



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Terapia pediatrica e farmacologia dello sviluppo

Ciclo XXIV

**Attivazione del gene delta globinico in vivo attraverso
la creazione di topi transgenici quale modello di
studio per la cura della beta talassemia**

06- SCIENZE MEDICHE

Presentata da: Dott.ssa Maria Francesca Manchinu

Coordinatore Dottorato Prof. Renzo Galanello

Tutor/Relatore Dott.ssa Maria Serafina Ristaldi

Esame finale anno accademico 2010 – 2011

INDICE

Introduzione

I geni globinici umani:.....	1
Le emoproteine umane.....	1
I geni globinici umani.....	2
Struttura del gene beta globinico.....	5
Struttura del gene delta globinico.....	7
Espressione dei geni per le globine durante l'ontogenesi normale.....	8
Espressione dei geni per le globine durante l'ontogenesi patologica.....	9
(Beta-Talassemia)	
Manifestazioni cliniche.....	12
Terapie.....	13
Cluster β globinico murino.....	16
Attivazione del gene delta globinico in vivo attraverso la creazione.....	17
di topi transgenici quale modello di studio per la cura della beta talassemia	

Materiali e Metodi

Costrutti.....	21
Produzione dei topi transgenici.....	22
Saggio luciferasi.....	23
Estrazione RNA e Retro Trascrizione.....	24
Analisi S1 nucleasi e PCR quantitativa.....	24
Analisi ematologiche:.....	25
Morfologia globuli rossi.....	25
High Performance liquid Chromatography (HPLC).....	26

Risultati

Saggio luciferasi.....	28
Analisi S1 nucleasi e PCR quantitativa.....	30
Analisi ematologiche:.....	31
Analisi degli indici ematici.....	31
Morfologia globuli rossi.....	38
High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	40
Discussione.....	41
Bibliografia.....	45

INTRODUZIONE

I GENI GLOBINICI UMANI

Le emoproteine umane

Le emoproteine sono proteine coniugate molto diffuse in natura, aventi molteplici funzioni e provviste di un colore tipicamente rosso. Sono costituite da una parte di natura proteica a cui si attribuisce il nome di GLOBINA, e da un gruppo prostetico di natura non proteica a cui si dà il nome generico di EME.

Le emoproteine più importanti sono la mioglobina, i citocromi e l'emoglobina. Quest'ultima è una proteina tetramericabile solubile presente negli eritrociti dei Vertebrati. La sua importantissima funzione biologica è quella di trasportare l'ossigeno molecolare (O_2), attraverso il circolo sanguigno, dai polmoni ai tessuti. Dal punto di vista fisiologico, l'importanza fondamentale del fornire ossigeno alle cellule risiede nel fornire materia prima per la produzione di ATP, coinvolta in tutti i processi metabolici dell'organismo dei Vertebrati, uomo compreso.

Considerata l'indubbia importanza che l'emoglobina riveste, si può senz'altro affermare che essa sia stata la proteina più studiata in biochimica e che la sua struttura, così come la conosciamo, sia ormai esente da errori strutturali significativi.

L'emoglobina è quindi una cromoproteina globulare la cui struttura consta di quattro catene polipeptidiche e quattro gruppi prostetici eme.

La sua sintesi richiede la produzione coordinata dell'eme, che conferisce la caratteristica colorazione rossa, e delle globine, che costituiscono la porzione proteica che circonda e protegge l'eme. Il gruppo eme, che lega reversibilmente il ferro all'emoglobina, è costituito da una parte organica, la *protoporfirina IX*, un sistema planare composto da quattro anelli pirrolici con al centro un atomo di ferro inorganico. Quest'ultimo giace leggermente al di fuori del piano della protoporfirina con la quale però interagisce tramite

quattro legami di coordinazione, mentre con la quinta posizione, perpendicolare al piano, lega un residuo di istidina o istidina prossimale .

Il gruppo eme è contenuto all'interno di una tasca proteica, formata da 20 amminoacidi idrofobici, che ne garantiscono la stabilizzazione e fanno in modo di mantenere il ferro nello stato di catione bivalente, necessario ai fini dell'interazione con l'ossigeno, attraverso un secondo residuo di istidina o istidina distale .

La porzione proteica (globina) è formata da quattro catene polipeptidiche uguali a due a due: due di tipo α (zeta e alfa), di 141 residui amminoacidici, due di tipo β (epsilon, gamma, beta e delta), di 146 amminoacidi. Le quattro subunità si associano spontaneamente tra loro formando, attraverso interazioni non covalenti, ma di tipo elettrostatico e idrofobico, la caratteristica struttura tetramerica della molecola.

Le catene polipeptidiche delle globine contengono numerosi amminoacidi, detti residui invariati, che hanno la funzione di garantire la stabilità e la corretta funzionalità della molecola, preservandone la struttura terziaria caratterizzata da otto alfa-eliche, un dimero di emoglobina, il quale non è in grado di trasportare l'ossigeno in maniera efficace fino a quando non si combina con un secondo dimero nella formazione del tetramero, ovvero la molecola biologicamente attiva ed in grado di espletare funzione di trasportatore (1).

I geni globinici umani

Vi sono tre tipi di emoglobina umana normale nell'adulto:

l'Hb A, propria dell'individuo dopo la nascita, che da sola costituisce circa il 96% di tutta l'emoglobina ed è composta da 2 catene globiniche α e 2 β ;

l'Hb A₂, anch'essa presente solo dopo la nascita, è composta da 2 catene α e 2 δ , inferiore al 3%;

(Hb F), l'emoglobina fetale propria del periodo della vita intrauterina, che è formata da 2 catene α e 2 catene γ , inferiore al 1%.

I geni globinici hanno una ben precisa distribuzione in un tratto di DNA dei cromosomi 11 e 16, formando un raggruppamento ("cluster") genico della dimensione di circa 50 Kb. Analizzando la localizzazione dei geni codificanti le globine di tipo β nell'uomo, notiamo una caratteristica che viene riscontrata anche considerando i geni per le α -globine umane e i geni per le globine β di topo.

Infatti, la successione 5' \rightarrow 3' dei geni per le globine ricorda la progressione dell'attivazione trascrizionale (epsilon \rightarrow gamma; gamma \rightarrow delta + beta) che viene operata durante l'ontogenesi, quando alla produzione di emoglobine embrionarie (Gower 1, Gower 2 e Portland) si sostituisce dapprima la produzione di emoglobina fetale (Hb F) e poi la produzione di emoglobine di tipo adulto (Hb A e Hb A2).

Le diverse catene globiniche nell'uomo sono codificate da una serie di geni organizzati in due cluster.

I geni α -simili sono localizzati sul cromosoma 16, quelli β -simili sul cromosoma 11. Il cluster α globinico contiene tre geni funzionali: il gene $\zeta 2$ che codifica la globina ζ , i geni α_2 e α_1 che codificano le catene α , figura 1.B. Le catene α prodotte da questi due geni α sono identiche. Nel cluster α ci sono dei pseudogeni, residui vestigiali dell'evoluzione non codificanti proteine: pseudo $\zeta 1$, pseudo α_1 e pseudo α .

Il cluster β contiene 5 geni funzionali: il gene che codifica per le catene embrionarie ϵ , i due geni $A\gamma$ e $G\gamma$ che codificano per le catene fetali γ , il gene δ che codifica per le catene δ ed il gene β che codifica per le catene β .

