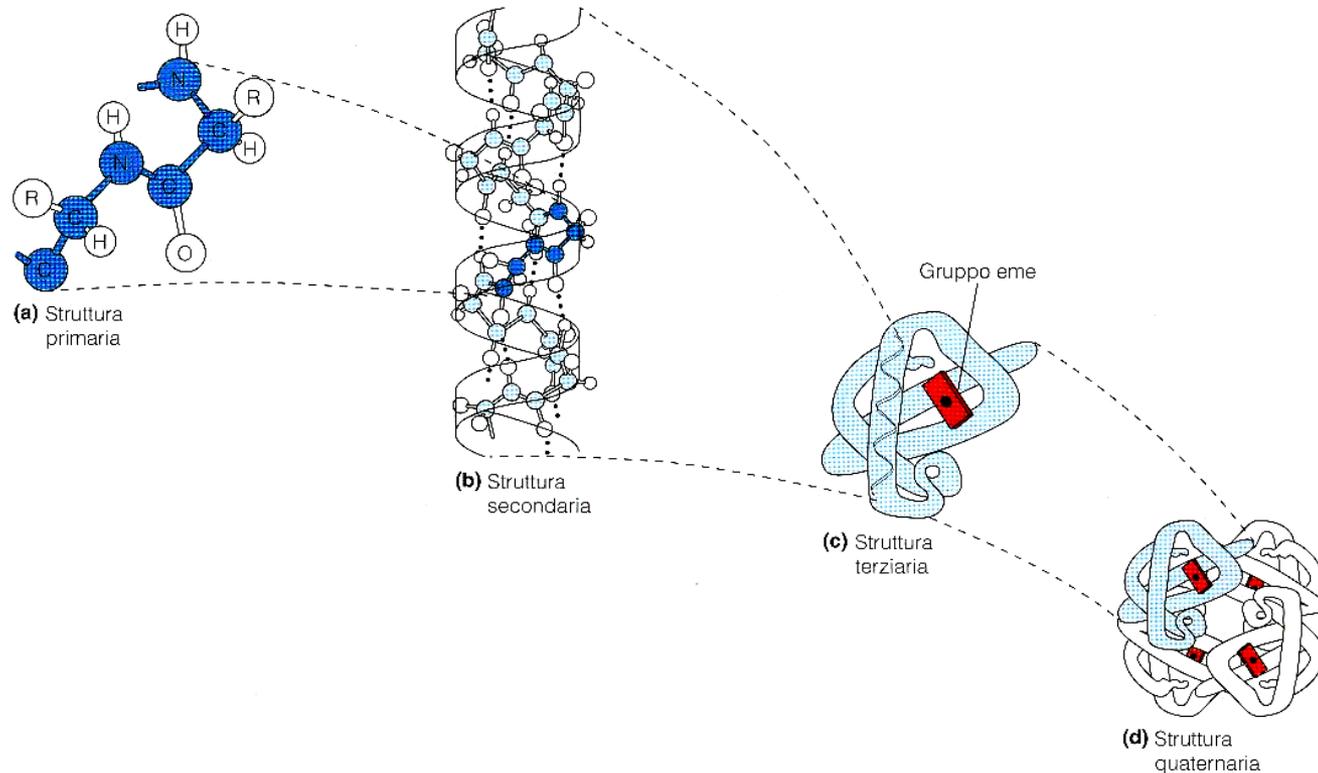


# PATOLOGIE DELL'EMOGLOBINA

# Dalla sequenza degli aminoacidi alla patologia

Ogni variazione della sequenza di aminoacidi può alterare la struttura quaternaria e la funzione di Hb



# Mutazioni a carico dell'emoglobina

Difetti qualitativi

Difetti quantitativi

Emoglobinopatie

Talassemie

## Normal beta chain

ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC  
Val His Leu Thr Pro Gln Gln Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Gln Val Gly Gly Gln Ala Leu Gly

## HbS Sickle cell (missense)

ATG GTG CAC CTG ACT CCT **GTG** GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC  
Val His Leu Thr Pro **Val** Gln Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Gln Val Gly Gly Gln Ala Leu Gly

## HbC (missense)

ATG GTG CAC CTG ACT CCT **AAG** GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC  
Val His Leu Thr Pro **Lys** Gln Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Gln Val Gly Gly Gln Ala Leu Gly

## HbThalassemia (nonsense)

ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC **TAG** GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC  
Val His Leu Thr Pro Gln Gln Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly **Stop**

