sTfR and GDF15 reflect increased ineffective erythropoiesis which signals higher iron demand leading to increased iron absorption and recycling. This is consistent with the finding that iron overload in TM is a result of regular transfusion therapy and disturbed hepcidin synthesis¹⁹.

CONCLUSIONS

Pediatric patients with erythrocyte membrane defect and thalassemia carriers showed alterations in erythro-

poiesis and iron metabolism. The regulation of iron homeostasis appeared to be more disbalanced in erythrocyte membrane defects than in thalassemia carriers, but to a lesser extent than in the TM subject. We propose that the degree of alteration may reflect the severity of disease-causing mutation. We confirmed the results of Guimarães et al.²⁰, that the (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio distinguishes thalassemia carriers from healthy controls and showed that it also differentiates patients with erythrocyte membrane defect. We propose that these individuals may be more susceptible to iron overload than the general population. As suggested for thalassemia carriers²⁰, the (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio can be used to follow up patients with erythrocyte membrane defects for evolution of the disease with a focus on alterations in erythropoietic activity and potential risk of iron overload. This ratio may also eventually help to make treatment choices including timing of splenectomy in patients with erythrocyte membrane defect and excessive hemolysis.

ACKNOWLEDGEMENT

The work was supported by the Ministry of Health Czech Republic, grant num.: NT13587, MHO and DP were supported by Czech Science Foundation, grant num.: 15-13732S; MHO and ZZ were supported by the Internal Grant of Palacky University, grant num.: LF_2015_015.

Author contributions: LS: data collection and analysis, contributed to GDF15 measurements, manuscript writing; DH: measured the levels of hepcidin; ZZ: determined GDF-15 levels; MD performed Hb electrophoresis, Sanger sequencing and cryohemolysis tests; MHA: responsibility for the hepcidin assay; VM: collected the patients' material and provided clinical information; JV: performed statistical analyses; MHO, DP: study design, results interpretation; All authors contributed to the editing of the manuscript.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

1. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet* 2001;2(4):245-55.
2. Piel FB, Weatherall DJ. The α -thalassaemias. *N Engl J Med* 2014;371(20):1908-16.
3. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol* 2008;141(3):367-75.
4. Ganz T. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004;11:251-4.
5. Ganz T and Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 2011;62:347-60.
6. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Eling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S, Miller JL. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13(9):1096-101.
7. Tanno T, Miller JL. Iron loading and overloading due to ineffective erythropoiesis. *Adv Hematol* 2010;2010:358283.
8. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46(7):678-84.

9. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* 1994;84(6):1697-702.
10. Nemeth E. Hepcidin in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1202:31-5.
11. Shalev H, Perez-Avraham G, Kapelushnik J, Levi I, Rabinovich A, Swinkels DW, Brasse-Lagnel C, Tamary H. High levels of soluble serum hemojuvelin in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Eur J Haematol* 2013;90(1):31-6.
12. Mojzíkova R, Koralkova P, Holub D, Zidova Z, Pospisilova D, Cermak J, Striezencova L, Laluhova Z, Indrak K, Sukova M, Partschova M, Kucerova J, Horvathova M, Divoky V. Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios. *Br J Haematol* 2014;165(4):556-63.
13. Pospisilova D, Holub D, Zidova Z, Sulovska L, Houda J, Mihal V, Hadacova I, Radova L, Dzubak P, Hajdich M, Divoky V, Horvathova M. Hepcidin levels in Diamond-Blackfan anemia reflect erythropoietic activity and transfusion dependency. *Haematologica* 2014;99(7):e118-21.
14. Zadrazil J, Horak P, Horcicka V, Zahalkova J, Strebl P, Hruby M. Endogenous erythropoietin levels and anemia in long-term renal transplant recipients. *Kidney and Blood Pressure Research* 2007;30(2):108-16.
15. Divoky V, Walczyskova S, Pospisilova D, Priwitzerova M, Takacova S, Kostecka I, Divoka M, Rozmanova S, Jarosova M, Cermak J, Indrak K. [Rare forms of hereditary anaemia in the Czech and Slovak populations – β - and $\delta\beta$ -thalassaemia and unstable haemoglobin variants] *Vnitr Lek* 2005;51:886-93.
16. Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol* 2010;17(3):184-90.
17. Ronzoni L, Sonzogni L, Duca L, Graziadei G, Cappellini MD, Ferru E. Growth Differentiation Factor 15 expression and regulation during erythroid differentiation in non-transfusion dependent thalassemia. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54(1):26-8.
18. Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, Nemeth E. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica* 2007;92(5):583-8.
19. Pasricha SR, Frazer DM, Bowden DK, Anderson GJ. Transfusion suppresses erythropoiesis and increases hepcidin in adult patients with β -thalassemia major: a longitudinal study. *Blood* 2013;122(1):124-33.
20. Guimarães JS, Cominal JG, Silva-Pinto AC, Olbina G, Ginzburg YZ, Nandi V, Westerman M, Rivella S, de Souza AM. Altered erythropoiesis and iron metabolism in carriers of thalassemia. *Eur J Haematol* 2015;94(6):511-8.
21. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis J, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 2005;105(10):4103-5.
22. Jones E, Pasricha SR, Allen A, Evans P, Fisher CA, Wray K, Premawardhana A, Bandara D, Perera A, Webster C, Sturges P, Olivieri NF, St Pierre T, Armitage AE, Porter JB, Weatherall DJ, Drakesmith H. Hepcidin is suppressed by erythropoiesis in hemoglobin E β -thalassemia and β -thalassemia trait. *Blood* 2015;125(5):873-80.
23. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006;55(6):667-74.
24. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108(12):3730-5.

