

F.S.E.



A.D. MDLXII



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

DOTTORATO DI RICERCA

"Biochimica, Biologia e Biotecnologie Molecolari"

Curriculum: **Biochimica comparata e dell'adattamento molecolare**

Coordinatore: Prof. Bruno Masala

Ciclo XX

Studio sui determinanti genetici correlati con la sintesi di emoglobina fetale nella vita adulta

Dottorando

Mara Sannai

Tutore

Prof. Bruno Masala

Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari

Tesi di dottorato cofinanziata con fondi della Fondazione Banco di Sardegna

Anno Accademico 2006-2007



INDICE

1. Riassunto	pag. 1
2. Introduzione	pag. 3
2.1. Cluster α -globinico	pag. 4
2.2. Cluster β -globinico	pag. 5
2.3. Le emoglobine umane	pag. 5
2.4. Elementi regolatori coinvolti nel <i>gene switching</i>	pag. 6
2.5. Basi molecolari e classificazione fenotipica delle talassemie	pag. 8
2.6. Le α -talassemie	pag. 9
2.7. Le β -talassemie	pag. 11
2.8. Disordini genetici correlati alla sintesi di elevati livelli di HbF nell'individuo adulto	pag. 14
3. Scopo della ricerca	pag. 21
4. Materiali e metodi	pag. 22
4.1. Campioni esaminati	pag. 22
4.2. Preparazione dei campioni	pag. 22
4.3. Isoelettrofocalizzazione dei tetrameri nativi	pag. 23
4.4. Isoelettrofocalizzazione semipreparativa dei tetrameri nativi	pag. 23
4.5. Elettroforesi delle globine in condizioni acide denaturanti	pag. 23
4.6. Cromatografia a scambio cationico delle globine	pag. 24
4.7. Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa delle globine	pag. 24
4.8. Amplificazione enzimatica <i>in vitro</i>	pag. 24
4.8.1. Amplificazioni di segmenti del cluster β -globinico	pag. 25
4.8.2. Clonaggio della regione HS2 della LCR	pag. 26
4.9. Diagnosi diretta di α -talassemia	pag. 27
4.9.1. Diagnosi della mutazione talassemica $\alpha^{-3.7}$	pag. 27
4.9.2. Diagnosi di $\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$	pag. 28
4.9.3. Diagnosi della mutazione talassemica $\alpha^{-4.2}$	pag. 28
4.10. Sequenziamento nucleotidico	pag. 29
4.11. Discriminazione allelica mediante Real-Time PCR	pag. 29
5. Risultati	pag. 31
5.1. Diagnosi molecolare di β -tal nei soggetti politrasfusi	pag. 31
5.2. Diagnosi di α -talassemia	pag. 32

5.3. Analisi del promotore prossimale dei geni fetali	pag. 32
5.4. Analisi dei microsatelliti e degli SNPs	pag. 33
5.5. Struttura degli assetti polimorfi per i microsatelliti e gli SNPs in <i>cis</i>	pag. 34
6. Discussione	pag. 37
7. Bibliografia	pag. 45
8. Tabelle e Figure	pag. 49

1. Riassunto

La principale causa della patogenesi delle β -talassemie è la presenza di catene α libere che precipitano e provocano severi danni che portano alla morte delle cellule eritroidi. Le manifestazioni cliniche dei pazienti risultano attenuate quando il difetto molecolare non abolisce la sintesi di catene β (condizioni β^+ -talassemiche), quando il paziente produce elevate quantità di catene γ che bloccano gran parte delle catene α libere producendo emoglobina fetale (HbF) o quando vi è coereditarietà con forme α_1 -talassemiche.

Nella maggior parte dei casi le condizioni β -talassemiche intermedie sono correlate alla presenza di uno o due alleli β^+ , nei quali la mutazione riduce la produzione di globine β . Tuttavia, in alcuni casi, i pazienti intermedi risultano omozigoti per un allele β^0 , tipico dei pazienti affetti da talassemia major. In alcuni pazienti affetti da talassemia intermedia l'unica spiegazione evidente che giustifica il fenotipo lieve non dipendente da trasfusione è la sintesi di globine γ che persiste nella vita adulta. Tale inusuale produzione sembrerebbe dovuta al contributo di particolari siti polimorfi presenti nel cluster β -globinico. I motivi polimorfi sono costituiti da sostituzioni nucleotidiche singole (SNPs) e microsatelliti localizzati in regioni intrageniche non tradotte (es. (TG) m (CG) m nelle regioni IVS2 dei geni fetali $G\gamma$ e $A\gamma$) oppure nelle sequenze promotrici distali e prossimali del gene $G\gamma$ o del gene β (es. (AT) x Ty 540 nucleotidi a monte del gene β) o in regioni regolatorie molto distanti dalle sequenze geniche come, ad esempio, il microsatellite (AT) x Ny(AT) z nel sito HS2 della β LCR. Si ritiene che questi possano esercitare un ruolo funzionale poiché in grado di alterare o di creare siti di legame per i fattori trascrizionali e che il modo migliore per comprenderne la funzione possa essere quello di considerare tutti i polimorfismi potenzialmente coinvolti nel loro complesso *in cis* su ciascun cromosoma.

L'assetto polimorfo in *linkage* alle mutazioni β -talassemiche tipiche dei β^0 -talassemici sardi non era ancora stato indagato e, inoltre, il 10% dei pazienti β^0 -tal sardi, manifesta condizioni cliniche lievi non dipendenti da trasfusione, tipiche della forma talassemica intermedia. Nei pazienti intermedi sardi il fenotipo lieve non è giustificato né dalla coesistenza di determinanti α -tal (presenti solo nel 25% dei pazienti), né dalla presenza del sito polimorfo $G\gamma$ -158 (positivo solo nel 9% dei pazienti). Pertanto, l'unico motivo che giustifica la condizione lieve non dipendente da trasfusione è la produzione elevata di HbF di per sé stessa.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di determinare la configurazione dei polimorfismi *in cis* alle mutazioni al *locus* β tipiche dei pazienti β -talassemici sardi ed anche quello di tentare di correlare il fenotipo clinico al particolare genotipo relativo ai polimorfismi SNPs e microsatelliti. Le indagini hanno interessato quattro categorie di soggetti che comprendono pazienti β -talassemici politrasfusi affetti da talassemia major (β^{039}/β^{039} e β^{039}/β^{+87}); β -talassemici omozigoti non dipendenti da trasfusione affetti da talassemia intermedia (β^{039}/β^{039}), individui eterozigoti per differenti mutazioni β -talasemiche (β^{039} , β^{+} IVS1-nt6) che presentavano livelli di HbF superiori alla norma (HbF = $6,2 \pm 1,8$) e soggetti non β -talassemici.

Nella regione IVS2 del gene $G\gamma$ e nel promotore distale del gene β sono stati identificati microsatelliti non descritti in letteratura.

Nessun paziente TM e TI presentava mutazioni riconducibili a forme di ndHPFH ed in tutti è stata verificata la presenza delle mutazioni α -tal più diffuse in Sardegna e nel bacino del Mediterraneo.

In tutti i pazienti intermedi il danno molecolare si è rivelato dovuto alla mutazione β^{039} (CAG \rightarrow TAG) in omozigosi, condizione presente anche nel 90% dei pazienti politrasfusi.

La mutazione β^{039} è risultata distribuita su differenti assetti di siti polimorfi, nessuno dei quali identico a quelli descritti in letteratura, dei quali due in associazione all'aplotipo II di Orkin e all'allele $^A\gamma^T$ e due all'aplotipo I di Orkin e all'allele $^A\gamma^I$. La mutazione β^{+87} , localizzata su cromosoma con assetto 7A, è risultata *linked* all'aplotipo VIII di Orkin, mentre il *locus* β^{+} IVS1-nt6 (assetto polimorfo 8A) all'aplotipo II.

La presenza del medesimo assetto di siti polimorfi nel 75% dei cromosomi dei pazienti intermedi e nel 67,5% dei pazienti politrasfusi, escluderebbe l'ipotesi che questa configurazione possa svolgere un ruolo di modulatore dell'espressione dell'HbF in questi pazienti.

2. INTRODUZIONE

La localizzazione cromosomica e la struttura nucleotidica della maggior parte dei geni che codificano le subunità dell'emoglobina (Hb) umana sono state definite alla fine degli anni '70 ([Lauer et al.](#), 1980; [Slightom et al.](#), 1980; [Spritz et al.](#), 1980; [Lawn et al.](#), 1980). Questi risultati, unitamente a quelli che hanno permesso a Max Perutz (1968) di descrivere nel dettaglio la struttura molecolare dell'Hb, hanno reso questa proteina la più studiata e forse la meglio conosciuta. L'Hb è, in effetti, la prima proteina la cui funzione è stata identificata con esattezza (il trasporto dell'ossigeno) ed una sua variante, caratterizzante l'anemia falciforme, la prima dimostrazione del concetto di "malattia molecolare" (Pauling et al., 1949). Ancora oggi l'Hb ed i geni globinici costituiscono il tema principale di numerosi gruppi di ricerca diffusi in tutto il mondo. Le ragioni sono molteplici e facilmente comprensibili anche in considerazione delle prospettive, di carattere non solo biochimico ma anche clinico, che possono derivare dalla applicazione dei risultati incessantemente raccolti. Le emoglobinopatie rappresentano le malattie congenite più diffuse nel mondo; le Hb anomale e le talassemie (tal) rappresentano un'opportunità unica per lo studio delle relazioni tra struttura e funzione delle proteine. L'Hb è la sola proteina a struttura nota delle quali si conoscono oltre 1300 varianti; il metabolismo energetico dell'eritrocita si è dimostrato dipendere largamente dal ciclo di ossigenazione-deossigenazione dell'Hb; i processi di controllo dell'espressione dei geni globinici sono assai complessi ma comunque simili a quelli degli altri geni eucarioti, così da costituire utili modelli di studio applicabili ad altri sistemi genici. Gli eventi molecolari alla base della "riattivazione genica" sono tuttora praticamente sconosciuti e rivestono grande interesse per le implicazioni che potrebbero avere quale modello sperimentale utile a comprendere i meccanismi che regolano l'espressione dei geni globinici umani e l'assenza di riattivazione dei geni fetali nell'individuo adulto. Questo modello è il presupposto di promettenti ricerche che mirano alla "terapia genica" ed allo sviluppo di terapie per l'induzione della sintesi di Hb fetale nei globuli rossi di pazienti talassemici adulti così da poter in parte supplire all'assenza di Hb adulta.

Il tetramero emoglobinico è composto di due subunità identiche di tipo α (ζ o α) e due di tipo β (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β) costituite di 141 e 146 residui amminoacidici, rispettivamente. Ciascuna globina lega un gruppo prostetico contenente un atomo di ferro ferroso (eme o ferroporfirina IX).

Ogni globina è prodotta sotto il controllo di un proprio gene strutturale ([Lauer et al.](#), 1980; [Slightom et al.](#), 1980; [Spritz et al.](#), 1980; [Lawn et al.](#), 1980). Tali geni hanno una organizzazione molto simile che riflette la loro origine da un progenitore comune. Ogni gene ha tre esoni e due introni (IVS, Intervening Sequence). Gli introni hanno dimensioni diverse in ciascun gene ed in quelli di tipo β la lunghezza dell'IVS2 è variabile anche fra geni allelici per la presenza, all'estremità 3', di

una sequenza polimorfa, il dinucleotide ripetuto $(TG)_n(CG)_m$ (Slightom *et al.*, 1980; Powers, & Smithies, 1986; Lanclos *et al.*, 1991). Un crescente numero di osservazioni suggerisce un possibile ruolo regolatorio del microsatellite nella modulazione della sintesi di livelli di HbF elevati nell'adulto normale o affetto da una emoglobinopatia (paragrafo 2.8.).

I geni α - e β -globinici sono raggruppati in due blocchi distribuiti su due cromosomi differenti. In ciascun cluster i *loci* sono disposti in direzione 5'→3' nello stesso ordine con il quale sono espressi durante lo sviluppo ontogenetico (Figura 2.1).

2.1. Cluster α -globinico

I geni α sono localizzati sull'estremità distale del braccio corto del cromosoma 16 (Locus HBA, banda 16p13,3) in un tratto di DNA lungo circa 30 Kb (Figura 2.1). A monte del cluster, circa 40 Kb in 5' al gene ζ , è presente un elemento regolatore, un sito ipersensibile ad una DNAsi eritroide-specifica, denominato HS-40, (HS, Hypersensitive Site) (Higgs *et al.*, 1980). Lungo tutto il cluster α sono presenti sequenze ripetute della famiglia *Alu* I (dal nome dell'enzima di restrizione che le identifica) oltre a regioni ipervariabili HVR (High Variability Region) o minisatelliti con alto contenuto in basi G e C (Jarman *et al.*, 1988). Le sequenze *Alu* favoriscono processi di ricombinazione nel cluster- α promuovendo sia l'appaiamento tra filamenti di DNA omologhi sia costituendo siti di legame per proteine di ricombinazione (Harteveld *et al.*, 1997).

Il cluster α (Figura 2.1) comprende il gene embrionale ζ , il blocco feto-adulto composto dai geni α_2 e α_1 , tre pseudogeni ($\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$) ed il gene θ_1 . Quest'ultimo, identificato più recentemente (Marks *et al.*, 1986) possiede tutte le caratteristiche di un gene funzionale che codifica, come i geni α , una proteina di 141 residui aminoacidici, non ancora evidenziata *in vivo*. Il gene non contiene difetti apparenti che potrebbero abolirne l'espressione. Potrebbe forse trattarsi di un gene espresso solamente in uno stadio molto precoce dello sviluppo embrionale. Tuttavia la trascrizione del gene θ avviene nella linea eritroleucemica K562, dove sono stati identificati tre differenti mRNA per la presenza nel gene di tre diversi siti di inizio della trascrizione (Hsu *et al.*, 1988).

I geni α_2 e α_1 presentano differenze strutturali solo nel primo e nel secondo esone (rappresentate da sostituzioni silenti), nell'IVS2 e nella regione 3'-non tradotta (3'-UTR).

Nonostante gli mRNA maturi delle due globine siano identici, così come le proteine prodotte, il gene α_2 ha una capacità espressiva da due a tre volte superiore rispetto al gene α_1 . (Liebhaber *et al.*, 1986). A conferma del ruolo dominante del gene α_2 nella sintesi della globina α , Moi *et al.* (1987) hanno dimostrato che le mutazioni a carico del codone di inizio dei geni α (responsabili di un tipo di α -tal non delezionale) determinano un fenotipo α -tal diverso a seconda del gene interessato. Il

mutante α_2 provoca una maggiore riduzione della sintesi dell'm-RNA e quindi un fenotipo α -tal più grave rispetto a quello prodotto dal mutante α_1 .

2.2. Cluster β -globinico

Il cluster β -globinico (Figura 2.1) mappa in un *locus* di circa 80 kb nel braccio corto del cromosoma 11 (Locus HBB banda 11p 15,15) e comprende cinque geni: uno embrionale ϵ , due fetali $G\gamma$ e $A\gamma$, e due adulti δ e β . È inoltre presente uno pseudogene $\psi\beta_1$.

Lungo il cluster sono presenti sequenze ripetitive della famiglia *Alu* I e *Kpn* I che hanno mostrato avere grande rilevanza funzionale; le sequenze *Alu* I, per esempio, sono probabilmente coinvolte nella comparsa di ampie delezioni (Bianco Silvestroni, 1998). In una regione compresa tra 5 e 25 Kb a monte del gene ϵ è presente la regione di controllo del cluster la β LCR (*Locus Control Region*). L'LCR costituisce un regolatore positivo classico che, a seguito del legame con fattori trascrizionali prodotti dalle stesse cellule eritroidi, favorisce l'inducibilità dei geni globinici legandosi competitivamente ai loro promotori (paragrafo 2.4).

Circa 3,6 Kb a valle del gene β -globinico, è presente un altro *enhancer* (L1), lungo circa 6,2 Kb, composto da sequenze ripetute della famiglia *Kpn* I. Un'altra sequenza, 3'HS-1, localizzata 21,8 Kb a valle del gene β globinico, analogamente alla β LCR, ha la proprietà di attivare i geni a monte della sua sequenza tanto più intensamente quanto più questi geni divengono più vicini a seguito di una delezione (Jane & Cunningham, 1998).

2.3. Le emoglobine umane

Durante i tre stadi dello sviluppo ontogenetico vengono sintetizzati sette tetrametri emoglobinici; tre embrionali, Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), due fetali, HbF ($\alpha_2^G\gamma_2$ e $\alpha_2^A\gamma_2$) e due adulti, HbA ($\alpha_2\beta_2$) e HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). La sintesi delle Hb è governata da un preciso programma molecolare inerente lo specifico stadio di sviluppo ontogenetico. Nel complesso, gli eventi molecolari che promuovono l'attivazione di alcuni geni e la disattivazione di altri sono definiti *switch* (interruttore). Il primo *switch* spegne i geni che esprimono le globine embrionali a favore di quelli fetali, il secondo disattiva i geni fetali a favore di quelli adulti β e δ .

La sintesi delle Hb embrionali avviene molto precocemente nei megaloblasti del sacco vitellino. Dalla sesta settimana dal concepimento comincia la produzione di HbF, prima nei macrociti della milza e poi nel fegato (Figura 2.2). L'HbF è costituita di una miscela dei tetrameri $\alpha_2^G\gamma_2$ e $\alpha_2^A\gamma_2$ che si differenziano per la struttura delle globine non- α .

La sintesi di HbA, prima nei normociti del fegato poi della milza e infine del midollo osseo, inizia gradualmente già dalla decima settimana di gestazione. La produzione di HbA₂ (adulta minore, $\alpha_2\delta_2$) è più tardiva, comincia lentamente nel periodo perinatale e si rende visibile dopo i primi due mesi di età. Verso l'ottavo mese di vita extrauterina l'HbA sostituisce quasi completamente l'HbF.

Alla nascita i livelli di HbF rappresentano circa l'80% dell'Hb totale e tendono progressivamente a ridursi all'1-2% entro i primi due anni di età. È a questo stadio, vale a dire a *switch* HbF→HbA concluso, che le mutazioni a carico del gene β si manifestano clinicamente poiché lo *switch* avviene ugualmente indipendentemente dal fatto che il gene β sia funzionale o meno.

La transizione da HbF a HbA rappresenta uno degli eventi più importanti nella biologia dell'Hb e, come detto, non si completa definitivamente poiché la sintesi di modeste quantità di globine γ persiste per tutta la vita. L'adulto sintetizza HbF in una sub-popolazione di eritrociti definiti "cellule F" che contengono anche HbA. I livelli di HbF e di "cellule F" possono variare considerevolmente e si ritiene che siano geneticamente controllati (Garner *et al.*, 2000).

2.4. Elementi regolatori coinvolti nei processi di *gene switching*

I meccanismi molecolari che governano la produzione coordinata, stadio specifica, dei sette tetrameri è un processo molto complesso non ancora completamente chiarito. L'utilizzo di cellule eritroleucemiche murine e topi transgenici, prodotti con numerosi costrutti contenenti porzioni o l'intero cluster del *locus* β -globinico umano, hanno chiarito o consentito di ipotizzare la cascata di eventi che rende possibile modulare l'espressione dei geni globinici. Il processo avviene attraverso complesse interazioni fra sequenze *cis-acting* e fattori *trans-acting*. Le prime sono rappresentate da sequenze specifiche dei geni globinici e dalla regione LCR; i fattori *trans-acting* comprendono i fattori trascrizionali proteici e le attività di rimodellamento della cromatina (Vakoc *et al.*, 2005; Bank, 2006).

I motivi *cis-acting* comprendono le sequenze dei promotori, degli *enhancer*, *silencer*, *insulators* e le regioni MARs/SARs (*Matrix Attachment Regions/Scaffold Attachment Regions*) e la LCR. Queste sequenze attivano o reprimono l'espressione dei geni β -globinici nell'appropriato stadio di sviluppo ontogenetico mediante la realizzazione di meccanismi differenti. Questi possono comportare: (1) l'interazione del promotore con fattori *trans-acting* (es. i *silencer* disattivano il promotore distale del gene ϵ interagendo con un complesso di proteine incluse GATA-1 e YY1; lo *switch* embrio-fetale è regolato da altri fattori come la SSP (*Stage Selector Protein*) che interagisce con gli SSE (*Stage Selector Elements*) presenti nei promotori dei geni ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$ e nelle regioni HS-2 e HS-3 dell'LCR); (2) l'isolamento della cromatina in forma aperta, che determina il blocco dell'attività catalitica dell'enzima istone deacetilasi (questo meccanismo è tipico degli *insulators* e, in parte, anche

dell'LCR); (3) l'interazione con la matrice nucleare con formazione di loops adiacenti. Questo meccanismo facilita il riconoscimento da parte dei fattori trascrizionali e, allo stesso tempo, avvicina le sequenze *cis*-regolatrici ai promotori dei geni interessati. Questo compito è svolto dagli elementi MARs/SARs.

L'LCR è stata identificata in oltre 36 diversi *loci* di differenti specie di mammiferi. E' il maggior componente strutturale dei *loci* β -globinici murini e umani ed è necessaria per il normale livello trascrizionale. Tale regione consta di cinque domini, chiamati HS 1-5, ipersensibili alle DNasi I, localizzati in regioni sprovviste di nucleosomi che, per tale ragione, sono più accessibili di altre per l'interazione con fattori trascrizionali e con le sequenze geniche a valle. Questi siti sono eritroide-specifici e, sotto il profilo ontogenetico, stabili, cioè rappresentano regioni della cromatina in una forma accessibile in tutti gli stadi dello sviluppo.

I primi 4 siti HS sono eritroide-specifici, mentre il sito HS 5 è ubiquitario. L'LCR contiene elementi *enhancer* che sono attivi durante tutti e tre gli stadi dello sviluppo ontogenetico. I geni umani di tipo β sono regolati attraverso i loro promotori prossimali, sebbene nel caso dello *switch* feto-adulto siano in parte regolati anche dalla competizione distanza-dipendente tra i promotori dei tre geni ($G\gamma$, $A\gamma$, β) e la regione LCR. Studi condotti *in vivo* su topi transgenici hanno dimostrato che se i geni γ e β vengono inseriti insieme vicino all'LCR la loro espressione non varia nei diversi stadi di sviluppo (Harju *et al.*, 2002).

Per interpretare la modalità di interazione dell'LCR sono stati ipotizzati quattro modelli. Il *looping model* prevede che l'LCR si ripieghi in loop insieme agli elementi regolatori della trascrizione ed interagisca in modo diretto con i promotori prossimali dei geni interessati; nel *tracking model* l'LCR si lega a fattori e cofattori trascrizionali formando un complesso attivo che migra, come su un binario, lungo l'elica del DNA. Quando questo complesso è localizzato nel promotore del gene che deve essere trascritto in quel determinato stadio dello sviluppo, si assemblano gli altri elementi necessari per la trascrizione ed il gene viene espresso; nel *tracking model facilitato* si ha la formazione di un loop, come nel primo modello, che poi scorre lungo il DNA e, in base ai fattori di trascrizione presenti nella cellula eritroide in quello specifico stadio dello sviluppo, attiva la trascrizione del gene corretto; il *linking model* ipotizza la presenza di una serie di fattori di trascrizione stadio specifici sequenziali che si dispongono lungo il cluster dall'LCR sino al promotore del gene interessato mantenendo una struttura cromatinica aperta nella quale possono interagire i complessi dei fattori di trascrizione (Harju *et al.*, 2002).

Gli elementi *trans* regolatori del cluster β -globinico comprendono una grande varietà di proteine la cui struttura, le basi molecolari della loro capacità di interazione con il DNA, della espressione genica e la dinamica della organizzazione della cromatina sono state in parte precisate.

Resta da chiarire come gli apparati nucleoproteici e multiproteici interagiscano in un sistema altamente integrato e regolato (Figura 2.3). Lo *switch* è infatti regolato dal rapporto tra diversi fattori di attivazione e repressione. I geni β -globinici umani, data la loro organizzazione in famiglia multigenica, sono tra i sistemi modello più adatti per affrontare questo problema. Per una trattazione dettagliata dei singoli fattori trascrizionali e del loro ruolo si rimanda a recenti monografie (Harju *et al.*, 2002; Bank, 2005 e 2006).

2.5. Basi molecolari e classificazione fenotipica delle talassemie

Le sindromi talassemiche rappresentano un gruppo di emoglobinopatie a trasmissione autosomica recessiva che derivano da alterazioni a carico dei geni globinici. Differentemente dalle emoglobinopatie qualitative che danno origine a varianti emoglobiniche, che possono essere totalmente asintomatiche o produrre quadri clinici di gravità variabile in relazione all'alterazione funzionale dell'Hb, le talassemie (tal) sono caratterizzate da ridotta o assente sintesi di una o più catene globiniche.

Tali sindromi sono molto eterogenee sia nel difetto molecolare che le determina che negli aspetti biochimici e fenotipici che le caratterizzano. A seconda del gene globinico compromesso si distinguono in α -, β -, γ - o δ -tal. La sintomatologia clinica e la gravità della malattia sono riconducibili al grado di sbilancio globino-sintetico α /non- α ; questo rapporto è pari a 1 nel soggetto normale mentre nel portatore β -tal varia fra 1,5-2 ed in quello α -tal fra 0,6-0,8.

La presenza di un eccesso di globina controparte, che continua ad essere prodotta in concentrazioni normali, all'interno dei precursori dei globuli rossi (GR) ha un forte impatto sul fenotipo finale. Le catene controparte libere sono incapaci di formare omotetrameri funzionali e stabili e precipitano nei GR, danneggiandoli e riducendone la sopravvivenza (emolisi). I precipitati globinici hanno differenti proprietà fisico-chimiche: le catene β libere sono relativamente stabili, formano omotetrametri (HbH) e precipitano molto lentamente formando diffuse inclusioni sotto-membranose. Tali precipitati accrescono la rigidità meccanica del GR accelerandone la distruzione. Viceversa, le catene α spaiate, che non formano omotetrametri, sono instabili e precipitano rapidamente confluendo al centro della cellula in un agglomerato (corpi inclusi) che prende contatto con le proteine del citoscheletro alterandole e accrescendo la fragilità meccanica del GR causandone la distruzione. Inoltre, la permeabilità della membrana aumenta determinando una lisi prematura. Lo stato anemico che ne consegue porta all'espansione del midollo osseo a causa dell'iperstimolazione insorta per compensare l'eritropoiesi inefficace. A questa seguono danni non solo a carico del midollo e del sistema scheletrico, ma anche di molti altri organi, in particolare fegato e milza (Figura 2.4).

