

Beta-Thalassemia and HB lepore heterozygotes: phenotype-genotype correlation

Citation for published version (APA):

de Sousa Ribeiro, M. L. (1997). *Beta-Thalassemia and HB lepore heterozygotes: phenotype-genotype correlation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19970613ms>

Document status and date:

Published: 01/01/1997

DOI:

[10.26481/dis.19970613ms](https://doi.org/10.26481/dis.19970613ms)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 9

SUMMARY	171
SAMENVATTING	177
CURRICULUM VITAE	181

CHAPTER 9

SUMMARY

The main objectives of the studies presented in this thesis are: **1)** the characterization of the Hb disorders in the Chinese population of Macao and of the β -thal mutations in the Portuguese and Spanish Alta Extremadura populations in order to establish the better strategy for prenatal diagnosis; **2)** the characterization of the Hb Lepore types in Portugal and Spanish Alta Extremadura and to establish the limits of their crossover regions; **3)** to study the effect of the β -thal mutations in the proximal and distal CACCC boxes of the β -globin gene promoter on the binding of nuclear proteins.

A review of the literature is presented in **Chapter 1**, which includes a short historical perspective of some of the more important achievements in the study of the Hb disorders. The ethnic distribution of the Hb disorders is presented, with special emphasis to their frequencies in the Mediterranean and Southeast Asian countries. The influence of malaria on the geographical distribution of the thalassemys and Hb S is briefly discussed. The more important clinical and hematological features of α -thal, β -thal, and abnormal Hbs are described in correlation with their pathophysiology. The structure and function of the globin genes, their organization and developmental expression is discussed together with the possible role of the *cis*- and *trans*-acting factors in the regulation of transcription. The common molecular basis of the thalassemys and Hb variants is reviewed in relation with their phenotypic expression. An appendix to this chapter provides an updated list of the known β -thal mutations.

The most relevant patient data and a description of the basic methodology used are presented in **Chapter 2**.

Chapter 3 provides data about the incidence of Hb disorders in Macao, Southeast Asia, and about the occurrence of several Hb variants and α - and β -thal alleles. The observed incidences are compared with those in Southern Chinese provinces. The implementation of an adequate prevention program and a prenatal diagnostic unit are discussed.

An incidence of $3.5 \pm 0.6\%$ was found for β -thal, and four different mutations; namely, IVS-II-654 (C \rightarrow T), CDs 41/42 (-TTCT), -28 (A \rightarrow G), -29 (A \rightarrow G), were identified. The first two account for 80% of the alleles. The incidence of α -thal was estimated at $6.2 \pm 0.4\%$, the α -thal-1 (SEA) and α -thal-2 (3.7 kb) deletions being the most common. Hb H disease, with a mild clinical phenotype, was found in 23 patients. The co-inheritance of Hb H disease ($-\alpha^{3.7}/-\text{SEA}$) and the β -thal -28 (A \rightarrow C) allele in one patient ameliorates the clinical phenotype; the co-inheritance of Hb New York [β 113(G15)Val \rightarrow Glu] in two siblings led to

an aggravation of the anemia. Hb Constant Spring, Hb New York, Hb E, and Hb J-Bangkok are the most common Hb variants in Macao. The rare variants Hb Hekinan and Hb Owari have also been found.

The molecular defects leading to β -thal and Hb Lepore in Portugal and Spanish Alta Extremadura, and the frequency of the various mutations in different regions are presented in **Chapter 4**. The implications of this study in carrier detection and in prenatal diagnosis programs are discussed. The observed frequencies are compared with those from other Spanish and Portuguese studies.