Příloha č. 7: Konferenční příspěvky (abstrakta a postery)



haematologica

the hematology journal

16th Congress of
the European Hematology Association
London, United Kingdom, June 9 - 12, 2011

ABSTRACT BOOK

2011 | s2

ISSN 0390-6078

Journal of the European Hematology Association
Published by the Ferrata-Storti Foundation, Pavia, Italy
Volume 96, supplement no. 2, June 2011
www.haematologica.org



Background. Thalassemia is a group of inherited disorders of haemoglobins characterised by a significant decrease in the rate of synthesis of one or more globin chains, which in beta thalassemia will be the beta chain. In adults the haemoglobin A2 (HbA2) comprises 2-3.5% of total haemoglobin. In some patients the proportion of HbA2 is raised. This is diagnostic for beta thalassemia trait, but can also be seen in some unstable haemoglobins. Mutations which cause decreased β -globin gene expression are classified as either β^+ (reduced level of β -globin synthesis) or β^0 (no β -globin synthesis). Aim In this study the HbA2 was quantified using two different methods, capillary zone electrophoresis (CE) and high-pressure liquid chromatography (HPLC). The results were correlated with the mutations found via β globin gene sequencing in order to establish whether or not quantitation of HbA2 by either method can be used to predict the β -globin mutation type (β^+ or β^0). Method The CE, HPLC and β globin gene sequencing were used to evaluate a total of 31 subjects with HbA2 > 3.5% (indicative of beta thalassemia trait). Results The HbA2 results produced by CE were statistically significantly lower than those obtained by HPLC when compared using a paired t-test ($p = < 0.001$). Three of the thirty one patients were found not to have any common beta globin gene mutations, but were included as the HPLC showed an HbA2 percentage of 3.6, 3.7 and 3.9 respectively. Out of the 31 patients, 8 cases were diagnosed as having heterozygous β^0 mutations including 4 patients with codons 41/42 (-TTCT) mutations, 2 patients with codons 8/9 (+G) mutations, 1 patient with a codon 15 (-T) mutation and 1 patient with a codon 39 (CAG-TAG) mutation. Twenty patients were found to be heterozygous for β^+ mutations including 8 patients with IVS-1-5 (G-C) mutations, 6 patients with IVS-1-110 (G-A) mutations, 3 patients with -29 (A-G) mutations, 2 patients with -88 (C-T) mutations and 1 patient with an IVS-I-6 (T-C) mutation. When compared using the students t-test there was no difference between the HbA2 results obtained using HPLC for the β^+ and β^0 mutations cohorts ($p = 0.06$). The same comparison performed using the HbA2 results obtained using CE showed a statistically significant difference between the β^+ and β^0 mutation cohorts ($p = 0.02$). The predictive values of the measurement of HbA2 in establishing whether a patient has a β^+ or β^0 mutation calculated using Receiver operating characteristic (ROC) curves are 0.701 and 0.763 for HPLC and CE respectively. **Summary/Conclusion.** From the results of this study the CE is more sensitive in distinguishing between β^+ and β^0 mutations. Although this difference is relatively modest it is suggestive of a trend which may be more profound if the cohort was larger. The HbA2 level was significantly lower with the CE analyser. No attempt was made to compare the different β^+ and β^0 mutations as the sample size was insufficient.

1593

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BETA-THALASSEMIA AND HEMOGLOBIN VARIANTS IN THE CZECH AND SLOVAK POPULATIONS: AN UPDATE

M Divoka,¹ M Partschova,² R Mojzíkova,² L Piterkova,²
M Horvathova,² J Cermak,³ D Pospisilova,¹ K Indrak,¹ V Divoky²
¹Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic
²Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc, Czech Republic
³Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

Background. β -thalassemia is considered to be a rare disorder in Middle Europe. Similarly to other non-malaria regions, the presence of β -thalassemia in Middle Europe reflects the historical as well as recent immigration and demographic changes that have influenced the genetic variability of the current populations living in this area. **Aims.** To assess the frequency and spectrum of mutations on the β -globin gene in Czech and Slovak patients with clinical symptoms of β -thalassemia or $\delta\beta$ -thalassemia. The results of the initial part of this research were published almost two decades ago (Indrak et al., Hum Genet 1992; 88: 399-404) and the aim of this work was to update this original report. Patients and Methods: Nearly 380 cases from seven hematological centers of Czech and Slovak Republics were analyzed. Blood samples were available for blood cell count measurements, hemoglobin (Hb) electrophoresis, chromatography and for genetic analyses. **Results.** Twenty-two β -thalassemia mutations were identified in more than 260 heterozygotes from 152 unrelated families of Czech or Slovak descent. Most of the mutations were of Mediterranean origin and accounted for 70% of patients. Newly discovered insertion of transposable element L1 into the β -globin gene represents a novel etiology of β -thalassemia due to a silencing effect of repressive chromatin associated with retrotransposon insertion (Piterkova et al, Haematologica 2011; 96(s2): 417-8, (EHA meeting abstract)). The list of abnormal hemoglobins now contains 14 β -globin variants, involving the rare high oxygen affinity Hb Olomouc associat-

ed with familiar polycythemia and two unique Heinz body hemolytic anemia variants (unstable Hb Hradec Kralove and Hb Hana). **Conclusions.** In the Czech and Slovak populations, β -thalassemia appears to be an uncommon disorder, which, however, must be considered as the prevailing cause of congenital hypochromic microcytic anemia. All but four studied patients were heterozygous carriers, manifesting thalassemia minor, with rare exceptions of dominantly inherited β -thalassemia with phenotype that ranged from severe thalassemia minor to thalassemia intermedia. Three of the four homozygous or double-heterozygous β -thalassemia patients were recent immigrants from malaria countries. Genetic drift and migration in the past as well as recent immigration are responsible for introduction of the Mediterranean alleles, while several mutations, described in single families, originated locally.