Le tal sono diffuse in tutto il mondo sebbene in origine fossero limitate ad una fascia comprendente popolazioni a pregressa elevata endemia malarica di origine Mediterranea, Africana,

Asiatica, situate nella fascia tropicale e sub tropicale estesa dal Mediterraneo al Sud-Est Asiatico. La presenza delle tal in queste zone è collegata alla diffusione della [malaria](#) che ha operato da agente selezionatore. Nel mondo i portatori sono oltre 300 milioni. In Italia le sindromi tal sono particolarmente frequenti nelle regioni meridionali (Campania, Puglia, Calabria), nelle isole (Sicilia e Sardegna) e nel Ferrarese e, per motivi legati a fenomeni di emigrazione, anche in altre regioni.

2.6. Le α -talassemie

Le α -tal sono causate dalla produzione difettosa o assente di catene α . Il danno molecolare più frequente è la delezione di segmenti di dimensione variabile a livello dei *loci* α . Altre alterazioni sono rappresentate da mutazioni puntiformi per sostituzione nucleotidica singola o delezioni di uno o pochi nucleotidi.

L'eterogeneità fenotipica delle α -tal è connessa al numero di geni talassemici per genotipo. Il genotipo normale ha un assetto a quattro geni ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), due su ciascun cromosoma 16. La forma α -tal più lieve, l' α_2 -tal ($-\alpha/\alpha\alpha$), è determinata dalla delezione (o altra anomalia) di uno dei quattro *loci* α ed è, nel complesso, asintomatica. L' α_1 -tal ($-\alpha/-\alpha$ o $--/\alpha\alpha$, a seconda che i geni α -tal siano *in cis* o *in trans* sul medesimo cromosoma) deriva dalla compromissione di due geni su quattro.

Fenotipicamente si distinguono in α^+ -tal e α^0 -tal. Le α^+ -tal comprendono il genotipo $-\alpha/\alpha\alpha$ che non determina alterazione dei parametri ematologici salvo una lieve riduzione dell'MCV (volume eritrocitario medio). Solo nel 50% dei casi il rapporto $\alpha/\text{non-}\alpha$ è leggermente inferiore a 0,9. Nell' α^0 -tal, dove è assente l'attività sintetica di due dei quattro geni ($-\alpha/-\alpha$ o $--/\alpha\alpha$), il quadro ematologico è quello tipico del talassemico con riduzione del livello medio di Hb, aumento del numero dei globuli rossi circolanti, dell'MCV, del contenuto globulare medio di Hb (MCH) e alterazione della morfologia eritrocitaria. Il rapporto $\alpha/\text{non-}\alpha$ è molto inferiore a 1, in genere tra 0,6 e 0,7.

Le forme delezionali sono favorite dall'elevata omologia strutturale delle due coppie di unità ricombinanti altamente omologhe (X, X; Z, Z) nelle quali sono localizzati i geni α (Figura 2.5). L'elevata omologia di struttura favorisce errori di appaiamento durante la meiosi e l'occorrenza di *crossing-over* omologhi ma dislocati che portano alla delezione di un gene su un cromosoma ed alla comparsa di tre geni α sul cromosoma complementare. (Figura 2.5).

Le forme predominanti di α -tal da delezione, diffuse in tutte le aree del mondo, sono la $\alpha^{3.7}$ - e la $\alpha^{4.2}$ -tal. La $\alpha^{3.7}$ -tal è la più frequente nel bacino del Mediterraneo e origina a seguito di un *crossing-over* disuguale tra i segmenti Z di un gene α_2 e di un gene α_1 (Figura 2.5). La rimozione di un tratto lungo 3,7 Kb compreso fra la regione 3' del gene α_2 e quella 5' del gene α_1 produce il gene ibrido da delezione $\alpha_2\alpha_1$ denominato *locus* $\alpha^{3.7}$. Il risultato del *crossing-over* disuguale sull'altro

cromosoma è l'aplotipo triplicato $\alpha\alpha\alpha$ che, all'interno del normale assetto $\alpha\alpha$, porta il gene tal complementare al locus $\alpha^{3.7}$: $\alpha_2\alpha^{-anti3.7}\alpha_1$ (Higgs *et al.*, 1980). Il locus ibrido $\alpha^{3.7}$ mantiene la sequenza promotore del gene α_2 ed ha pertanto una capacità espressiva maggiore rispetto al gene α_1 . Nell'eterozigote $\alpha^{3.7}$ -tal il rapporto α_2/α_1 è circa 1,7 mentre nel normale è circa 2,7.

Nella Figura 2.5 è schematizzato il processo responsabile della delezione di 4,2Kb, la forma α -tal ($\alpha^{4.2}$ -tal) più comune nel Sud-Est asiatico. In questo caso, il *crossing-over* non genera loci ibridi poiché si stabilisce tra i segmenti omologhi X (Dodè *et al.*, 1993).

Un'altra mutazione α -tal abbastanza frequente in Italia, specialmente in Puglia, è la delezione di 20,5 Kb che rimuove tutto il gene α_2 e gran parte di quello α_1 ed è causata, presumibilmente, da un evento di *crossing-over* simile a quello che origina la $\alpha^{4.2}$ -tal (Figura 2.6). Con minore incidenza, è pure presente la delezione -MED, la quale rimuove entrambi i loci α dello stesso cromosoma (Bianco Silvestroni, 1998). La diagnosi molecolare delle α -tal da delezione si esegue direttamente mediante reazioni di amplificazione enzimatica *in vitro* (paragrafo 4.9).

Nel bacino del Mediterraneo sono diffuse anche α -tal da mutazioni puntiformi che causano la riduzione o la mancata sintesi della globina α . Spesso la mutazione è localizzata in una regione codificante e dà origine ad una globina strutturalmente anomala e molto instabile tanto da risultare assente o presente in concentrazioni molto ridotte (circa 1-2%) nel sangue periferico degli eterozigoti. Allo stato eterozigote i difetti puntiformi o le delezioni di pochissimi nucleotidi che causano α -tal determinano un fenotipo microcitemico più o meno evidente, ma mai grave. Appartengono a queste categorie le mutazioni che colpiscono il codone d'inizio ATG, facilmente identificabili mediante digestione enzimatica perchè aboliscono il sito per *Nco* I. La sostituzione $\underline{A}T\bar{G}\rightarrow\underline{A}C\bar{G}$ al gene α_2 , è frequente in Italia e specialmente in Sardegna (Pirastu *et al* 1984); la sostituzione $\underline{A}T\bar{G}\rightarrow\underline{G}T\bar{G}$ è stata descritta sia sul gene α_1 che sul gene ibrido $\alpha^{3.7}$ (Moi *et al.*, 1987). Inoltre, a carico del codone d'inizio del gene α_2 è stata identificata anche la mutazione da *frameshift* $\underline{A}T\bar{G}\rightarrow A-G$ (Bianco Silvestroni, 1998).

In Sardegna il 33% della popolazione è portatore silente ($-\alpha/\alpha\alpha$), l'1,5% doppio eterozigote ($-\alpha/-\alpha$), e lo 0,8% è portatori del tipo $--/\alpha\alpha$.

2.7. Le β -talassemie

Le β -tal sono caratterizzate da assente (β^0 -) o ridotta (β^+ -tal) sintesi delle catene β -globiniche. Sono clinicamente asintomatiche nell'eterozigote anche se nella maggioranza dei casi vi sono segni ematologici che ne permettono la diagnosi poiché si manifestano con indici eritrocitari al di sotto

della norma o ai limiti inferiori di essa (MCV <77 fl, MCH <27pg). L'HbA₂ è chiaramente aumentata (>4,5%) e lo sbilancio globinosintetico è intorno al valore teorico 2. Nei portatori β⁺-tal il quadro ematologico microcitemico è più lieve, l'HbA₂ è aumentata ed il rapporto α/non-α è meno sbilanciato che nei portatori β⁰-tal (circa 1,5 e da 1,5 a 2, rispettivamente).

In base al fenotipo clinico si distinguono tre quadri principali: talassemia minor o microcitemia (stato di portatore eterozigote), talassemia major (TM, stato clinico grave, trasfusione dipendente) e talassemia intermedia (TI, stato clinico lieve, non trasfusione dipendente) ([Weatherall, 2001](#); [Stamatoyannopoulos et al., 2001](#); [Steinberg et al., 2001](#)).

La condizione TM (omozigosi β⁰/β⁰ o doppia eterozigosi β⁰/β⁺), si colloca per gravità clinica all'estremo opposto rispetto allo stato di portatore. E' caratterizzata da grave anemia (Hb<7g/dl) microcitica ipocromica, intensa anisopoichilocitosi, reticolociti tendenzialmente diminuiti, elevato sovraccarico marziale, splenomegalia. Il soggetto affetto da TM giunge all'osservazione clinica in età neonatale per la grave anemia che, se non trattata adeguatamente, esprime tutte le caratteristiche tipiche della malattia (Figura 2.4) che le attuali terapie (trasfusioni, terapia ferrochelante) hanno fortemente attenuato ([Stamatoyannopoulos et al., 2001](#)).

Le forme TI (omozigosi β⁺/β⁺ o β⁰/β⁰ o doppia eterozigosi β⁰/β⁺) si collocano clinicamente in posizione intermedia rispetto alle forme TM e quella di portatore. La TI presenta un ampio spettro di gravità dell'anemia (Hb 7-9,5 g/dl), peraltro sempre microcitica ipocromica, tanto da mostrare un comportamento clinico talvolta paragonabile alle forme TM oppure silente come nel portatore. L'età alla quale il paziente richiede una valutazione specialistica è più tardiva rispetto alle TM, sicuramente oltre i due anni di età ma, talvolta, perfino in età adulta ([Weatherall, 2001](#); [Steinberg et al., 2001](#)).

Il meccanismo alla base del fenotipo lieve che caratterizza i pazienti affetti da TI desta grande interesse ed è stato ampiamente studiato. Nella maggior parte dei casi la condizione TI è correlata alla presenza di uno o due alleli β⁺, nei quali la mutazione riduce, senza abolire, la produzione di globine β. In altri casi, la sindrome tal lieve è determinata da alleli β-globinici che dirigono la sintesi di Hb iperinstabili. Tuttavia, in alcuni casi, i pazienti affetti da TI risultano omozigoti per un allele β⁰, tipico dei pazienti affetti da TM. Poiché lo stato di grave anemia che caratterizza le β-tal riflette il grado di squilibrio globinico α/non-α, i determinanti genetici che correggono questo sbilancio sono in grado di ridurre la severità clinica negli omozigoti e nei composti eterozigoti. Nella maggior parte delle forme di TI, le manifestazioni cliniche attenuate sono conseguenti alla coereditarietà di geni α-tal (in molte popolazioni ad elevata incidenza β-tal, è spesso frequente anche l'α-tal) e/o alla presenza di HbF in concentrazioni prossime a quelle delle globine β sintetizzate dall'adulto normale (paragrafo 2.8). La coereditarietà con forme α₂-tal non modifica la severità clinica, mentre la presenza di due o tre geni α

non funzionanti determina un notevole miglioramento fenotipico soprattutto in concomitanza con una mutazione di tipo β^+ (Thein, 2005).

Non è chiaro il motivo per il quale in alcuni casi di TI lo *switch* non porti al silenziamento dei geni γ come nella stragrande maggioranza dei pazienti β^0 -tal che, infatti, mostrano una anemia severa dipendente da trasfusione. Numerose evidenze dimostrano che la capacità intrinseca di produrre HbF può essere correlata anche a determinanti genetici, *quantitative trait loci* (QTLs), che segregano indipendentemente dal cluster β -globinico (Garner *et al.*, 2000).

I pazienti TI differiscono dai TM anche per l'iperbilirubinemia e la reticolocitosi. Ciò si spiega perché, essendo il difetto genetico più lieve rispetto alle forme TM, una parte dei precursori eritroidi riesce a raggiungere la maturazione incrementando il numero di reticolociti circolanti e contribuendo alla quota emolitica, più marcata che nella TM. Inoltre, la morte intramidollare, dovuta all'eritropoiesi inefficace, colpisce elementi che hanno raggiunto un certo grado di emoglobinnizzazione. Spesso gli affetti da TI presentano splenomegalia.

Quanto detto riassume in maniera molto schematica un panorama in realtà molto più complesso. Infatti, all'eterogeneità molecolare dei disordini β -tal corrisponde una classificazione clinica che in molti casi segue parallelamente la prima, non sempre coincidente in quanto molte variabili, molecolari e non, possono modificare il fenotipo ematologico che in genere si associa ad una determinata mutazione o alla combinazione di due diverse mutazioni.

Ad oggi sono stati descritti circa 200 difetti che determinano le β -tal. Questi comprendono mutazioni singole, piccole delezioni, inserzioni o delezioni (rare) nel gene β che interferiscono con l'elaborazione, la stabilità e la traduzione dell'mRNA, oppure determinano la produzione di globine β molto instabili. La lista dettagliata delle mutazioni è consultabile nel sito Globin Gene Server <http://globin.cse.psu.edu> (Hardison *et al.*, 2002; Steinberg *et al.*, 2001; Stamatoyannopoulos *et al.*, 2001).

Le mutazioni β -tal sono classificate in base al meccanismo mediante il quale esse compromettono l'attività del gene β . Nel testo che segue sono trattate quelle responsabili delle sindromi β^0 - e β^+ -tal più comuni nel bacino del Mediterraneo e, in particolare, in Sardegna.

I difetti che alterano la trascrizione del gene β , nella maggior parte dei casi, sono mutazioni puntiformi a livello dei blocchi funzionali del promotore, come l'ATA box (mutazioni ai nt -28, -29, -30, -31), il CACCC box prossimale (ai nt -86, -87, -88, -90, -92) e quello distale (nt -101). Queste mutazioni conferiscono quasi sempre un fenotipo β^+ -tal lieve, silente o sub-silente, poiché non bloccano la trascrizione ma ne riducono l'efficienza del 20 - 40%. Nella popolazione italiana le più diffuse sono la -101 (C→T), la -87 (C→G) e la -86 (C→A). La β -87 C→G altera il sito di legame per il fattore trascrizionale EKLF (Ho *et al.*, 1998). Nell'eterozigote l'attività residua del gene β è

circa 45-50%, mentre nell'omozigote il quadro clinico è più grave in quanto l'espressione si riduce a livelli del 20-30%.

I difetti nella maturazione dell'mRNA dipendono da mutazioni che aboliscono, alterano o creano *ex-novo* i dinucleotidi invariati GT (sito donore) o AG (sito accettore) indispensabili per il normale processo di *splicing*. Nella popolazione italiana le più frequenti sono le mutazioni IVS I-1 (G→A) e IVS II-1 (G→A) che annullano il sito di *splicing* e in omozigosi causano β^0 -tal.

Quando la mutazione riduce l'efficienza di un sito di *splicing* la condizione β -tal che ne deriva è di tipo β^+ . In Italia la più frequente è la β^+ IVS I-6 (T→C), o β^+ Portoghese. Allo stato omozigote è associata a manifestazioni cliniche che variano da condizioni lievi non dipendenti da trasfusioni a quadri clinici gravi. L'attenuazione del quadro clinico è proporzionale alla quota di HbF prodotta nel soggetto adulto, ma il meccanismo molecolare che, limitatamente ad alcuni soggetti, determina il mancato spegnimento dei geni fetali, non è stato ancora chiarito.

Anche le mutazioni che generano un sito di *splicing* alternativo sono di tipo β^+ . In Italia le più frequenti sono la β^+ IVS I-110 (G→A) e la β^+ IVS II-745 (C→G). La prima, molto diffusa in tutto il bacino del Mediterraneo, genera un nuovo sito *acceptor* posizionato 19 nucleotidi a monte di quello normalmente presente all'estremità 3' dell'IVS I. La sequenza è riconosciuta in maniera preferenziale durante lo *splicing*, tanto che l'80-90% delle molecole di pre-mRNA maturano in modo anormale e solo il restante 10-20% è rappresentato da molecole normali.

Le mutazioni al codone d'inizio e quelle non-senso sono sempre di tipo β^0 . Le mutazioni non-senso consistono nella sostituzione di una base e originano un codone di stop (TAA, TAG o TGA). In Italia, l'unica mutazione non-senso è la β^0 39 (CAG→TAG). Nella popolazione Sarda, nella quale l'incidenza dei portatori β -tal è molto elevata (circa 12,5%), quasi tutti sono portatori di alleli β^0 -tal gravi dovuti per il 95% alla mutazione nonsense β^0 39 e per circa il 2% a quella frameshift β^0 6 che porta all'arresto prematuro della traduzione (Rosatelli *et al.*, 1987; Masala *et al.*, 1988; Rosatelli *et al.*, 1992).

Le β -tal sono fra le prime patologie umane studiate con le tecniche del DNA ricombinante. Nel 1982 Orkin *et al.*, attraverso l'analisi di sette siti polimorfi in una regione di 60 kb all'interno del cluster β -globinico, hanno definito nove diversi aplotipi, in *linkage* con differenti mutazioni β -tal (Figura 2.7). Lo studio di 91 cromosomi β^0 - o β^+ -tal provenienti dall'area mediterranea ha dimostrato che le frequenze degli aplotipi della popolazione talassemica erano sovrapponibili a quelle osservate nella popolazione normale.

Sebbene gli aplotipi riflettano la presenza di specifici alleli nella popolazione, non sono sufficienti per correlare uno specifico difetto ad un determinato aplotipo perchè la stessa mutazione può essere distribuita su più di un aplotipo oppure più mutazioni possono essere associate sullo stesso.

Per esempio, nella popolazione sarda la mutazione β^0 -39 tal è associata a cinque diversi aplotipi. I più frequenti sono l'aplotipo I (22%), il II (64%) e, anche se raramente, l'aplotipo IX (4%) (Pirastu *et al.*, 1987; Masala *et al.*, 1988; Piras *et al.*, 2005).

2.8. Disordini genetici correlati alla sintesi di elevati livelli di HbF nell'individuo adulto

Nell'adulto normale la quota di HbF supera raramente l'1% dell'Hb totale. La sintesi delle globine fetali ($G\gamma$ e $A\gamma$) è confinata ad una linea di cellule, chiamate cellule F, il cui numero è geneticamente determinato (Garner *et al.*, 2000). Alla nascita, il rapporto tra i tetrameri fetali $\alpha_2G\gamma_2/\alpha_2A\gamma_2$ è di 70/30. Nella vita perinatale si assiste al decremento quantitativo a favore dell'HbA e, contemporaneamente, ad un cambiamento nella composizione percentuale dell'HbF; il rapporto $G\gamma/A\gamma$, infatti, si inverte e si stabilizza intorno al valore di 40/60 (Schroeder, 1980; Stamatoyannopoulos *et al.*, 1993).

Livelli incrementati di HbF nella vita adulta possono essere dovuti ad effetti primari o secondari di patologie acquisite o ereditarie.

In presenza di disordini acquisiti, il rapporto $G\gamma/A\gamma$ è sempre di "tipo adulto" (40/60) e l'incremento di HbF è indirettamente determinato dalla iperstimolazione del midollo osseo. Al contrario, valori elevati di HbF con rapporto di "tipo fetale" ($G\gamma/A\gamma = 70/30$) oppure con una forte prevalenza del tetramero $\alpha_2A\gamma_2$ (60-95%) o, ancora, con oltre l'85% del tetramero $\alpha_2G\gamma_2$, indicano la presenza di determinanti genetici quali delezioni, polimorfismi e mutazioni puntiformi a carico dei geni γ e/o di altre porzioni del cluster β -globinico coinvolte nella regolazione dell'espressione dei geni fetali. Nelle condizioni ereditarie l'aumento di HbF può essere il diretto risultato di alterazioni genetiche (*Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin* o HPFH) oppure conseguente a stati di stress eritropoietico o del processo emolitico quali quelli delle sindromi β -tal e anemia falciforme.

Livelli incrementati di HbF possono essere osservati in soggetti adulti affetti da alcune patologie quali coriocarcinoma, tumori testicolari, anemia perniziosa. Tuttavia, l'aumento di HbF è variabile e non sempre presente. Condizioni acquisite nelle quali è sempre riscontrabile un'augmentata sintesi di HbF sono la gravidanza, imponenti perdite ematiche, leucemie, trapianto di midollo. Queste condizioni hanno in comune l'anemia, cronica o acuta, conseguenza diretta della patologia o, piuttosto, del trattamento terapeutico (Wajcman *et al.*, 2000).

Le condizioni ereditarie contraddistinte da un'elevata quota di HbF sono le sindromi HPFH e la $\delta\beta$ -tal (Wood, 2001). Il termine $\delta\beta$ -tal deriva dall'osservazione che in questa forma di tal gli eterozigoti mostrano elevati valori di HbF e livelli di HbA₂ normali. L'anomala attività dei geni γ , anomala perchè persiste nello stadio ontogenetico adulto, è controbilanciata da una corrispondente

diminuzione dell'attività del gene β -globinico, quando presente, cosicché la sintesi globinica risulta bilanciata (Wood, 2001).

La distinzione fra HPFH e $\delta\beta$ -tal è molto sottile ed è relativa al quadro clinico ed ematologico del portatore. Le HPFH includono un gruppo molto eterogeneo di condizioni benigne caratterizzate, in eterozigosi, da livelli di HbF compresi fra il 4 e il 30% con indici globulari ed ematocrito vicini al normale. Gli eterozigoti $\delta\beta$ -tal hanno livelli di HbF inferiori (5-15%), l'ematocrito leggermente ridotto e indici globulari microcitici e ipocromici.

A loro volta, le HPFH si distinguono in HPFH non-delezionali (ndHPFH) e HPFH da delezione (dHPFH) a seconda che il cluster β -globinico sia intatto oppure presenti delezioni più o meno estese. In queste ultime, la delezione coinvolge l'estremità 3' del cluster β e può estendersi fino a rimuovere i geni δ e β (Rochette *et al.*, 1994). Nelle $\delta\beta$ -tal la delezione può rimuovere, oltre ai geni δ e β , anche il gene $A\gamma$.

Allo stato omozigote i pazienti affetti da $\delta\beta$ -tal e dHPFH presentano solo HbF poichè sia il gene δ che quello β risultano deleti in tutto o in parte. Poichè le globine γ vengono prodotte in misura da garantire una buona compensazione di quelle α , ne risulta una anemia emolitica di modesta entità. Per lo stesso motivo, l'associazione di queste sindromi con la β -tal comporta un ridotto sbilancio globinosintetico ed un quadro clinico più lieve. Il motivo per il quale, differentemente dalle β -tal, le $\delta\beta$ -tal e le HPFH determinano la produzione di livelli elevati di catene γ , non sono ancora stati definiti nei dettagli. A tal fine, sono stati proposti tre meccanismi: 1) la delezione di sequenze regolatrici del cluster β , che agiscono come elementi regolatori positivi o negativi. Il fenotipo risultante è un equilibrio di quelle sequenze regolatrici che rimangono nel cluster; 2) la delezione impedisce la giustapposizione in prossimità dei geni γ di *enhancer* normalmente localizzati a valle del gene β . Ciò favorirebbe un incremento della espressione dei geni fetali; 3) la delezione del gene β permette alla β -LCR di continuare a interagire con i geni γ adulti normalmente quiescenti. Tuttavia, un unico meccanismo non può spiegare i differenti fenotipi associati alle delezioni. Si ritiene che i meccanismi non siano esclusivi di un particolare tipo di delezione e che il loro contributo possa differire da caso a caso relativamente al particolare tipo di delezione (Wood, 2001).

In Sardegna, soprattutto nell'area meridionale dell'isola, è presente con incidenza di circa 1:1000 una forma non delezionale di $\delta\beta$ -tal associata ad alti livelli di HbF. Il difetto molecolare della $\delta\beta$ -tal di tipo sardo deriva dalla sostituzione C→T nel promotore del gene $A\gamma$ (al nt -196) in *cis* al difetto talassemico β^{039} .

Le ndHPFH sono mutazioni puntiformi a livello della regione promotrice del gene $G\gamma$ o di quello $A\gamma$, la maggior parte delle quali sono localizzate intorno alle posizioni localizzate a -114, -175 and -200 rispetto al sito Cap (Stamatoyannopoulos *et al.*, 2001). La sostituzione nucleotidica singola modifica gli elementi regolatori *cis-acting* alterando il sito di legame per i vari fattori trascrizionali *trans-acting*, eritroidi specifici o ubiquitari (Ottolenghi *et al.*, 1989). Pertanto, la mutazione può decrementare l'affinità di un fattore di repressione per la specifica sequenza di riconoscimento e di conseguenza ridurre l'effetto del repressore, oppure può favorire il legame con fattori trascrizionali che agiscono positivamente e che normalmente non si legherebbero al promotore (Rochette *et al.*, 1994; Forget, 1998; Jane e Cunningham, 1998; Wood, 2001).

La Figura 2.8 mostra la sequenza dettagliata del promotore γ -globinico, dei siti di legame per i fattori di trascrizione e le mutazioni nd-HPFH che causano il mancato silenziamento del gene mutato, e determinano nel portatore la sintesi di HbF composta principalmente dal tetramero contenente la globina γ codificata dal gene mutato. I fattori proteici coinvolti sono: SSP, SP1, CDP, CP1, GATA-1, NF-E3, EKLF-like, OCT-1 (Rochette *et al.*, 1994; Forget, 1998; Jane e Cunningham, 1998; Wood, 2001; Zhou *et al.*, 2004).

Le sostituzioni nucleotidiche singole identificate nel gene $G\gamma$ sono la -202C→G, -200+C, -175T→C, -161G→A, -158 C→T (o polimorfismo *Xmn* I- $G\gamma$), -114C→T and -114C→G, -110A→C. Quelle al gene $A\gamma$ interessano le posizioni -202C→T, -198T→C, -196C→T, -195C→G, -175T→C, -158C→T, -117G→A e -114C→T oltre a una breve delezione di 13 bp (da -114 a -102). Ciascuna di queste mutazioni è associata ad uno specifico fenotipo HPFH e sono state descritte in quasi tutti i gruppi etnici. Quando la stessa mutazione è presente in popolazioni differenti, è associata ad aplotipi di Orkin diversi, suggerendo un'origine indipendente della mutazione. Un esempio è la $A\gamma$ -117 G→A linked all'aplotipo VII nei sardi (Pistidda *et al.* 1995) e all'aplotipo I nei Greci (Yang *et al.* 1988).