Chapter 4a provides data on 131 unrelated Portuguese β -thal carriers. Four mutations [CD 39 (CAG→TAG), IVS-I-6 (T→C), IVS-I-1 (G→A), and CD 15 (TGG→TGA)] occurred in excess of 10%. A surprisingly high prevalence of IVS-I-6 (T→C) and CD 15 (TGG→TGA) was found in restricted areas in Central Portugal. Both alleles have a C→T polymorphism at CD 2. IVS-I-6 (T→C) is a mild β^+ -thal mutation, as was evidenced by the mild β -thal intermedia phenotype of many patients homozygous for this mutation. CD 15 (TGG→TGA), a newly discovered nonsense mutation, is described in **Chapter 4b**. The molecular characterization of the β -thal alleles in 65 Spanish individuals from Alta Extremadura and another 149 Portuguese β -thal carriers is presented in **Chapter 4c**. These data confirm an uneven geographical distribution for some of the β -thal alleles, the Spanish Alta Extremadura having the same prevalent mutations as Southern Portugal. CD 39 (C→T), the most common mutation in Portugal, and IVS-I-110 (G→A) have an homogeneous distribution along the country. The IVS-I-1 (G→A), IVS-I-6 (T→C), CD 15 (TGG→TGA), and CD 6 (-A) alleles occur in clusters, with high incidences in different regions: Spanish Alta Extremadura, like Southern Portugal, has a high incidence of the IVS-I-1 (G→A) allele, followed by the CD 39 (C→T), and the IVS-I-110 (G→A) alleles. Six other mutations have been identified with a low frequency. In conclusion, five mutations account for about 95% of the alleles in Portugal, and three mutations for 92% of the alleles in Spanish Alta Extremadura.

Unusual β -thal phenotypes and genotypes are presented in **Chapter 5**, to illustrate the importance of the molecular characterization of the mutations in providing an appropriate genetic counseling. The value of the ethnic background in searching for the mutations is discussed.

The investigation of a newly discovered dominant β -thal intermedia phenotype is described in **Chapter 5a**. A young girl presented with splenomegaly, moderate hypochromic microcytic anemia and hyperbilirubinemia; her mother and maternal grandfather had a similar condition. Anisopoikilocytosis, basophilic stippling, and inclusion bodies were detected in her peripheral blood. Hb A₂ was 4% and Hb F was 3.5%; no abnormal Hb was detected by IEF, and the tests for unstable Hbs were negative. Through sequencing of amplified DNA a heterozygosity for a 12 nt deletion and a 6 nt insertion at CDs 134-137 of the β -globin gene was discovered. The abnormal gene codes for a β -globin chain in which the normal Val-Ala-Gly-Val is replaced by Gly-Arg. The pathophysiology of this dominant inherited β -thal phenotype was discussed.

Chapter 5b describes a case of incorrect genetic counseling of a couple of Italian origin, in which the woman had a classical β -thal trait and her husband with hypochromia and microcytosis and normal Hb A₂, was assumed to be an α -thal carrier. They were told that they were at no risk of having children with a severe form of thalassemia, but unfortunately, their newborn baby had the clinical and hematological features of a β -thal major. By DNA analysis the father was identified as a CD 39 (C→T) heterozygote, the mother as an IVS-I-110 (G→A) heterozygote, and the baby as a CD 39 (C→T)/IVS-I-110 (G→A) compound heterozygote. The father was also a δ -thal carrier; a 7.2 kb deletion which includes the δ -globin gene was present on the non- β -thal chromosome. The importance of the molecular characterization of the mutation in all couples with thalassemic hematological parameters was discussed.

The molecular characterization of 33 unrelated Hb Lepore carriers is presented in **Chapter 6**. The Hb Lepore-WB (δ 87Gln- β IVS-II-8) variant was identified in 13 Spanish families and the Hb Lepore-Balt (δ 68 and β 85) variant in one Spanish and 19 Portuguese families. The crossover region of Hb Lepore-Balt was defined as being two CDs shorter than previously described. The effect of the -158 (C→T) polymorphism on the transcription, as well as in the translation of the γ -globin gene, its association with higher γ - and γ -mRNA percentages, and higher Hb F levels in the Hb Lepore-Balt carriers is discussed. An excess of γ -mRNA relative to the Hb F levels was observed, which points to a less efficient synthesis of the γ chains apparently due to a competition between β - and γ -mRNAs for translation factors. The rate of translation, and the role of the δ gene promoter and the enhancer elements within the IVS-II and in the 3' region of the β gene in the transcription of the $\delta\beta$ hybrid gene are also discussed.