Funding. Supported by grants NT11208 and NS10281-3/2009 (Ministry of Health Czech Republic); MSM 6198959205 (Ministry of Education, Youth and Sports) of the Czech Republic; student projects LF_2011_006 and LF_2011_011 of the Palacky University.

1594

GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY A SINGLE INSTITUTION EXPERIENCE

K Palla, E Perraki
Chania General Hospital, Chania, Greece

Background. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G-6PD) is an X-linked disorder affecting red cell metabolism. Its distribution varies significantly among different geographic regions. In Greece where this disease is endemic, an estimated 225,000 males and 92,000 females are affected. The main clinical manifestations are acute hemolytic anemia and jaundice triggered by infection or ingestion of fava beans or oxidative drugs. **Aims.** To present data indicating the frequency of G6PD deficiency in the population admitted to the hospital of Chania city (Crete island) where there is extensive consumption of fresh or dried fava beans and previously have been reported several cases of favism. **Methods:** During 13 -year period (1997-2010), tests for the quantitative measurement of G-6PD activity by enzymatic colorimetric assay by a commercial kit (Trinity biotech, Menarini) were conducted on 1397 samples. Any individual with an activity below 4,6 (U/g Hb) and 146 (U/1012 RBC) was considered G-6PD deficient. **Results:** Of the 1397 (1030 males, 367 females) screened, 267 (147 males, 120 females) were children. Among children 14/267 (5, 24%) were immigrants and 32/267 (11,98%) were found to have G-6PD deficiency. Complete enzyme deficiency was shown in 19/267 (7,11%) males whereas 2/267 (0,74%) were immigrants. Moderate enzyme deficiency was identified in 13/267 (4, 86%) females. 4/267 (1, 49%) children were admitted to hospital with G6PD deficiency related acute hemolysis. The children with hemolysis were males, (2/5 were immigrants), younger than 5 years old and have consumed fava beans. Of the adults (220 males, 910 females) 65/1130 (5,75%) were deficient in G6PD. Complete enzyme deficiency was shown in 40/1130 (3,53%) males and 6/1130 (0,53%) were females. Moderate enzyme deficiency was identified in 19/1130 (1, 68%) females. The overall incidence of the deficiency in screened population (97/1397) was 6,94%. The rate among men was 59/1030 (5,73%) and among females, 38/367 (10,35%), with the male to female ratio 1:2. **Conclusion:** G6PD deficiency seems to affect more females than males. As neonatal screening for G6PD is long established in Greece, clinical cases of favism are observed rarely. Acute hemolysis was found only in young children. We believe that the screening with a comprehensive education program should be performed for young children in order to prevent the occurrence of hemolysis.

1595

THE ROLE OF REGULATORY T CELLS AND FOXP3 EXPRESSION IN GREEK B-THALASSEMIA MAJOR PATIENTS

E Farmaki, M Economou, E Vlachaki, V Tzimouli, A Kondou, A Taparkou, A Teli, V Perifanis, M Athanassiou-Metaxa
Aristotle University of Thessaloniki, 'Hippokraton' General Hospital, Thessaloniki, Greece

Background: The suppressive/immunomodulatory function of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T (Treg) cells is crucial for the maintenance of immune homeostasis. Although a large number of studies have been performed on immune status of patients with β -thalassemia major, including T and B-lymphocyte subpopulations, little information is available regarding the role of Treg cells in this patient group. **Aim:** The aim of the present study was to determine B cells and T cells subpopulations,



blood[®]



Advertisement



Molecular Characterization of Hemoglobinopathies and Red Cell Enzymopathies in the Czech and Slovak Populations: An Update

Martina Divoka, Renata Mojzikova, Lucie Piterkova, Pavla Pospisilova, Martina Partschova, Monika Horvathova, Dagmar Pospisilova, Zuzana Luluhova Striezencova, Jaroslav Cermak, Karel Indrak, Vladimir Divoky

Blood 2011 118:5307;

[Article](#)[Info & Metrics](#)[e-Letters](#)

Abstract

Abstract 5307

Background: Thalassemias are rare disorders in Middle Europe. However, as a result of historical and recent migration, thalassemias became common cause of congenital anemia in the Czech and Slovak populations. Abnormal hemoglobin variants and red-cell enzymopathies are rare cause of congenital anemia in this region.

The aim of this work was to update the original reports of this research published almost two decades ago (Indrak et al., Hum Genet 1992; 88:399-404, Xu et al., Blood 1995; 85:257-63, Lenzner et al., Blood 1997; 89:1793-9). We assessed the frequency and spectrum of β -globin gene mutations in the patients with clinical symptoms of β -thalassemia or δ,β -thalassemia, the α -globin gene status in the patients with clinical symptoms of α -thalassemia, and we characterized red cell enzymopathies on molecular level in the Czech and Slovak populations.