Tra i geni $A\gamma$ e δ si trova uno pseudogene, pseudo β che ha una struttura simile agli altri geni del cluster, ma non è funzionale (2), figura 1. A.

Il controllo dell'espressione tessuto specifica e dello sviluppo di ciascuno dei geni β globinici riflette l'interazione di elementi regolatori cis attivi del DNA con fattori trans attivi che sono in parte ubiquitari ed in parte eritroidi specifici. La regolazione dell'espressione di un gene avviene sia a livello trascrizionale che postrascrizionale. Fino ad oggi si sono raggiunti buoni successi nello studio della regolazione trascrizionale.

Gli elementi regolatori cis attivi includono il promoter di ciascun gene,

sequenze enhancer a valle del gene β e a monte del gene γ , una sequenza silencer a monte del gene ϵ , e una sequenza nel secondo introne del gene β globinico (IVS2) che è stata descritta come una regione necessaria per l'espressione del gene β globinico.

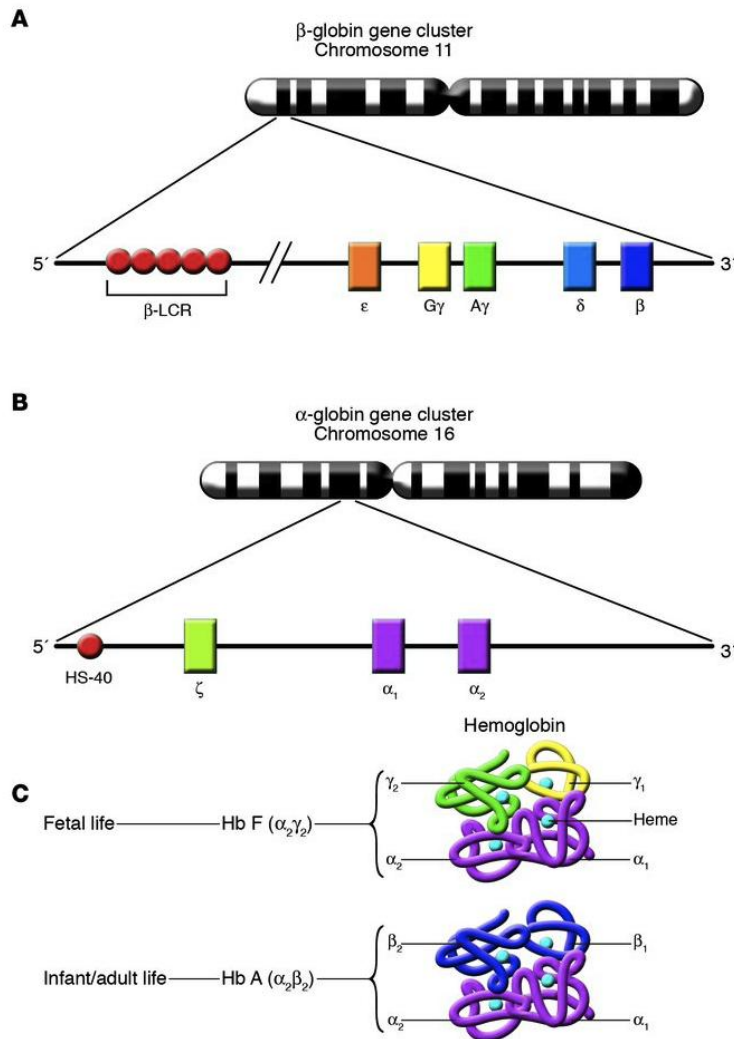


Figura1: Cluster globinici codificanti, con evidenziate le regioni LCR e la corrispondenza tra gene codificante e catena codificata (indicate con lo stesso colore). A monte del gene ϵ nel cluster β globinico vi sono delle sequenze indicate con il nome di Locus Control Region (LCR) che controllano l'attività dell'intero cluster. La loro delezione comporta, infatti, la perdita completa di funzione dei geni a valle, figura 2.

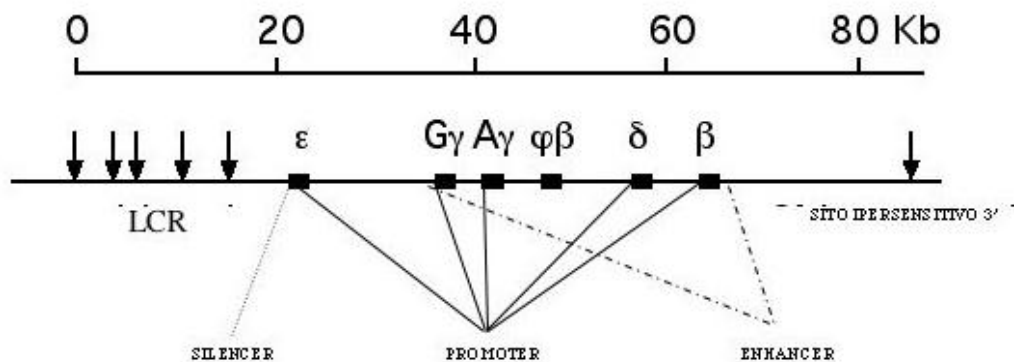


Figura 2: Rappresentazione schematica di alcuni degli elementi regolatori del cluster β globinico

L'LCR del gene β globinico consiste di diversi siti estremamente sensibili all'azione della DNase I chiamati siti ipersensitivi (HS) disposti in una regione di circa 20 Kb, un ulteriore sito ipersensitivo si trova situato 20Kb in 3' rispetto al gene β globinico .

Le sequenze di DNA associate con gli HS contengono numerosi siti che si legano a fattori di trascrizione sia eritoridi specifici che ubiquitari.

Gli alti livelli di espressione assicurati dall'LCR sembrano essere il prodotto di almeno due attività separate: la costituzione di domini di cromatina attiva e una diretta attivazione del gene (3,4,6).

Struttura del gene beta globinico

Il gene β globinico è lungo 1.6 Kb ed è situato in singola copia nel braccio corto del cromosoma 11, nel cosiddetto cluster β globinico.

Così come tutti i geni globinici che hanno una struttura omologa che rivela la loro origine comune, il gene β globinico è costituito da tre esoni interrotti da due introni preceduti e seguiti da dinucleotidi -GT e -AG.

Tali sequenze consensus riconosciute dal sistema dello splicing sembrano essere coinvolte nella formazione di una struttura secondaria con l'RNA U1,

che può essere considerato come uno tra i cofattori necessari perché gli enzimi dello splicing taglino l'RNA in modo corretto.

Sequenze nella porzione 5' dell'RNA U1 sono complementari sia alla sequenza consensus 5' che alla sequenza consensus 3' degli introni, favorendo la formazione di strutture "loop" molto importanti per un accurato splicing .

La trascrizione dei geni globinici, come in generale la trascrizione dei geni degli eucarioti, è regolata da sequenze presenti nel promoter a distanza ben precisa dal sito di inizio della trascrizione.

La regione promoter del gene β globinico adulto nei mammiferi contiene sequenze evolutivamente conservate che sono essenziali per la regolazione dell'espressione tessuto specifica. Esse includono le sequenze consensus TATA, CAAT, CACCC e GATA1.

Questi motivi di DNA legano fattori transattivanti tessuto specifici, tra i quali il fattore eritroide specifico KLF1 (Kruppel-like Factor 1), una proteina zinc fingers che lega il CACCC box ed è essenziale per l'attivazione del gene β globinico in cellule eritroidi adulte.