The binding of specific erythroid factors to the proximal and distal CACCC motifs of the β -promoter region, and the effect of the -88 (C→T) and -101 (C→T) mutations in this binding, are discussed in **Chapter 7**. When nuclear extracts from HEL cells were incubated with labeled synthetic oligonucleotides containing the proximal CACCC box or the Sp1 binding motif, two specific retarded bands (B1 and B2) were generated. Competition assays showed that the nuclear protein responsible for these bands has a strong specificity and affinity for the CCCCGCCCC motif, which provide good circumstantial evidence that the major *trans*-acting factor producing bands B1 and B2 is the Sp1 nuclear protein. The lack of competition with the -88M/-101N probe suggests that it is the proximal CACCC box which participates in the binding of the *trans*-acting factors; this binding is abolished by the -88 C→T mutation. The absence of competition with the -101N or -101M probes suggests that the distal CACCC box has no binding capacity for the *trans*-acting factors. The correlation between the binding capacity of the proximal and the distal CACCC motifs and the phenotypes of carriers of point mutations in each of the boxes is discussed.

In **Chapter 8**, the data presented in this study are discussed according to the most relevant data from the literature.

The main objectives of this study have been fulfilled and this dissertation provides satisfactory data to define the correct strategy for a prenatal diagnosis program in Macao,

in Portugal, and in Spanish Alta Extremadura. The most common mutations have been identified, as well as the molecular defects associated with different phenotypes. The Hb Lepore variants have been characterized and their crossover regions precisely defined. By gel retardation assays it was shown that only the proximal, and not the distal CACCC box has binding capacity for the *trans*-acting factors, that is abolished by nt substitutions. Good circumstantial evidence that the major *trans*-acting factor responsible for this binding is the Sp1 nuclear protein was also shown.

SAMENVATTING

De belangrijkste vraagstellingen van de onderzoeken die in dit proefschrift zijn opgenomen betreffen: 1) de karakterisering van de Haemoglobine-afwijkingen in de Chinese bevolking van Macao en de β -thal mutaties in de bevolkingen van Portugal en Spaans Alta Extremadura teneinde een betere strategie voor prenatale diagnostiek vast te stellen; 2) de karakterisering van de HB Lepore typen in Portugal en Spaans Alta Extremadura en het bereik van hun crossover gebieden vaststellen; 3) de bestudering van het effect van de β -globine gen promotor op de binding van kerneiwitten.

Een literatuurreview is opgenomen in Hoofdstuk 1. Het omvat een korte historische inleiding over enige belangrijke ontdekkingen met betrekking tot het onderzoek van haemoglobine-afwijkingen. De etnische verdeling ervan wordt gepresenteerd en speciaal de mate van voorkomen in het Middellandse Zeegebied en Zuid-Oost Azië. De invloed van malaria op de geografische verdeling van thalassemie en sikkelcelanaemie wordt kort besproken. De belangrijkste klinische en haematologische kenmerken van α -thal, β -thal en afwijkende haemoglobines worden beschreven in verband met hun pathofysiologie. De structuur en functie van de globine genen, hun organisatie en hun expressie gedurende de ontwikkeling wordt besproken, samen met de mogelijke rol van de *cis*- en *trans*-werkende transcriptie-factoren. Van de algemene moleculaire basis van de thalassemieën en Hb-varianten in relatie tot de fenotypische expressie wordt een overzicht gegeven. Aan dit hoofdstuk is een appendix toegevoegd met een lijst van alle bekende β -thal mutaties.

De belangrijkste patiëntengegevens en een beschrijving van de basale methodologie vormen de inhoud van Hoofdstuk 2.

Hoofdstuk 3 begint met vermelding van de incidentie van Hb-afwijkingen in Macao, Zuid-Oost Azië, en van het voorkomen van diverse Hb-varianten en α - en β -thal allelen. De waargenomen incidenties zijn vergeleken met die van Zuid-Chinese provincies. De implementatie van een adequaat preventie programma en een prenataal diagnostisch centrum zijn besproken.

Een incidentie van $3,5 \pm 0,6$ werd gevonden voor β -thal en de volgende vier mutaties werden geïdentificeerd: IVS-II-654 (C→T), CDs 41/42 (-TTCT), -28(A→G), -29(A→G). De eerste twee namen 80 % van de allelen voor hun rekening. De incidentie van α -thal werd geschat op $6,2 \pm 0,4$ %. De α -thal-1 (SEA) en α -thal-2 (3.7 kb) deleties kwamen het meest voor. Hb H-ziekte, welke een mild klinisch fenotype heeft, kwam bij 23 patiënten voor. Het gelijktijdig voorkomen van HB H-ziekte ($-\alpha^{3.7}/-^{SEA}$) en het β -thal -28 (A→C) allel in een patiënt verbetert het klinische fenotype; de gelijktijdige overerving van Hb H-ziekte met Hb New York [β 113(G15)Val→Glu] verergerde de anaemie in twee sibs. Hb Constant Spring, Hb New York, Hb E en Hb J-Bangkok zijn de meest frequent voorkomende Hb varianten in Macao. De zeldzame varianten Hb Hekinan en Hb Owari werden ook

waargenomen.