Patients and methods: Nearly 390 cases with clinical symptoms of thalassemia or hereditary nonspherocytic hemolytic anemia from several centers of Czech and Slovak Republic were analyzed. Hematological parameters, hemoglobin electrophoresis and enzyme activities were

measured by standard procedures. Genomic DNA was used for PCR–sequencing analysis.

Results: We identified 22 β -thalassemia mutations in more than 260 heterozygotes; most of the mutations were of Mediterranean origin. The newly discovered insertion of transposable element L1 into the HBB gene represents a novel etiology of β -thalassemia due to a silencing effect of repressive chromatin associated with retrotransposon insertion. The list of abnormal hemoglobins now contains 14 β -globin variants, involving Heinz body hemolytic anemia variant Hb Hana (β 63(E7) His–Asn), phenotype of which was worsened by concomitant partial glutathione reductase deficiency (Mojzikova et al., Blood Cells Mol Dis 2010; 45:219–22).

Several G6PD and PK variants were described in the Czech and Slovak populations; the G6PD variants include G6PD Olomouc, G6PD Varnsdorf and G6PD Praha. Recently, we identified a new frameshift mutation c. 1553delG (p. Arg518fs) at the homozygous state in exon 11 of the PKLR gene of the pediatric patient who suffered from transfusion dependent hemolytic anemia with Hb=9.4 g/dL, Ret=4.5%. His red cells PK activity was 4.52 IU/gHb (normal range 13–17 IU/gHb). The mutation occurs in C domain of PK–R subunit containing the binding site for fructose–1,6–bisphosphate. The patient's extremely elevated level of growth differentiation factor 15 (GDF15, 3577 pg/mL, healthy controls 231–345 pg/mL) could explain hereditary hemochromatosis and signs of iron overload in this patient.

Conclusions: In the Czech and Slovak populations, hemoglobinopathies and red–cell enzymopathies appear to be an uncommon disorder, which, however, must be considered as the prevailing cause of congenital anemia. Most of the thalassemia patients were heterozygous, manifesting thalassemia minor. Most of the hemoglobin variants were described in single families, some of them originated locally. Among hemolytic anemias due to red–cell enzymopathies is the most frequent PK deficiency.

This work was supported by grants NT11208, NS10281 (Ministry of Health Czech Republic), MSM6198959205 (Ministry of Education, Youth and Sports) and student projects LF_2011_006 and LF_2011_011 of the Palacky University.

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

© 2011 by The American Society of Hematology

[^ Back to top](#)

Advertisement

Alfa-talasemie diagnostikované v ČR na molekulární úrovni: nové diagnostické přístupy

M. Divoká¹, M. Kolářková¹, A. Lapčíková¹, V. Divoký², K. Indrák¹

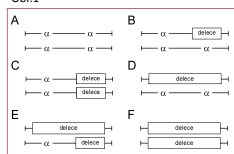
- 1) Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc
- 2) Ústav biologie LF UP Olomouc



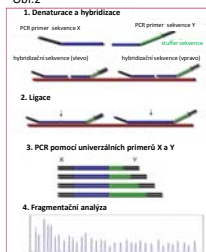
Úvod: Talasemie jsou nejčastější příčinou vrozených anémií spojených s poruchami globinové syntézy. Na rozdíl od β -talasemií, kde nacházíme převážně bodové mutace, jsou α -talasemie způsobené z 95 % delecemi úseků DNA HBA lokusu na 16. chromozomu (obr. 1). Na základě skriningových testů jsme vybrali skupinu 81 pacientů s normální hladinou HbA₂ a HbF a zároveň s nálezem v KO, který spolu s dalšími vyšetřeními podporoval diagnózu talasemie, a u kterých již dříve byla vyloučena β -talasemie. Vzorů nemocných jsme vyšetřili pomocí nově zavedených molekulárně-genetických metod (ASO-PCR, MLPA) na event. přítomnost α -talasemické delecce. Výsledky vyšetření jsou předmětem tohoto sdělení.

Metodika: Tradičně jsme pro analýzu HBA lokusu využívali technologie Southern blotu. Nově jsme zavedli alelově-specifickou PCR (ASO-PCR), která umožní identifikaci 6ti nejběžnějších α -talasemických mutací ($-\alpha 3.7$, $-\alpha 4.2$, $-\alpha 20.5$, $-\text{MED}$, $-\text{SEA}$, $-\text{FIL}$) (obr. 3). Relativně novou technologií molekulární diagnostiky je MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), která je založena na ligaci dvou sond a následující amplifikaci (obr. 2). MLPA slouží k detekci změn počtu kopií genových sekvencí – od malých (jednonukleotidových) delecí až po rozsáhlé delecce celého lokusu, ale i duplikací a amplifikací. Systém MLPA KIT P140_HBA (MRC-Holland) detekuje změny v počtu kopií u 24 různých sekvencí v rámci HBA lokusu.