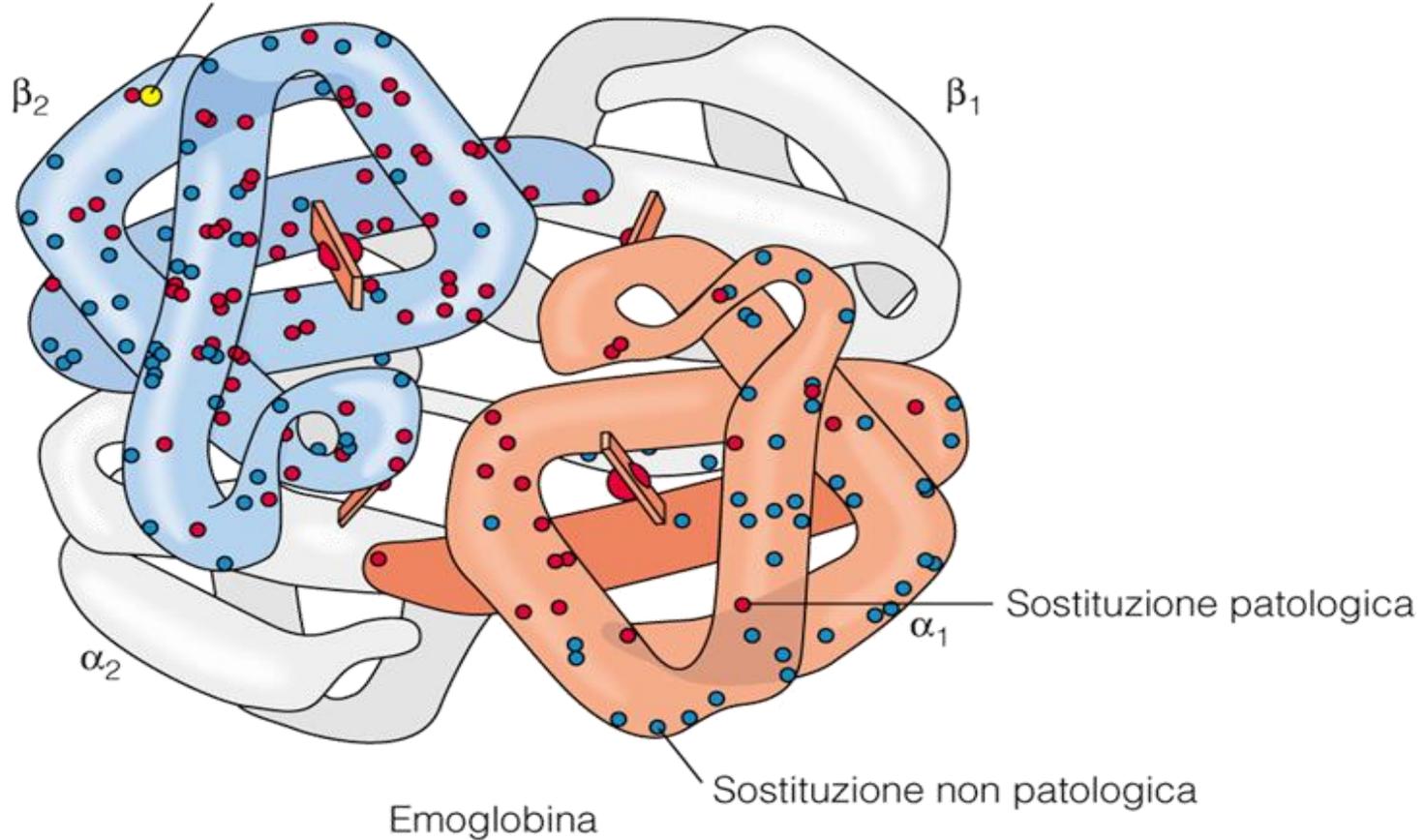
## HbThalassemia (frameshift) -AA

ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG **GTC TGC CGT TAC TGC CCT GTG GGG CAA GGT GAA CGT GGA TGA AGT TGG TGG TGA GGC CCT GGG C**  
Val His Leu Thr Pro Gln Gln **Val Cys Arg Tyr Cys Pro Val Gly Gln Gly Gln Arg Ala Stop**

# Varianti strutturali dell' Emoglobina

## Mutazioni silenziose e patologiche

Mutazione dell'anemia falciforme



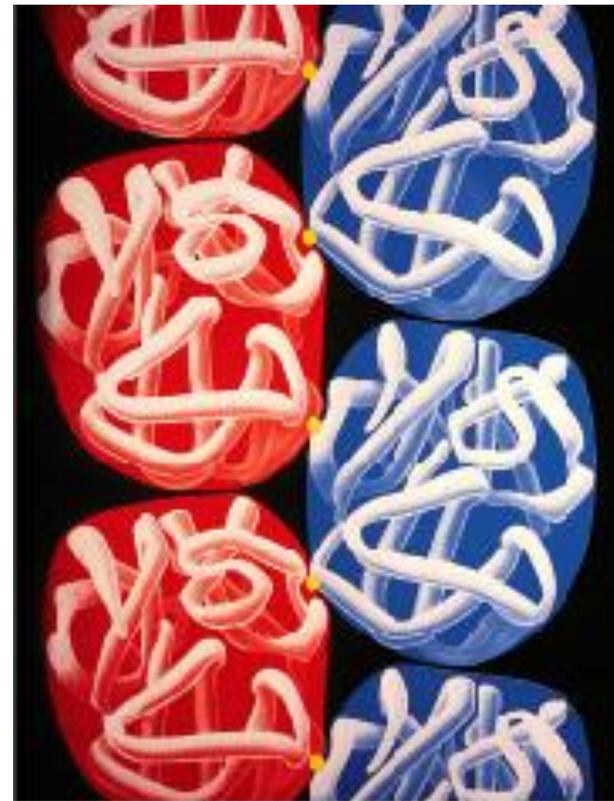
# Varianti strutturali dell' Hb

> 800 differenti emoglobine umane mutate

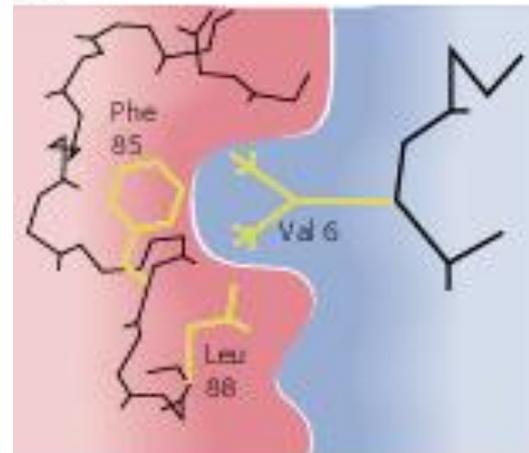
- Sostituzione di **residui in superficie**: solitamente innocui (mutazioni silenziose), eccetto HbS
- Sostituzioni di **residui interni**: destabilizzano la struttura quaternaria (formazione di precipitati o corpi di Heinz, interazione con membrana, lisi, anemia emolitica)
- Modificazioni che **stabilizzano metHb**: impediscono formazione di HbO<sub>2</sub>, cianosi (es. sostituzione delle His prossimali con Tyr nella catena  $\alpha$  e  $\beta$ ).
- Sostituzioni **nell'interfaccia  $\alpha\beta$** : impediscono transizioni T/R (spesso a favore di R), alta affinità per O<sub>2</sub>, scarso rilascio di O<sub>2</sub>, ipossia periferica, policitemia

# Emoglobina S (anemia falciforme o *sickle cells*)

- Prima malattia di cui si è scoperta la base molecolare (Pauling, 1949)
- Un solo aminoacido variante (Glu  $\beta$ 6  $\rightarrow$  Val)