Schematizzando si può dire che il primo elemento funzionale chiamato ATA o TATA box si trova a circa 30 nucleotidi a monte del CAP, la sua funzione sembra quella di legare e di porre nella giusta fase di lettura la RNA Polimerasi II.

La seconda regione è chiamata CCAAT box e si trova a circa -70 -80 nucleotidi dall'inizio della trascrizione.

Il terzo elemento funzionale CACCC è situato a circa 105 nucleotidi 5' rispetto al CAP, è duplicato nel promoter del gene β , in singola copia nei geni γ e assente nei geni δ e α (figura 3).

I promoters dei geni globinici presentano diverse differenze tra loro, per questo motivo è stato ipotizzato e poi confermato un coinvolgimento di tali strutture non solo nel determinare l'efficienza di trascrizione ma anche nella regolazione dell'espressione nel corso dello sviluppo, (5,6).

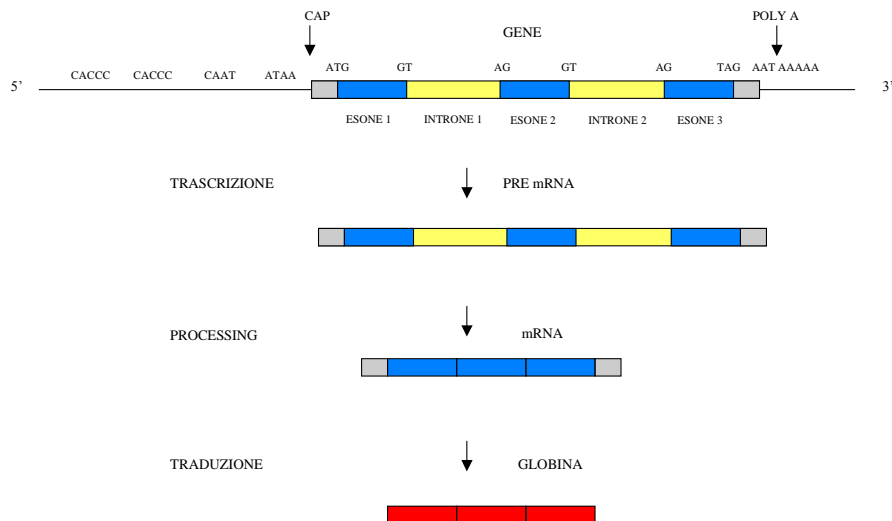


Figura 3 Rappresentazione schematica della struttura ed espressione dei geni globinici.

Struttura del gene delta globinico

Il gene δ globinico si trova anch'esso nel cluster β globinico sul cromosoma 11 situato in posizione 5' rispetto al gene β a circa 5Kb di distanza da esso.

La catena δ globinica forma insieme alle catene α l'emoglobina HbA₂ ($\alpha_2\beta_2$). L'HbA₂ rappresenta meno del 3% della emoglobina totale in individui adulti normali ed è tipicamente incrementata nei portatori di β talassemia.

Il gene δ globinico è altamente omologo al gene β globinico derivante da un comune antenato ma il suo promoter rispetto al promoter del gene β presenta le seguenti alterazioni: mancanza del CACCC box, mutazione del CCAAT box (GCAAT), ridotta distanza tra CAAT e TATA box.

A tali modificazioni sarebbe imputabile la ridotta funzione del gene δ globinico sebbene sia stata dimostrata anche una ridotta stabilità del δ mRNA rispetto al β mRNA, (5).

Espressione dei geni per le globine durante l'ontogenesi normale

L'analisi della sequenza dei geni β -globinici in specie differenti ha chiarito anche alcuni interessanti aspetti della biochimica delle globine. Il grado di omologia tra le sequenze codificanti le globine embrionarie o adulte di specie diverse è molto alto. Inoltre, occorre sottolineare che il grado di omologia tra i geni embrionali e adulti di una stessa specie è, ad esempio, in genere inferiore al grado di omologia riscontrato all'interno dei geni embrionari di tipo β appartenenti a specie differenti. Tale osservazione suggerisce un'evoluzione molecolare dei geni embrionali, fetali e adulti strettamente dipendente dall'ambiente nel quale la globina (sia essa di tipo α o di tipo β) deve operare. Il primo cambiamento (switch) di espressione genica (zeta \rightarrow alfa; epsilon \rightarrow gamma) avviene dopo 5 settimane di gestazione; il secondo (gamma \rightarrow delta + beta) avviene in periodo peri-natale.

Responsabile del cambiamento del tipo di globine prodotte è una graduale sostituzione di cellule eritropoietiche pre-determinate alla biosintesi di tipi definiti di globina con altre, provenienti da compartimenti differenti.

Ad esempio, in una prima fase il sito di eritropoiesi è il sacco vitellino, che produce cellule eritroidi programmate all'espressione dei geni globinici zeta, epsilon e alfa. Tra la quinta e la sesta settimana di gestazione il fegato sostituisce il sacco vitellino in qualità di maggiore compartimento di eritropoiesi.

Nel periodo perinatale e nell'adulto, invece, il principale compartimento in cui avviene l'eritropoiesi è il midollo osseo, (Figura 4).

Da quanto descritto, emerge che la regolazione dell'espressione dei geni globinici deve necessariamente essere un processo altamente coordinato, che comporta alterazioni fisio-patologiche qualora anche uno solo dei geni globinici sia strutturalmente e funzionalmente alterato.

Importanti sono le alterazioni fisiopatologiche dovute alla mancata produzione di catene globiniche β (beta talassemia).

Gli effetti della mancanza dei quattro geni codificanti la globina alfa o della presenza di un solo gene per la globina alfa sono anch'essi gravi.