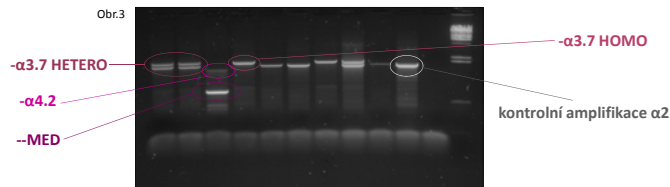
Obr.1



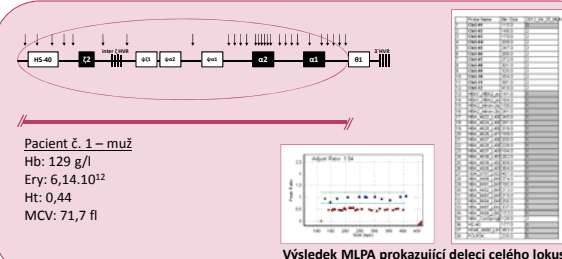
Obr.2



Obr.3



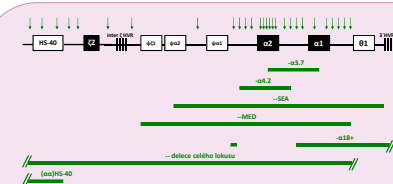
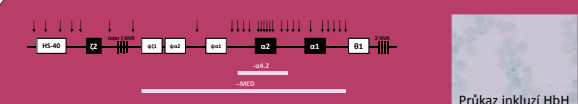
Výsledky



Pacient č. 2 – muž; Hb: 132 g/l; Ery: 6.29.10¹²; Ht: 0.42; MCV: 66.1 fl. Původní analýza Southern-blotovým mapováním lokusu odhalila novou 18+ kb α -talasemickou delecí zahrnující HBA1 gen (Indrák a kol., 1993). Výrazná mikrocytóza a hypochromie byla vysvětlena zastavením transkripce HBA2 genu represivním chromatinem, který se dostal díky 18+ kb delecí do blízkosti HBA2 genu (Barbour a kol, 2000).



MLPA potvrdila 18+ kb α -talasemickou delecí zahrnující HBA1 gen, ale navíc odhalila **krátkou delecí lokalizovanou mezi HBA2 a HBA1P geny**, popsanou nedávno v turecké populaci (Onay a kol., 2008, 2009). Tato krátká delecce nemohla být genetickým mapováním odhalena.



Souhrn výsledků:

typy delecí	počet pacientů
$-\alpha 3.7$	10
$-\alpha 3.7$ HOM	2
$-\text{SEA}$	8
delecce celého lokusu	3
delecce HS-40	1
kombinace $-\alpha 4.2/-\text{MED}$	1

Závěr:

První systematická analýza provedená na selektovaném souboru 81 nemocných odhalila novými diagnostickými přístupy 25 nemocných s delecemi v rámci α -globinového lokusu. V rámci analyzovaného souboru prezentujeme:

- **Prioritní popis** nemocných s α -talasemií způsobenou **rozsáhlou delecí celého HBA lokusu**, včetně regulační oblasti HS-40. Tyto typy delecí jsou jen velmi vzácně detekovány.
- V roce 1993 popsán pacient z ČR s **unikátní 18+ kb α -talasemickou delecí zahrnující HBA1 gen**, ale s **fenotypem odpovídajícím nefunkčnosti HBA1 i HBA2** má ještě další, dříve nerozpoznanou **krátkou delecí lokalizovanou mezi HBA2 a HBA1P geny**, která byla nedávno popsána z Turecka. Jak může tato krátká delecce (v *cis* nebo *trans* pozici) přispívat k výslednému fenotypu bude předmětem dalších funkčních studií.
- V ČR **prioritní genetickou analýzu** pacienta s **onemocněním HbH**. Jedná se o pacienta původem z Afriky s genotypem $-\alpha 4.2/-\text{MED}$.
- **Prioritní popis** pacienta z ČR s α -talasemií způsobenou **delecí regulační oblasti lokusu HS-40**, ale s intaktními α -globinovými geny. HS-40 region je nezbytný pro erytroidně-specifickou expresi genů α -globinového lokusu. Podobné typy delecí jsou velmi sporadicky detekovány v různých populacích. Heterogenita α -talasemií je v ČR zřejmě daleko větší než se dosud soudilo. Navíc, α -talasemické alely budou se stupňující se migrací v ČR postupně přibývat, a s tím bude stoupat i nutnost jejich přesné diagnostiky.

Poděkování: Lékařům hematologických pracovišť v České republice a na Slovensku za poskytnutí patientských vzorků a za spolupráci.

Podpořeno: IGA NT11208 a LF_2012_007.



Hemoglobinopatie v české a slovenské populaci



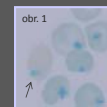
M. Divoká¹, M. Kolářková¹, J. Lipert¹, A. Novosadová¹, M. Orviská¹, A. Lapčíková¹, L. Láníková², M. Partschová², D. Pospíšilová³, V. Divoky², K. Indrák¹

1) Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc 2) Ústav biologie LF UP Olomouc 3) Dětská klinika FN a LF UP Olomouc

Úvod: Hemoglobinopatie (talasemie, strukturní hemoglobinové varianty) jsou nejrozšířenější monogenní dědičné nemoci na světě, ale ve střední Evropě je jejich výskyt vzácný. Přesto jsme v posledních letech v naší laboratoři diagnostikovali talasemické alely u téměř 300 rodin a strukturní Hb varianty u 40ti rodin. Předmětem našeho sdělení je shrnutí výsledků a popis některých případů vzácných vrozených anemií.