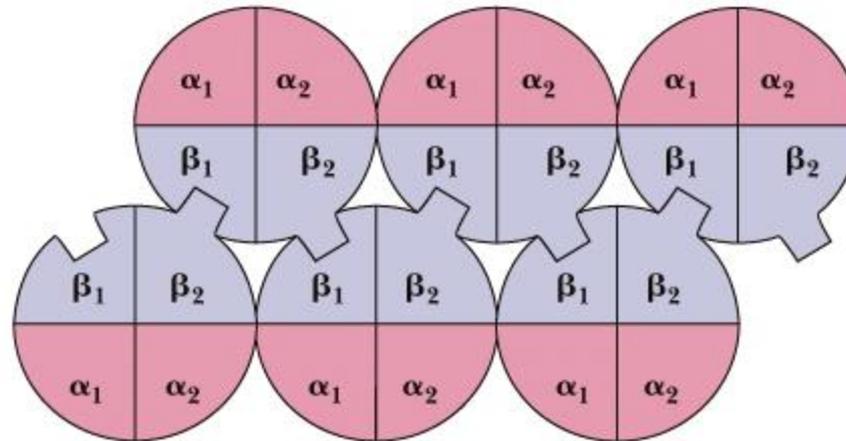
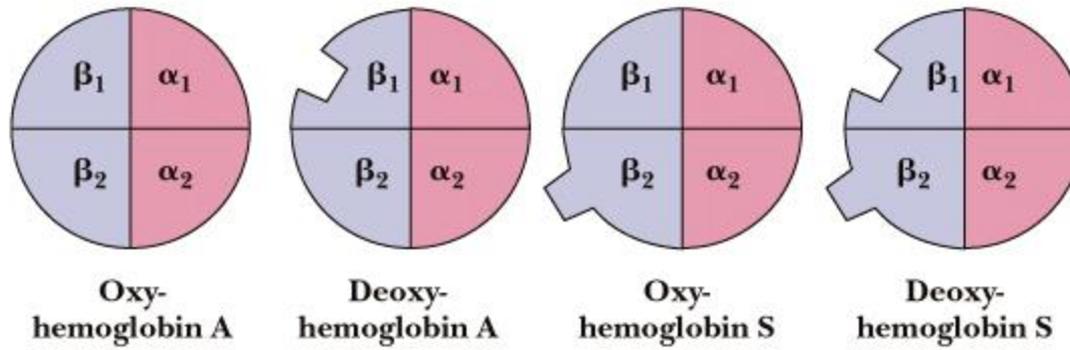


(a)



(b)

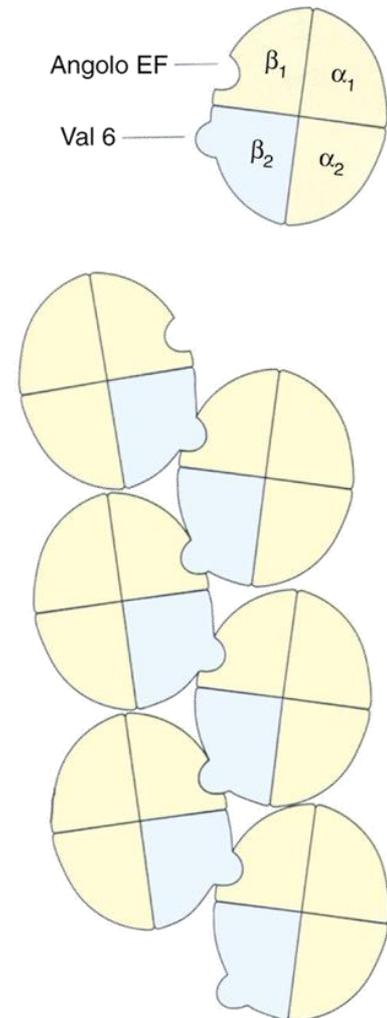
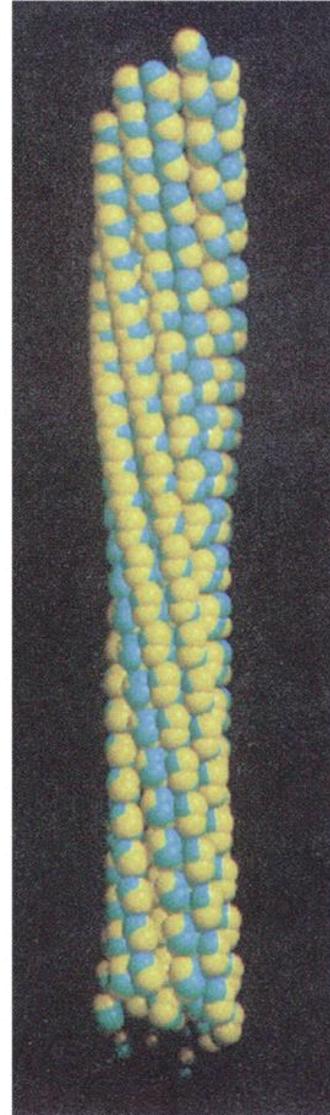
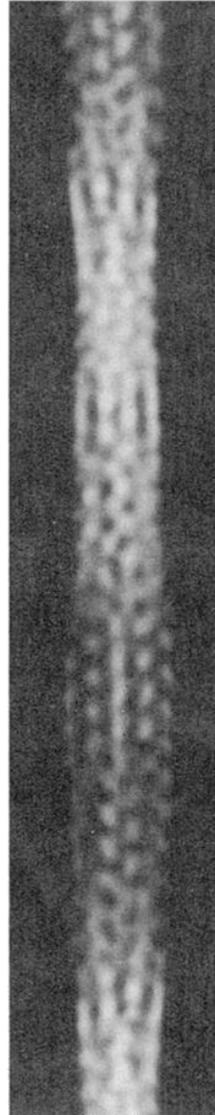
Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e  
Figure 15.40



Deoxyhemoglobin S polymerizes into filaments

# Polimerizzazione di HbS

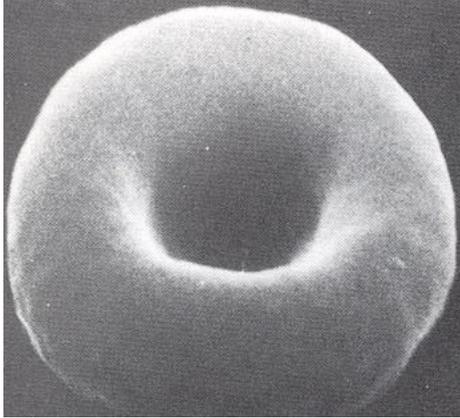
- Val si adatta nella tasca della molecola di Hb adiacente
- Reazione favorita se deossi-Hb
- Hb tende ad aggregarsi in fibre insolubili