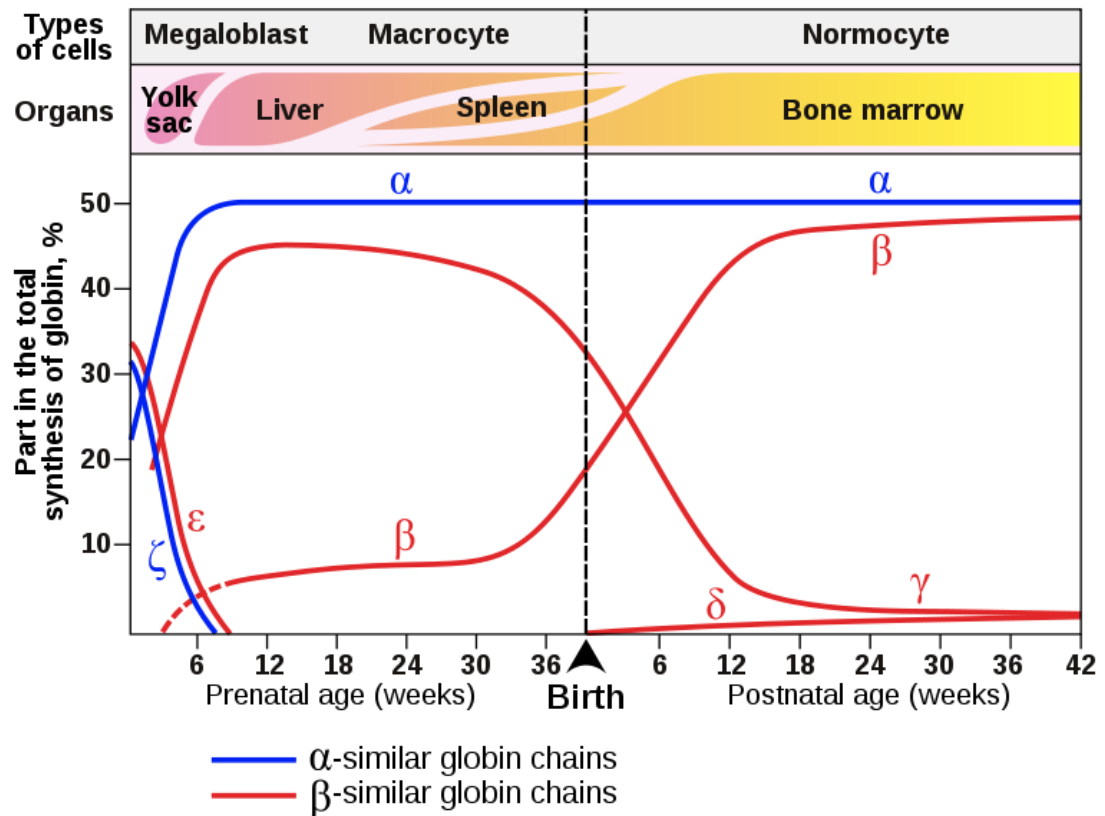


Figura 4: Espressione genica delle diverse catene globiniche attraverso lo stadio fetale fino ad un anno di vita.

Espressione dei geni per le globine durante l'ontogenesi patologica (Beta-Talassemia)

I geni globinici possono presentare vari tipi di alterazioni dando origine alle differenti forme di microcitemia. Le alterazioni più comuni sono le delezioni (totale assenza del gene interessato) o le mutazioni (piccoli difetti puntiformi). In entrambi i casi, i geni perdono la loro funzione e quindi non producono o producono solo in piccolissima quantità le corrispondenti catene globiniche.

I difetti dei geni globinici colpiscono non solo il gene β ma anche i geni α , γ , δ . Le varietà più importanti sono però le β microcitemie che causano in determinate condizioni genetiche l'anemia mediterranea, mentre le α microcitemie, pur essendo molto più frequenti delle β microcitemie, causano un quadro clinico molto meno grave e, solo in alcuni paesi del sud-est asiatico, una malattia mortale (idrope-ascite fetale).

Gli studi sul DNA dei geni globinici hanno messo in luce non solo l'esatta disposizione dei geni globinici α e non- α rispettivamente sui cromosomi 16 e 11 ma anche l'esistenza di numerosissime varietà di microcitemie α , β , δ , γ .

In soggetti che manifestano beta-talassemia, sono state studiate e individuate più di 200 differenti mutazioni geniche responsabili della patologia, la maggior parte delle quali consistono in delezioni estese di 1 o più esoni, o mutazioni puntiformi di una o poche basi, che interferiscono con la funzionalità del gene stesso.

Le alterazioni del gene per le β -globine spesso presentano una distribuzione etnico-geografica ben precisa, e comprendono:

- Mutazioni a livello della regione promotrice del gene: l'effetto di tali mutazioni è quello di ridurre l'efficienza del processo di trascrizione; in questo caso, le catene β - globiniche vengono prodotte anche se in quantità inferiore (β^+ -talassemia). Molte di queste alterazioni possono essere definite "lievi".

- Mutazioni non-senso e frameshift: queste mutazioni portano a una traduzione incompleta e quindi a una proteina non funzionale. Sono da considerarsi mutazioni gravi (β^0 -talassemia). Interessano soprattutto gli esoni e causano una prematura terminazione della sintesi proteica; inoltre, possono interessare anche il codone d'inizio, quello di stop.

- Mutazioni che alterano il processo di maturazione dell'RNA: tale processo avviene attraverso:

1. alterazione dei siti donatore e accettore, che impediscono il processo di escissione degli introni, processo di splicing, e provocano forme gravi di talassemia di tipo β^0 e la degradazione dell'mRNA, dovuto all'alterazione dei dinucleotidi invarianti a livello delle giunzioni esone/introne, che impediscono il normale processo di separazione.

2. alterazione delle regioni di consenso intorno ai siti accettore e donatore, che riducono l'efficienza con cui avviene l'escissione degli introni e danno luogo a forme di tipo β^+ di variabile gravità.

3. sostituzioni nucleotidiche che creano siti di splicing alternativo, sia all'interno degli introni, che degli esoni. Generalmente provocano un fenotipo di tipo β^+ ed hanno variabile gravità, che dipende dalla regione in cui il nuovo sito si attiva.

- Mutazioni nella regione di consenso, che funge da segnale di poliadenilazione, mutazioni nel sito di inizio della trascrizione (CAP) e nella regione 3' non tradotta. Generano talassemie di tipo β^+ , alcune delle quali sono considerate tra le più lievi descritte.

- Mutazioni nella tripletta d'inizio della traduzione.

- Delezioni geniche, comprendono anche l'Hb Lepore, che si originano da un crossing-over non omologo fra i geni β e δ adiacenti. Tale evento porta alla formazione di una subunità formata all'estremo N-terminale da un tratto di catena δ e all'estremo C-terminale da un tratto di catena β .

La beta talassemia rappresenta il difetto monogenico più diffuso in Italia e nel mondo, raggiunge frequenze particolarmente alte in Sardegna, Sicilia, nelle regioni meridionali e nell'area del Delta Padano.

L'ereditarietà è di tipo autosomico recessivo. Lo stato eterozigote di beta talassemia è asintomatico.

Quando entrambe le copie del gene della catena β dell'emoglobina sono difettose, si ha la talassemia major, o morbo di Cooley, che si manifesta verso il quarto-sesto mese di vita, nel periodo in cui normalmente avviene lo switching delle catene globiniche da γ a β .

La talassemia intermedia è una forma attenuata di talassemia, che si manifesta in modo molto variabile in individui omozigoti, è costituita da una serie estremamente eterogenea di quadri di diversa gravità a patologia molecolare complessa.

La prevenzione è basata sull'identificazione dei portatori, la consultazione genetica e la diagnosi prenatale e ciò ha portato, negli ultimi anni, ad una

radicale riduzione dell'incidenza della malattia, soprattutto in Sardegna dove il programma è stato applicato in maniera capillare, (7).

Manifestazioni cliniche

I portatori di beta talassemia non mostrano manifestazioni cliniche evidenti. Il livello emoglobinico è del 15% circa inferiore ai valori normali, i globuli rossi possono essere irregolari nella forma e nel numero, in alcuni casi si può presentare un modesto ingrossamento della milza.

Nella talassemia major si ha anemia grave a insorgenza postnatale, eritropoiesi inefficace ed emolisi periferica oltre che una grande espansione midollare, epatosplenomegalia e aumentato assorbimento del ferro. In questi pazienti si hanno, oltre che specifici disturbi nello sviluppo corporeo e alterazioni scheletriche, delle particolari alterazioni ematologiche. Negli strisci periferici si notano corpi di Jolly e punteggiatura basofila ed è presente una grande immissione in circolo di precursori eritroidi e talvolta granulocitari giustificata dall'emopoiesi extramidollare. Anche i reticolociti sono moderatamente aumentati e sono rilevabili segni emolitici dovuti ed eritropoiesi inefficace con iperbilirubinemia indiretta, ipersideremia e iperferritinemia, (8). Con il termine di talassemia intermedia ci si riferisce invece a un ampio spettro di quadri clinici di gravità minore rispetto alla major. Geneticamente i soggetti sono molto eterogenei ed hanno una riduzione dello sbilanciamento delle sintesi di α e β globine.