Metodika: Pro diagnostiku hemoglobinopatií v laboratoři používáme bioanalytické metody:

- stanovení hladiny HbA₂ chromatograficky na koloně
- stanovení hladiny HbF alkalickou denaturací
- elektroforézu hemoglobinu
- testy stability hemoglobinu (Heinzova tělíska – obr. 1, isopropanolový test)
- a molekulárně biologické přístupy:
- alelově specifická PCR (ASO-PCR)
- sekvenční analýza
- MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; MRC-Holland)



Shrnutí výsledků (2002- duben 2013)

α-talasemie

Pro detekci delecí v α-globinovém lokusu jsme zavedli ASO-PCR a MLPA HBA, čímž jsme nahradili dříve využívanou technologii Southern blotu. V posledních dvou letech jsme detekovali celkem 6 typů α-talasemických delecí zobrazených na schématu HBA lokusu (obr. 2) u 30 nepříbuzných rodin (tab. 1). Kromě běžných typů delecí jsme zjistili i delecce celého HBA lokusu nebo regulační oblasti HS-40, které jsou popisovány jen vzácně. U jedné pacientky původem z Afriky jsme detekovali onemocnění HbH (fenotyp -α4.2/-MED).



TYPY DELECÍ	POČET RODIN
-α3.7	14
-α3.7 HOM	4
-SEA	7
delecce celého lokusu	3
delecce HS-40	1
kombinace -α4.2/-MED	1

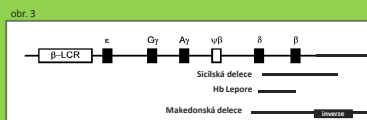
Strukturní hemoglobinové varianty

Doposud jsme detekovali 15 β-globinových hemoglobinových variant (tab. 2) u 40ti nepříbuzných rodin českého a slovenského původu, kromě HbS, který je vždy u imigrantů z Afriky, včetně dvou homozygotů se srpkovitou anémií.

Hb S	β6 (Glu→Val)	deoxy forma precipituje	normální
Hb E	β26 (Glu→Lys)	mírná nestabilita	mikrocytóza, talasemie minor
Hb C	β6 (Glu→Lys)	normální	mikrocytóza, talasemie minor
Hb Knossos	β27 (Ala→Ser)	normální	mikrocytóza, talasemie minor
Hb Monroe	β30 (Arg→Thr)	mírná nestabilita	mikrocytóza, talasemie minor
Hb Lepore	δβ-hybrid	normální	mikrocytóza, talasemie minor
Hb Saint Louis	β28 (Leu→Gln)	nestabilní, ↑ Met-Hb	HA, cyanóza
Hb Köln	β98 (Val→Met)	nestabilní	mírná HA
Hb Haná	β63 (His→Asn)	nestabilní, ↑ Met-Hb	HA u dcery, asympt. matka-kuřačka
Hb M-Saskatoon	β63 (His→Tyr)	nestabilní, Met-Hb	familiární cyanóza, methemoglobinémie
Hb Sydney	β67 (Val→Ala)	nestabilní	HA
Hb Santa Ana	β88 (Leu→Pro)	nestabilní	HA
Hb Nottingham	β98 (Val→Met)	nestabilní	těžká HA, transfúze
Hb Hradec Králové	β115 (Ala→Asp)	vysoce nestabilní	těžká HA, transfúze, talasemie intermedia
Hb Olomouc	β86 (Ala→Asp)	↑ O ₂ afinita	erytrocytóza

δ/β-talasemické delecce

Zjistili jsme 3 delecční typy δ/β-talasemie (obr. 3). Vedle relativně častých – Sicilských δ/β-talasemie a Hb Lepore jsme v roce 2012 identifikovali i vzácnou Makedonskou δ/β-talasemickou delecí u pacienta původem ze Středomoří. Prezентujeme zde jeho hematologická data (tab. 3), výsledek PCR (obr. 4) a MLPA analýzy (obr. 5) potvrzující kombinaci dvou deletovaných úseků DNA ohraničujících inverzi u Makedonské δ/β-tal.



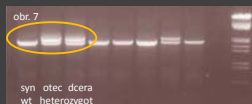
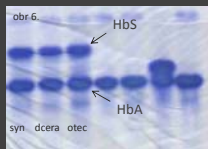
Hb (g/l)	135
ERY (10 ¹² /l)	6,41
Hematokrit	0,44
MCV (fl)	68,6
MCH (pg)	21,1
HbA ₂ (%)	2,3
HbF (%)	7
ELFO Hb	standardní



Kombinace HbS s α-talasemií u česko-afričské rodiny

Prezentujeme výsledky vyšetření u česko-afričské rodiny, kdy otec Afričan je nosič alely pro HbS, stejně tak jeho dvě děti (potvrzena přítomnost HbS chromatograficky i elektroforeticky (obr. 6), molekulárně geneticky pomocí sekvenční analýzy; tab. 5). Současně bylo detekováno na molekulární úrovni pomocí ASO-PCR (obr. 7) a MLPA u otce a jeho dcery tiché nosičství α-talasemie, konkrétně heterozygotní delecce -α3.7.