De moleculaire defecten die leiden tot β -thal en Hb Lepore in Portugal en Spaans Alta Extremadura en de frequentie en de verscheidenheid aan mutaties in de verschillende gebieden zijn weergegeven in **Hoofdstuk 4**. De implicaties hiervan voor dragerschapsonderzoek en prenatale diagnostiek zijn besproken. De waargenomen frequenties zijn vergeleken met die van andere Spaanse en Portugese studies.

Hoofdstuk 4a geeft gegevens over 131 onverwante Portugese β -thal dragers. Vier mutaties [CD 39 (CAG→TAG), IVS-I-6 (T→C), IVS-I-1 (G→A) en CD 15 (TGG→TGA)] kwamen in meer dan 10 % van de gevallen voor. In bepaalde gebieden van Centraal Portugal werd een verrassend hoge prevalentie van IVS-I-6 (T→) en CD 15 (TGG→TGA) gevonden. Beide allelen hebben een C→T polymorfisme op plaats CD 2. IVS-I-6 (T→C) is een milde β^+ -thal mutatie, hetgeen bewezen werd door het milde β -thal intermediaire fenotype van veel patiënten die homozygoot waren voor deze mutatie. CD 15 (TGG→TGA), een nieuw ontdekte nonsens mutatie, is beschreven in **Hoofdstuk 4b**. De moleculaire karakterisering van de β -thal allelen in 65 Spaanse individuen van Alta Extremadura en 149 andere Portugese β -thal dragers is het onderwerp van **Hoofdstuk 4c**. Deze gegevens bevestigen een ongelijke geografische verdeling van sommige β -thal allelen, waarbij Spaans Alta Extremadura dezelfde prevalentie mutaties heeft als Zuid Portugal. CD 39 (C→T), de meest voorkomende mutatie in Portugal en IVS-I-110 (G→A) hebben een homogene verdeling over het land. De IVS-I-1 (G→A), IVS-I-6 (T→C), CD 15 (TGG→TGA) en CD 6 (-A) allelen komen in clusters voor, met hoge incidenties in verschillende gebieden: Spaans Extramedura heeft evenals Zuid Portugal een hoge incidentie van het IVS-I-1 (G→A) allel, gevolgd door de CD 39 (C→T) en de IVS-I-110 (G→A) allelen. Zes andere mutaties werden in een lage frequentie gevonden. Samenvattend: vijf mutaties nemen meer dan 95 % van de allelen in Portugal voor hun rekening en drie mutaties 92 % van de allelen in Spaans Alta Extremadura.

Ongebruikelijke β -thal fenotypen en genotypen zijn onderwerp van **Hoofdstuk 5**, om de betekenis van de moleculaire karakterisering voor de genetic counseling te illustreren. De betekenis van de etnische achtergrond bij het zoeken naar mutaties is in dat hoofdstuk besproken.

Het onderzoek naar het nieuw ontdekte dominante β -thal intermediaire fenotype is beschreven in **Hoofdstuk 5a**. Een jong meisje presenteerde zich met splenomegalie, matige hypochrome microcytaire anaemie en hyperbilirubinemie; haar moeder en grootvader van moeders zijde hadden een soortgelijke aandoening. Anisopoikilocytose, basophile korreling en cel-insluitels werden waargenomen in het perifere bloed. Het Hb A₂-gehalte was 4 % en het HB F 3,5 %; met IEF werd geen afwijkend haemoglobine gevonden en de testen voor onstabiele haemoglobines waren negatief. Door sequentie analyse werd een heterozygoot voor een 12 nt deletie en een 6 nt insertie op de plaats van de CDs 134-137 van het β -globine gen ontdekt. Het afwijkende gen codeert voor een β -globine keten waarin het normale Val-Ala-Gly-Val is vervangen door Gly-Arg. De pathofysiologie van het dominant overgeërfd β -thal phenotype is besproken.