I sintomi più tipici della talassemia intermedia sono anemia, ingrossamento della milza, calcolosi biliare a ulcere malleolari. Bisogna inoltre ricordare che la severità clinica della beta talassemia è influenzata anche da fattori ambientali oltre che da ulteriori fattori genetici e che fenotipicamente ci possono essere risposte diverse a genotipi uguali.

La coesistenza di una α talassemia può ad esempio rendere meno grave il quadro clinico di β talassemia così come una condizione di emocromatosi di origine genetica lo può aggravare .

Terapie

Negli ultimi anni i progressi continui nella terapia emotrasfusionale, nella terapia ferrochelante e nel trapianto di midollo osseo hanno migliorato la prognosi della talassemia, ma la malattia impone tuttora continui sacrifici ai pazienti e ai familiari.

Grazie alla ricerca scientifica, si avvicina la possibilità di correggere o eliminare i difetti responsabili della talassemia. Gli studi sono orientati principalmente verso quattro settori: miglioramento della qualità del sangue trasfuso e della terapia ferrochelante, produzione di nuovi farmaci, trapianto di midollo osseo e terapia genica.

La terapia classica per la talassemia major consiste in ripetute trasfusioni. Queste, però, provocano un accumulo di ferro in diversi organi tra cui il miocardio, il fegato e diverse ghiandole endocrine (specie pancreas, paratiroide e tiroide). L'accumulo di ferro danneggia gravemente i tessuti e deve essere trattato con una terapia a base di farmaci detti chelanti, che sequestrano ed eliminano il ferro, come la deferoxamina B (Desferal), che viene somministrata tramite lunghe e ripetute infusioni sottocutanee (fino a 12 ore al giorno).

Oggi esistono anche chelanti orale (deferiprone – deferasirox) che sembrano dare risultati promettenti e nuovi chelanti orali sono in corso di avanzata sperimentazione. Il trapianto di midollo, in questo momento, è l'unica cura che può portare alla guarigione definitiva per le persone affette da talassemia major. Il problema maggiore del trapianto di midollo è la necessità di identificare donatori compatibili, di solito fratelli/sorelle del paziente. Queste limitazioni riducono l'uso di quest'approccio terapeutico. E' necessario quindi trovare delle vie alternative per la cura della beta talassemia. L'identificazione di nuovi approcci terapeutici in grado di migliorare le condizioni di vita dei pazienti talassemici è quindi un obiettivo fondamentale della ricerca scientifica, e di particolare interesse in quella sarda.

Le alternative, ancora sperimentali, si basano sull'introduzione permanente del gene della β -globina umana corretto nelle cellule ematopoietiche staminali del paziente (terapia genica) Nel caso specifico della β talassemia si sta valutando

la possibilità di correggere il difetto molecolare tramite l'inserimento di un gene β normale in cellule staminali ematopoietiche (HSCs).

I primi studi sono stati compiuti trasferendo il gene β globinico umano in HSCs murine tramite dei vettori ricombinanti oncoretrovirali. Si è ottenuta un'espressione tessuto-specifica, ma con livelli di espressione bassi o variabili. Sadelain et al. hanno utilizzato un vettore lentivirale per trasferire il gene β nelle HSCs murine ottenendo la correzione del quadro ematologico di topi affetti da talassemia intermedia e major (9,10).

In Francia è stato avviato il primo trial clinico per la terapia genica in pazienti con β talassemia major e SCD (Sickle Cell Disease). Al primo paziente, affetto da talassemia major, sono state trapiantate cellule autologhe CD34⁺ trasdotte con un vettore lentivirale contenente delle sequenze regolatrici e il gene β globinico con una mutazione all'aminoacido 87 (la mutazione ha un effetto anti-falcemico e permette la distinzione rispetto alla proteina endogena). Il paziente ha avuto un miglioramento del quadro ematologico dopo cinque settimane dal trapianto ed è diventato indipendente dalle trasfusioni. Nonostante il risanamento, nel paziente è stato riscontrato un clone con integrazione nel sito del gene HMGA2, un potenziale oncogene, (11). L'analisi delle trapiantate, ha mostrato una dominanza del clone con questo particolare locus d'inserzione, rispetto ai cloni con un diverso locus d'inserzione. Il clone esprime una forma tronca dell'mRNA di HMGA2 che è stata trovata in correlazione con tumori benigni, (12).

Un altro filone di ricerca si basa sulla comprensione dei meccanismi molecolari che regolano il silenziamento e l'attivazione dei geni globinici durante lo sviluppo (Switching emoglobinico). Ad esempio riuscire a capire come il gene γ globinico è silenziato al termine della vita fetale e come nello stesso tempo sia attivata la produzione del gene che produce la catena emoglobinica adulta (β globina) potrebbe permetterne la manipolazione genetica, allo scopo di riattivare il gene γ o per evitarne il silenziamento così da compensare la mancanza delle catene β globiniche.

Ricerche recenti di Biologia Molecolare su cellule eritroidi e su modelli murini e studi di associazione genomica (GWAS = Genomic Wide Association

Studies) hanno consentito di evidenziare i meccanismi molecolari che regolano il processo biologico fondamentale della transizione emoglobina fetale (HbF)→emoglobina adulta (HbA). Queste conoscenze hanno una notevole rilevanza biologica ma anche clinica, poiché la possibilità di interferire su questa transizione e di determinare quindi una produzione continuativa di HbF nella vita adulta possono migliorare marcatamente il quadro clinico sia della beta talassemia (talassemia major) che della anemia falciforme (13, 14).

Infatti, studi recenti hanno evidenziato che i fattori di trascrizione KLF1 e BCL11A giocano un ruolo fondamentale nella transizione HbF→A. KLF1 è capace di attivare l'espressione del gene β -globinico ma anche di BCL11A. BCL11A è un regolatore negativo dell'espressione dei geni γ . Nel periodo fetale si osservano basse concentrazioni di KLF1. Ne consegue ridotta espressione di β -globina e di BCL11A che determina elevata espressione di catene γ . Nel periodo postnatale aumenta la produzione di KLF1. La produzione di β -globina viene attivata e contemporaneamente KLF1 stimola l'espressione di BCL11A che a sua volta silenzia i geni γ -globinici.

Nel periodo fetale l'espressione di KLF1 è ridotta in modo tale da non essere sufficiente per stimolare l'espressione del gene β -globinico e di BCL11A. Questo è il tipico profilo fetale di espressione dei geni β -globinici con bassi livelli di β -globina e alti livelli di geni γ -globinici, secondariamente ai ridotti livelli di BCL11A. Una simile situazione avviene in presenza di difetti molecolari del gene KLF1. Nella vita postnatale si verifica un aumento di espressione di KLF1 che determina una attivazione sia del gene β -globinico che di BCL11A, il quale reprime l'espressione γ -globinica.

Alla luce di queste conoscenze si possono postulare due alternative potenzialmente capaci di attivare farmacologicamente la produzione di HbF:

- Inibizione controllata di KLF1 con conseguente riduzione dell'espressione di BCL11A e aumentata produzione di catene γ ;
- Inibizione diretta di BCL11A, con aumento di espressione dei geni γ -globinici probabilmente preferibile per evitare eventuali effetti negativi nell'espressione dei geni β -globinici in seguito all'inibizione di KLF1, (15).