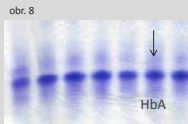
	OTEC	SYN	DCERA
Hb (g/l)	152	148	128
ERY (10 ¹² /l)	5,46	5,35	5,28
Hematokrit	0,49	0,46	0,41
MCV (fl)	89,4	86,5	77,3
MCH (pg)	27,8	27,7	24,2
HbA ₂ (%)	4,7	4,8	4,9
HbF (%)	0,4	0,2	0,3
HbS (%)	35	36	31
gen HBB	β6 (Glu→Val)	β6 (Glu→Val)	β6 (Glu→Val)
HBA lokus	-α3.7	negativní	-α3.7



Hemoglobin Monroe

Hemoglobin Monroe byl původně popsán jako vysoce nestabilní varianta s elektroforeticky nedetekovatelným mutantním hemoglobinem (obr. 8). Nedávno Agarwal a Prchal (Haematologica, 2007) ukázali, že nesmyslná mutace ve 30. kodonu β-globinového genu je především talasemická, vedoucí k výrazné redukci transkriptu. Tomu odpovídají i krevní obrazy našich nemocných, zvýšený HbA₂ (tab. 6) a nepřítomnost Heinzových tělísek.

Hb (g/l)	124
ERY (10 ¹² /l)	6,77
Hematokrit	0,39
MCV (fl)	57,5
MCH (pg)	18,3
HbA ₂ (%)	4,6
ELFO Hb	standardní



β-talasemie

Za posledních více než 10 let jsme detekovali β-talasemickou mutaci u 195 nepříbuzných rodin (341 heterozygotů) českého nebo slovenského původu. Většinou se jednalo o β-talasemii minor, výjimečně o β-talasemii intermedia. Ve dvou případech jsme potvrdili β-talasemii major (dvojitý heterozygot, imigranti z Afriky). Bylo detekováno celkem 24 typů β-talasemických mutací (tab. 4). U jedné rodiny byla popsána inserce L1 retrotranspononu do β-globinového genu jako nová etiologie vzniku β-talasemie z utlumení exprese hypermetylací DNA a deacetylací chromatinu v oblasti β-globin-L1 promotoru (Láníková et al, zasláno k publikaci).

TYPY MUTACÍ	POČET RODIN
IVS-1 (G-A)	52
IVS-110 (G-A)	37
CD 39 (C-T)	22
IVS-8-1 (G-A)	14
IVS-II-745 (C-G)	7
CD 38/39 (C-G)	7
IVS-1-6 (T-C)	21
CD 121 (G-T)	9
CD 8 (A-A)	5
CD 82/83 (T-G)	3
IVS-1-3 (G-C)	1
posice -87 (C-T)	4
CD 112 (T-A)	1
CD 7/8 (+G)	1
44 nt deletion	1
CD 5 (C-T)	1
CD 6 (A-A)	1
CD 41/42 (-TTCT)	3
CD 17 (A-T)	2
posice -86 (C-A)	1
CD 71/72 (+A)	1
Poly A (A-G)	1
posice -87 (C-G)	1
L1 inserce retrotranspononu	1

Závěr: Hemoglobinopatie jsou nejčastější příčinou vrozené anémie v ČR a na Slovensku. Se stupňující se migrací bude jejich výskyt postupně přibývat a s tím bude stoupat i nutnost jejich přesné diagnostiky (včetně prenatalní).

Poděkování: Lékařům hematologických pracovišť v České republice a na Slovensku za poskytnutí patientských vzorků a za spolupráci.

Podpořeno: IGA NT11208, IGA NT13587, LF_2013_004 a LF_2013_010

Heterogenita α -talasemických delecí v české populaci: potvrzení úlohy oblasti HS-40 v regulaci exprese α -globinových genů

M. Divoká¹, D. Pospíšilová³, A. Lapčíková¹, M. Kolářková¹, M. Orviská¹, J. Lipert¹, A. Novosadová¹, V. Divoký², K. Indrák¹

- 1) Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc
- 2) Ústav biologie LF UP Olomouc
- 3) Dětská klinika FN a LF Olomouc



Úvod: Alfa-talasemie jsou vrozené anémie s recesivní dědičností charakterizované kvantitativní redukcí syntézy α -globinových řetězců. Onemocnění je nejčastěji způsobeno delecemi úseků DNA v α -globinovém lokusu (HBA; obr. 1) na 16. chromozomu a vyznačuje se mikrocytární hypochromní anémií s různými fenotypovými stupni závažnosti.

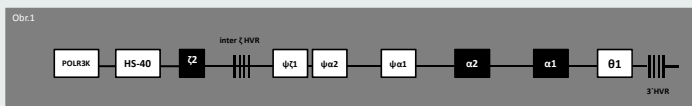
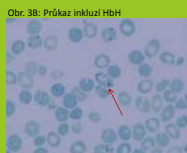
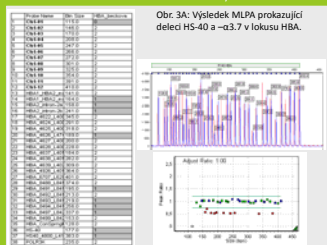
U α^+ talasemií je jeden ze dvou genů na chromozomu deletován ($-\alpha/\alpha;$) nebo inaktivován bodovou mutací. U α^0 talasemií jsou inaktivovány oba α -globinové geny na chromozomu, nejčastěji delecí, která postihuje část lokusu ($-\alpha/-\alpha;$) (obr. 2). Stejný efekt, tj. úplnou ztrátu exprese genů příslušného lokusu, má delecce regulační oblasti (human alpha globin upstream regulatory element, HS-40) v poloze *cis*. HS-40 se nachází více než 40 kb 5' od α -globinových genů, působí jako zesilovač genové exprese, nezbytný pro erytroidně-specifickou transkripci genů HBA lokusu.