Negli eterozigoti ndHPFH i livelli di HbF variano dal 10% al 30% nei $G\gamma$ -HPFH e fra 4% e 20% negli eterozigoti $A\gamma$ -HPFH.

La ndHPFH $G\gamma$ -158 C→T (o *Xmn* I- $G\gamma$), data la sua frequenza ($f = 0,32 - 0,35$) in tutti i gruppi etnici, è considerata un polimorfismo (Gilman & Huisman, 1985). Contrariamente alle altre mutazioni ndHPFH, l'*Xmn* I- $G\gamma$ non contiene sequenze di legame riconoscibili dai fattori di trascrizione noti. Inoltre, ha effetti minimi nei soggetti normali e negli eterozigoti β -tal mentre può essere responsabile di un significativo incremento di HbF (100% $G\gamma$) nelle condizioni di stress emolitico cronico tipiche degli omozigoti β -tal (Thein, 2005).

Il meccanismo attraverso il quale la $G\gamma$ -158 può determinare un incremento di HbF non è ancora stato chiarito. La sua frequenza risulta molto bassa nei pazienti TM rispetto a quella calcolata nei

soggetti affetti da TI. Questa differenza suggerisce un suo particolare ruolo nell'attenuazione della severità del quadro clinico e giustifica, in parte, l'esistenza di fenotipi clinici differenti associati alla stessa mutazione β -tal. Ciò nonostante, livelli di HbF inferiori al 2% e omozigosi per Xmn I- $G\gamma$, in alcuni soggetti TM, lasciano supporre che l'effetto del polimorfismo sia modulato dalla presenza di altri determinanti genetici (Garner *et al.*, 2004; Bandyopadhyay *et al.*, 2005).

Sono state descritte condizioni nelle quali la persistenza di HbF non è riconducibile a determinanti HPFH o $\delta\beta$ -tal. Nella maggior parte dei casi, l'HbF non supera il 5-10% dell'Hb totale ma, in presenza di forme β -tal, nelle quali rappresenta oltre il 95%, garantisce livelli di Hb circolante pari a 7-10 gr/dl. I meccanismi molecolari alla base di questo incremento di HbF non sono ancora stati chiariti.

Studi condotti su diverse popolazioni indicano una correlazione fra gravità della forma β -tal ed altre variabili genetiche polimorfe (microsatelliti e sostituzioni nucleotidiche singole o SNP) che, modulando la sintesi di HbF, determinerebbero un miglioramento del fenotipo complessivo del paziente (clinico, ematologico, eritrocitario). Numerosi siti polimorfi posizionati all'interno del cluster β -globinico, da soli o in combinazione, sembrano agire da modulatori della sintesi dell'HbF sia in soggetti β -tal che normali (Goncalves *et al.*, 1998; Lapoumeroulie *et al.*, 1999; Ragusa *et al.*, 2003; De Angioletti *et al.*, 2004, Bandyopadhyay *et al.*, 2005, Papachatzopoulou *et al.*, 2006). In particolare si tratta di alcune SNP localizzate nel promotore del gene $G\gamma$, della sequenza (TG)n(CG)m compresa nell'IVS2 di entrambi i geni fetali, del microsatellite (AT)xTy in 5' al gene β e della sequenza ricca in AT che caratterizza la regione HS2 della LCR (Figura 2.7). La sintesi di HbF in molti casi sarebbe influenzata anche dalla presenza del polimorfismo $G\gamma$ -158 (Zertal-Zidani *et al.*, 2002). Solo in alcuni dei sopraccitati lavori (Ragusa *et al.*, 2003; De Angioletti *et al.*, 2004) è stato determinato l'assetto polimorfo relativo delle 10 posizioni *in cis* nel cluster β -globinico di soggetti β -tal con alti livelli di HbF. In letteratura, molti lavori riportano i risultati correlando i livelli di HbF con uno o al massimo due siti variabili alla volta.

De Angioletti *et al.* (2004) hanno esaminato composti eterozigoti per la mutazione β^+ -87 C→G di origine campana e siciliana. Gli autori hanno evidenziato un'ampia eterogeneità clinica: alcuni soggetti presentavano un quadro clinico attenuato con scarsa o nessuna esigenza trasfusionale, mentre altri un fenotipo tipicamente talassemico. Questa eterogeneità non era riconducibile al tipo di mutazione presente sul gene β *in trans* alla β^+ -87, dal momento che i soggetti con fenotipo attenuato erano portatori di mutazioni più gravi di quelle presenti nei soggetti con quadro clinico grave. Il fattore importante era la quota di HbF: $6,2 \pm 1,5$ g/dl e $G\gamma/\gamma_{tot}$ $69,4 \pm 2,6\%$ nei fenotipi β -tal attenuati e $2,6 \pm 1,5$ g/dl ($G\gamma/\gamma_{tot}$ $48,8 \pm 16,2\%$) nei fenotipi β -tal gravi. Gli autori ritengono che questa

differenza potrebbe dipendere dallo specifico assetto polimorfo *in cis* al gene β^+-87 , differente nei due gruppi analizzati.

Lo stesso assetto polimorfo del gruppo con fenotipo attenuato è stato descritto da Ragusa *et al.* (2003), come potenzialmente implicato nella persistente sintesi di HbF. Gli Autori descrivono due famiglie siciliane nelle quali, contrariamente all'atteso, la mutazione β^0 IVS2nt1 G→A determina un fenotipo asintomatico negli omozigoti ed uno molto attenuato nei composti eterozigoti per la β^0 IVS2nt1, ed altre mutazioni β^0 gravi. L'assenza di un quadro clinico severo era interpretabile considerando che nei probandi oltre il 90% dell'Hb circolante era rappresentato da HbF. Gli Autori concludono che il mancato spegnimento dei geni fetali di questi pazienti sarebbe riconducibile al fatto che la mutazione β^0 IVS2nt1 è associata all'aplotipo III di Orkin (Orkin *et al.*, 1982) ed è in linkage all'assetto polimorfo: LCR (AT)₉N₁₂(AT)₁₀, G γ -158 T, G γ -IVS2 (TG)₁₁(CG)₃, A γ -IVS2 (TG)₁₃, β (AT)₉T₅. Un'altra interessante osservazione che avvalorava l'ipotesi di Ragusa *et al.* (2003) è rappresentata dagli omozigoti β^0 IVS2nt1 ma con aplotipo di Orkin I e/o IX il cui quadro clinico non risulta mai asintomatico.

Alcuni dei risultati descritti appaiono piuttosto attraenti poiché indicano che la definizione di questi assetti polimorfi (da non confondere con gli aplotipi di Orkin) possono chiarire le basi molecolari per la correlazione genotipo/fenotipo in numerosi casi di β -tal oltre che dimostrarsi utili in sede di diagnosi molecolare della patologia. L'associazione di una mutazione β -tal severa con un assetto polimorfo che sostiene (o modula) la sintesi di HbF, potrebbe rivelarsi un elemento importante da considerare in sede di diagnosi prenatale e/o di terapia trasfusionale.

La configurazione (o le configurazioni) polimorfe in *linkage* alle mutazioni β^039 e $\beta^0(-A)6$, tipiche dei β^0 -tal sardi non sono note. L'interesse è rafforzato dall'evidenza che, sebbene la maggioranza degli omozigoti e dei composti eterozigoti per tali mutazioni sviluppino forme di TM, circa il 10% manifestano TI. In Sardegna, fra gli omozigoti $\beta^0(-A)6$ o nei doppi eterozigoti $\beta^0(-A)6/\beta^039$ le forme TI sono più frequenti di quelle TM (Galanello *et al.*, 1989). Nel 24% dei soggetti TI il quadro clinico attenuato è riconducibile ad una ridotta sintesi di globine α che riduce lo squilibrio globinosintetico. Inoltre, poiché la mutazione $\beta^0(-A)6$ è sempre associata all'aplotipo IX di Orkin, che a sua volta è in linkage al polimorfismo G γ -158, i TI mostrano omo- o eterozigosi per l'*Xmn* I.

Negli omozigoti per la β^039 -tal prevalgono condizioni di TM, sebbene non siano rari i casi di TI (Galanello *et al.*, 1989). Le ragioni non sono conosciute ed il fenotipo lieve non dipendente da trasfusione non trova giustificazione né per la concomitante presenza di determinanti α -tal (presenti solo nel 25% dei pazienti) né nella positività per il polimorfismo in G γ -158 (positivo solo nel 9% dei pazienti).

Nella β -tal omozigote la HbF rappresenta praticamente l'unico tetramero sintetizzato. Poiché i geni γ sono fisicamente associati al gene β -globinico, lo studio della composizione della HbF nelle sindromi tal assume una notevole importanza in quanto può fornire utili indicazioni sui meccanismi della attivazione ed espressione di tutti i geni globinici. L'HbF dei tal adulti ha una composizione percentuale in globine $G\gamma$ e $A\gamma$ significativamente diversa rispetto a quella del neonato normale o di quello tal. Tale diversa composizione si è dimostrata dipendere non soltanto dai meccanismi di disattivazione dei geni fetali, che dopo la nascita tendono ad invertire il rapporto $G\gamma:A\gamma$, ma soprattutto in modo particolare dalla presenza di specifiche mutazioni al promotore dei rispettivi geni (Masala *et al.*, 1986; Masala *et al.*, 1988; Manca *et al.*, 1991; Gilman *et al.*, 1994).

L'aplotipo II di Orkin, quello sul quale con maggiore incidenza è localizzata la mutazione β -tal più diffusa in Sardegna, ed anche l'aplotipo X, ambedue positivi per il sito *Hind* III in $A\gamma$ IVS2, sono caratterizzati dalla presenza di un allele mutato del gene $A\gamma$ che codifica per la variante globinica $A\gamma^T$ (Masala *et al.*, 1988) Questa variante, caratterizzata dalla sostituzione Ile \rightarrow Thr in posizione 75(E19) costituisce la controparte non- α della variante qualitativa più comune delle catene globiniche fetali, l'HbF-Sardegna ($\alpha_2A\gamma_275(E19)Ile\text{---}Thr$). L'Hb è stata scoperta in un soggetto tal non trasfuso di origine sarda (Grifoni *et al.*, 1975) e successivamente identificata in diverse popolazioni del mondo (Huisman, 1997). Nei pazienti β -tal sardi la frequenza genica è molto elevata ($f = 0,722$ nella β^0 -tal e $0,346$ nella β^+ -tal) così come tale frequenza è fra le più alte rilevate nel genere umano anche nella popolazione non tal ($f = 0,175$) (Manca *et al.*, 1986). Il gene $A\gamma^T$ differisce dall'allele normale non solo al codone 75 (ATA Ile \rightarrow ACA Thr) ma anche nel promotore dove, in posizione da -225 a -222 è sempre presente una delezione di quattro paia di basi (-AGCA) responsabile della ridotta espressività (pari a circa il 20%) del gene (Manca *et al.*, 1990 (a); 1991).

3. SCOPO DELLA RICERCA

In alcuni pazienti affetti da TI, l'unica spiegazione evidente che giustifica il fenotipo lieve non dipendente da trasfusione è la sintesi di globine γ che persiste nella vita adulta. Non è chiaro il motivo per il quale in tali pazienti lo *switch* neonatale HbF \rightarrow HbA non comporti la forte riduzione dell'attività dei geni γ come avviene in quasi tutti i pazienti β^0 -tal che, difatti, sono affetti da anemia severa e vincolati alla dipendenza trasfusionale.

L'inusuale produzione del tetramero fetale sembrerebbe dovuta al contributo di elementi *cis-acting* presenti nel cluster β -globinico. Tali elementi sono SNPs e microsatelliti localizzati in regioni intrageniche non tradotte o nelle sequenze promotrici distali e prossimali del gene $G\gamma$ o del gene β oppure localizzati in regioni regolatorie molto distanti dalle sequenze geniche come, per esempio, la β LCR. Sebbene i polimorfismi siano spesso considerati marcatori neutrali, si ritiene che possano esercitare un ruolo funzionale poiché in grado di alterare o di creare siti di legame per i fattori trascrizionali e che il modo migliore per comprenderne la funzione sia quello di considerare tutti gli SNPs e i microsatelliti potenzialmente coinvolti nel loro complesso.

L'assetto polimorfo in *linkage* alle mutazioni β -tal tipiche dei β^0 -tal sardi non era ancora stato indagato e, inoltre, il 10% dei pazienti β^0 -tal sardi, manifesta condizioni cliniche lievi non dipendenti da trasfusione, tipiche della TI. Nei pazienti intermedi sardi il fenotipo lieve non è giustificato né dalla concomitante presenza di determinanti α -tal (presenti solo nel 25% dei pazienti), né dalla presenza del polimorfismo $G\gamma$ -158 (positivo solo nel 9% dei pazienti). Pertanto, l'unico motivo che giustifica la condizione lieve non dipendente da trasfusione è la produzione elevata di HbF di per sé stessa.

L'obiettivo che si propone questa ricerca è quello di determinare la configurazione degli SNPs e dei microsatelliti *in cis* alle mutazioni β -tal tipiche dei β^0 -tal sardi e tentare di comprendere se un determinato assetto polimorfo può influire nel sostenere una produzione elevata di HbF stabilmente per tutta la vita dell'individuo.

Le indagini hanno interessato diverse categorie di soggetti: pazienti β -tal omozigoti politrasfusi affetti da TM, pazienti β -tal omozigoti non dipendenti da trasfusione affetti da TI, individui eterozigoti per differenti mutazioni β -tal che presentavano livelli di HbF superiori alla norma e soggetti non β -tal.

4 MATERIALI E METODI

4.1. Campioni esaminati

Sono stati esaminati 48 soggetti di cui 24 affetti da β -tal. Di questi, 20 di cui due bambini affetti da TM dipendenti da trasfusione e quattro affetti da TI che non sono mai stati sottoposti a regime trasfusionale. L'indagine di uno di questi soggetti è stata estesa ai familiari (madre, padre e sorella). Di nessuno era stato determinato il difetto molecolare.

Inoltre, sono stati oggetto di indagine due individui adulti non talassemici (madre e figlia) che presentavano livelli di HbF superiori alla norma.

Come controlli sono stati inclusi nell'indagine 19 adulti privi di determinanti β -tal e con livelli di HbF nella norma.

I campioni di sangue sono stati prelevati presso il Centro Trasfusionale della ASL N. 2 di Olbia e presso l'Istituto di Ematologia ed Endocrinologia dell'Università di Sassari.

Tutti i soggetti hanno rilasciato il consenso informato.

4.2. Preparazione dei campioni

Preparazione degli emolisati da sangue prelevato in EDTA

Aliquote di sangue intero venivano emolizzate o con H₂O tridistillata (milliQ) per le indagini elettroforetiche o, dopo lavaggio in soluzione fisiologica (NaCl 0,9% e 5' a 3500 rpm, per tre volte), i globuli rossi venivano lisati con un volume di H₂O milliQ e 0,5 volumi di tetracloruro di carbonio e centrifugati 20' a 4500 rpm per recuperare la soluzione acquosa di Hb da utilizzare per l'analisi cromatografica RP-HPLC.

Estrazione del DNA da sangue intero

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita sia mediante *salting out* (Miller *et al.*, 1988) sia mediante il kit Qiagen QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cod.51306).

Un μ g di DNA miscelato con Blu di Bromofenolo (BBF) 0,25% e saccarosio 40% a pH 7,0 veniva esaminato per il *sizing* in gel elettroforesi di agarosio 0,8% in TBE 1X (TrisCl 89mM, acido borico 89mM, Na₂EDTA 2,5mM, pH 8,0), a 75V per 45'. Prima della semina il campione veniva miscelato ad una soluzione di, per aumentare la densità del campione e facilitare la sua deposizione nel pozzetto.

4.3. Isoelettrofocalizzazione dei tetrameri nativi

Il gel di poliacrilammide era al 5% (% acrilammide:bisacrilammide = 30:0,93) (Masala e Manca, 1991). La miscela veniva preparata aggiungendo anfoliti a pH 6,7-7,7 (6,2%), anfoliti a pH 3-10 (0,5%), Temed (0,15%) ed ammonio persolfato (0,56 mg/ml).

Soluzioni elettrolitiche: NaOH 0,1 M al catodo; acido glutammico 40mM all'anodo. Condizioni elettriche: prefocalizzazione a 400 V a 4°C; isoelettrofocalizzazione (IEF) 1600 V, per due ore a 4°C. Quantità di campione seminato: 4 µl di emolisato in H₂O allo 0,5% di Hb.

Le bande focalizzate venivano fissate 10' in acido tricloroacetico 20%, colorate 30' in BBF (0,1%) in etanolo 50% ed acido acetico 5% e decolorate in etanolo al 30% e acido acetico al 6%.

L'immagine dei tracciati veniva acquisita mediante il GelDoc 2000 (BioRad) e la concentrazione delle singole frazioni emoglobiniche veniva espressa come percento dell'Hb totale.

4.4. Isoelettrofocalizzazione semipreparativa dei tetrameri nativi

E' la versione semi-preparativa del metodo descritto nel precedente paragrafo utile per arricchire fino al 95% i livelli di HbF isolabile da campioni di sangue di adulto contenenti livelli di tale Hb inferiori al 4% (Manca & Masala 1990(b)).

4.5. Elettroforesi delle globine in condizioni acide-denaturanti

L'elettroforesi veniva effettuata in presenza del detergente non ionico Triton X-100 (AUT-PAGE) (Alter *et al.*, 1980). Il gel di poliacrilammide al 12% (0,75 mm di spessore) era costituito da: acrilammide: bisacrilammide (50:0,32), urea 6M, acido acetico glaciale 4,5%, Triton X-100 1,8%, TEMED 0,36%, riboflavina 0,4µg/ ml (Manca *et al.*, 1986). La polimerizzazione U.V. dipendente si completa in circa 1h.

Per ciascun campione venivano depositi 13 µg di emolisato in H₂O in 11µl di soluzione denaturante (urea 8 M, acido acetico glaciale al 10%, β-mercaptoetanolo al 10%). Tracciante: Pironin-G.

Condizioni elettriche: 19 h a 6 mA/gel, a 4°C. in acido acetico 5%. Colorante: Coomassie Brilliant Blue R-250 allo 0,5% in metanolo 30% e acido acetico 7%. Decolorante: metanolo 30% e acido acetico 7%.

Deidratazione del gel: 1h in Gel Air Dryer (Biorad). I livelli percentuali delle singole globine venivano calcolati mediante Gel Doc 2000 (BioRad). Le globine β sono espresse come percentuale delle globine non-α totali e ciascuna globina γ come percentuale delle globine γ totali.

4.6. Cromatografia a scambio cationico delle globine

Le Hb sono state esaminate anche mediante *cation-exchange* High Performance Liquid Chromatography (CE-HPLC). E' stato utilizzato il Variant BioRad analyzer ed il programma "β-thalassemia short program" (BioRad Laboratories).

4.7. Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa delle globine

Per la RP-HPLC delle globine sono stati utilizzati il cromatografo Agilent Chem Station 1100 e la colonna Vydac C4 (4,6 X 250 mm) a pori larghi (300 Å).

Fase mobile: miscela dei due eluenti A (20% di acetonitrile o CH₃CN), 0,1% acido trifluoroacetico o TFA) e B (60% CH₃CN e 0,1% TFA) (Masala e Manca,1994).

Gli emolisati venivano diluiti 0,1 g di Hb/dl in acqua milliQ e 20μl venivano iniettati in colonna.

Gradiente cromatografico: dal 53% al 59% dell'eluente B in 38 minuti (1ml/min, 25°C).

Le globine β sono espresse come percentuale delle globine non-α totali e ciascuna globina γ come percentuale delle globine γ totali.

4.8. Amplificazione enzimatica *in vitro*

Per tutte le reazioni di amplificazione (PCR), se non diversamente specificato, sono stati utilizzati 20 μl di miscela: Tampone 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 2,5 mM, primer 0,3 μM, DNA genomico 0,1 μg, *Taq* polimerasi 1,25 U.

Tutte le PCR sono state eseguite nel Thermal Cycler Gene AMP[®] PCR Sistem 2700 (Applied Biosystem).

Quando necessario, la resa degli amplificati è stata migliorata mediante reazioni di nested o eminested.

Fatta eccezione per alcuni primer descritti in letteratura (Sutton *et al.*, 1989; Dodè *et al.*, 1993; Foglietta *et al.*, 1996; De Angioletti *et al.*, 2004), tutti gli altri sono stati disegnati sulle rispettive sequenze di riferimento (GeneBank accession number: per il cluster β U01317 e per il cluster α Z84721) mediante il software on line <http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer>. I primer utilizzati sono elencati nella Tabella I.

Il risultato delle reazioni di PCR veniva accertato in gel elettroforesi d'agarosio all'1 o al 2% in presenza di appropriati standard di pesi molecolari (Marker III, Marker VI, Marker XIV; Roche).

4.8.1. Amplificazione di segmenti del cluster β-globinico

Sito HS2 della LCR

La coppia di primer LCR 3/LCR 4 isola un frammento di 462 bp tra i nt -10943 e -10481 rispetto al sito Cap del gene ϵ .

Profilo termico: pre-PCR 3' a 94°C, PCR (35 cicli) 1' a 94°C, 1' a 62°C, 1,30' a 72°C, post-PCR 8' a 72°C. In quest'ultimo step la *Taq* polimerasi aggiunge alle estremità 3' le code di poli-A necessarie per il successivo clonaggio.

Gene G γ

Il promotore distale del gene G γ è stato amplificato in un frammento di 318 bp, compreso tra i nucleotidi -1513 e -1195, mediante la coppia di primer preG γ 1/preG γ 2.

Profilo termico: pre-PCR 3' a 94°C, PCR (35 cicli) 1' a 94°C, 1' a 61°C, 1,30' a 72°C, post-PCR 8' a 72°C.

La regione compresa fra il promotore prossimale e la 3'-UTR (da -598 a +1776) è stata amplificata con i primer R160/G γ 2.

Profilo termico: pre-PCR a 95°C per 3', PCR (35 cicli) a 95°C per 1', 62°C per 30", 74°C per 3', post-PCR a 72°C per 8'. Due aliquote del frammento ottenuto sono state sottoposte rispettivamente a una reazione di nested-PCR ed ad una di eminested-PCR con le coppie G γ 1/AG γ 8 e R160/R161, rispettivamente. **Profilo termico:** identico al precedente fatta eccezione per la temperatura di annealing: 62°C per R160/R161, 55°C per G γ 1/AG γ 8.

Gene A γ

La regione compresa fra il promotore prossimale e la 3'-UTR (da -293 a +1909) è stata amplificata con i primer R162/A γ 10. Due aliquote del frammento ottenuto sono state sottoposte rispettivamente a una reazione di nested-PCR con le coppie G γ 1/AG γ 8 e R162/R161, rispettivamente.

Profilo termico: identico a quello della sezione precedente fatta eccezione per la temperatura di annealing: 53°C per R162/A γ 10, 48°C per R162/R161, 55°C per G γ 1/AG γ 8.

Gene β

Il promotore distale è stato amplificato in un frammento di 354 bp (da -724 a -370) mediante la coppia di primer pro β 1/pro β 2.

Gli esoni sono state amplificati con P1/P2 per isolare un frammento di 706 bp comprendente il 1° ed il 2° esone; e β 3/ β 4 per amplificare il 3° esone.

Profilo termico: identico a quello della sezione precedente fatta eccezione per la temperatura di annealing: 58°C per pro β 1/pro β 2; 62°C per P1/P2 e per β 3/ β 4.

Gene $\psi\beta$ ed estremità 3' fiancheggiante

I primer $\psi\beta$ fwd/ $\psi\beta$ rev amplificano un frammento di 701 bp (da +11962 a +12663 rispetto al *Cap* del gene *G γ*); la coppia 3' $\psi\beta$ fwd/3' $\psi\beta$ rev isolano un frammento di 592 bp (da +15033 a +15625 rispetto al *Cap* del gene *G γ*).

Profilo termico: pre-PCR a 95°C per 3', PCR (35 cicli) 95°C per 1', 58°C 30", 72°C 1'.

Gli amplificati sono stati digeriti con *Hinc* II (GTc/t↓g/aAC) per stabilire la presenza o meno del sito di restrizione necessario per derivare l'aplotipo di Orkin (Orkin *et al.*, 1982).

Cinque μ g degli amplimeri sono stati digeriti con 3 U di enzima in un volume di 15 μ l a 37°C per 90', seguiti da 10' a 65°C.

In presenza del palindromo, l'enzima nell'amplificato con $\psi\beta$ fwd/ $\psi\beta$ rev produce due frammenti, uno da 360 bp e l'altro da 340 bp; nell'amplificato 3' $\psi\beta$ fwd/3' $\psi\beta$ rev genera un frammento da 120 bp ed uno da 470 bp.

4.8.2. Clonaggio della regione HS2 della LCR

Sono stati utilizzati i kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) per purificare l'amplimero LCR3/LCR4 da gel d'agarosio e il TA Cloning Kit (Invitrogen) per il clonaggio.

La trasformazione delle cellule di *E. coli* competenti (DH5 α ® Competent Cells) è stata realizzata tramite shock termico.

Dopo 2 ore a 37°C con LB Broth Base (Sigma) le cellule sono state piastrate su un terreno solido (LB Agar, Sigma) contenente ampicillina 10mg/ml (Sigma), isopropil- β -D-tiogalattosio 100 mM (Promega) e X-Galattosio 3,3 μ g/ml (Promega) ed incubate *over night* a 37°C.

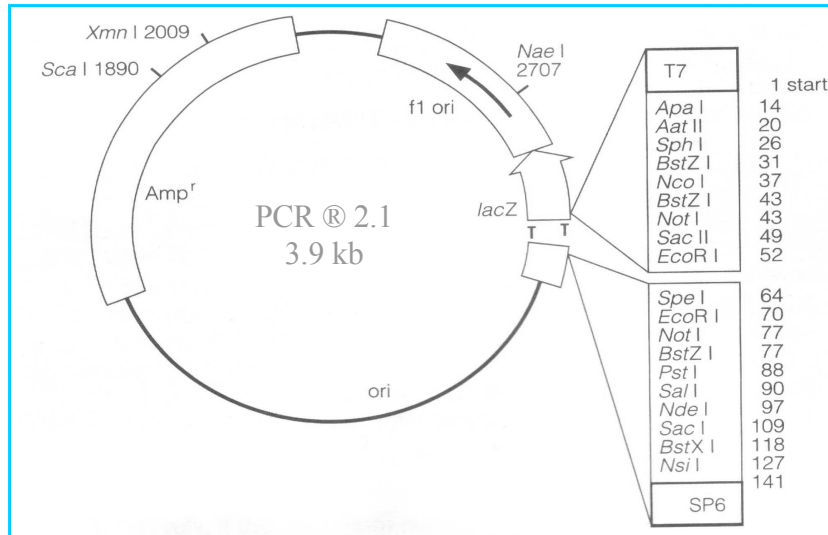
Le cellule contenenti plasmidi riciclati comprendenti l'inserto possono crescere in presenza di ampicillina e producono colonie bianche. Queste sono state raccolte, inoculate su un terreno di coltura contenente ampicillina (10 mg/ml) ed incubate *over-night* a 37°C.