Hoofdstuk 5b beschrijft een case van een onjuiste genetic counseling van een paar van Italiaanse afkomst. De vrouw was heterozyoot voor β -thal en haar man had hypochromie en microcytose bij een normaal Hb A₂. Daarom werd aangenomen dat hij een α -thal drager was. Er werd geen verhoogd risico medegedeeld, maar hun kind had de klinische en haematologische kenmerken van β -thal major. DNA onderzoek toonde aan dat de vader heterozyoot was voor CD 39 (C→T), de moeder heterozyoot voor IVS-I-110 (G→A) en het kind was een compound heterozyoot voor beide mutaties. De vader was ook δ -thal drager; een 7,2 deletie, die het δ -globine gen omvatte was aanwezig op het non- β -thal chromosoom. Het belang van de moleculaire karakterisering van de mutatie bij alle paren met haematologische parameters die passen bij thalassemie, is besproken.

Het moleculaire onderzoek van 33 onverwante Hb Lepore dragers is onderwerp van **Hoofdstuk 6**. De Hb Lepore-WB (δ 87Gln- β vs-ii-8) variant werd gevonden in 13 Spaanse families en de Hb Lepore-Balt (δ 68 en β 85) variant in een Spaanse en 19 Portugese families. Het crossover gebied van Hb Lepore-Balt bleek twee CDs korter dan bekend. Het effect van het -158 (C→T) polymorfisme op de transcriptie en de translatie van het γ -globine gen, zijn associatie met hogere γ - en γ -mRNA percentages en hogere Hb F waarden in de Hb Lepore-Balt dragers is besproken. In verhouding tot de Hb F waarden werd een overmaat aan γ -mRNA waargenomen, hetgeen wijst op een minder efficiënte synthese van de γ ketens, blijkbaar tengevolge van een competitie tussen de β - en γ -mRNAs voor translatie factoren. De translatie-snelheid, alsmede de rol van de δ gen promotor en de enhancer elementen binnen de IVS-ii en het 3'-gebied van het β gen bij de transcriptie van het $\beta\delta$ hybride gen zijn ook besproken.

De binding van specifieke erythroïde factoren aan de proximale en distale CACCC motieven van de β -promotor regio en de effecten van de -88 (C→T) en -101 (C→T) mutaties op deze binding, vormen de inhoud van **Hoofdstuk 7**. Wanneer kernextracten van HEL cellen werden geïncubeerd met gelabelde synthetische oligonucleotiden die de proximale CACCC box of het SP1 binding motief bevatten, ontstonden twee specifieke vertraagde banden (B1 en B2). Competitie assays toonden aan dat het kerneiwit dat verantwoordelijk was voor deze banden een grote specificiteit en affiniteit had voor het CCCC GCCC motief. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de banden B1 en B2 worden geproduceerd door het SP1 kerneiwit. Het ontbreken van competitie met de -88M/-101N probe suggereert dat het de proximale CACCC box is die participeert in de binding met de trans-werkende factoren; deze binding gaat verloren door de -88 C→T mutatie. De afwezigheid van competitie met de -101N of -101M probes suggereert dat de distale CACCC box geen bindingscapaciteit heeft voor de trans-werkende factoren. De correlatie tussen de bindingscapaciteit van de proximale en distale CACCC motieven en de fenotypen van dragers van puntmutaties in elk van de boxen vormde onderwerp van discussie.

In **Hoofdstuk 8** worden de gepresenteerde gegevens afgezet tegen de literatuur.

Geconcludeerd kan worden dat de belangrijkste doelstellingen van dit proefschrift zijn gerealiseerd. Er zijn voldoende gegevens verkregen voor de aanpak van de prenataal diagnostiek programmas in Macao, in Portugal en in Spaans Alta Extremadura. De meest frequent voorkomende mutaties zijn geïdentificeerd evenals de moleculaire defecten die zijn geassocieerd met verschillende fenotypen. De Hb Lepore varianten zijn gekarakteriseerd en hun crossover gebieden precies in kaart gebracht. Door gel retardatie proeven werd aangetoond dat slechts de proximale en niet de distale CACCC box bindings capaciteit heeft voor de trans-werkende factoren. Deze gaat verloren door nt substituties. Er werden goede aanwijzingen verkregen dat het Sp1 kerneiwit de belangrijkste trans-werkende factor is, die verantwoordelijk is voor die binding.