Výsledky

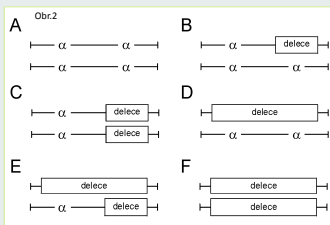
Delecce oblasti HS-40 byla detekována u 7 rodin (11 členů) s klinickými projevy odpovídajícími ztrátě dvou α -globinových genů (nosičství α -talasemie); u 1 rodiny s klinickými projevy odpovídajícími ztrátě tří α -globinových genů (choroba HbH); (obr. 3A, 3B, 3C). Molekulární analýzou nemocných jsme zjistili, že u 3 rodin (6 členů) se jednalo o rozsáhlé delecce celého HBA lokusu, včetně HS-40 (obr. 4). U 4 rodin (5 členů) jsme detekovali různé dlouhé delecce regulační oblasti HS-40, ale s intaktními α -globinovými geny (obr. 5A, 5B).

HbH onemocnění

Pacientka – žena (předkové pochází z Itálie). Hb: 87 g/l; Ery: $4,96 \cdot 10^{12}$; Ht: 0,29; MCV: 59,3 fl.; hladina HbA₁: 1,3 %; hladina HbF: 0,5 %; ELFO Hb: standardní spektrum (HbH nelze detekovat elektroforeticky); Heinzova tělíska: pozitivní, prokázány inkluze HbH. Pomocí MLPA zjištěny dvě různé delecce vedoucí k inaktivaci tří α -globinových genů a způsobující HbH onemocnění (delecce HS-40 na jednom chromozomu, na druhém chromozomu delecce $\sim 3,7$).



Metodika: Pro analýzu delecí HBA lokusu jsme vzorky vyšetřili pomocí technologie molekulární diagnostiky - MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), která je založena na ligaci dvou sond a následující amplifikaci. MLPA slouží k detekci změn počtu kopií genových sekvencí – od malých (jednonukleotidových) delecí až po rozsáhlé delecce celého lokusu, ale i duplikací a amplifikací. Systém MLPA KIT P140_HBA (MRC-Holland) detekuje změny v počtu kopií u 24 různých sekvencí v rámci HBA lokusu.



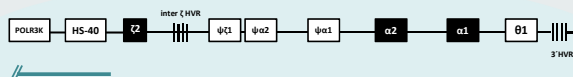
Soubor pacientů:

Vyšetřili jsme celkem 116 rodin (137 členů) s podezřením na α -talasemii (pacienti s normální hladinou HbA₁ a HbF a zároveň s nálezem v krevním obraze, který spolu s dalšími vyšetřeními podporoval diagnózu talasemie, a u kterých byla již dříve vyloučena β -talasemie). MLPA analýza odhalila u 50 rodin (55 nemocných) různé delecce v rámci HBA lokusu. Ve většině případů se jednalo o běžné typy delecí jednoho nebo dvou α -globinových genů, známé ze Středozeří nebo z jihovýchodní Asie.

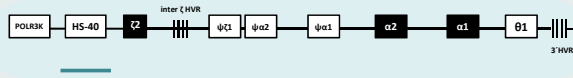
Obr.4: Schématické znázornění delecce celého HBA lokusu, včetně regulační oblasti HS-40.



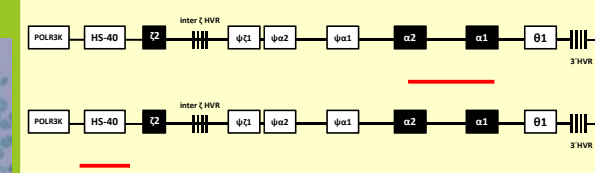
Obr.5A: Schématické znázornění delecce regulační oblasti HS-40 zahrnující oblast POLR3K v rámci HBA lokusu.



Obr.5B: Schématické znázornění krátké delecce samotné regulační oblasti HS-40 v rámci HBA lokusu.



Obr.3C: Schématické znázornění delecí v rámci HBA lokusu u pacientky s HbH.



Závěr:

V našem souboru 116 rodin s podezřením na α -talasemii jsme potvrdili delecce regulační oblasti HS-40 u 7 rodin (11 členů). Fenotyp odpovídající nosičství pro α^0 -talasemickou delecí byl u všech 11 nemocných stejný, nezávisle na tom, byly-li součástí delecce i oba α -globinové geny; jde tedy o potvrzení klíčové úlohy HS-40 v regulaci exprese α -globinových genů.

Mimořádný je případ dětské pacientky s HbH onemocněním způsobeným inaktivací dvou α -globinových genů delecí HS-40 na jednom chromozomu v kombinaci s delecí jednoho α -globinového genu na druhém chromozomu.

Naše studie poukazuje na neočekávanou heterogenitu α -talasemických mutací v české populaci a na nutnost správné a včasné diagnostiky tohoto onemocnění, založené na molekulárně-genetických analýzách.

Poděkování: Lékařům hematologickým pracovišť v České republice a na Slovensku za poskytnutí patientských vzorků a za spolupráci.

Podpořeno: IGA_LF_2014_001; IGA MZ ČR NT13587-4.