Per estrarre il DNA plasmidico dalle colture è stato utilizzato il kit PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen).

Per confermare la presenza dell'inserto di interesse nel vettore di clonaggio ed evitare il problema dei falsi positivi, prima di procedere con la reazione di sequenza, un'aliquota di DNA plasmidico era sottoposta a digestione con *EcoR* I (in un volume finale di 15 μ l: 3 μ l di DNA plasmidico, tampone 1X, *EcoR* I 5U; 90' a 37°C, 10' a 65°C). In presenza del costrutto, mediante gel

elettroforesi in agaroso si separano due frammenti, uno di 3929 bp, che contiene il plasmide linearizzato ed uno di circa 500 bp che comprende l'amplificato ottenuto dopo idrolisi enzimatica.

Il DNA è stato sottoposto a sequenziamento nucleotidico utilizzando gli stessi primer utilizzati in amplificazione.



4.9. Diagnosi diretta di α -talassemia

Per tutte le reazioni di PCR sono stati utilizzati 0,1 μ g di DNA, 2,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di dNTPs, 0,25 μ M di ciascun primer, tampone 1X (Dodè *et al.*, 1993). Volume finale di reazione e le unità di *Taq* polimerasi così come il profilo termico, variavano in relazione ai primer utilizzati e vengono specificati nelle apposite sezioni.

La eventuale presenza di condizioni α -tal determinate dalle forme delezionali $\alpha^{-20.5}$ e α^{-MED} è stata effettuata mediante utilizzo del kit Alphagenics (Diac).

4.9.1. Diagnosi della mutazione talassemica $\alpha^{-3.7}$

Sono stati utilizzati i primer C10 e C2 (Figura 4.1). Il primo, aspecifico, nel gene α_2 ibridizza alla regione compresa tra i nt -1050 e -1030 e nel gene α_1 in quella tra i nt -1250 e -1230. Il primer C2 è specifico e riconosce la sequenza in 3' il gene α_1 (Dodè *et al.*, 1993).

Alla miscela di reazione (paragrafo 4.8), si aggiungevano 5U di *Taq* polimerasi e 1% di DMSO (volume finale di 50 μ l). Profilo termico: pre-PCR a 95°C per 10', PCR (30 cicli) 94°C 1', 52°C 1', 72°C 3'.

Nell'individuo con assetto normale $\alpha\alpha$, C10/C2 amplificano un frammento di 2,1 kb contenente il gene α_1 ; in presenza della delezione di 3,7 kb amplificano un frammento di 1,9 kb contenente il gene ibrido $\alpha_2\alpha_1$ ($\alpha^{-3.7}$). Nell'eterozigote vengono amplificati entrambi i frammenti (Figura 4.2) potendo in tal modo discriminare il genotipo normale ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), il genotipo eterozigote ($\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$) e quello omozigote ($\alpha^{-3.7}/\alpha^{-3.7}$).

4.9.2. Diagnosi di $\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$ - tal

In ciascuna reazione di PCR sono state utilizzate due coppie di primer: T37/D e G/F (Figura 4.1). Il primer T37, diretto, ibridizza nella regione intergenica fra i due *loci* α . Il primer D, reverse, riconosce l'estremità 3' del gene α_2 . La coppia G ed F, rispettivamente diretto e reverse, amplifica una porzione del pseudogene $\psi\alpha_1$ (Foglietta 1996).

Se l'assetto del cluster α è normale ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), i primer T37/D, data la lunghezza del frammento delimitato, non amplificano alcun prodotto. Al contrario, in presenza del gene da fusione $\alpha_1\alpha_2$ la coppia T37/D produce un frammento di 1799 bp.

L'amplimero di 228 bp prodotto dalla coppia G/F rappresenta il controllo interno.

Alla miscela di reazione (paragrafo 4.8), si addizionavano 3U di *Taq* e 5% di DMSO (volume finale 20 μ l).

Il protocollo termico è lo stesso descritto per la diagnosi dell' $\alpha^{-3.7}$.

Con questa metodica non è possibile discriminare tra il genotipo eterozigote ($\alpha\alpha/\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$) e quello omozigote ($\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}/\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$).

4.9.3. Diagnosi della mutazione talassemica $\alpha^{-4.2}$

Sono state utilizzate le coppie di primer G/E e G/F (Figura 4.1) (Foglietta, 1996). Nel caso in cui sia presente la delezione da 4,2 kb, la coppia G/E sintetizza un amplimero di 1762 bp. Se l'individuo è normale, i primer risultano troppo lontani e non amplificano.

L'amplimero di 228 bp prodotto dalla coppia G/F rappresenta il controllo interno.

Alla miscela di reazione (paragrafo 4.8), si addizionavano 5U di *Taq* polimerasi e 10% di DMSO (volume finale 20 μ l).

Profilo termico: pre-PCR a 95°C per 10', PCR (30 cicli) 94°C 1', 58°C 1', 72°C 3'.

La metodica permette di riconoscere gli eterozigoti ($\alpha\alpha/\alpha^{-4.2}$) e gli omozigoti ($\alpha^{-4.2}/\alpha^{-4.2}$).

4.10. Sequenziamento nucleotidico

E' stato utilizzato il Kit BigDye® Terminator Cycle sequencing v3.1 (Applied Biosystems) che impiega i quattro didesossiribonucleotiditriofosfati (ddNTPs) marcati con fluorocromi differenti (BigDye Terminator).

L'analisi è stata condotta con il sistema capillare ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems).

I primer utilizzati per il sequenziamento sono indicati con asterisco nella Tabella I.

La miscela di reazione comprendeva: 2 µl di tampone 1X, 4 µl di mix (comprendente dNTPs/ddNTPs e *Taq* polimerasi), 3,2 pmol di primer, 1 ng di DNA /100 bp (volume finale: 20 µl).

Il protocollo termico: 95°C per 3', 30 cicli di 96°C per 30", 50°C per 15", 72°C per 4'.

Come controllo interno è stato utilizzato il pGem®Control Template, 21 M13 Control Primer in dotazione con il kit. Per il DNA di controllo veniva utilizzata la stessa miscela di reazione, ma differenti cicli termici: 25 cicli di PCR a 96°C per 10", 50°C per 5" e 60°C per 4'.

Al termine ciascun campione veniva purificato mediante Centri Sep Spin Columns (Applied Biosystem), miscelato con formammide (10 µl di formammide: 5 µl di campione) e denaturato per 4' a 95°C.

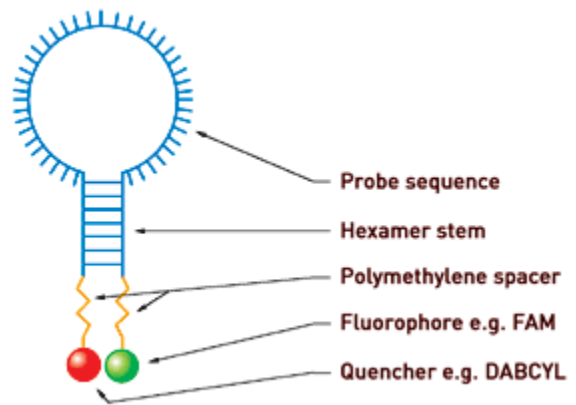
L'allineamento delle sequenze nucleotidiche con quelle di riferimento è stato realizzato con il software Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1998).

4.11. Discriminazione allelica mediante Real-Time PCR

La discriminazione allelica per la presenza della mutazione non senso β^{039} (CAG→TAG) è stata effettuata mediante Real-Time PCR con sonde fluorescenti "Molecular Beacons".

La sonda *Molecular Beacons* è un oligonucleotide che forma una forcina, la cui sequenza è complementare al bersaglio amplificato, e un piccolo tratto duplex formato da 5-7 coppie di basi.

Un'estremità è marcata con un reporter mentre l'altra con un quencher. In soluzione, quando la sonda è libera, reporter e quencher sono appaiati e non si ha emissione di fluorescenza. Lo strumento rileva fluorescenza quando, durante l'*annealing* di ciascun ciclo di PCR, la forcina si lega alla sequenza bersaglio ed il quencher si allontana dal reporter. Data la specificità per la sequenza target, la sonda si appaia ai prodotti di amplificazione nella regione compresa tra i primer forward e reverse. Poiché l'emissione della fluorescenza si verifica solo se i primer e la sonda legano il DNA target, la specificità della Real-Time PCR risulta considerevolmente più alta rispetto alla PCR convenzionale.



L'analisi necessita di due sonde marcate con fluorofori differenti che differiscono per un solo nucleotide.

Il termociclatore Real-Time PCR (I Cycler IQ-BioRad) a lampada al tungsteno durante la reazione di PCR eccita i fluorocromi. La fluorescenza viene convogliata ad uno spettrografo che separa le componenti del reporter e del quencher. La variazione della fluorescenza dei reporter nella cinetica d'amplificazione è ottenuta acquisendo lo spettro di emissione di ogni singolo campione per ciascun fluoroforo per tutta la durata della PCR, in tempo reale. La fluorescenza è proporzionale alla quantità di sonde fluorescenti.

Dal raffronto della fluorescenza dei campioni di controllo (omozigoti per le due mutazioni da discriminare) e quelli in esame, l'algoritmo discrimina l'etero- e/o l'omozigosi per la specifica mutazione.

I primer sono stati disegnati mediante il software "Beacon designer 2" CD39F: 5'-CATGTGGAGACAGAGAAGAC -3' (+192; + 214) e CD39R: 5'- AGCATCAGGAGTGGACAG -3' (+320; +337) che amplificano un frammento di 145 bp compreso tra i nt +192 e +337 (rispetto al Cap del gene β).

Con lo stesso software sono state scelte le sonde complementari alla sequenza wild type (2CD39WP) e a quella del gene mutato (2CD39MP), marcate con due fluorofori differenti:

2CD39WP o Fam-490: 5'-Fam-CGCGATCGTCTACCCTTGGACCCCAGAGGTTCTTTGGATCGC-3' BHQ1-3', che fluoresce a 490nm;

2CD39MP o Tet-530: 5'-Tet-CGCGATCGTCTACCCTTGGACCTTAGAGGTTCTTTGGATCGC-3' BHQ1-3' che fluoresce a 530nm.

I fluorofori sono stati abbinati al quencher in 3' BHQ1 (Black Hole Quencher 1) che, a differenza di altri quencher, non ha una sua fluorescenza nativa e copre tutto lo spettro di emissione dei reporter (480→580nm).

Per ricercare il protocollo termico migliore è stato eseguito un gradiente di temperatura e il profilo preferibile è risultato essere: pre-PCR a 95°C 2', PCR (50 cicli) 95°C 10", 64°C 50". In questo ultimo passaggio viene rilevata la fluorescenza.

La miscela di reazione, in 50 μ l conteneva: 0,2 μ g di DNA, 25 μ l Supermix (BioRad), 0,3 μ M di ciascun primer, 0,2 μ M di ciascuna sonda.

5. RISULTATI

5.1. Diagnosi molecolare di β -tal nei soggetti politrasfusi

La diagnosi molecolare di β -tal nei soggetti politrasfusi è stata effettuata mediante discriminazione allelica tramite Real-Time PCR (Figura 5.1) e sequenziamento nucleotidico diretto (Figura 5.2).

Diciotto dei 20 pazienti politrasfusi sono risultati omozigoti per la mutazione β^{039} (CAG→TAG) e due composti eterozigoti per la β^{039} e un'altra mutazione che, in un paziente, è risultata la β^{+87} C→G (Tabella II).

Dei restanti 28 soggetti non dipendenti da trasfusione, quattro sono risultati omozigoti β^{039} . Di questi, tre conoscevano la loro condizione di TI (non dipendente da trasfusione), sebbene la mutazione alla base della loro condizione non fosse mai stata accertata. Un quarto omozigote β^{039} , che al momento della diagnosi aveva 27 anni, era asintomatico e non conosceva il suo stato di β -tal omozigote (Tabella III, nominativo SG). Sono stati pertanto esaminati i familiari (SE padre, LV madre e SA sorella) che sono risultati eterozigoti per la medesima mutazione β^{039} (Tabella IV).

La mutazione β IVS1-6 (T→C) è stata identificata in un soggetto (PSi) la cui madre (SR) è risultata esente da tale mutazione (Tabella IV). Madre e figlia presentavano entrambe, in eterozigosi e in omozigosi, rispettivamente, la sostituzione sinonima CAC→CAT (His) al codone $\beta 2$.

I restanti 19 soggetti (Tabella V) non mostravano determinanti β -tal e sono stati inclusi nell'indagine come controlli normali (non β -tal).

I soggetti esaminati sono stati suddivisi in quattro gruppi:

- gruppo A: 20 pazienti β^0 -tal (di cui il 35% femmine) affetti da TM trasfusione-dipendente (Tabella II);
- gruppo B: 4 pazienti β^0 -tal (50% femmine) affetti da TI non dipendente da trasfusione (Tabella III);
- gruppo C: 19 controlli non β -tal (50% femmine) (Tabella V);
- gruppo D: 3 familiari (SE, LV e SA) di uno dei pazienti TI (SG) e 2 soggetti SR (madre) e PSi (figlia) nei quali segregano geni β -tal e determinanti ad alta HbF (Tabella IV).

Nella Tabella VI sono riassunti i livelli percentuali delle Hb tetrametro. Grazie alla presenza di elevati livelli di HbF mostrati dai soggetti affetti da β -tal TM e TI, è stato possibile identificare mediante IEF la variante fetale HbF-Sardegna in omozigosi nel 55% dei pazienti del gruppo A e nel 50% del gruppo B, ed in eterozigosi nel 30% del gruppo A e nel 50% del gruppo B. Nel gruppo dei

pazienti TM, gli omozigoti $A\gamma^T/A\gamma^T$, hanno livelli percentuali della globina anomala pari a $40,6 \pm 4,3$ mentre gli eterozigoti $A\gamma^I/A\gamma^T$ $23,7 \pm 10,7$ di globina $A\gamma^I$ e $16,25 \pm 4,8$ di quella $A\gamma^T$. Dei quattro pazienti TI, i due omozigoti $A\gamma^T/A\gamma^T$ hanno $46 \pm 1\%$ della globina anomala e i due eterozigoti $A\gamma^I/A\gamma^T$, $17,6 \pm 4,8\%$ di $A\gamma^T$ e $20,7 \pm 6,1\%$ di $A\gamma^I$.

Nel neonato normale e/o tal i livelli della globina $A\gamma$ e del suo allele $A\gamma^T$ sono i seguenti: omozigoti $A\gamma^I/A\gamma^I$ $31,4\% \pm 2,6$; omozigoti $A\gamma^T/A\gamma^T$ $29,3\% \pm 2,4$; eterozigoti $A\gamma^I/A\gamma^T$: $15,8\% \pm 1,4$ di $A\gamma^I$ e $13,9\% \pm 1,3$ di $A\gamma^T$)

Nei soggetti inclusi nei gruppi C e D, l'eventuale presenza della HbF-Sardegna è stata rilevata direttamente a livello genico per la presenza in omo- o eterozigosi del gene $A\gamma^T$.

Nelle due categorie dei pazienti β -tal, il rapporto $G\gamma:A\gamma$ è quello tipico del neonato normale e del talassemico alla nascita, nei quali i livelli della globina $G\gamma$ rappresentano oltre il doppio di quelli della globina $A\gamma$.

Nei tal politrasfusi e negli intermedi, i livelli percentuali della globina $G\gamma$ sono risultati sovrapponibili (TM $60,7 \pm 6,9$ e TI $57,8 \pm 7,7$) $p=0,109$. I livelli percentuali calcolati nel neonato normale risultano pari a $68,9 \pm 3$, range 59-78, per la catena $G\gamma$ e $31,1 \pm 3$, range 22-41 per quella $A\gamma$ (Masala e Manca, 1994).

5.2. Diagnosi α -talassemia

In tutti i soggetti esaminati è stata verificata la presenza delle mutazioni α -tal più diffuse in Sardegna e nel bacino del Mediterraneo.

Nei gruppi A, B e C è stata individuata la mutazione tal $\alpha^{3.7}$ (Tabelle II, III e V). Allo stato omozigote $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$ è presente nel 5% del gruppo A e nel 25% del gruppo B; allo stato eterozigote $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ nel 35% del gruppo A, nel 50% del gruppo B e nel 15,8% del gruppo C.

Nei pazienti del gruppo B e nei campioni PSi e SR è stata inoltre esclusa la eventuale presenza di condizioni α -tal determinate dalle forme delezionali $\alpha^{20.5}$ e α --MED (Tabella IV).

5.3. Analisi del promotore prossimale dei geni fetali

Nessun campione presentava mutazioni riconducibili a forme di ndHPFH.

Il polimorfismo Xmn $G\gamma$ -158 C→T (l'enzima riconosce il palindromo GAATT↓AATTC quando è presente T) è stato identificato in omozigosi in un solo individuo del gruppo C (Tabella V), mentre il 20% dei soggetti del gruppo A (Tabella II), il 25% del gruppo B (Tabella III) ed il 35% del gruppo C (Tabella V) è risultato eterozigote. Nel gruppo D (Tabella IV) sono risultati eterozigoti SE

(padre del paziente SG affetto da TI) e SR e PSi (madre e figlia). Inoltre, SR, mostra in eterozigosi la sostituzione A→G a monte del sito per Xmn , al nt -398.

Nel promotore $A\gamma$ il sequenziamento ha permesso di riconoscere la delezione di quattro paia di basi AGCA (da -225 a -222), sempre presente in linkage all'allele $A\gamma^T$ (Manca *et al.*, 1990). La delezione era presente in oltre il 50% dei cromosomi del gruppo A, nel 37,5% del gruppo B, nel 21% del gruppo C e nel 40% del gruppo D (Tabelle II-V).

5.4. Analisi dei microsatelliti e degli SNPs

Nelle Tabelle II-V sono riassunte le configurazioni polimorfe dei motif e degli SNPs identificate nel cluster β -globinico dei 96 cromosomi esaminati.

La regione HS2 della LCR è stata sequenziata sia direttamente dal prodotto di PCR che dopo clonaggio al fine di ottenere sequenze non ambigue nei casi di eterozigosi per il microsatellite $(AT)_xN_y(AT)_z$.

Complessivamente sono state identificate 6 diverse configurazioni: $(AT)_8N_{12}(AT)_{11}$, $(AT)_8N_{12}(AT)_{12}$, $(AT)_9N_{12}(AT)_{11}$, $(AT)_{10}N_{10}(AT)_{11}$, $(AT)_{10}N_{12}(AT)_{11}$ e $(AT)_9N_{12}(AT)_{10}$. La configurazione più comune è la forma 8-12-11. Il grado maggiore di variabilità è presente nel gruppo dei controlli normali, sebbene in tale gruppo sia stato esaminato un numero inferiore di cromosomi, (Tabella V).

A monte del gene $G\gamma$ sono stati determinati gli SNPs nelle posizioni -1450 (T/G), -1280 (A/G) e -1225 (A/G). Nel 20% dei casi, a causa della presenza di eterozigosi ai nt -1280 e -1225, l'assetto è stato dedotto mediante confronto con gli omozigoti. Il polimorfismo -1450 T, -1280 G, -1225 G (da qui in poi abbreviato in T;G;G) è il più comune (Tabelle II-V). E' presente in oltre il 72% dei cromosomi del gruppo A, nel 75% del gruppo B, in circa il 29% del gruppo C e nel 40% del gruppo D.

L'arrangiamento polimorfo T;G;A è stato definito nel 7,5%, 12,5%, 23,4% e 30% dei cromosomi dei gruppi A, B, C e D, rispettivamente; l'arrangiamento T;A;G nel 5% del gruppo A, nel 12,5% del gruppo B, nel 5,2% del gruppo C e nel 30% dei cromosomi del gruppo D (Tabelle II-V).

Cinque differenti microsatelliti sono stati identificati nella sequenza $G\gamma$ IVS2. Il microsatellite più diffuso è $(TG)_{11}(CG)_3$ (nell'85% dei cromosomi del gruppo A). La maggiore eterogeneità è stata riscontrata nel gruppo dei controlli, nel quale sono state evidenziate tutte e cinque le diverse configurazioni $(TG)_{11}(CG)_3$, $(TG)_{19}(CG)_2CACG$, $(TG)_{18}(CG)_2CACG$, $(TG)_{19}(CG)_3CACG$ e $(TG)_{16}(CG)_2CACG$ (Tabelle II-V).

Similmente, nella sequenza $A\gamma$ IVS2 sono stati identificati cinque differenti microsatelliti. Il più comune è risultato il $(TG)_{10}(CG)_5(TG)_7$ presente nel 75% dei cromosomi del gruppo A e nel 62,5% del gruppo B. Le altre configurazioni polimorfe identificate sono $(TG)_9(CG)_5(TG)_8$, la più comune nel

gruppo di controllo (oltre il 39%), il (TG)₁₃ ed i microsatelliti (TG)₁₂(CG)₃(TG)₇ e (TG)₅CG(TG)₃(CG)₅(TG)₈, identificati solo nel gruppo C (Tabelle II-V).

Nel promotore distale del gene β l'allele (AT)₇T₇ è risultato quello più comune. Tutti i pazienti TM e TI sono risultati monomorfici per questo microsatellite, mentre nel gruppo di controllo C il microsatellite è risultato polimorfo essendo presenti, oltre a (AT)₇T₇, le configurazioni (AT)₉T₅, (AT)₁₁T₃ (AT)₇T₈ (Tabelle II-V).

In un soggetto del gruppo D, SR, è stata identificata, in eterozigoti, la sostituzione T→C nel promotore distale del gene β , 552 nt dal sito Cap.

L'aplotipo II (- + + - + + +) di Orkin (Orkin *et al.*, 1982) è stato identificato mediante sequenziamento nucleotidico delle regioni IVS2 dei geni G γ e A γ contenenti il sito per *Hind* III (A↓AGCTT) e mediante l'amplificazione di due segmenti comprendenti, rispettivamente, una porzione del gene $\psi\beta$ e quella in 3' a $\psi\beta$, e successiva digestione con *Hinc* II. Questo aplotipo è condiviso in omo- o eterozigoti dal 94% dei politrasfusi (Tabella II), omozigoti per la β^039 -tal.

Due dei quattro pazienti TI sono risultati omozigoti II/II (BMa e SG), mentre gli altri sono tutti eterozigoti per il II ed altri non correttamente identificati.

In eterozigosi con l'aplotipo II, tre pazienti TM β^039 mostrano l'aplotipo I (+ - - - - + +) e uno l'aplotipo VI (- + + - - +).

L'analisi dei risultati ottenuti nei restanti TM ha solo permesso di escludere o di suggerire il corretto aplotipo.

Il paziente doppio eterozigote β^039/β^+-87 è risultato eterozigote II/VIII (- + - + - + -) mentre l'altro paziente composto eterozigote per la mutazione β^039 e un'altra non determinata, ha mostrato l'aplotipo II in probabile eterozigosi con gli aplotipi III, o IV, o IX.

5.5. Struttura degli assetti polimorfi per i microsatelliti e gli SNPs *in cis*

L'analisi dei polimorfismi, la presenza di diverse omozigosi ed il clonaggio genico, hanno consentito di ricostruire l'assetto completo dei microsatelliti e degli SNPs *in cis* al cluster β -globinico.

Sono state osservate otto differenti configurazioni, denominate 1A-8A, che sono riassunte nella Tabella VII. L'assetto più frequente è l'1A:

β LCR	Pre G γ - framework	<i>Xmn</i> I	G γ IVS2	A γ IVS2	promotore β
(AT) ₈ N ₁₂ (AT) ₁₁	T; G; G	-158 C	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₀ (CG) ₅ (TG) ₇	(AT) ₇ T ₇

Questo assetto caratterizza il 75% dei cromosomi dei politrasfusi e degli intermedi. E' linked all'aplotipo II di Orkin. In omozigosi è presente in 11 pazienti TM (Tabella II) e in due intermedi

(Tabella III). I familiari dell'intermedio SG (SE, LV e SA, Tabella IV), sono pure essi eterozigoti per l'assetto 1A. Inoltre, lo stesso assortimento di siti polimorfi è presente nel 10% dei controlli normali (Tabella V).

L'assetto 2A (Tabella VII), anch'esso linked all'aplotipo II, differisce dall'1A per la struttura del microsatellite localizzato nella β -LCR ed è stato rilevato in un soggetto politrasfuso (FS) in eterozigosi con l'1A:

β LCR	Pre $G\gamma$ - framework	<i>Xmn</i> I	$G\gamma$ IVS2	$A\gamma$ IVS2	promotore β
(AT) ₁₀ N ₁₂ (AT) ₁₁	T; G; G	-158 C	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₀ (CG) ₅ (TG) ₇	(AT) ₇ T ₇

L'assetto 3A (Tabella VII) è presente in eterozigosi in uno (GS) dei pazienti TI:

β LCR	Pre $G\gamma$ - framework	<i>Xmn</i> I	$G\gamma$ IVS2	$A\gamma$ IVS2	promotore β
(AT) ₁₀ N ₁₂ (AT) ₁₁	T; G; A	-158 C	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₉ (CG) ₅ (TG) ₈	(AT) ₇ T ₇

L'assetto 4A (Tabella VII) è presente in eterozigosi in uno (LS) dei pazienti TM:

β LCR	Pre $G\gamma$ - framework	<i>Xmn</i> I	$G\gamma$ IV S2	$A\gamma$ IVS2	promotore β
(AT) ₉ N ₁₂ (AT) ₁₁	T; G; G	-158 T (+)	(TG) ₁₉ (CG) ₂ CACG	(TG) ₁₃	(AT) ₇ T ₇

L'assetto 5A (Tabella VII) è presente in eterozigosi in due pazienti politrasfusi (SAn e MJ).