Cluster β globinico murino

Il cluster β globinico del topo è localizzato sul cromosoma 7 e contiene quattro geni funzionali: il $\beta h1$ e l' $\epsilon\gamma^2$, che codificano rispettivamente per una catena embrionica precoce ed una tardiva, ed i geni $b1(\beta^{\text{major}})$ e $b2(\beta^{\text{minor}})$ che codificano per le catene globiniche adulte (figura 5).

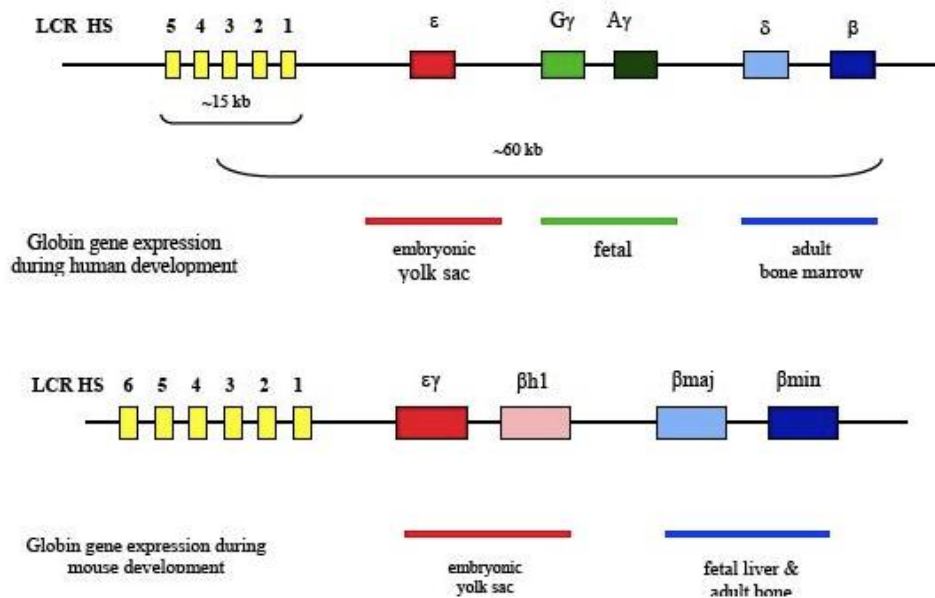


Figura 5: Cluster beta globinico nell'uomo e nel topo.

I geni embrionici sono espressi dal 9,5 giorno dopo il concepimento (days post coitum, d.p.c.) dal sacco vitellino e dal fegato fetale. Lo switch che porta all'espressione dei geni adulti e alla scomparsa di quelli embrionici, avviene fra il 14 e il 15 dpc. I geni $b1$ e $b2$ vengono espressi inizialmente nel fegato fetale e nella milza, poi, nella vita adulta, nel midollo osseo. Le due catene globiniche sono espresse in proporzioni diverse, il $b1$ produce l'80% del totale delle β globine, il $b2$ il restante 20%, (16) . I topi possiedono tre diversi aplotipi del complesso β globinico, l'HbbS, l'HbbD e l'HbbP.

I topi con l'aplotipo HbbS hanno i geni $b1$ e $b2$ simili, esprimono catene β (β^S) strutturalmente identiche che migrano durante l'elettroforesi associate alla catena α in un dimero, formando un'unica banda.

Nell'aplotipo HbbD i due geni per la β globina adulta sono differenti e producono due catene β diverse fra di loro e rispetto alla globina β^S . In particolare il gene b1 esprime la catena β^{Dmajor} mentre il gene b2 produce la catena β^{Dminor} , ciascuna catena associata in un dimero alla catena α , migra durante l'elettroforesi e forma una banda distinta.

I topi con aplotipo HbbP presenta un pattern di migrazione simile a quello dell'HbbD ma le sequenze proteiche delle catene espresse sono differenti e vengono chiamate β^{Pmajor} e β^{Pminor} , (17).

Attivazione del gene delta globinico in vivo attraverso la creazione di topi transgenici quale modello di studio per la cura della beta talassemia

Il principale scopo del progetto è verificare la possibilità di attivare il gene δ globinico in vivo attraverso la creazione di topi transgenici quale modello di studio per la cura della β talassemia. Il gene δ globinico è espresso meno del 3% rispetto al β nella vita adulta. Le ragioni di questa bassa espressione sono state recentemente chiarite e risiedono nella mancanza, nella sequenza del promotore, di alcune sequenze consensus evolutivamente conservate che rappresentano i siti di legame per alcuni fattori di trascrizione. Le sequenze regolatorie di DNA in cis agiscono, infatti, insieme ai fattori di trascrizione nella regolazione tessuto-specifica, nel livello di espressione e nei tempi dello switching del cluster β globinico. Tra queste sequenze consensus rivestono una particolare importanza i CACCC box.

Il CACCC box nell'uomo e di altri mammiferi è duplicato e i due elementi sono chiamati "prossimale" e "distale".

Il CACCC box prossimale lega il fattore di trascrizione KLF1 che è stato dimostrato, essere indispensabile per l'espressione tessuto specifica del gene β globinico.

Il nostro gruppo di ricerca è stato in grado di dimostrare che è possibile attivare il promoter del gene δ globinico creando al suo interno la sequenza consensus per il CACCC box prossimale, (18). Il promoter mutagenizzato è stato sequenziato e introdotto in un vettore plasmidico di 8.4 KB contenente il

promoter del gene β che controlla l'espressione del gene della renilla luciferasi e il promoter del gene delta controlla l'espressione di un secondo gene reporter la firefly luciferasi. I due promoter sono sotto il controllo del sito ipersensitivo HS2 della LCR del cluster β globinico. Le due luciferasi agiscono su substrati differenti e perciò dal rapporto della loro attività è possibile risalire all'entità dell'attivazione dei due promoter. Gli esperimenti sono stati condotti in colture cellulare e i risultati in saggi di espressione transiente mostrano che entrambi i CACCC box possono incrementare l'efficienza della trascrizione del promoter del gene δ globinico sia in sistemi di cellule eritroidi sia in quelle non eritroidi e stato dimostrato inoltre che la presenza di un singolo sito di legame KLF1 (CACCC) è sufficiente per la riattivazione del promoter del gene δ globinico fino all'80% rispetto al promoter del gene β globinico.

I risultati in vitro sono stati poi confermati dagli studi in vivo mediante la creazione di modelli murini transgenici contenenti gli stessi costrutti esaminati in vitro.

Gli studi di espressione sono stati condotti su tre linee indipendenti contenenti il CACCC prossimale e su tre linee di controllo contenenti il promoter del gene δ globinico Wild-Type(wt).

I risultati ottenuti in vivo hanno confermato che il CACCC box prossimale da solo è in grado di attivare il promoter del gene δ globinico ad un livello potenzialmente terapeutico per la β talassemia.

In seguito, per essere in grado di stimare il livello di produzione di catene δ globinico umano in vivo e in competizione con il gene β globinico, abbiamo prodotto un costrutto composto dal micro LCR (HS1-HS4) e dal gene δ globinico umano guidato dal CACCC δ promoter .

Abbiamo usato questo costrutto per generare tre linee indipendenti di topi transgenici (CACCC δ -LCR) in grado di esprimere il gene δ globinico umano. Abbiamo quantificato l'espressione del gene δ globinico umano attraverso real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) e analisi S1.