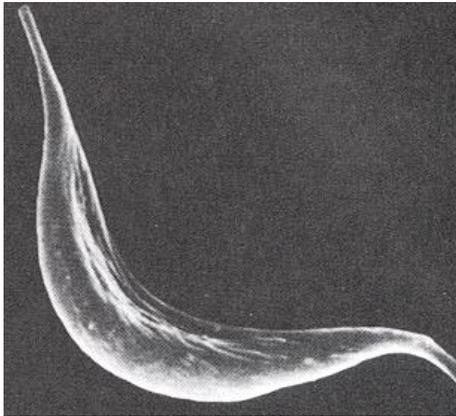


Berg et al., BIOCHIMICA 6/E, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2007

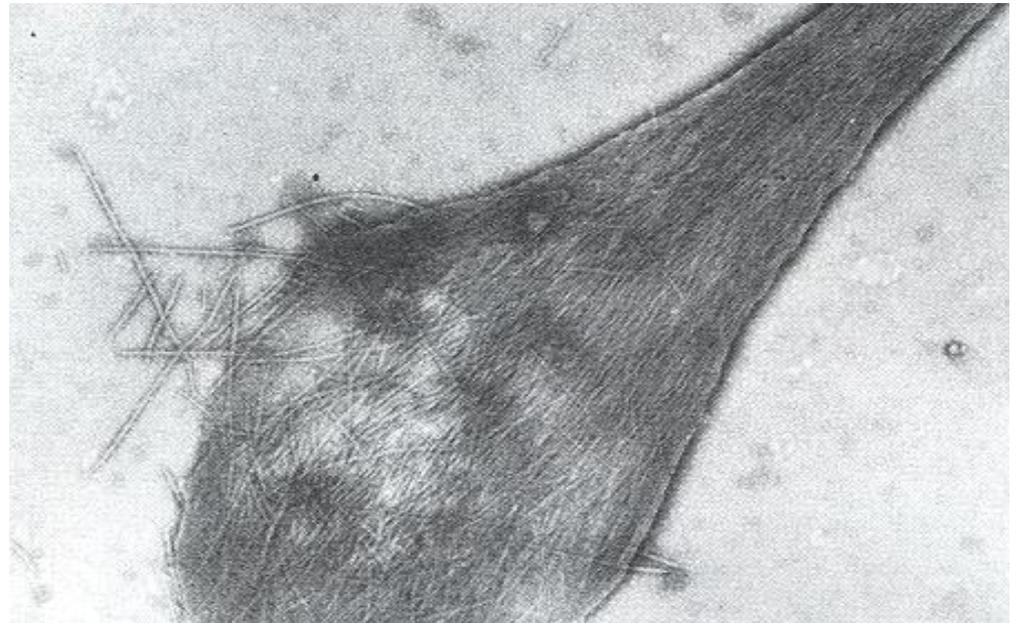
# Sickle Cell Anemia



Normal RBC



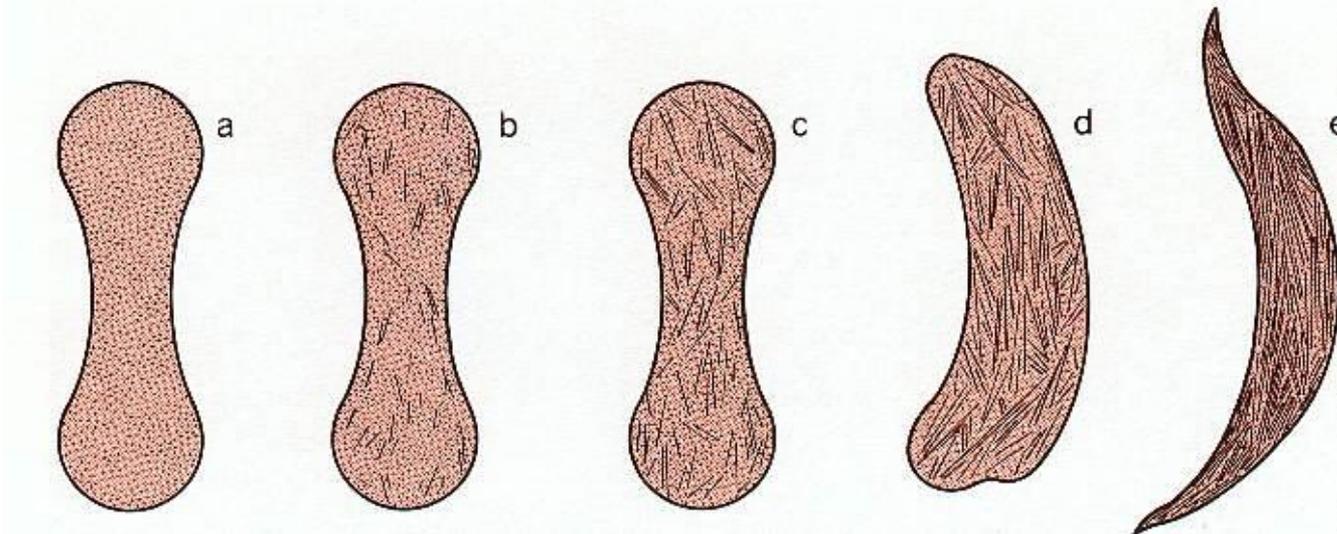
Sickled RBC

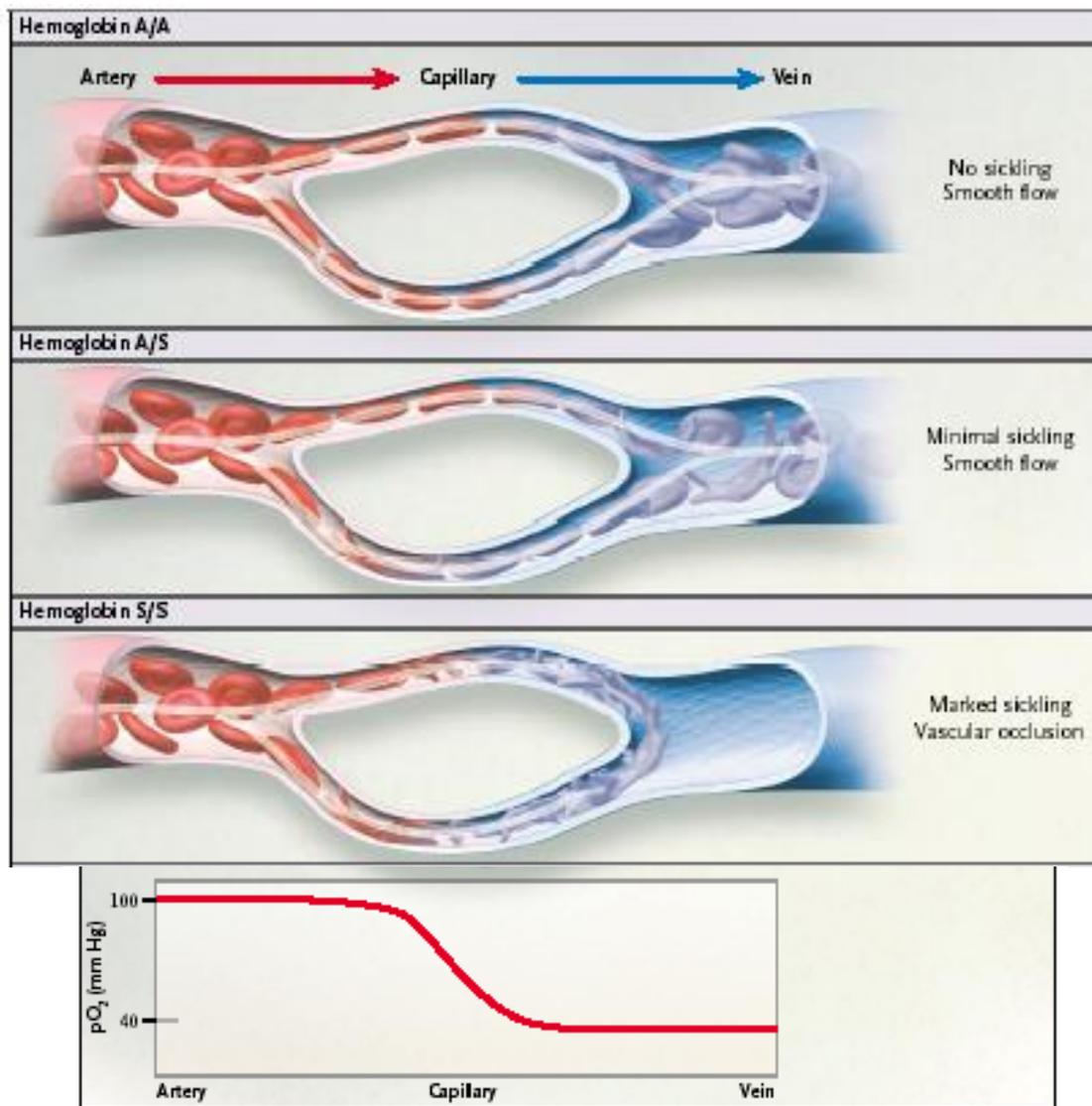


Ruptured, sickled RBC

# Cellule falciformi o *sickle cells*

- L'eritrocita omozigote con HbS (SS) assume una forma allungata a falce
- Ostruisce il deflusso di sangue nel capillare (infiammazione e dolore)
- Diventa fragile e si emolizza rilasciando Hb nella circolazione (ulteriore infiammazione)
- L'emoglobina libera inoltre è un forte «scavenger» del NO

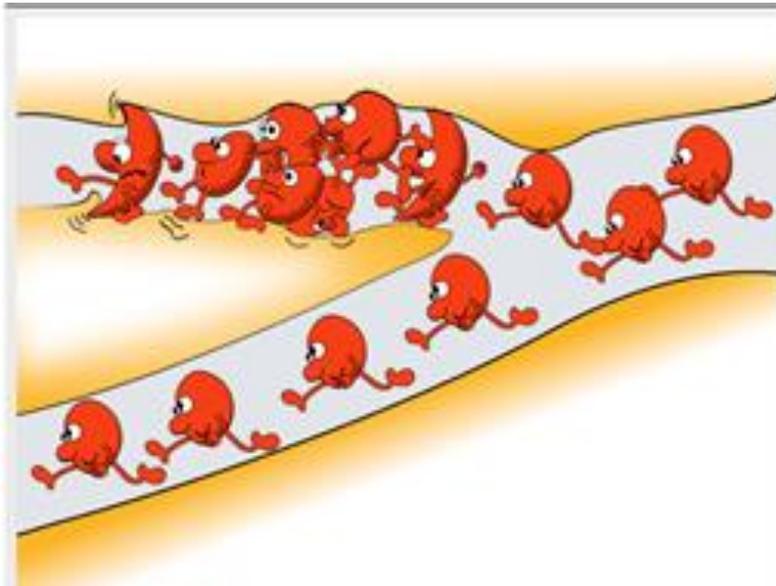




**Desaturation of normal and variant hemoglobins during passage from artery to vein.**

NEJM, 2004

# OSTRUZIONE DEL MICROCIRCOLO



- Il sangue ricco di globuli rossi falcizzati diventa più vischioso e rallenta la sua corsa soprattutto nei distretti periferici dell'organismo, dove il piccolo diametro dei vasi rende difficile il passaggio degli eritrociti falcizzati, rigidi
- Ciò provoca un'ulteriore estrazione di ossigeno, con conseguente ulteriore gelificazione dell'emoglobina S e falcizzazione massiva
- I globuli rossi falcizzati aderiscono facilmente alla parete dei vasi, favorendo la formazione di microtrombi nell'organo colpito, con conseguente ischemia e relativi microinfarti, spesso assai dolorosi
- Gli organi più colpiti sono quelli dove il flusso di sangue è più lento e quindi dove più facilmente si può avere mancanza di ossigeno: ossa, fegato, rene, milza, polmone; o in quelli dove c'è una maggiore estrazione di ossigeno: muscoli, cervello