Nel paziente MJ l'assetto è linked all'aplotipo I:

β LCR	Pre $G\gamma$ - framework	<i>Xmn</i> I	$G\gamma$ IVS2	$A\gamma$ IVS2	promotore β
(AT) ₉ N ₁₂ (AT) ₁₀	T; G; A	-158 C	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₉ (CG) ₅ (TG) ₈	(AT) ₇ T ₇

L'assetto 6A (Tabella VII), linked all'aplotipo I di Orkin, è presente in eterozigosi nel paziente PMG politrasfuso:

β LCR	Pre $G\gamma$ - framework	<i>Xmn</i> I	$G\gamma$ IVS2	$A\gamma$ IVS2	promotore β
(AT) ₈ N ₁₂ (AT) ₁₁	T; G; A	-158 C	(TG) ₁₉ (CG) ₂ CACG	(TG) ₉ (CG) ₅ (TG) ₈	(AT) ₇ T ₇

Il cromosoma con la mutazione β^+ -87 C→G del paziente RGM è risultato possedere l'assetto 7A (Tabella VII) in linkage con l'aplotipo VIII di Orkin:

β LCR	Pre $G\gamma$ - framework	<i>Xmn</i> I	$G\gamma$ IVS2	$A\gamma$ IVS2	promotore β
(AT) ₁₀ N ₁₂ (AT) ₁₁	T; A; G	-158 T	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₃	(AT) ₇ T ₇

Il campione PSo, la cui determinante β -tal in trans alla β^{039} non è stata determinata, possiede, su un altro aplotipo di Orkin non identificato, la stessa associazione di siti polimorfi dell'assetto 8A (Tabella VII), anche se il microsatellite presente nella regione HS2 della LCR non è stato determinato.

Il campione PSi, eterozigote per la mutazione β^+ -tal IVS1-6 (Tabella VII), in linkage alla mutazione possiede l'assetto 8A:

β LCR	Pre $G\gamma$- framework	<i>Xmn</i> I	$G\gamma$ IVS2	$A\gamma$ IVS2	promotore β
(AT) ₈ N ₁₂ (AT) ₁₂	T; G; G	-158 C	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₀ (CG) ₅ (TG) ₇	(AT) ₇ T ₇

6. Discussione

La difettosa sintesi di globine β , cui consegue la presenza di globine α libere che precipitano causando gravi danni che determinano la morte delle cellule eritroidi, rappresenta la principale causa della patogenesi delle β -tal. La quantità di catene α in eccesso, i cui effetti sono riassunti nella Figura 2.4, correla con la gravità dell'eritropoiesi inefficace. Ciò implica che la condizione talassemica si manifesta in misura meno grave (i) quando il difetto molecolare non produce una completa assenza di sintesi di catene β ma ne permette la produzione di una quota al di sotto della norma; (ii) quando nelle cellule eritroidi talasemiche è presente un'elevata quantità di catene γ che assemblano a formare tetrameri con gran parte delle catene α libere o (iii) quando la sintesi di globine α è ridotta a causa della concomitante presenza di uno o più difetti α -tal. Pertanto, la caratterizzazione molecolare dei geni β -tal riveste un ruolo molto importante poiché può consentire di prevedere il grado di riduzione della sintesi di catene β e, conseguentemente, l'entità dell'eritropoiesi inefficace.

Le indagini biochimico-molecolari sono attualmente mirate, in alcuni laboratori, all'identificazione delle sequenze di DNA che possono favorire la sintesi di catene γ , come si verifica nel caso della delezione di entrambi i geni δ e β (causa della $\delta\beta$ -tal) (Rochette *et al.*, 1994), delle varie forme di HPFH e della presenza del sito polimorfo *Xmn* I-G γ (Wood, 2001). Questi studi rappresentano probabilmente alcune fra le migliori possibilità per stabilire l'approccio terapeutico più appropriato per l'attenuazione del danno talassemico. La possibilità di differenziare tra forme clinicamente lievi e non dipendenti, se non occasionalmente, da trasfusione (TI) e condizioni gravi (TM) all'esordio della patologia, è infatti essenziale per stabilire il trattamento più opportuno per il paziente. L'accurata diagnosi di un fenotipo lieve TI può evitare inutili trasfusioni e le relative complicazioni, mentre la tempestiva diagnosi di TM consente di iniziare precocemente la terapia trasfusionale, così da prevenire o ritardare l'ipersplenismo e ridurre il rischio di sviluppare una risposta immunologica contro antigeni eritrocitari estranei che derivano dalla trasfusione.

L'esatta identificazione dei fenotipi TM e TI è particolarmente difficile. La coereditarietà di forme α_2 -tal non modifica la severità clinica, mentre la presenza di due o tre geni α non funzionanti determina un notevole miglioramento fenotipico soprattutto in concomitanza con una mutazione di tipo β^+ (Thein, 2005). Ciò nonostante, per alcuni pazienti affetti da TI, l'unica spiegazione apparente che giustifica il fenotipo lieve è la sintesi di globine γ che persiste nella vita adulta. Non è ancora stato chiarita la ragione per la quale nei pazienti TI lo *switch* neonatale HbF \rightarrow HbA non comporti la forte riduzione dell'attività dei geni γ come avviene in quasi tutti i pazienti β^0 -tal, affetti da anemia severa e vincolati alla dipendenza trasfusionale. Per tale motivo si comprende la ragione del grande interesse

connesso alla conoscenza delle basi molecolari della sintesi e della regolazione dell'HbF nei pazienti β -tal.

L'inusuale capacità di produzione del tetramero fetale in alcuni pazienti TI sembra dovuta al contributo di elementi *cis-acting* presenti nel cluster β -globinico (Goncalves et al., 1998; Lapoumeroulie et al., 1999; Zertal-Zidani et al., 2002; Ragusa et al., 2003; De Angioletti et al., 2004, Bandyopadhyay et al., 2005, Papachatzopoulou et al., 2006). Tali elementi sono SNPs e microsatelliti localizzati in regioni intrageniche non tradotte (es. (TG)_n(CG)_m nell'IVS2 dei geni G_γ e A_γ) oppure nelle sequenze promotrici distali e prossimali (es. i nt -1450, -1280, -1225 e -158 in 5' al gene G_γ ; (AT)_xTy in 5' al gene β) o, ancora, in regioni regolatrici molto distanti dalle sequenze geniche (es. (AT)_xN_y(AT)_z nel HS2 della β LCR) (Figura 2.7). Sebbene tali polimorfismi siano spesso considerati marcatori neutrali, si ritiene che possano avere un ruolo funzionale poiché in grado di alterare o di creare siti di legame per fattori di trascrizione.

Molti autori hanno considerato il ruolo e gli effetti di queste posizioni polimorfe esaminate singolarmente o due per volta (es. -158 in 5' al gene G_γ e (AT)_xTy in 5' al gene β); tuttavia recenti studi indicherebbero che il modo migliore per comprendere la funzione di un particolare polimorfismo possa essere quello di considerare tutti i polimorfismi potenzialmente coinvolti nel loro complesso. L'assetto polimorfo relativo delle otto posizioni *in cis* nel cluster β -globinico è stato determinato da Ragusa et al. (2003) e De Angioletti et al. (2004) in pazienti β -tal con alti livelli di HbF. Gli autori dimostrano che i soggetti con fenotipo attenuato hanno in comune un particolare assetto di siti polimorfi che, *in cis* o *in trans*, sostiene la sintesi di elevate quantità di HbF.

Queste premesse, nonché la considerazione che l'assetto polimorfo in *linkage* alle mutazioni β -tal tipiche dei β^0 -tal sardi non era ancora stato indagato, rappresentano il presupposto di questa ricerca. Un ulteriore elemento di interesse è rappresentato dalla circostanza che, nonostante fra gli omozigoti $\beta^0\beta^0$ o nei doppi eterozigoti $\beta^0\beta^0/\beta^6$ sardi prevalgano condizioni di TM, il 10% di essi manifesta condizioni cliniche tipiche della TI (Galanello et al., 1989). Altro obiettivo della ricerca è perciò rappresentato dalla possibilità di comprendere quanto un determinato assetto polimorfo *in cis* al *locus* β -tal possa influire nel sostenere un'elevata e stabile produzione di HbF per tutta la vita adulta. Nei TI sardi il fenotipo lieve non trova giustificazione nella concomitante presenza di determinanti α -tal (presenti solo nel 25% dei pazienti), né nella presenza del polimorfismo G_γ -158 (positivo solo nel 9% dei pazienti). Pertanto, l'unica giustificazione per la condizione lieve non dipendente da trasfusione è la produzione elevata di HbF di per sé stessa.

Sono stati oggetto d'indagine di questa ricerca quattro pazienti sardi affetti da TI e 20 affetti da TM. Tre dei quattro TI erano a conoscenza della loro condizione β -tal non dipendente da trasfusione

(Tabella III). Il quarto paziente (SG), al momento della diagnosi di β -tal omozigote aveva 27 anni, mostrava una modesta anemia (9,3 g/dl Hb) ed era asintomatico. Tale paziente ha perciò suscitato un notevole interesse in vista della definizione di una correlazione fenotipo/genotipo più agevolata.

In tutti i pazienti TI esaminati il danno molecolare si è rivelato dovuto alla mutazione β^{039} in omozigosi, condizione presente anche in 18 fra i 20 pazienti TM politrasfusi (Tabella II). Differentemente da questi ultimi, che hanno livelli di HbF molto variabili e mai tali da sostituire l'assenza di HbA (Tabella VI), nei TI l'elevato incremento di HbF (oltre il 95%) è alla base della loro sintomatologia lieve, e pertanto non dipendono da trasfusioni.

La ricerca di eventuali determinanti che possono giustificare le manifestazioni lievi del fenotipo TI, ha dimostrato che soltanto il paziente SG è omozigote per la mutazione $\alpha^{3.7}$, corrispondente ad α_1 -tal, condizione responsabile di una consistente riduzione dell'eccesso di globine α (Tabella III). Per quanto attiene alla sintesi persistente di HbF, si è potuto escludere che questa potesse dipendere dalla presenza di mutazioni ndHPFH ai promotori dei geni $G\gamma$ e $A\gamma$ (Wood, 2001). Questo risultato è in accordo anche con la determinazione della composizione globinica dell'HbF (Tabella VI) che è risultata composta da catene $G\gamma$ e $A\gamma$ nel rapporto tipico del neonato normale ($G\gamma$ $57,8 \pm 7,7\%$ e $A\gamma$ $42,2 \pm 7,7\%$).

In tutti i pazienti intermedi è stata identificata, in etero- o in omozigosi, la variante HbF-Sardegna (in concentrazioni corrispondenti a $17,6 \pm 4,8\%$ e $46 \pm 1\%$, rispettivamente) prodotta sotto il controllo dell'allele mutato $A\gamma^T$. I livelli percentuali delle globine $A\gamma^T$ ($17,6 \pm 4,8\%$) ed $A\gamma^I$ ($20,7 \pm 6,1\%$) rilevati negli eterozigoti per la HbF-Sardegna confermano che la delezione di quattro bp (-AGCA), localizzata da -225 a -222 nel promotore del gene $A\gamma^T$, riduce l'espressività del *locus* $A\gamma^T$ di circa il 20% rispetto all'allele normale $A\gamma^I$ (Gilman, *et al.*, 1988; Manca *et al.*, 1991).

Nei pazienti TI sono stati definiti l'aplotipo secondo Orkin e l'assetto completo dei polimorfismi *in cis* al cluster β . Tutti sono risultati possedere l'assetto 1A (in omozigosi nei pazienti SG e BM) (Tabella III); uno, GS, è risultato eterozigote 1A/3A. Queste due configurazioni non sono mai state descritte e si differenziano nella lunghezza dei repeats dei microsatelliti HS2 della β LCR e dell' $A\gamma$ IVS2 ed anche per gli SNPs del pre $G\gamma$ framework. I pazienti SG e GS manifestano condizioni cliniche differenti che vanno dalla completa assenza di sintomi (SG) al quadro clinico compromesso (GS), sebbene mai sottoposto a trasfusione.

Al momento di intraprendere questa indagine, del microsatellite (TG)_n(CG)_m erano noti 9 alleli nell'IVS2 del gene $G\gamma$ e 13 nell'IVS2 del gene $A\gamma$ (Powers & Smithies, 1986; Lanclos *et al.*, 1991; Lapoumeroulie *et al.*, 1999). In particolare, Lapoumeroulie *et al.* (1999) hanno messo in evidenza che la frequenza dell'allele (TG)₁₃ nell' $A\gamma$ IVS2 nella popolazione siciliana era quasi 16 volte più alta nei

pazienti TI rispetto al gruppo dei TM. L'allele era inoltre presente solo nei soggetti TI con livelli incrementati di HbF indipendentemente dallo specifico aplotipo di Orkin (Orkin *et al.* 1982). Questo risultato suggerisce che il microsatellite (TG)₁₃ potrebbe essere considerato uno dei possibili candidati nella modulazione dell'espressione dei geni fetali (Lapoumeroulie *et al.*, 1999). Nessuno dei pazienti TI esaminati in questa indagine è risultato possedere tale allele.

A dimostrazione della elevata omogeneità genetica, nella maggior parte dei casi la popolazione sarda tal possiede un microsatellite con configurazione (TG)₁₀(CG)₅(TG)₇, mai associato al gene A γ I ma solo a quello mutato A γ T. Tale microsatellite è sempre *linked* agli aplotipi II e VI di Orkin. Questo dato conferma quanto rilevato nella popolazione siciliana sia β -tal (TM e TI) che normale, nella quale tuttavia non è stato precisato se il gene globinico fosse di tipo A γ I o A γ T (Lapoumeroulie *et al.*, 1999). Nei TI esaminati oltre il 75% dei cromosomi mostrava l'aplotipo II di Orkin confermando che nella popolazione della Sardegna la mutazione β^{039} , presente nel 95% dei β -tal (TM e TI), è associata all'aplotipo II di Orkin nel 64% circa dei casi (Pirastu *et al.*, 1987; Piras *et al.*, 2005).

L'allele (TG)₁₃, l'unico motivo che rappresenta un perfetto repeat (TG)_n non interrotto, è presente in eterozigosi in tre pazienti TM eterozigoti A γ I/A γ T (Tabella II), mentre nei controlli (Tabella V), nessuno dei quali presenta livelli di HbF incrementati, il (TG)₁₃ è presente in eterozigosi nel 21% dei cromosomi esaminati (8 su 36). L'allele (TG)₁₃ è sempre associato al gene A γ I e non è *linked* all'aplotipo I, che è il secondo aplotipo di Orkin più frequente in Sardegna quando associato al gene β -tal. Questo risultato conferma dati precedenti (Lapoumeroulie *et al.*, 1999).

Il cromosoma β^{039} appare fortemente selezionato come dimostrato anche dalla configurazione del microsatellite localizzato nella IVS2 di G γ . Ad eccezione di tre dei 20 pazienti politrasfusi (FA, LS e PMG) che sono eterozigoti (TG)₁₁(CG)₃ e (TG)₁₉(CG)₂CACG, tutti gli altri campioni esaminati, TM e TI, hanno il genotipo omozigote (TG)₁₁(CG)₃ (Tabelle II e III). Nei controlli non β -tal, oltre ai motivi (TG)₁₉(CG)₃CACG e (TG)₁₈(CG)₂CACG identici a quelli identificati da Lapoumeroulie *et al.* (1999), è stato rilevato il microsatellite (TG)₁₆(CG)₂CACG, mai descritto in letteratura (Tabella V).

Dei siti *cis-acting* considerati in questa indagine, il polimorfismo *Xmn* I-G γ è quello più conosciuto poiché è stato il primo ad essere correlato all'aumento della HbF (Gilman & Huisman, 1985) poiché, soprattutto in condizioni di stress emolitico cronico, tipico degli omozigoti β -tal, può essere responsabile di un significativo incremento di HbF costituita prevalentemente dalla catena G γ (Thein, 2005). L'associazione *Xmn* I-G γ in *cis* o *in trans* con il microsatellite (AT)₉T₅, nel promotore β , incrementa il livello di HbF sia in individui non tal sotto stress eritropoietico che in pazienti β -tal o falcemici in misura molto maggiore rispetto alla combinazione *Xmn* I-G γ /(AT)₇T₇. Questo microsatellite è definito *wild type* poiché presente con una frequenza del 67% nelle popolazioni non talassemiche del Mediterraneo (Kalotychou *et al.*, 2002; Bandyopadhyay *et al.*, 2005). Negli

eterozigoti β -tal i livelli di HbF sono maggiormente aumentati quando il repeat (AT)₉T₅ è presente sia allo stato omozigote che in associazione con il wild type (AT)₇T₇ (Guida *et al.*, 2006). Ciò ha suggerito che il repressore proteico BP1 può legarsi in misura maggiore al microsatellite se questo ha configurazione (AT)₉T₅, riducendo in questo modo l'espressione del gene β (Kalotychoy *et al.*, 2002). La possibile influenza del microsatellite nella regolazione dell'espressione del gene β -globinico è stata valutata mediante esperimenti di trasfezione con linee cellulari eritroidi (MEL) e non eritroidi (Hela). La riduzione dell'espressione del gene reporter, associata ai motivi (AT)₉T₅ (29%) e (AT)₁₁T₃ (22%) rispetto al riferimento (AT)₇T₇, è stata verificata solo nel primo sistema. Si ritiene che ciò possa essere dovuto alla mancanza dei fattori di trascrizione tessuto-specifici nel sistema non eritroide (Kalotychoy *et al.*, 2002).

In pazienti $\delta\beta$ -Lepore e talassemici di origine europea, la configurazione (AT)₉T₅ in *in cis* o *in trans* al sito *Xmn* I-G γ è stata trovata associata ad un sostanziale incremento di HbF (Bandyopadhyay *et al.*, 2005). I pazienti esaminati in questa indagine mostrano in omozigosi il microsatellite (AT)₇T₇ e solo un cromosoma su otto nel gruppo degli intermedi e quattro su quaranta nei politrasfusi sono risultati positivi per *Xmn* I, a riprova del fatto che questi due siti non sarebbero implicati nel miglioramento del quadro clinico dei pazienti TI. La bassa incidenza del motif (AT)₉T₅ nella popolazione talassemica è in accordo con precedenti studi (Galanello *et al.*, 1993; Guida *et al.*, 2006).

Nella popolazione di controllo l'analisi del repeat (AT)_xT_y e del polimorfismo *Xmn* I ha dimostrato l'esistenza di una maggiore eterogeneità (Tabella V). Il 21% dei cromosomi era positivo per *Xmn* I, associato in un solo caso al microsatellite (AT)₉T₅. Oltre a questo *motif* ed al wild type (AT)₇T₇, la popolazione non β -tal possiede anche le configurazioni (AT)₁₁T₃ e (AT)₇T₈, quest'ultima mai descritta in letteratura.

Pertanto, nessuna delle posizioni polimorfe finora considerate, esaminate singolarmente o per coppie, a parità di mutazione β -tal, possono essere considerate responsabili del diverso fenotipo mostrato dai pazienti politrasfusi gravi e dagli intermedi.

Ragusa *et al.* (2003) e De Angioletti *et al.* (2004) sono stati tra i primi a considerare questi *motifs* e SNPs come in grado di agire in sinergia nel modulare l'espressione dell'HbF. Gli autori hanno analizzato pazienti tal del sud Italia, Sicilia e Campania, ed i risultati dimostrano che i soggetti con fenotipo lieve non dipendente da trasfusione, nonostante i differenti determinanti β -tal (β^0 -IVS2 +1 G \rightarrow A e β^+ -87 C \rightarrow G) correlati a diversi aplotipi di Orkin (III e VIII), condividevano la medesima configurazione polimorfa *in cis* alla mutazione β -tal: (AT)₉N₁₂(AT)₁₀ nella β LCR, *Xmn* I (+), (TG)₁₁(CG)₃ in G γ IVS2, (TG)₁₃ in A γ IVS2 e (AT)₉T₅ nel promotore distale di β . La stessa mutazione β^+ -87 è stata caratterizzata in uno dei pazienti politrasfusi (RGM) esaminati in questa indagine (Tabella II). Il paziente RGM ha il medesimo genotipo dei due descritti da De Angioletti *et al.* (2004),

vale a dire: doppio eterozigote β^+-87/β^039 con aplotipo di Orkin VIII/II. Inoltre, nessuno mostra mutazioni α -tal né HPFH. Diversamente dai pazienti di De Angioletti, RGM ha un fenotipo grave, dipendente da trasfusione dall'età di sette anni (oggi ha 40 anni), e livelli di HbF pari a 4,5g/dl, mentre nei due siciliani questo valore oscilla fra i 7,4 ed i 9,6g/dl. L'analisi dei siti polimorfi del paziente sardo, ha rivelato la presenza dell'assetto 7A che differisce da quello descritto da De Angioletti *et al.* (2004) nella β LCR e nel promotore distale di β (Tabella VII). Ritenere che ai fini della correlazione genotipo/fenotipo questo risultato rappresenti la base molecolare del differente decorso clinico dei pazienti è certamente imprudente, tuttavia sarebbe stato più difficilmente interpretabile se tale paziente avesse avuto lo stesso assetto polimorfo dei pazienti siciliani con fenotipo lieve.

L'aumento della fetale correlabile ad un assetto come quello descritto da Ragusa *et al.* (2003) e De Angioletti *et al.* (2004) giustificerebbe (presumibilmente) il quadro ematologico evidenziato in altri due soggetti, madre (SR) e figlia (PS), inclusi in questa indagine. Entrambe presentavano livelli di HbF superiori alla norma (4,1% e 8,9% del totale delle Hb circolanti, rispettivamente) e nella figlia, che mostrava 3,9% di HbA₂, è stata scoperta la mutazione $\beta^+IVS1-nt6$ T→C, una delle mutazioni β -tal più diffuse nell'area orientale del Mediterraneo (Efremov *et al.*, 1994; El-Latif *et al.*, 2002) in eterozigosi (Figura 5.2). Poiché la figlia non ha ereditato la mutazione β -tal dalla madre, e poiché entrambe hanno alta HbF, sembra prevedibile che i livelli di HbF possano essere correlati all'assetto polimorfo comune ai due soggetti, cioè quello *in trans* alla mutazione $\beta^+ IVS1-nt6$. Fatta eccezione per (AT)xTy nel promotore distale del gene β , l'assetto è identico a quello descritto in soggetti β -tal, di origine meridionale, con fenotipo attenuato e alti livelli di Hb ($9,8 \pm 1,1$ g/dl) e di HbF ($6,2 \pm 1,5$ g/dl) (Ragusa *et al.*, 2003; De Angioletti *et al.*, 2004). Inoltre, la quota di HbF della figlia, quasi doppia rispetto a quella della madre, potrebbe essere influenzata anche dalla configurazione dei polimorfismi *in cis* alla mutazione $\beta^+ IVS1-nt6$. Il genotipo è risultato l'8A (Tabella VII) che si differenzia dall'1A per il microsatellite della β LCR.

Le analisi molecolari sono state estese anche ai genitori e alla sorella (SE, LV, SA) del paziente intermedio SG, asintomatico. In tutti i familiari è stato riscontrato il tipico quadro ematologico del microcitemico (HbA: $89,3 \pm 1,46\%$, HbA₂: $4,17 \pm 1,19\%$) determinato dall'eterozigosi per la β^039 -tal. Differentemente dalla maggior parte dei portatori β -tal, tutti i familiari mostrano, però, una quantità di HbF piuttosto elevata ($5,96 \pm 0,85\%$) (Figura 6.1). Il probando ha ereditato due cluster β -globinici che presentano la medesima configurazione polimorfa (Tabelle III e IV). Come dimostrato anche dalla presenza della variante emoglobinica HbF-Sardegna (Figura 6.2), rilevabile alla elettroforesi, il probando è omozigote per il locus $A\gamma^T$ (Masala *et al.*, 1988; Oggiano *et al.*, 1988).

L'HbF del probando è infatti composta per il 53% dal tetramero $\alpha_2^G\gamma_2$ e per il 47% dal tetramero $\alpha_2^A\gamma^T_2$. La presenza della delezione di 4bp (-AGCA) da -225 a -222, tipica del promotore $A\gamma^T$, la positività per l'enzima *Hind* III a + 1270 bp e la configurazione (TG)₁₀(CG)₅(TG)₇ del microsatellite nell' $A\gamma$ IVS2 confermano la presenza dell'allele $A\gamma^T$ in omozigosi nel probando (Tabella III) ed in eterozigosi nei familiari (Tabella IV). Come mostra la Tabella IV, i familiari del probando sono eterozigoti al microsatellite nell' $A\gamma$ IVS2. Infatti, *in trans* alla mutazione β^{039} , sono stati identificati il (TG)₁₃ e il (TG)₉(CG)₅(TG)₈, nel padre e nella madre, rispettivamente.

In tutti i familiari, l'incremento dei livelli di fetale è stato correlato con l'eterozigosi per l'assetto 1A (Tabella IV). Tuttavia, nel padre (SE), vi è anche da considerare il contributo dell'associazione (AT)₉T₅ e *Xmn* I-G γ (Tabella IV).

L'assetto 1A è presente, in omozigosi (SG e BMa) o in eterozigosi anche negli altri β -tal intermedi (Tabella III). Considerando la pressione selettiva esercitata dalla malaria per 25 secoli sulla popolazione sarda, tale evidenza non appare sorprendente. Tuttavia è evidente che l'insieme dei risultati mostra che l'assetto 1A, da solo, non può giustificare il fenotipo lieve dei pazienti TI poiché risulta il più frequente anche nei pazienti β -tal gravi politrasfusi (Tabella II). Un'ulteriore dimostrazione che l'assetto 1A non è implicato nel miglioramento del quadro clinico dei TI, è rappresentata dal caso di uno dei pazienti politrasfusi, TaM (Tabella II), il quale, allo stesso modo del paziente SG (asintomatico), presenta in omozigosi l'assetto 1A ed il genotipo α_1 -tal, $\alpha^{-3.7}/\alpha^{-3.7}$. Il paziente TaM, peraltro, è stato trasfuso precocemente a soli sei mesi e, al momento dell'indagine, presentava meno di 1 g/dl di HbF.

Nei pazienti sardi esaminati, la mutazione β^{039} è risultata distribuita su 6 differenti assetti di siti polimorfi (Tabella VII). Di questi, due (1A e 2A) sono associati all'aplotipo II di Orkin e all'allele $A\gamma^T$ e altri due (5A e 6A) all'aplotipo I e all'allele $A\gamma^I$. L'assetto 3A è stato identificato in uno dei soggetti intermedi (GS). Il 4A è l'unico positivo per il sito *Xmn* I-G γ ed è presente in un politrasfuso (LS).