I risultati della RT-qPCR mostrano un aumento di espressione del gene δ

rispetto al controllo (Linea 72) che contiene l'intero cluster beta globinico umano.

La linea transgenica ottenuta (CACCC δ M-LCR) è stata poi incrociata con un modello murino di β talassemia intermedia (th3/+) per valutare se l'attivazione del gene δ globinico era in grado di risanare il genotipo th3/th3 che è letale.

Il modello murino per la β -Talassemia è stato generato tramite la delezione di entrambi i geni globinici adulti (β major e β minor), codificanti per le catene β -globiniche adulte.

I topi omozigoti per la delezione (Hbb^{Th-3}/Hbb^{Th-3}) presentano una forma di β^0 -talassemia molto severa, paragonabile al morbo di Cooley che è la forma più grave di talassemia negli umani. L'omozigosi per la delezione porta ad una totale assenza di catene non- α dopo lo switch, ciò fa sì che gli animali muoiano perinatalmente.

Il successo nella cura della β talassemia in vivo attraverso l'attivazione del gene δ globinico confermerà questo gene come possibile target terapeutico per questa malattia. Nell'applicazione pratica l'attivazione del gene δ globinico potrebbe essere ottenuta con l'utilizzo di molecole selezionate attraverso high throughput screening o attraverso fattori di trascrizione modificati in vitro che attivano il gene δ globinico.

Per selezionare molecole in grado di attivare il promoter del gene δ globinico potrebbe essere utilizzata la linea transgenica HS2F δ LR β L contenente i promoter wt dei geni δ e β in precedenza descritta e utilizzare cellule di fegato fetale e di midollo osseo adulto di topi di questa linea come materiale biologico su cui effettuare un high throughput screening alla ricerca di molecole capaci di attivare l'espressione del gene δ .

Recentemente sono stati fatti grandi progressi nell'ingegnerizzare in vitro sequenze specifiche di proteine zinc finger. È perciò possibile ideare fattori di trascrizione capaci di attivare in maniera specifica il promoter del gene δ globinico, come possibile strumento terapeutico per le emoglobinopatie.

Il successo nella cura della β talassemia in vivo attraverso l'attivazione del gene δ globinico confermerà questo gene come possibile target terapeutico per questa malattia.

MATERIALI E METODI

COSTRUTTI

Per i primi esperimenti dove l'obiettivo era dimostrare la possibilità di attivare il promoter del gene δ globinico, abbiamo prodotto un costrutto che conteneva una singola sequenza enhancer HS2 e i promoter dei geni globinici δ e β che guidavano rispettivamente l'espressione della Firefly e della Renilla Luciferasi (HS2 δ FL β RL), figura 6.A. Questo costrutto è stato ottenuto clonando un frammento BamHI di 1,8 Kb del plasmide β REN nel costrutto δ pESL(18).

Il frammento BamHI conteneva il cDNA della Renilla Luciferase sotto il controllo del promoter di 450 bp del gene β globinico. La sequenza del promoter δ globinico mutato è stata ottenuta attraverso mutagenesi sito specifica in vitro usando il metodo megaprimer, (19).

Per i nostri studi, oltre al costrutto contenente il sito ipersensitivo HS2 il promoter del gene β globinico che guidava l'espressione del gene della renilla luciferasi e il promoter del gene δ globinico mutato (CACCC box prossimale) che guidava l'espressione di un secondo gene reporter la firefly luciferasi (HS2 δ MFL β RL), abbiamo prodotto come controllo un costrutto con il promoter del gene δ globinico wild type (HS2 δ wtL β RL). In seguito abbiamo prodotto un altro costrutto costituito invece dal micro LCR (HS1-HS4) e dal gene δ globinico umano guidato dal promoter contenente il CACCC box prossimale, figura 6.C. Il costrutto è stato ottenuto mediante clonazione di un frammento di 4.7Kb (KpnI) costituito dal gene δ globinico e il suo promoter mutagenizzato nel GSE 1417 che conteneva il micro LCR (CACCC δ M-LCR). Come controllo è stato prodotto anche un costrutto contenente il promoter del gene δ globinico senza la presenza del CACCC box prossimale (CACCC δ wt-LCR).

Entrambi i costrutti sono poi stati linearizzati e purificati per essere utilizzati per la produzione delle linee transgeniche attraverso la microiniezione del

DNA negli ovociti che è la tecnica maggiormente utilizzata per la produzione di animali transgenici.

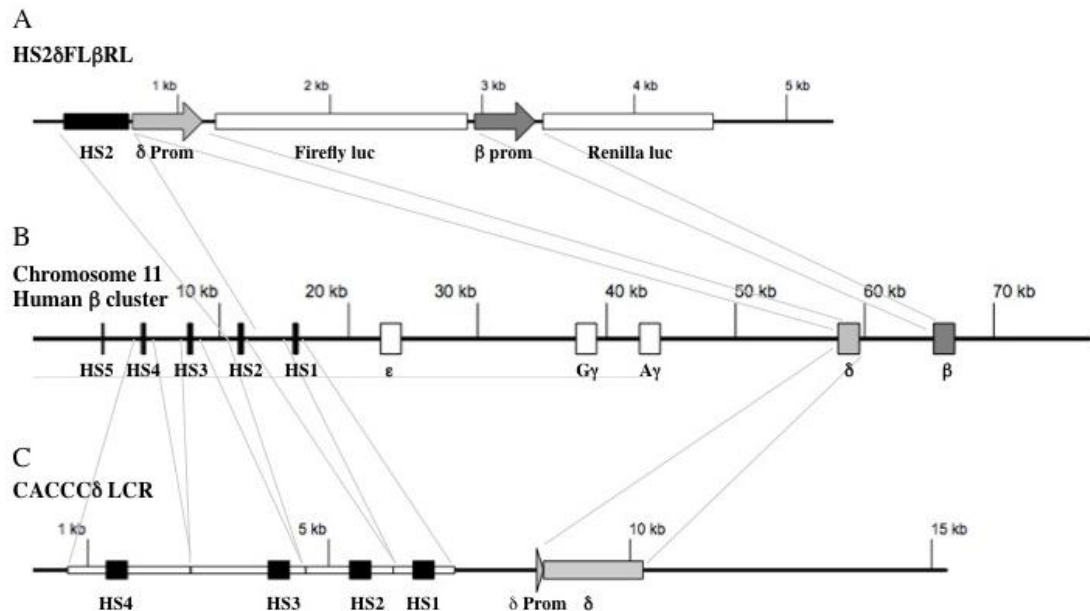


Figura 6: Cluster beta globinico e costrutti.

PRODUZIONE DEI TOPI TRANSGENICI

Per la produzione degli animali transgenici abbiamo utilizzato: le femmine donatrici di uova, le femmine che fungono da madri adottive, i maschi fertili e i maschi sterili.