# Rimozione dei globuli rossi falcizzati da parte di cellule fagocitarie (soprattutto milza)

I globuli rossi falcizzati vengono precocemente distrutti soprattutto dalla milza, con conseguente anemia

Sottoposta ad un lavoro eccessivo, la milza in un primo tempo si ingrossa: splenomegalia

Successivamente, a causa delle frequenti ostruzioni del flusso di sangue con conseguenti microinfarti, si trasforma (di solito dopo il 10° anno di età) in tessuto cicatriziale: sclerosi ed atrofia splenica



Figura 30.22. Rimozione di eritrociti falcizzati da parte della milza.  
Adattato e ridisegnato da: [unict.it/deo](http://unict.it/deo)

Anemia

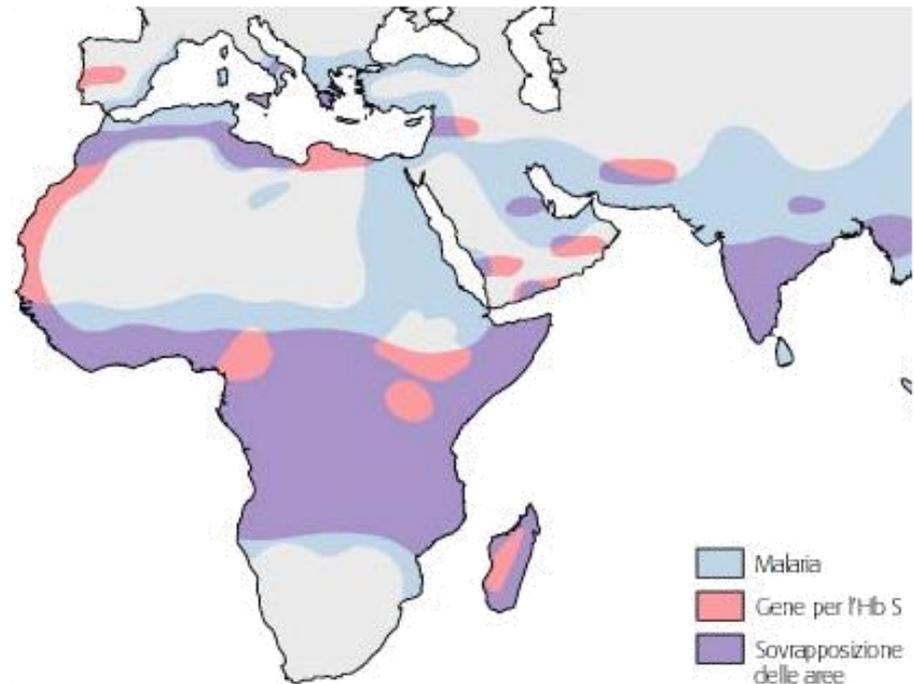
Splenomegalia

distruzione dell'eme → aumento bilirubina

# Associations between HbS and protection against malaria

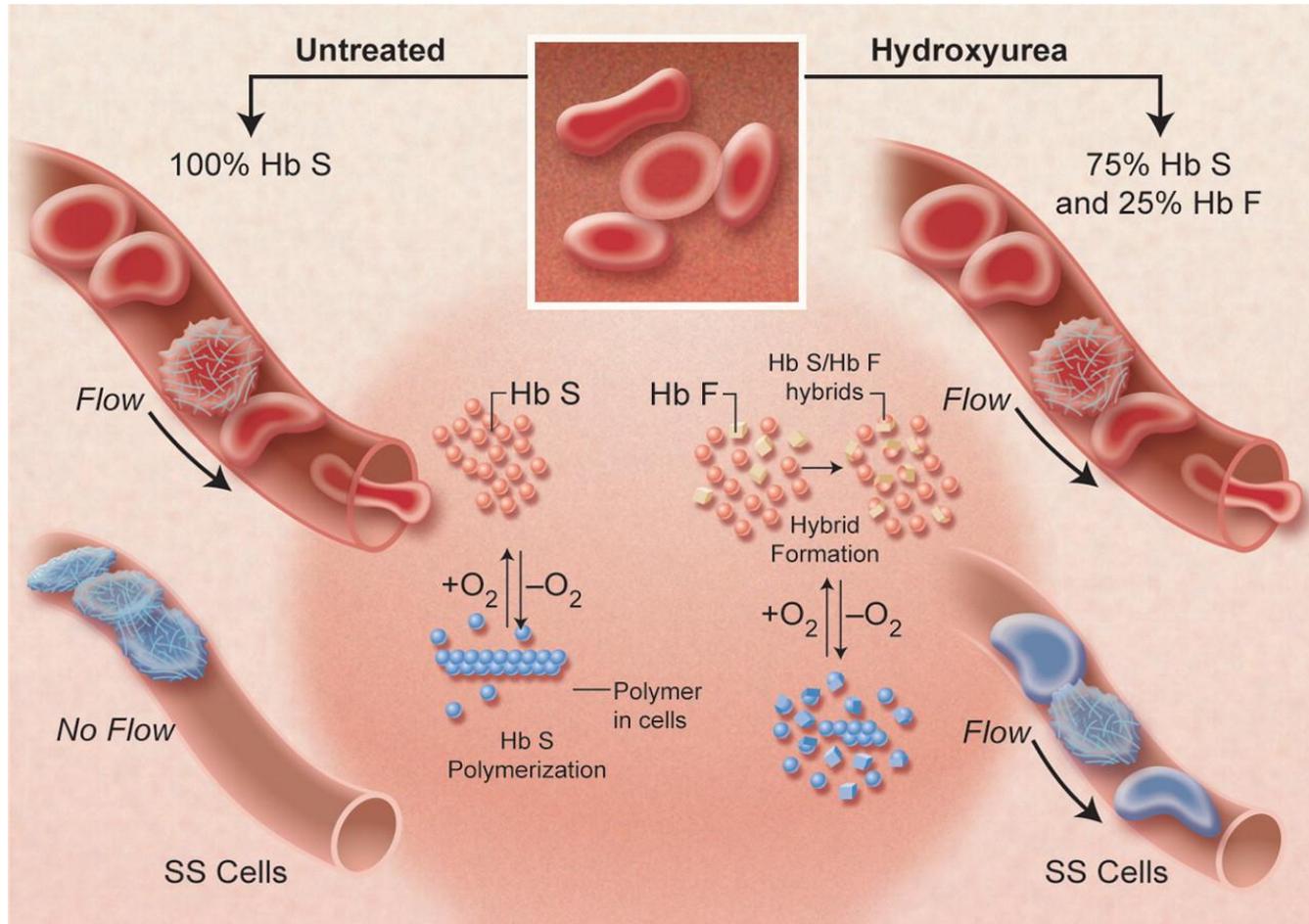
- the persistence of the sickle mutation in human populations is due to the **protection from malaria** afforded to **heterozygous** individuals.
- Example of “heterozygous advantage” in which the carriers of a recessive allele have higher chances of survival than those homozygous for the mutated gene.