La mutazione β^+-87 , localizzata su cromosoma con assetto 7A, è risultata *linked* all'aplotipo VIII di Orkin, mentre il *locus* β^+ IVS1-nt6 (assetto 8A) è *linked* all'aplotipo II (Tabella VII). La stessa mutazione era stata precedentemente identificata sull'aplotipo IV (Efremov *et al.*, 1994), sul VI e sul VII (El-Latif *et al.*, 2002).

Purtroppo, non è stato possibile associare, in diversi casi, una particolare combinazione di siti polimorfi ad uno specifico aplotipo di Orkin. E' verosimile che alcuni assetti possano derivare da eventi mutazionali ricombinatori, fenomeni peraltro molto frequenti soprattutto a livello dei geni γ -globinici (Powers *et al.*, 1984; Hattori *et al.*, 1986; Manca *et al.*, 1988).

L'esistenza di polimorfismo al *locus* β -globinico è stato descritto per la prima volta nel 1978 (Kan e Dozy) allorché, in pazienti americani, è stato dimostrato un sito per *Hpa* I in *linkage disequilibrium* con cromosomi contenenti la mutazione falcemica β^S . La presenza di diversi RFLP e l'ereditabilità non casuale del conseguente aplotipo in *linkage disequilibrium* con differenti mutazioni β -tal ha avuto un ruolo fondamentale nella diagnosi prenatale delle tal e nello studio della storia evolutiva delle mutazioni del gene β -globinico. Questi studi hanno dimostrato che gli aplotipi del cluster β -globinico non sono statici ed evolvono attraverso fenomeni di ricombinazione e mutazioni puntiformi. Pertanto, gli aplotipi sono piuttosto diversi nelle diverse popolazioni ed è difficile trovare una corrispondenza assoluta fra aplotipi descritti in gruppi etnici diversi o, ancora, l'eventuale associazione potrebbe essere puramente casuale.

Appare chiaro che nella popolazione β -tal sarda, praticamente monomorfica per la mutazione β^{039} , uno specifico assetto di siti polimorfi (non Orkin) non può rappresentare l'unica causa responsabile della differenza tra un quadro clinico lieve ed uno più severo, trasfusione-dipendente. Più probabilmente la causa è da ricercare all'interno del cluster β -globinico, in posizioni ancora non note, oppure su altri geni presenti su altri cromosomi che segregano indipendentemente dal *locus* β .

Numerose evidenze dimostrano che la capacità intrinseca di produrre HbF può essere correlata anche a diversi QTL, regioni di DNA associate ad un particolare carattere fenotipico strettamente associato al gene che determina il tratto β -tal, che mappano su cromosomi diversi e segregano indipendentemente dal cluster β -globinico. QTLs coinvolti nella modulazione dell'HbF sono stati mappati sul cromosoma 6q23 e sul Xp22.2 (Garner *et al.*, 2000). Non è chiaro se l'effetto del QTL si manifesti a carico di fattori *trans-acting* che interagiscono direttamente con i geni γ -globinici o indirettamente (es. interazioni proteina-proteina) ma comunque in modo specifico per i geni γ -globinici (Crossley e Orkin 1993). Alternativamente, il gene 6q potrebbe codificare per un fattore coinvolto nella via di maturazione eritroide che porterebbe ad un prematuro reclutamento dei progenitori delle cellule eritroidi con conseguente incremento dei livelli di cellule F e quindi HbF.

Bibliografia

- Alter BP, Goff SC, Efremov GD, Gravely ME, Huisman THJ (1980) Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the G γ /A γ ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *British journal of Haematology*, **44**: 527-534.
- [Bandyopadhyay S](#), [Mondal BC](#), [Sarkar P](#), [Chandra S](#), [Das MK](#), [Dasgupta UB](#) (2005) Two β -globin cluster-linked polymorphic loci in thalassemia patients of variable levels of fetal hemoglobin. *European Journal of Haematology*, **75**: 47-53.
- [Bank A](#) (2005) Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's as simple as α , β , γ , δ . *Journal Clinical Investigation* **115**: 1470-1473.
- Bank A (2006) Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood*, **107**: 435-443.
- Bianco Silvestroni I (1998) Le talassemie, un problema medico-sociale: ieri e oggi. Istituto italiano di medicina Sociale.
- Crossley M, Orkin SH (1993) Regulation of the β -globin locus. *Current opinion in Genetics and Development*, **3**: 232-237.
- De Angioletti M, Lacerra G, Pagano L, Alessi M, D'Avino R, Manca L, Carestia C (2004): β -thalassemia-87 C \rightarrow G: Relationship of the HbF modulation and polymorphisms in compound heterozygous patients. *British Journal of Hematology*, **126**: 743-749.
- Dodè C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J (1993) Rapid analysis of $-\alpha^{3,7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *British Journal of Haematology*, **83**:105-111.
- [Efremov DG](#), [Dimovski AJ](#), [Baysal E](#), [Ye Z](#), [Adekile AD](#), [Ribeiro ML](#), [Schiliro G](#), [Altay C](#), [Gurgey A](#), [Efremov G.D](#), (1994) Possible factors influencing the haemoglobin and fetal haemoglobin levels in patients with beta-thalassaemia due to a homozygosity for the IVS-I-6 (T \rightarrow C) mutation. *British Journal of Hematology*, **86**: 824-830.
- El-Latif MA, Filon D, Rund D, Oppenheim A, Kanaan M (2002) The β^+ -IVS-1-6 (T \rightarrow C) mutation accounts for half of the thalassemia chromosomes in the palestinian population of the mountain regions. *Hemoglobin* **26**: 33-40.
- Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G, Bianco I (1996) Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology, *Haematologica*, **81**: 387-396.
- [Forget, BG](#) (1998): Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **850**: 38-44.
- Galanello R, Dessì E, Melis MA, Addis M, Sanna MA, Rosatelli C, Argiolu F, Giagu N, Turco MP, Cacace E (1989) Molecular analysis of β^0 -thalassemia intermedia in Sardinia. *Blood*, **74**: 823-827.
- Galanello R, Meloni A, Gasperini D, Saba L, Cao A, Rosatelli MC, Perseu L (1993) The repeated sequence (AT) $_x$ T $_y$ upstream to the b-globin gene is a simple polymorphism. *Blood*, **81**: 1974-1975.
- Garner C, Silver N, Best S, Menzel S, Martin C, Spector TD, Thein SL (2004) Quantitative trait locus on chromosome 8q influences the switch from fetal to adult haemoglobin. *Blood*, **104**: 2184-2186.
- Garner C, Tatu T, Reittie JE (2000) Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood*, **95**: 342-346.
- Gilman JG, Huisman THJ (1985) DNA sequence variation associated with elevated fetal $G\gamma$ globin production. *Blood*, **66**: 783-787.
- Gilman JG, Johnson ME, Mishima N. (1988) Four base-pair DNA deletion in human $A\gamma$ globin-gene promoter associated with low $A\gamma$ expression in adults. *British Journal of Haematology*, **68**: 455-458.
- Gilman JG, Manca L, Frogheri L, Pistidda P, Guiso L, Longinotti M, Masala B (1994) Mild β^+ (-87)-thalassemia CACCC box mutation is associated with elevated fetal hemoglobin expression *in cis*. *American Journal of Hematology*, **45**: 265-267.
- Goncalves I, Ducrocq R, Lavinha J (1998) Combined effect of two different polymorphic sequences within the beta globin gene cluster on the level of HbF. *American Journal of Hematology*, **57**: 269-276.
- [Grifoni V](#), [Kamuzora H](#), [Lehmann H](#), [Charlesworth D](#) (1975) A new Hb variant: Hb F Sardinia gamma75(E19) isoleucine leads to threonine found in a family with Hb G Philadelphia, beta-chain deficiency and a Lepore-like haemoglobin indistinguishable from Hb A2. *Acta Haematologica*, **53**: 347-355.
- Guida V, Cappabianca MP, Colosimo A, Rafanelli F, Amato A, Dallapiccola B (2006) Influence of $G\gamma$ -158 C \rightarrow T and β (AT) $_x$ (T) $_y$ gene polymorphisms on HbF levels in Italian β -thalassemia carriers and wild-type subjects. *Haematologica*, **91**: 1275-1276.

- Hardison RC, Chui DHK, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H (2002) HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Human Mutation*, **19**: 225-233.
- Harju S, McQueen KJ, Peterson KR (2002) Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 683-700.**
- Harteveld KL, Losekoot M, Fodde R, Giordano PC, Bernini LF (1997) The involvement of Alu repeats in recombination events at the α -globin gene cluster: characterization of two alpha-zero-thalassemia deletion breakpoints. *Human Genetics*, **99**: 528-534.
- Hattori Y, Kutlar F, Chen SS, Huisman THJ, Demuro P, Formato M, Manca L, Masala B (1986) DNA polymorphisms in North Sardinian newborns and their linkage with abnormal γ globin gene arrangements and with β^0 -thalassemia. *Biochemical Genetics*, **24**: 669-681.
- Higgs DR, Pressley L, Clegg JB, Weatherall DJ, Serjeant GR (1980) Alpha thalassemia in black populations. *Johns Hopkins Medical Journal*, **146**: 300-310.
- Ho PJ, Hall GW, Watt S, West NC, Wimperis JW, Wood WG, Thein SL (1998) Unusually severe heterozygous beta-thalassemia: evidence for an interacting gene affecting globin translation. *Blood*, **92**: 3428-3435.
- Hsu Shih-Lan, Marks J, Shaw Jeng-Pyng, Tam M, Higgs DR, Shen CC, Shen Che-Kun J (1988) Structure and expression of the human θ_1 globin gene. *Nature*, **331**: 94-96.
- Huisman THJ (1997) Gamma chain abnormal human fetal hemoglobin variants. *American Journal of Hematology*, **55**: 159-163.
- Jane SM, Cunningham JM (1998) Understanding fetal globin gene expression. A step towards effective HbF reactivation in haemoglobinopathies. *British Journal of Haematology*, **102**: 415-422.
- Jarman AP, Higgs DR (1988) A new hypervariable marker for the human α -globin gene cluster. *American Journal of Human Genetics*, **42**: 8-16.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ (1998) Multiple alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Science*, **23**: 403-405.
- Kalotychou V, Kollia P, Voskaridou E, Patargias T, Anagnou NP, Loukopoulos D (2002) Functional role of the four different types of (AT)_xT_y motifs 5' to the β -globin gene and their distribution in the Greek population. *Blood Cells Molecules and Diseases*, **28**: 39-46.
- Kan YW, Dozy AM (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **75**: 5631-5635.
- Lanclos, KD, Oner, C, Dimovski, AJ, Gu, YC, Huisman, THJ (1991) Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the γ^G - and γ^A -globin genes of β -S chromosomes with five different haplotypes. *Blood*, **77**: 2488-2496.
- Lapoumeroulie C, Castiglia L, Ruberto C, Fichera M, Amata S, Labie D, Ragusa A (1999) Genetic variations in human fetal globin gene microsatellites and their functional relevance. *Human Genetics*, **104**: 307-314.
- Lauer J, Shen CK, Maniatis T (1980) The chromosomal arrangement of human alpha-like globin genes: sequence homology and alpha-globin gene deletions. *Cell*, **20**: 119-130.
- Lawn RM, Efstratiadis A, O'Connell C, Maniatis T (1980) The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. *Cell*, **21**: 647-651.
- Liebhaber SA, Cash FE, Ballas SK (1986) Human alpha-globin gene expression the dominant role of the α 2-locus in mRNA and protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **261**: 15327-15333.
- Manca L, Cocco E, Gallisai D, Masala B, Gilman JG (1991) Diminished γ^T fetal globin levels in Sardinia haplotype II β^0 -thalassemia patients are associated with the four base pair deletion in the γ^T promoter. *British Journal of Haematology*, **78**: 105-107.
- Manca L, Cocco E, Masala B, Gilman JG (1990a) Polymerase chain reaction amplification applied to the direct detection of a 4bp deletion in the promoter region of the γ^A -gene. *American Journal of Hematology*, **35**: 131-133.
- Manca L, Formato M, Demuro P, Pilo G, Gallisai D, Orzalesi M, Masala B (1986) The γ globin chain heterogeneity of the Sardinian newborn baby. *Hemoglobin*, **10**: 519-528.
- Manca L, Masala B (1990b) A simple approach to the determination of the γ chain composition of HbF in adult human samples. *Hemoglobin*, **14**: 517-527.

- [Manca L, Masala B, Orzalesi M, Huang HJ, Huisman THJ](#) (1988) Abnormal γ -globin gene arrangements in Sardinians. *Hemoglobin* **12**: 741-753.
- Marks J, Shaw JP, Shen Che-Kun J (1986) Sequence organization and genomic complexity of primate θ_1 globin gene, a novel α -globin-like gene. *Nature*, **321**: 785-788.
- Masala B, Formato M, Manca L, Demuro P, Gallisai D, Dore F, Longinotti M (1986) Polymorphism of foetal haemoglobin in the Sardinian β^+ -thalassaemia. *Acta Haematologica*, **76**: 208-211.
- Masala B, Manca L (1991) Detection of the common Hb F Sardinia [$^A\gamma^{75(E19)Ile\rightarrow Thr}$] variant by isoelectric focusing in normal newborn and in adult affected by elevated fetal hemoglobin syndromes. *Clinica Chimica Acta*, **198**: 195-202.
- Masala B, Manca L (1994) Separation of globin chains by the reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, **231**: 21-44.
- Masala B, Manca L, Gallisai D, Stangoni A, Lanclos KD, Kutlar F, Yang KG, Huisman THJ (1988) Biochemical and molecular aspects of β -thalassemia types in North Sardinia. *Hemoglobin*, **12**: 661-671.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells". *Nucleic Acids Research*, **16**: 1215.
- [Moi P, Cash FE, Liebhaber SA, Cao A, Pirastu M](#) (1987) An initiation codon mutation (AUG---GUG) of the human alpha 1-globin gene. Structural characterization and evidence for a mild thalassaemic phenotype. *Journal of Clinical Investigation*, **80**: 1416-1421.
- Oggiano L, Dore F, Pistidda P, Guiso L, Manca L, Masala B, Pirastu M, Rosatelli C, Cao A, Longinotti M (1988) Homozygous for the β^{039} mutation with thalassaemia intermedia in Northern-Sardinia. *Hemoglobin*, **12**: 673-680.
- Orkin SH, Kazazian HH, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJV (1982): Linkage of β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature*, **296**: 627-631.
- Ottolenghi S, Mantovani R, Nicolis S, Ronchi A, Giglioni B (1989) DNA sequences regulating human globin gene transcription in nondeletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Hemoglobin*, **13**: 523-541.
- Papachatzopoulou A, Kourakli A, Makropoulou P, Kakagianne T, Sgourou A, Papadakis M, Athanassiadou A (2006) Genotypic heterogeneity and correlation to intergenic haplotype within high HbF β -thalassaemia intermedia. *European Journal of Haematology*, **76**: 322-330.
- [Pauling L, Itano HA](#), Singer SJ, Wells IC (1949) Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*, **110**: 543-548.
- [Perutz MF](#) (1968) The Croonian Lecture. The haemoglobin molecule. *Proceeding of the Royal Society London. Biological Sciences*, **173**: 113-140.
- [Piras I, Vona G, Falchi A, Latini V, Ristaldi S, Vacca L, Varesi L, Calo CM](#) (2005) β -globin cluster haplotypes in normal individuals and beta(0)39-thalassaemia carriers from Sardinia, Italy. *American Journal of Human Biology*, **17**: 765-772.
- Pirastu M, Galanello R, Doherty MA, Tuveri T, Cao A, Kan YW (1987) The same beta-globin gene mutation is present on nine different beta-thalassaemia chromosomes in a Sardinian population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, May; **84**: 2882-2885.
- [Pirastu M, Saglio G, Chang JC, Cao A, Kan YW](#) (1984) Initiation codon mutation as a cause of alpha thalassaemia. *Journal of Biological Chemistry*, **259**:12315-12317.
- [Pistidda P, Frogheri L, Oggiano L, Guiso L, Manca L, Dore F, Masala B, Gilman JG, Longinotti M](#) (1995) Fetal hemoglobin expression in compound heterozygotes for -117 (G \rightarrow A) $^A\gamma$ HPFH and β^{039} nonsense thalassaemia. *American Journal of Hematology*, **49**: 267-270.
- [Powers PA, Altay C, Huisman THJ, Smithies O](#) (1984) Two novel arrangements of the human fetal globin genes: G γ -G γ and A γ -A γ . *Nucleic Acids Research*, **12**: 7023-7034.
- Powers PA, Smithies O (1986) Short gene conversions in the human fetal globin gene region: a by-product of chromosome pairing during meiosis? *Genetics*, **112**: 343-358.
- Ragusa A, Amata S, Lombardo T, Castiglia L, Maier-Redelsperger M, Labie D, Bernini L (2003) Asymptomatic and mild β -thalassaemia in homozygotes and compound heterozygotes for the IVS2+1G>A mutation: role of the β -globin gene haplotype. *Hematologica*, **88**: 1099-1105.
- Rochette J, Craig JE, Thein SL (1994): Fetal hemoglobin levels in adults. *Blood Reviews*, **8**: 213-224.

- [Rosatelli C](#), [Leoni GB](#), [Tuveri T](#), [Scalas MT](#), [Di Tucci A](#), [Cao A](#) (1987) Beta thalassaemia mutations in Sardinians: implications for prenatal diagnosis. *Journal of Medical Genetics*, **24**: 97-100.
- [Rosatelli MC](#), [Tuveri T](#), [Scalas MT](#), [Leoni GB](#), [Sardu R](#), [Faa V](#), [Meloni A](#), [Pischedda MA](#), [Demurtas M](#), [Monni G](#) (1992) Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassaemia in the Italian population. *Human Genetics*, **89**: 585-589.
- Schroeder WA (1980) The synthesis and chemical heterogeneity of human fetal haemoglobin. *Hemoglobin*, **4**: 431-446.
- [Slightom JL](#), [Blechl AE](#), [Smithies O](#). (1980) Human fetal $G\gamma$ - and $A\gamma$ -globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*, **21**: 627-638.
- [Spritz RA](#), [DeRiel JK](#), [Forget BG](#), [Weissman SM](#) (1980) Complete nucleotide sequence of the human delta-globin gene. *Cell*, **21**: 639-646.
- Stamatoyannopoulos G, Grosfeld, F. (2001) The Molecular Basis of Blood Disease (Stamatoyannopoulos, G., Majerus, P.W., Perlmutter, R.M., Varmus, H., eds.). W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- [Stamatoyannopoulos G](#), [Josephson B](#), [Zhang JW](#), [Li Q](#) (1993) Developmental regulation of human gamma-globin genes in transgenic mice. *Molecular Cell Biology*, **13**: 7636-7644.
- Steinberg MH, Forget BG, Higgs D Nagel RL (2001) Disorders of Haemoglobin. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*, **32**: 66-69.
- Thein SL (2005) Genetic modifiers of β -thalassaemia. *Haematologica*, **90**: 649-660.
- [Vakoc CR](#), [Letting DL](#), [Gheldof N](#), [Sawado T](#), [Bender MA](#), [Groudine M](#), [Weiss MJ](#), [Dekker J](#), [Blobel GA](#), (2005): Proximity among distant regulatory elements at the β -globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Molecular Cell*, **17**: 453-462.
- Wajcman H, Galactéros F, Hanichi A, Yapo A, Préhu C (2000) HbF in the adult: could its composition discriminate normal from abnormal foetal globin gene expression? *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III*, **323**: 975-981.
- Weatherall DJ (2001): Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Genetics*, **2**: 245-255.
- Wood, W.G. (2001) Hereditary persistence and fetal hemoglobin and $\delta\beta$ thalassaemia. In Disorders of Hemoglobin (Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R., and Nagel, R.L., eds.). pp. 356-388, Cambridge University Press, Cambridge.
- Yang KG, Stoming TA, Fei YJ, Liang S, Wong SC, Masala B, Huang RB, Wei ZP, Huisman THJ (1988) Identification of base substitutions in the promoter regions of the $A\gamma$ - and $G\gamma$ -globin genes in $A\gamma$ - (or $G\gamma$) β^+ -HPFH heterozygotes using the DNA-amplification-synthetic oligonucleotide procedure. *Blood*, **71**: 1414-1417.
- Zertal-Zidani S, Ducrocq R, Sahbatou M, Satta D, Krishnamoorthy R (2002) Foetal haemoglobin in normal healthy adults: relationship with polymorphic sequences cis to the β globin gene. *European Journal of Human Genetics*, **10**: 320-326.
- Zhou W, Zhao Q, Sutton R, Cumming H, Wang X, Cerruti L, Hall M, Wu R, Cunningham JM, Jane SM (2004) The role of p22 NF-E4 in human globin gene switching. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 26227-26232.

8. Tabelle e Figure

Tabella I*Primer utilizzati per le reazioni di amplificazione e di sequenziamento*

Nome	Allele e/o regione genica	Sequenza 5' → 3'	Posizione §
LCR 3*	β LCR	CCATAGTCCAAGCATGAGCA	-10943 / -10924
LCR 4*	β LCR	ATAGAGGCCACCTGCAAGATA	-10502 / -10481
Pre Gy 1*‡	Pre Gy framework	GAGTAACTGGAAGATACTGATAA	-1491 / -1513
Pre Gy 2*‡	Pre Gy framework	AACTCGATCCATGACCTTGG	-1195 / -1214
R-160*	Gγ	GCACTGAAACTGTTGCTTTATAGGAT	-598 / -623
R-161*	Gγ e Aγ	GGCGTCTGGACTAGGAGCTTATTG	-30 / -49
Gγ 2	Gγ	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	+1756 / +1776
Gγ 1*	Gγ e Aγ	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	+945 / +966
AGγ8*	Gγ e Aγ	AATGGATTGCCAAAACGGTC	+1397 / + 1416
R-162*	Aγ	CTAAAGGGAAGAATAAATTAGAGAA	-293 / -268
Aγ 10	Aγ	GACCTGGGGGCTGGATTGATTGCAG	+1885 / +1909
ψβ fwd°	ψβ	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	+11962 / +11983
ψβ rev°	ψβ	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	+12643 / +12663
3'ψβ fwd°	3' a ψβ	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	+15033 / +15054
3' ψβ rev°	3' a ψβ	GGACCCTAACTGATATAACTA	+15604 / +15625
Pro β 1*	Promotore β	TAAGAGGTCTCTAGTTTTTTATCTC	-700 / -724
Pro β 2*	Promotore β	CTACCATAATTCAGCTTTGGGAT	-370 / -392
P1*	β	GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC	-140 / -116
P2*	β	ATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGG	+540 / +566
β 3*	β	CAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCT	+1226 / +1252
β 4*	β	GGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTA	+1556 / +1582
C2♦	α1	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	+870 / +889
C10♦	α2, α1	GATGCACCCACTGGACTCCT	-1050 e -1030 in α1 -1250 e -1230 in α2
T37◇	3' α2	GCTCCAGCCGGTTCAGCTATTGC	+2390 / +2414
D◇	3' α2	AACACCTCCATTGTTGGCCCATTC	+865 / +890
E◇	3' α2	CCCTGGTGTTCAGGAGCAAGCC	+2325 / +2348
F◇	3' ψα1	GGCACATTCCGGGCAGAGAGAA	-3383 / -3405
G	5' ψα1	CCAGTTTACTCCATGTGGTGCCTC	-3587 / -3611

§ Le posizioni sono riferite al sito Cap del rispettivo gene tranne per la coppia LCR3-LCR4 le quali sono riferite al sito Cap del gene globinico ε; per i primer ψβ fwd, ψβ rev, 3'ψβ fwd e 3' ψβ rev che sono riferite al sito Cap del gene Gγ e per i primer F e G che sono riferiti al Cap del gene α2.

* Primer adoperati per le reazioni di sequenza

‡ De Angioletti et al., 2004

° Sutton et al., 1989

♦ Dodè et al., 1993

◇ Foglietta et al., 1996

§ Le posizioni sono riferite ai cap dei rispettivi geni, tranne che per la coppia LCR3- LCR4 le cui posizioni sono riferite rispetto al sito Cap del gene globinico ε, e per i primer ψβ fwd, ψβ rev, 3'ψβ fwd e 3' ψβ rev le cui posizioni sono riferite al Cap del gene Gγ.

Tabella II

Dati molecolari dei pazienti politrasfusi (Gruppo A)

Nome	Loci		# β LCR	Pre G γ	G γ Xmn I	# G γ IVS2	delez. AGCA	# A γ IVS2	Pre- β	*Orkin	Assetto
	α	β									
PC	$\alpha^{3.7}$	β^{039}					-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^{039}					-	13	7-7		
BM	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
CG	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
DM	$\alpha^{3.7}$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
FS	$\alpha^{3.7}$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	10-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	2A
MM	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11		-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11		-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
MG	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
MD	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	?	1A
PSa	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	VI	1A
RG	$\alpha^{3.7}$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
SF	$\alpha^{3.7}$	β^{039}			-			10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}			-			10-5-7	7-7	II	1A
SEm	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
TaM	$\alpha^{3.7}$	β^{039}		TGG	-	11-3	+		7-7	II	1A
	$\alpha^{3.7}$	β^{039}		TGG	-	11-3	+		7-7	II	1A
FA	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	10-12-11	TGG	-	19-2		9-5-8	7-7	I	n.d
LS	$\alpha^{3.7}$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	9-12-11	TGG	+	19-2		13	7-7	n.d.	4A
MJ	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	9-12-10	TGA	-	11-3	-	9-5-8	7-7	I	5A
PM	$\alpha^{3.7}$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	19-2	-	9-5-8	7-7	I	6A
SAn	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGA	-	11-3		9-5-8	7-7	n.d	5A
PiS	$\alpha\alpha$	β^{039}		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^x		TAG	+	11-3	-	13	7-7	n.d	n.d
RGM	$\alpha\alpha$	β^{039}	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^{87}	10-12-11	TAG	+	11-3	-	13	7-7	VIII	8A

struttura dei microsatelliti: β LCR: (AT)_xN_y(AT)_z; G γ e A γ IVS2: (TG)_n(CG)_m; Pre- β : (AT)_xT_y

* Aplotipo secondo Orkin

Tabella III*Dati molecolari pazienti talassemici intermedi (Gruppo B)*

Nome	Loci		# β LCR	Pre G γ	G γ Xmn I	# G γ IVS2	delez. AGCA	# A γ IVS2	Pre- β	*Orkin	Assetto
	α	β									
BMa	$\alpha^{3.7}$	β^039	8-12-11	TGG	-	11-3	n.d.	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^039	8-12-11	TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
DF	$\alpha^{3.7}$	β^039		TGG	-		+		7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^039		TAG	+				7-7	n.d.	n.d.
GS	$\alpha\alpha$	β^039	8-12-11	TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^039	10-12-11	TGA	-	11-3		9-5-8	7-7	n.d.	3A
SG	$\alpha^{3.7}$	β^039	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha^{3.7}$	β^039	8-12-11	TGG	-	11-3			10-5-7	7-7	II

struttura dei microsatelliti: β LCR: (AT)_xN_y(AT)_z; G γ e A γ IVS2: (TG)_n(CG)_m; Pre- β : (AT)_xT_y

* Aplotipo secondo Orkin

Tabella IV

Dati molecolari dei soggetti adulti con alti livelli di HbF (Gruppo D)

Nome	Loci		# β LCR	Pre G γ	G γ <i>Xmn I</i>	# G γ IVS2	delez. AGCA	# A γ IVS2	# Pre- β	*Orkin	Assetto
	α	β									
◇ SR	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-12	TGA	-	11-3	-	9-5-8	9-5	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A	9-12-10	TAG	+	11-3	-	13	7-7	VIII	n.d.
◇ PSi	$\alpha\alpha$	β^{IVS1-6}	8-12-12	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	8A
	$\alpha\alpha$	β^A	9-12-10	TAG	+	11-3	-	13	7-7	VIII	n.d.
‡ SE	$\alpha^{3.7}$	β^{039}	8-12-12	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	n.d.	β^A	n.d.	TAG	+	11-3	-	13	9-5	n.d.	n.d.
‡ LV	$\alpha^{3.7}$	β^{039}	8-12-12	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	n.d.	β^A	n.d.	TGA	-	19-2	-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
‡ SA	n.d.	β^{039}	8-12-12	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	n.d.	β^A	n.d.	TGA	-	19-2	-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.

◇ Madre (SR) e figlia (PSi)

‡ Padre (SE), madre (LV) e sorella (SA) del paziente intermedio asintomatico (SG in Tabella III)

struttura dei microsatelliti: β LCR: (AT)_xN_y(AT)_z; G γ e A γ IVS2: (TG)_n(CG)_m; Pre- β : (AT)_xT_y

* Aplotipo secondo Orkin

Tabella V

Dati molecolari dei controlli non β -talassemici (Gruppo C)

Nome	Loci		# β LCR	Pre G γ	G γ Xmn I	# G γ IVS2	delez. AGCA	# A γ IVS2	# Pre- β	*Orkin	Assetto
	α	β^A									
AF	$\alpha^{3.7}$	β^A		TGA	+			13	7-7	I	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A		TAG	+			5-3-5-8*	7-7	n.d.	n.d.
AZ	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-12	TGG	-			10-5-7		II	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-12	TGA	-			9-5-8		n.d.	n.d.
CD	$\alpha\alpha$	β^A		TGG	-					II	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	-					n.d.	n.d.
CT	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-11	TGG	-			9-5-8		n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A	10-10-12	TGA	-			9-5-8		n.d.	n.d.
CA	$\alpha\alpha$	β^A	9-12-11		-	18-2	-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A	10-12-11		-	19-2	-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
CAn	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	-			10-5-7		II	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A		TAG	-			9-5-8		n.d.	n.d.
DS	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
FG	$\alpha^{3.7}$	β^A	9-12-11	TGA	+			9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A	10-12-11	TAG	-			13	9-5	n.d.	n.d.
GF	$\alpha\alpha$	β^A			+	18-2		9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A			-	19-2		13	7-7	n.d.	n.d.
ML	$\alpha\alpha$	β^A		TGG	-	11-3	+	10-5-7	11-3	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	-	19-3	-	9-5-8	9-5	n.d.	n.d.
MM a	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-11	TGG	-	11-3	+	10-5-7	11-3	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^A	10-12-11	TGA	-	19-2	-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
MI	$\alpha\alpha$	β^A	8-12-11	TGG	+	11-3	+	10-5-7	9-5	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^A	9-12-10	TAG	-	11-3	-	13	9-5	n.d.	n.d.
MC	$\alpha^{3.7}$	β^A		TGG	+		+	10-5-7	7-7	n.d.	1A
	$\alpha\alpha$	β^A		TAG	-		-	13	7-8	n.d.	n.d.
PMo	$\alpha\alpha$	β^A		TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	1A
	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	-	19-2	-	9-5-8	9-5	n.d.	n.d.
PS	$\alpha\alpha$	β^A		TGG	-	11-3		10-5-7	7-7	n.d.	1A
	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	-	19-2		9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
PtS	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	+	11-3	-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A		TAG	-	19-3	-	13	9-5	n.d.	n.d.
RT	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	+	11-3	-	9-5-8	7-7	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A		TAG	-	19-2	-	13	7-7	n.d.	n.d.
SM	$\alpha\alpha$	β^A	9-12-10	TGG	-	11-3	+	10-5-7	7-7	II	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A	10-12-11	TGA	-	16-2	-	13	9-5	n.d.	n.d.
SB	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	-	18-2	-	9-5-8	7-8	n.d.	n.d.
	$\alpha\alpha$	β^A		TGA	-	18-2	-	9-5-8	7-8	n.d.	n.d.

struttura dei microsatelliti: β LCR: (AT)_xN_y(AT)_z; G γ e A γ IVS2: (TG)_n(CG)_m; Pre- β : (AT)_xT_y

* Aplotipo secondo Orkin

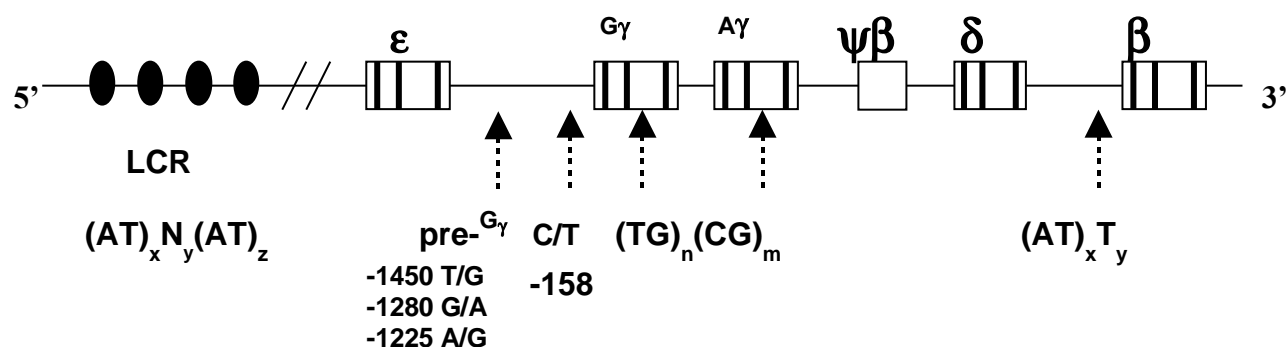
Tabella VI*Dati biochimici dei quattro gruppi di soggetti esaminati*

	Hb (gr/dl)	% HbA	% HbA₂	% HbF	%Gγ/γ totali
Gruppo A Politrasfusi (n = 20)	9,3 ± 0,4	*	3,0 ± 0,4	25,1 ± 19,6	60,7 ± 6,9
Gruppo B Intermedi (n = 4)	8,6 ± 1,5	----	3,8 ± 1,8	96,1 ± 1,8	57,8 ± 7,7
Gruppo C Controlli (n = 19)	14,1 ± 1,3	96,44 ± 0,73	3,0 ± 0,3	0,5 ± 0,5	n.d.
Gruppo D Adulti con elevata HbF (n = 5)	12,9 ± 1,43	89,7 ± 2,4	3,8 ± 1,1	6,2 ± 1,8	n.d.

* Non inclusa perché del donatore

Tabella VII:

Assetti di siti polimorfi identificati nei pazienti TM e TI esaminati



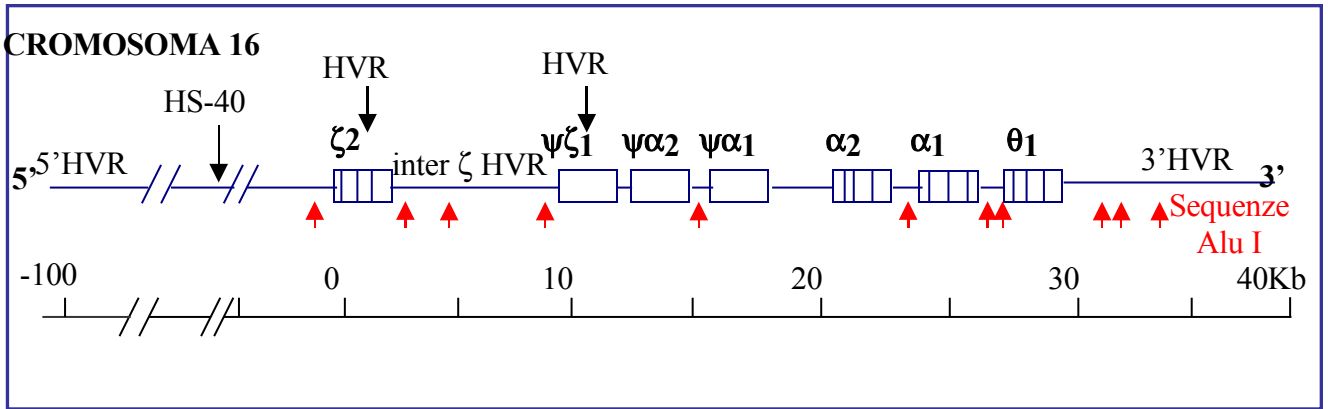
Assetto	#Nome	*Orkin	β LCR	Pre $G\gamma$	$G\gamma$ Xmn I	$G\gamma$ IVS2	$A\gamma$ IVS2	Pre- β	Locus β
1A	§	II	(AT) ₈ N ₁₂ (AT) ₁₁	TGG	-	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₀ (CG) ₅ (TG) ₇	(AT) ₇ T ₇	β^{039}
2A	FS	II	(AT) ₁₀ N ₁₂ (AT) ₁₁	TGG	-	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₀ (CG) ₅ (TG) ₇	(AT) ₇ T ₇	β^{039}
3A	GS	nuovo	(AT) ₁₀ N ₁₂ (AT) ₁₁	TGA	-	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₉ (CG) ₅ (TG) ₈	(AT) ₇ T ₇	β^{039}
4A	LS	nuovo	(AT) ₉ N ₁₂ (AT) ₁₁	TGG	+	(TG) ₁₉ (CG) ₂ CACG	(TG) ₁₃	(AT) ₇ T ₇	β^{039}
5A	MJ	I	(AT) ₉ N ₁₂ (AT) ₁₀	TGA	-	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₉ (CG) ₅ (TG) ₈	(AT) ₇ T ₇	β^{039}
6A	PMG	I	(AT) ₈ N ₁₂ (AT) ₁₁	TGA	-	(TG) ₁₉ (CG) ₂ CACG	(TG) ₉ (CG) ₅ (TG) ₈	(AT) ₇ T ₇	β^{039}
7A	RGM	VIII	(AT) ₁₀ N ₁₂ (AT) ₁₁	TAG	+	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₃	(AT) ₇ T ₇	β^{+87}
9A	PSi	II	(AT) ₈ N ₁₂ (AT) ₁₂	TGG	-	(TG) ₁₁ (CG) ₃	(TG) ₁₀ (CG) ₅ (TG) ₇	(AT) ₇ T ₇	β^{+} IVS1-6

= identificativo dei campioni

§ = sono inclusi tutti i pazienti politrasfusi e intermedi (l'assetto di ciascun paziente è specificato nelle Tabelle II e III).

pre- $G\gamma$ framework
-1450 T/G
-1280 G/A
-1225 A/G

A



B

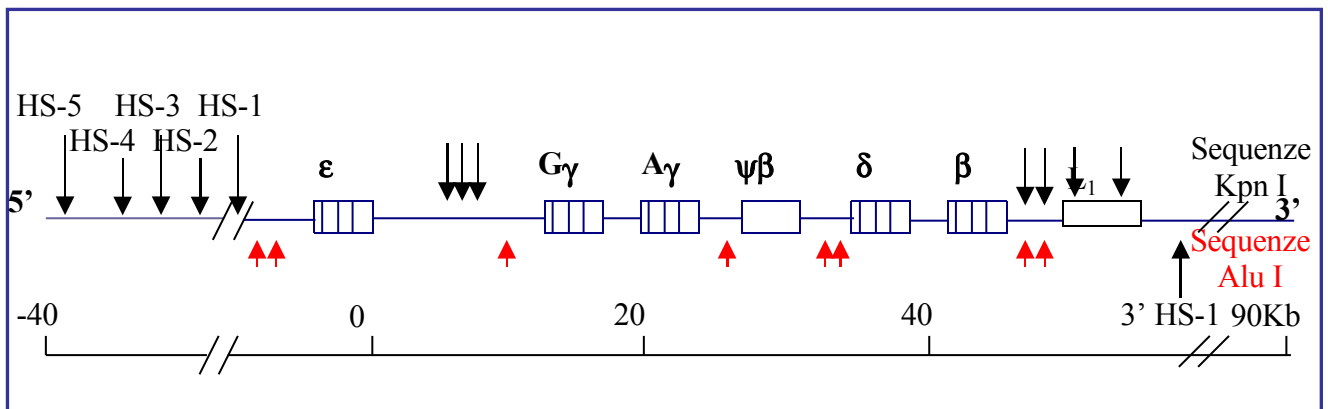


Figura 2.1: Cluster dei geni α - e β -globinici.

A: *Loci* α -globinici.

B: *Loci* β -globinici.

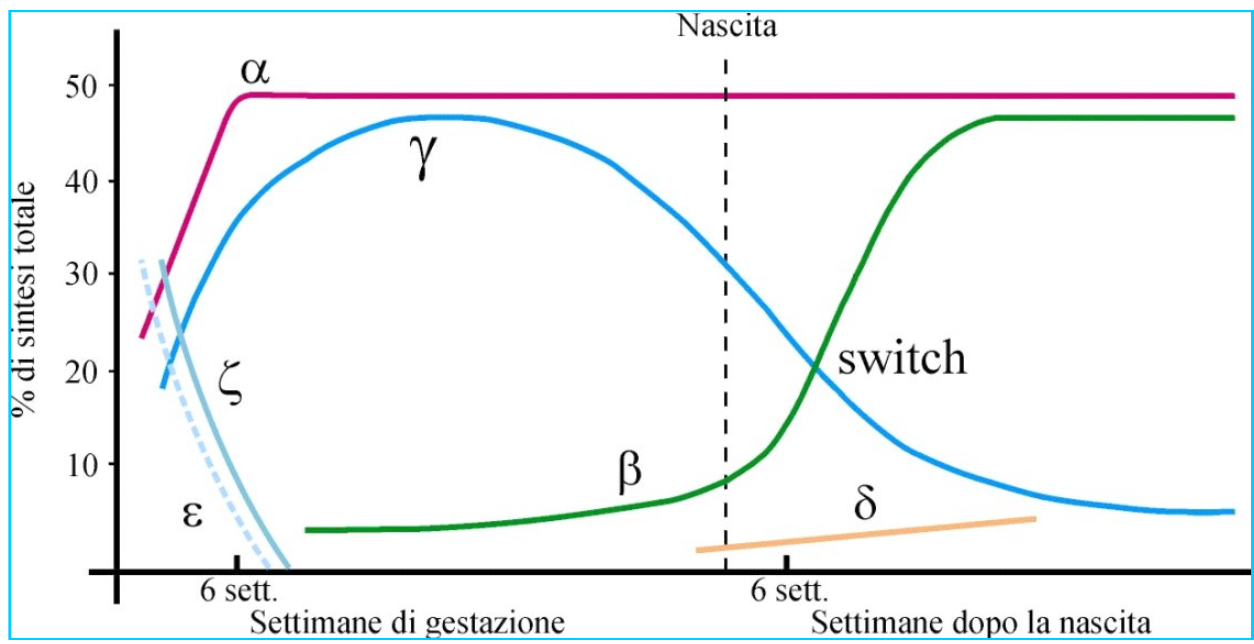


Figura 2.2: Switch ontogenetico delle emoglobine e sedi della sintesi globinica

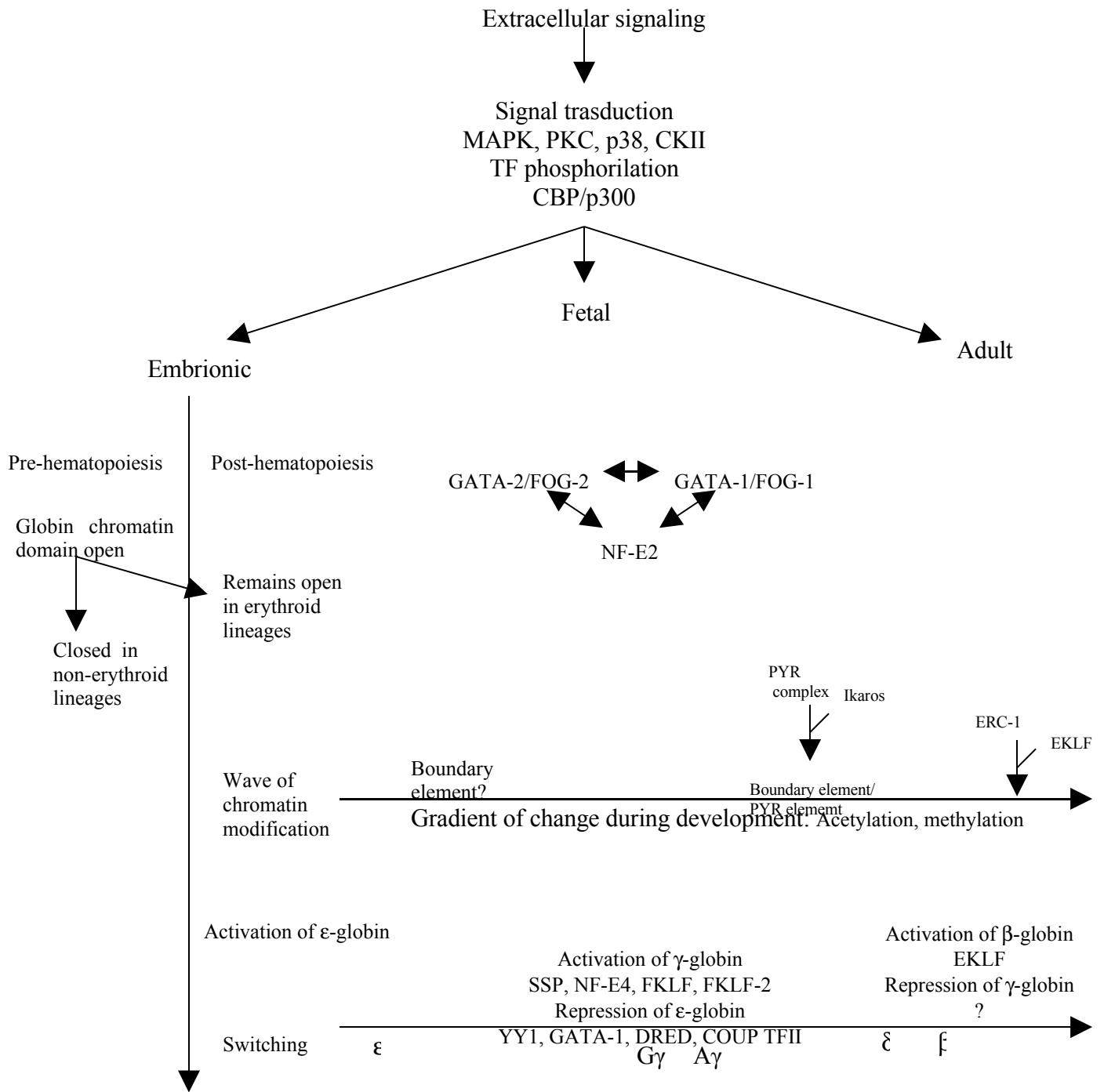


Figura 2.3: Fattori principali coinvolti nello *switch* dei geni β -globinici.

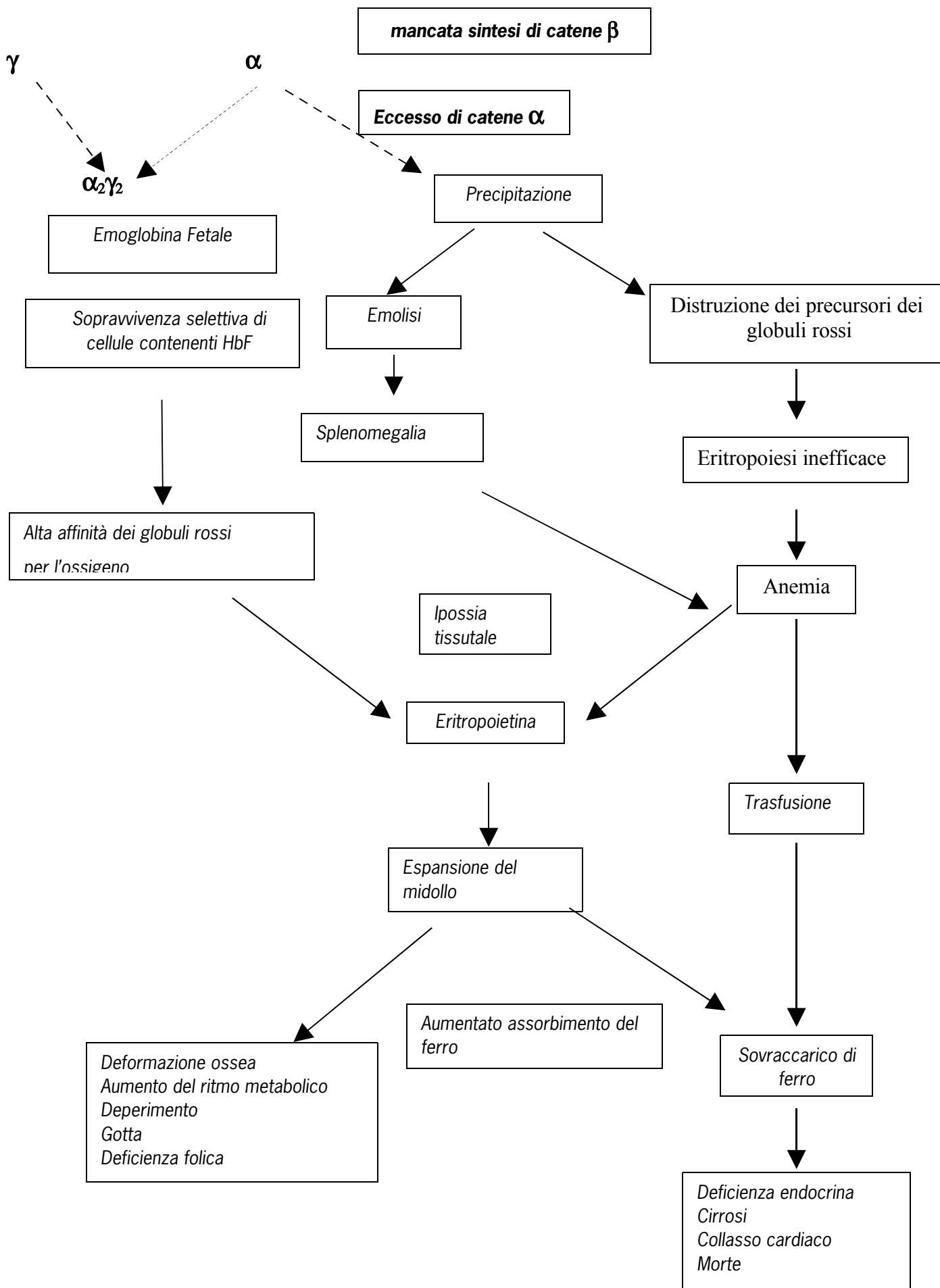
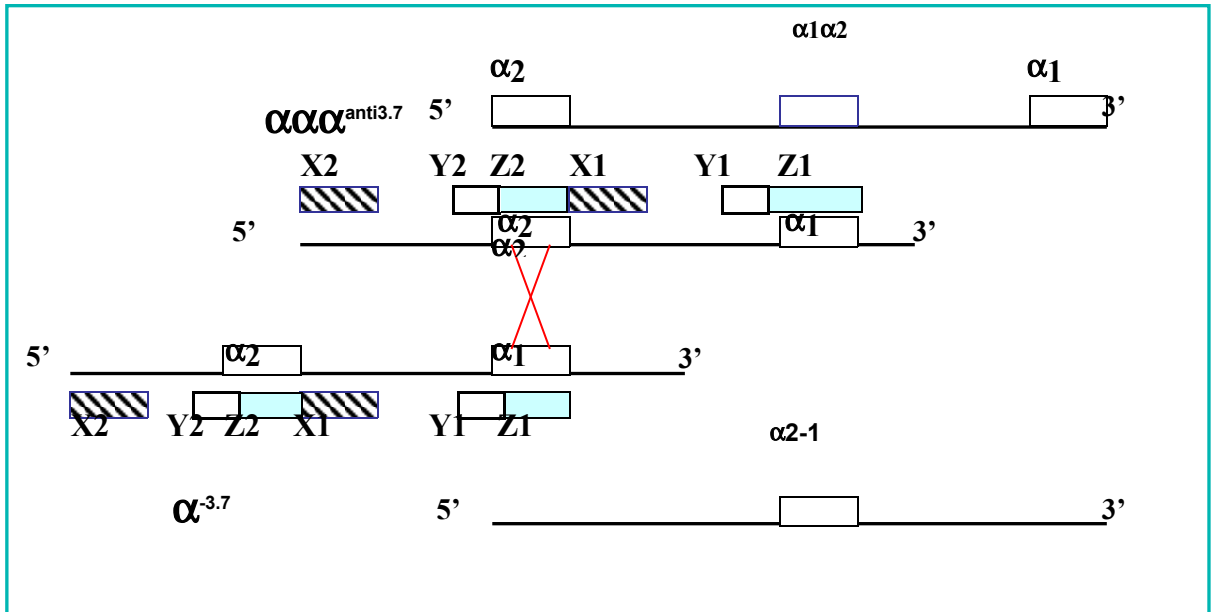


Figura 2.4: Schema riassuntivo della patofisiologia delle β -talassemie

A



B

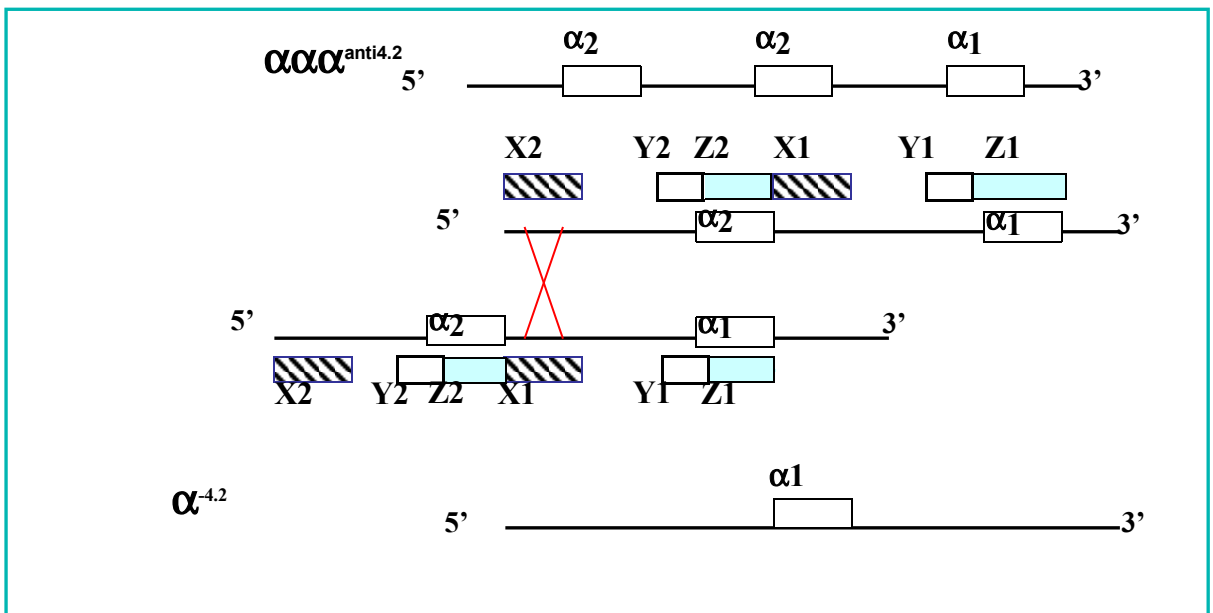


Figura 2.5. *Crossing-over* ineguali ai geni α -globinici.