- **mechanism(s) of protection ?**



# Example of treatment of *sickle cell disease*

Postulated effect of **hydroxyurea**: inhibition of HbS polymerization, by increasing HbF levels (shown as 25%) in each sickle erythrocyte and thus decreasing the degree of microvascular obstruction at any oxygen level.



**Talassemie** "difetti quantitativi"  
assente o ridotta sintesi di catene globiniche



sintesi di catene globiniche non bilanciata



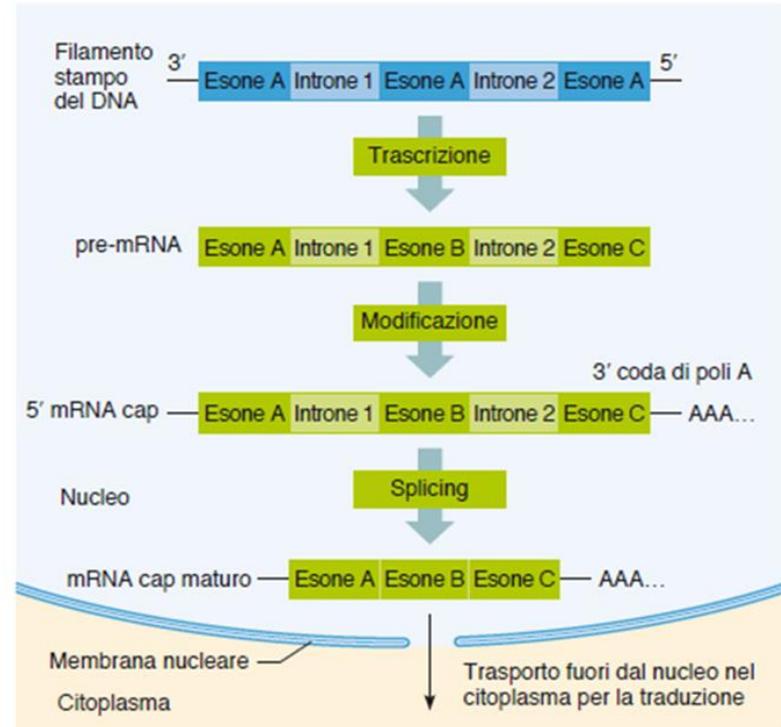
ridotta sintesi di emoglobina



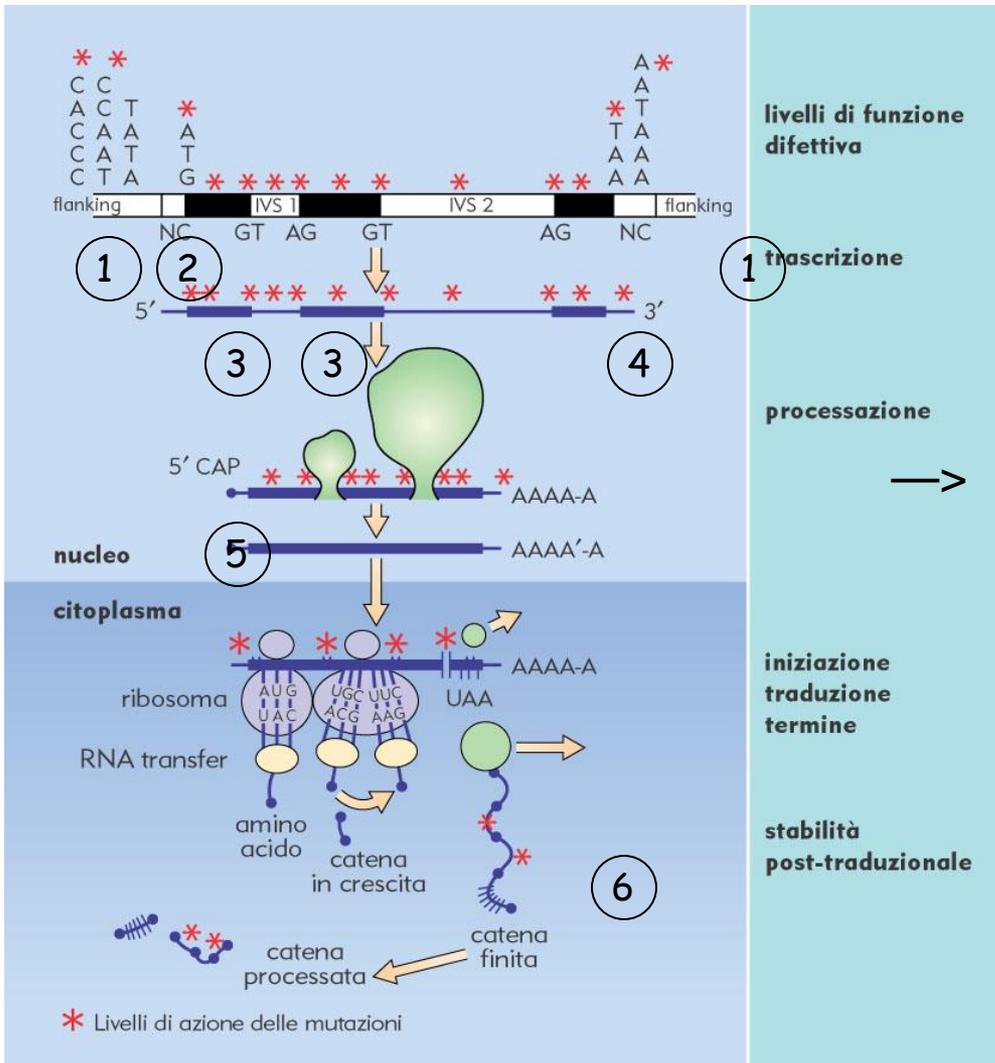
globuli rossi ipocromici e microcitici

# GENE → PRODOTTO POLIPEPTIDICO FUNZIONANTE

1. Il gene deve essere presente;
2. Il gene deve essere trascritto;
3. Il trascritto deve essere maturato: rimozione degli introni, aggiunta del CAP, aggiunta del poli-A
4. L'mRNA maturo deve essere portato nel citoplasma e caricato sui ribosomi;
5. La traduzione deve avere inizio;
6. L'mRNA deve essere tradotto per tutta la sua lunghezza;
7. La catena polipeptidica deve essere stabile