A: produzione del cromosoma $-\alpha^{3.7}$ e del triplicato $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$.

B: produzione del gene $-\alpha^{4.2}$ e del triplicato $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$.

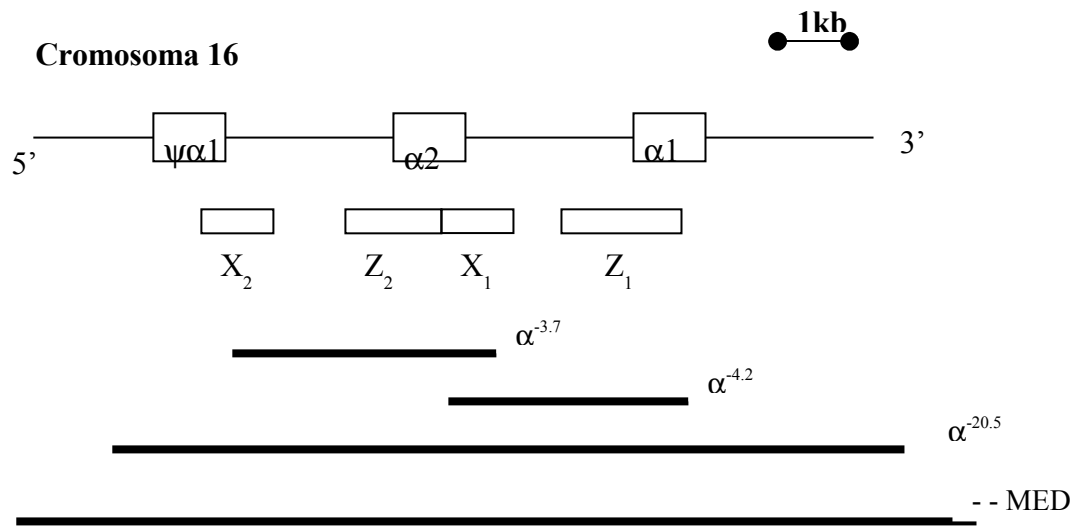
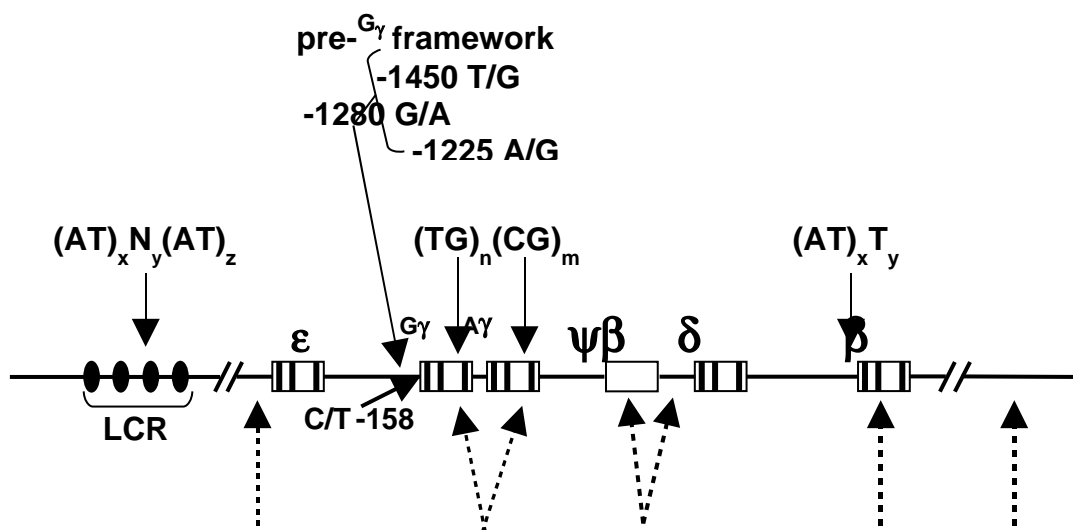


Figura 1.6: Localizzazione ed estensione delle delezioni responsabili delle condizioni α -talassemiche piú diffuse nel bacino del Mediterraneo.



Siti di restrizione → *Hinc* II *Hind* III *Hinc* II *Ava* II *Bam* HI
di Orkin

Aplotipi	<i>Hinc</i> II 5'ε	<i>Hind</i> III Gγ IVS2	<i>Hind</i> III Aγ IVS2	<i>Hinc</i> II ψβ	<i>Hinc</i> II 3' ψβ	<i>Ava</i> II IVS2 β	<i>Bam</i> HI 3' β
I	+	-	-	-	-	+	+
II	-	+	+	-	+	+	+
III	-	+	-	+	+	+	-
IV	-	+	-	+	+	-	+
V	+	-	-	-	-	+	-
VI	-	+	+	-	-	-	+
VII	+	-	-	-	-	-	+
VIII	-	+	-	+	-	+	-
IX	-	+	-	+	+	+	+

Figura 1.7 Siti polimorfi cluster β-globinico

Le frecce piene indicano la posizione degli SNPs e dei microsatelliti.
Le frecce tratteggiate la posizione dei siti di restrizione di Orkin.
Nel riquadro sono indicati i nove aplotipi di Orkin (Orkin *et al.*, 1982).

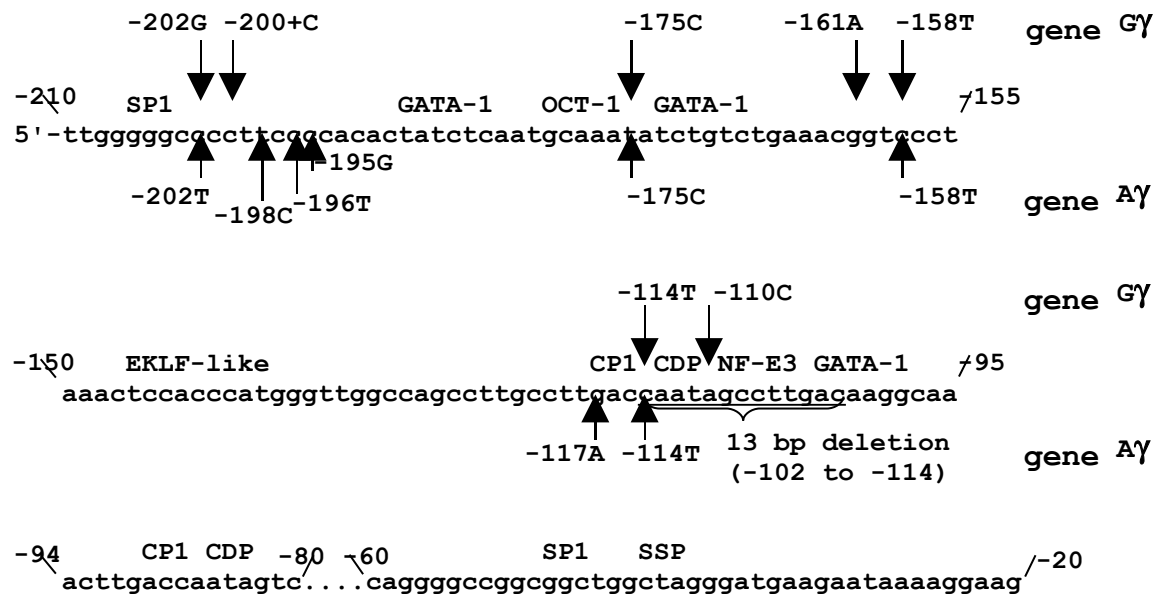


Fig. 1.8: Struttura del promotore dei geni globinici γ

Le aree grigio chiaro indicano la posizione delle sequenze conservate che sono siti di legame per i fattori trascrizionali; le scure la sovrapposizione di sequenze conservate contigue.

Le frecce indicano la posizione delle mutazioni puntiformi che generano le sindromi $G\gamma$ - e $A\gamma$ -ndHPFH.

Per le sigle dei fattori trascrizionali si rimanda al testo ed alle referenze bibliografiche (Rochette et al., 1994; Forget, 1998; Jane e Cunningham, 1998; Wood, 2001; Zhou et al., 2004).

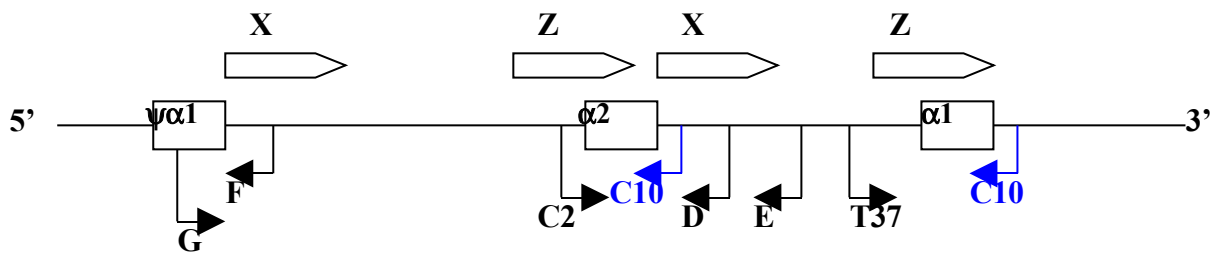


Figura 4.1: Posizione dei primer utilizzati per amplificare segmenti del cluster α -globinico.

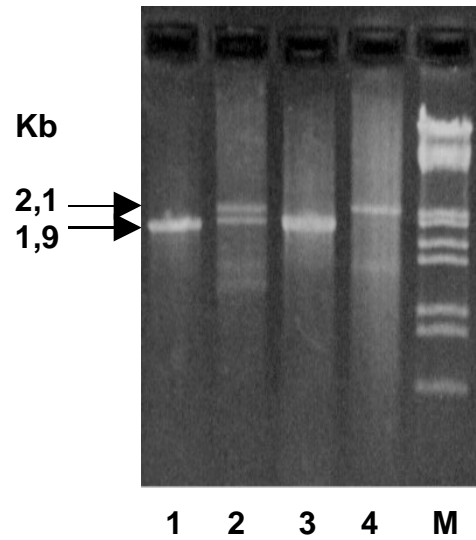
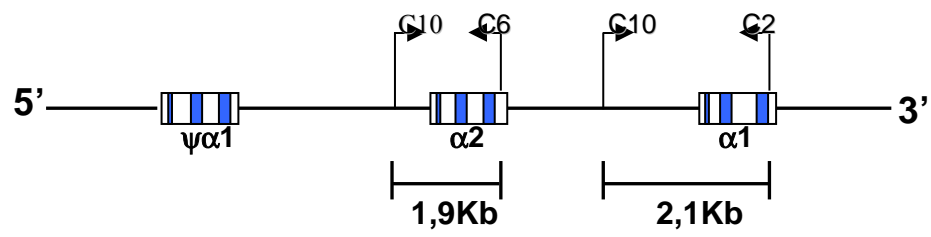


Figura 4.2: Diagnosi di α -talassemia

- 1, 3: controlli (genotipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
- 2: eterozigote $\alpha^{-3.7}$ -talassemico (genotipo $\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$).
- 4: omozigote $\alpha^{-3.7}$ -talassemico (genotipo $\alpha^{-3.7}/\alpha^{-3.7}$)
- M: standard di pesi molecolari

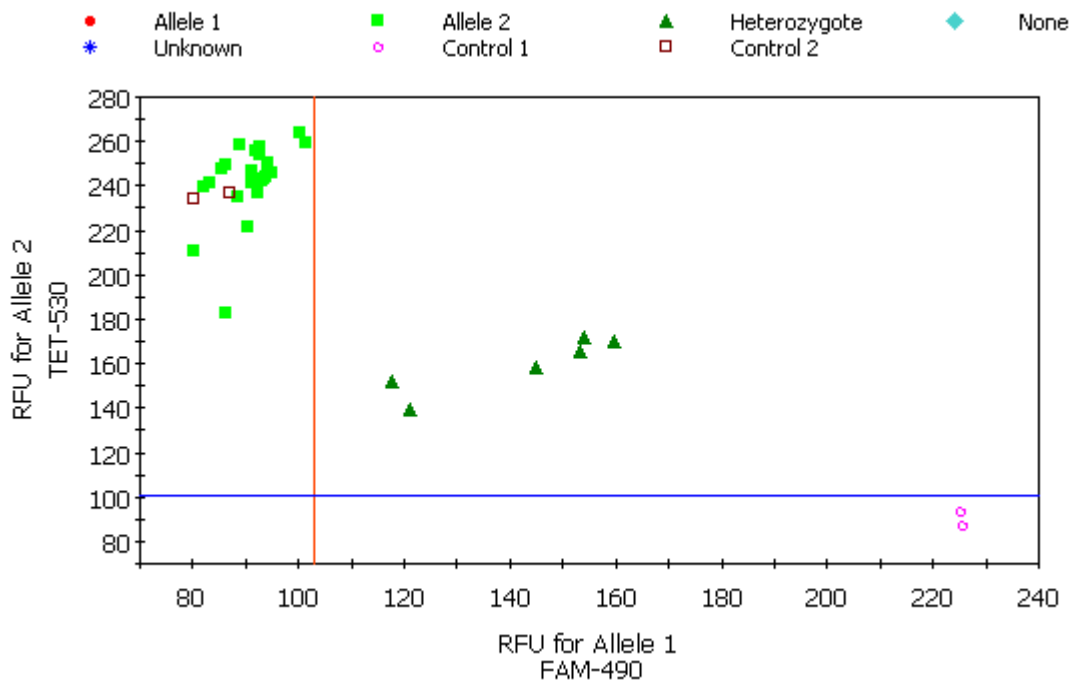


Figura 5.1: Plot di discriminazione allelica per la β^{039}

In ascissa: valori di unità di fluorescenza relativa per il fluoroforo FAM-490
 In ordinate: valori di unità di fluorescenza relativa per il fluoroforo TET-530
 Cerchio rosa: controlli wild type (codone 39 CAG)
 Quadrato scuro: controlli per l'allele mutato (codone 39 TAG)
 Quadrato verde chiaro: campioni omozigoti per l'allele mutato
 Triangolo verde scuro: campioni eterozigoti α

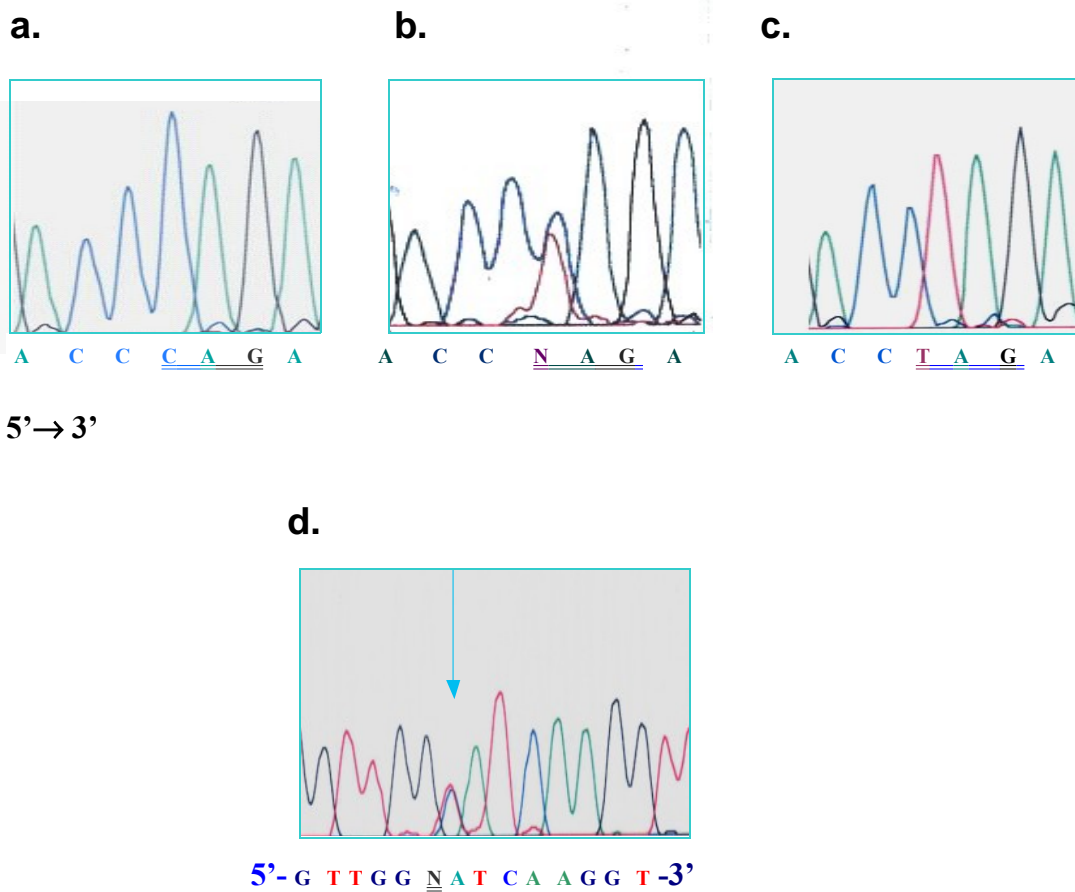


Figura 5.2. Diagnosi di β -talassemia mediante sequenziamento nucleotidico

- a.) Controllo normale: CAG \rightarrow Gln;
- b.) Eterozigote β^{39} : (C / T)AG \rightarrow Gln;
- c.) Omozigote β^{39} -talassemico: TAG \rightarrow Stop
- d.) Eterozigote β IVS1 nt 6 (T / C)

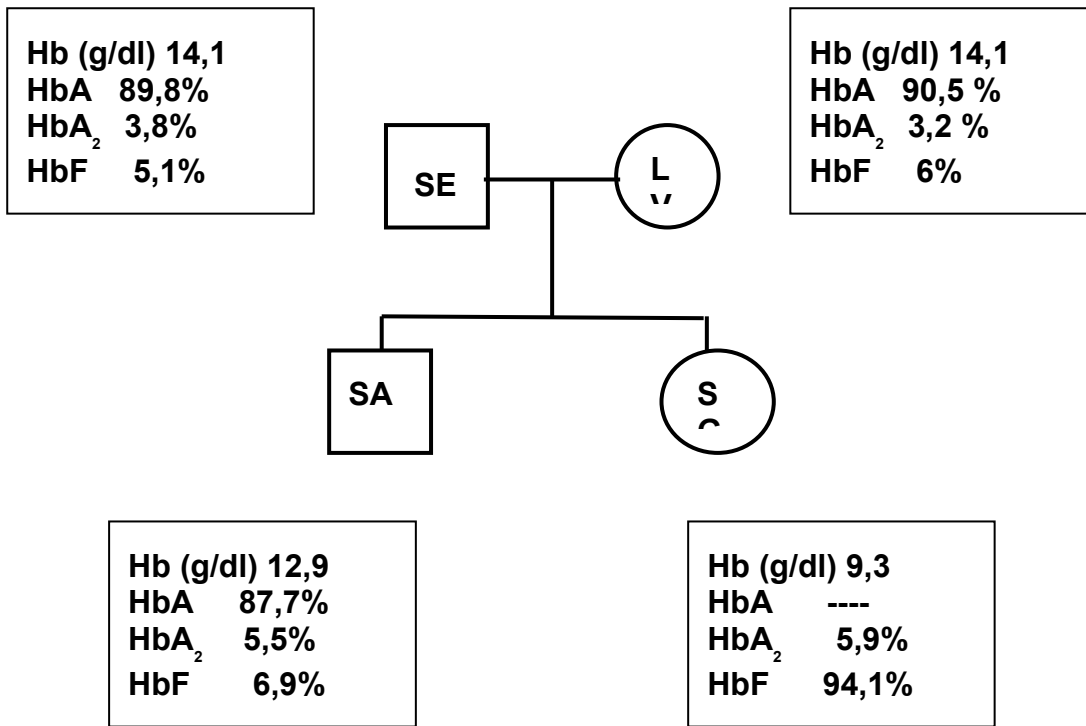


Figura 6.1: Albero genealogico della famiglia del talassemico intermedio (SG) asintomatico

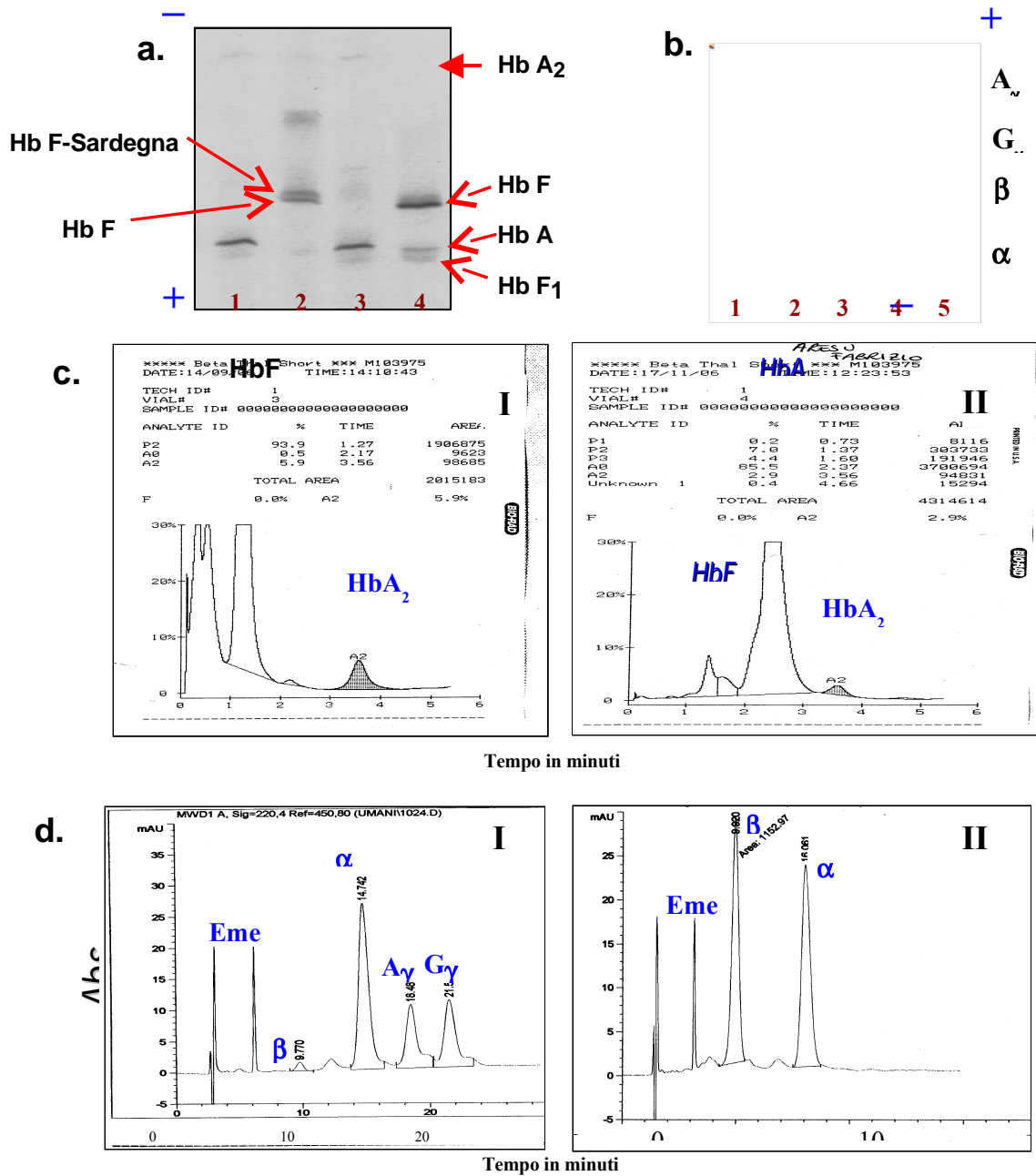


Fig. 6.2: Dosaggio e composizione delle emoglobine

a. IEF delle Hb.

1, 3: adulti normali; 2: adulto β^0 talassemico intermedio; 4: neonato normale.

b. AUT- PAGE delle globine.

1: neonato normale; 2,4,5: adulti normali; 3: adulto β^0 -talassemico intermedio.

c. Cromatografia a scambio cationico delle Hb.

I: Adulto β^0 -talassemico intermedio; **II:** Adulto normale.

d. RP-HPLC delle globine.

I: Adulto β^0 -talassemico intermedio; **II:** Adulto normale.