# MECCANISMI MOLECOLARI NELLE TALASSEMIE



1. Delezione genica (per lo più  $\alpha$  Tal)
2. Mutazione della regione "promoter"
3. Anomalie dello *splicing*
4. Mutazione del segnale di poliadenilazione
5. Interruzione prematura (mutazioni non senso e frameshift)

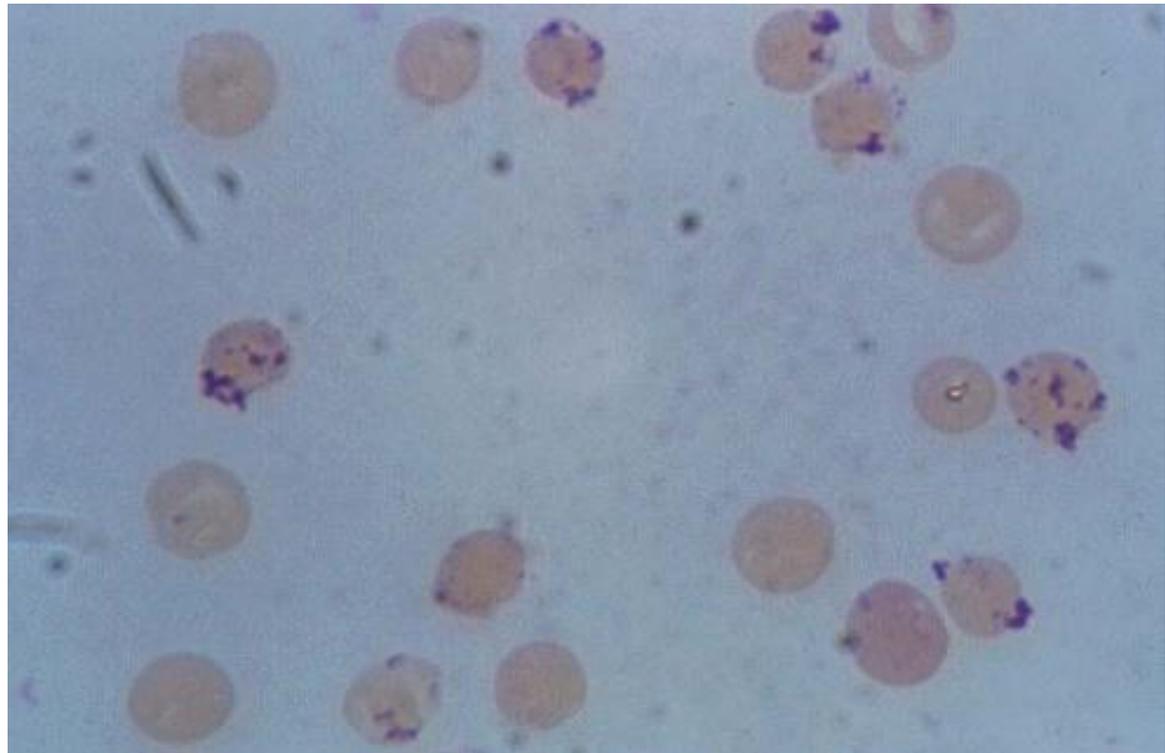
# Talassemie

## “difetti quantitativi”

- **$\beta$ -talassemia**: mancata ( $\beta^0$ ) o ridotta ( $\beta^+$ ) espressione della catena  $\beta$ 
  - Forma molto grave nell'omozigote (Morbo di Cooley)
  - Per compensazione, i pazienti esprimono la catena  $\gamma$  (persistenza ereditaria dell'Hb fetale)
  - Eccesso catene alpha che precipitano
  - Distruzione intramidollare delle cellule immature, distruzione delle cellule mature → anemia

The main pathophysiology results from **chain imbalance** → in erythroid precursors cells excess chains precipitate → membrane **damage** — **hemolysis, anemias, dyserythropoiesis**

**Heinz Bodies**  
in Hemolytic Anemias



# Talassemie

## “difetti quantitativi”

**$\alpha$ -talassemia:** mancata espressione della catena  $\alpha$

Le  $\alpha$  talassemie sono spesso dovute a delezione di uno o più geni  $\alpha$

Produzione di  $\gamma_4$  (Hb Bart) o  $\beta_4$  (HbH), ma senza transizioni allosteriche né effetto Bohr.

I tetrameri  $\gamma_4$  e  $\beta_4$  hanno maggior affinità per l'O<sub>2</sub>  
→ ipossia tissutale

HbH precipita: distruzione cellule mature

→ anemia (globuli rossi ipocromici e microcitici)

Anche le talassemie proteggono dalla malaria (vantaggio per gli eterozigoti)

# DIFFERENTI TIPI DI $\alpha$ -talassemia

L'individuo normale ha 4 geni  $\alpha$  per assetto diploide

La gravità clinica del fenotipo dipende dal numero di geni  $\alpha$  residui

- Individuo con 3 geni  $\alpha$  normale
- Individuo con 2 geni  $\alpha$  ( $-\alpha/-\alpha$ ;  $--/aa$ ) lieve anemia
- Individuo con 1 gene  $\alpha$  talassemia major ( $\beta_4$ , HbH)
- Individuo con 0 geni  $\alpha$  idrope fetale ( $\gamma_4$ , Hb di Bart)  
(letale in utero)