Per quanto riguarda le donatrici di ovociti sono largamente utilizzate le femmine del ceppo FVB/N perché possiedono buone caratteristiche riproduttive, i pronuclei degli ovociti sono particolarmente larghi e hanno una buona resistenza alla rottura da microiniezione. Si utilizzano femmine di età compresa tra le 4 e le 6 settimane, superovulate in maniera da ottenere un maggior numero di ovociti effettuando una prima iniezione intraperitoneale di PMS (che determina la maturazione dei follicoli) seguita 48 ore dopo da una seconda iniezione sempre intraperitoneale di HCG (che facilita la rottura dei

follicoli e l'emissione delle uova). Le femmine riceventi chiamate anche madri adottive o foster sono C57/BL6XCBA/J. Si usano ad un'età di circa 6 settimane e si devono fare accoppiare con maschi sterili in modo che l'utero si prepari all'impianto dell'embrione. I maschi fertili sono anche chiamati "studs", appartengono al ceppo FVB/N e devono avere un'età di almeno 8 settimane. I maschi sterili C57/BL6XCBA/J vengono vasectomizzati a circa 2 mesi di età. Gli steps operativi che abbiamo seguito per la produzione di topi transgenici sono rappresentati fondamentalmente da sei fasi:

1. Superovulazione mediante somministrazione di gonadotropine delle femmine donatrici;
2. Accoppiamento al giorno 0 delle femmine donatrici con maschi fertili (detti "studs") e accoppiamento di femmine riceventi ("foster") con maschi sterili vasectomizzati;
3. Prelevamento di ovociti al giorno 1 dagli ovidotti delle femmine accoppiatesi con gli studs;
4. Microiniezione del costrutto nei pronuclei degli ovociti prelevati;
5. Trasferimento degli zigoti microiniettati in femmine riceventi pseudogravide.

Gli animali nati dagli esperimenti di microiniezione sono stati genotipizzati attraverso PCR con primers specifici (δ FW: GAGGCAAAGAAGAACTT, δ REV: GTCTGTTTGAGGTTGCT) che amplificano il promoter del gene δ globinico umano e Southern Blotting utilizzando un frammento del promoter del gene δ come probe. L'estrazione del DNA si esegue con l'utilizzo della Tail mix (20) e Proteinase K, incubazione a 55° over night e fenolo/cloroformio estrazione.

Gli animali risultati positivi alla genotipizzazione (fondatori) sono poi stati messi in accoppiamento con animali "wild type" per verificare la trasmissione del transgene alla progenie.

SAGGIO LUCIFERASI

Gli studi di espressione sono stati condotti su tre linee indipendenti (HS2 δ MFL β RL) e su tre linee di controllo (HS2 δ wtL β RL).

Il livello d'espressione dei due geni reporter è stato quantizzato negli organi ematopoietici a diversi stadi di sviluppo: nel sacco vitellino a 10.5 post *coitum* (pc) e nel fegato fetale a 12.5, 14.5 e 16.5- (pc)

Per ogni linea transgenica sono state analizzate tre gravidanze per ogni punto dello sviluppo.

L'estratto proteico è stato ottenuto mediante omogeneizzazione dei tessuti eritropoietici in buffer di lisi per l'analisi della attività luciferasica.

Una frazione corrispondente a circa un quinto dell'omogenato totale è stata analizzata usando un kit commerciale (Dual-Luciferase Reporter Assay System - Promega) e letti al luminometro. L'analisi è stata condotta sullo stesso campione per le due Renilla e Firefly luciferasi consecutivamente.

ESTRAZIONE RNA E RETRO TRASCRIZIONE

L'RNA totale è stato estratto dal sangue del topo adulto utilizzando il metodo standard con il TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Cat N°10296-010).

Per verificare la qualità ed il grado di purezza dell'RNA su tutti i campioni è stata effettuata una elettroforesi orizzontale su gel di agarosio 2%.

Ciò ha permesso di visualizzare su gel attraverso raggi ultravioletti (UV) l'integrità delle bande di rRNA di 28s, 18s, 5s e la possibile presenza di DNA contaminante. Inoltre la quantità e la purezza sono state misurate usando il NanoDrop 2000 C Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Utilizzando la tecnica della trascrizione inversa abbiamo sintetizzato il cDNA (Invitrogen SuperScript First Strand cat N° 11904-018 Carlsbad, CA).

ANALISI S1 NUCLEASI E PCR QUANTITATIVA

L'esperimento è stato portato avanti seguendo i lavori di Berry M. e Stroubulis J (21, 22).

La probe S1 del gene δ globinico è un frammento genomico *RsaI* di 230 pb

che da un frammento di 140 pb.

La quantificazione del segnale ottenuto dall'analisi dell'S1 è stato misurato usando il Phosphorimager (Molecular Dynamic;Amersham Biosciences UK).

Per determinare l'espressione del mRNA del gene δ globinico è stata effettuata una RT-qPCR.

Sono stati utilizzati i seguenti primers e probe:

Gene target "delta" (Hs00426283_m1);

Geni di riferimento "Eukaryotic 18S rRNA" (cod art.4319413E) e "GAPDH" (cod art 4308313). e la TaqMan Universal PCR Master Mix (Part Number 4304437 Applied Biosystems). La RT-qPCR è stata eseguita utilizzando la macchina 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) usando le condizioni universali (10 min a 95° C, dopo 15 s a 95° C e 1 min a 60° C per 40 cicli). Per valutare i livelli di espressione dei geni è stato utilizzato il metodo comparativo dei Threshold Cycle (Ct), (23).

ANALISI EMATOLOGICHE

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena caudale dei topi wt, Hbbth3/+ e Hbbth3/+ CACCC δ M-LCR (omozigote e eterozigote).

Utilizzando lo strumento "Automated Hematology Cell Counters MS4 Melet Schloesing Lab" siamo stati in grado di misurare l'emoglobina totale (Hb), il numero di globuli rossi (RBC), ematocrito (Hct), volume corpuscolare medio (MCV), quantità media di emoglobina in ogni globulo rosso (MCH), contaglobuli automatici (RDW). Parte degli esperimenti sono stati fatti anche con lo strumento "HemoCue Plasma/Low Hb Photometer", un sistema automatizzato per la misurazione della concentrazione di emoglobina nel sangue .

Morfologia globuli rossi

Lo striscio di sangue è stato eseguito sui topi (wt, Hbbth3/+ e Hbbth3/+ CACCC δ M-LCR in omozigosi ed eterozigosi) ponendo una piccola goccia di sangue proveniente dalla vena caudale su un vetrino. Per la colorazione

abbiamo utilizzato il May-Grunwald Giemsa (May-Grunwald solution Sigma cat.N.63590; Giemsa's reagent cod 453616 Farmitalia Carlo Erba Milano It).

High Performance liquid Chromatography (HPLC)

L'HPLC è stata eseguita tramite lo strumento Variant II (Bio Rad, Hercules,CA) utilizzando il programma Beta-Thal Short Program (Bio-Rad).

Per l'analisi sono stati prelevati 100uL di sangue dal plesso orbitale dei topi wt, Hbbth3/+ e Hbbth3/+ CACCC δ M-LCR (omozigote e eterozigote).

Le analisi HPLC sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Università degli Studi di Cagliari c/o Ospedale Microcitemico.

RISULTATI

Il gene δ globinico è espresso meno del 3% rispetto al β nella vita adulta.

Le ragioni di questa bassa espressione sono state recentemente chiarite e risiedono nella mancanza, nella sequenza del promotore, di alcune sequenze consensus evolutivamente conservate che rappresentano i siti di legame per alcuni fattori di trascrizione. Le sequenze regolatorie di DNA in cis agiscono, infatti, insieme ai fattori di trascrizione nella regolazione tessuto-specifica, nel livello di espressione e nei tempi dello switching del cluster beta globinico. Tra queste sequenze consensus rivestono una particolare importanza i CACCC box.

Il CACCC box nell'uomo e di altri mammiferi è duplicato e i due elementi sono chiamati "prossimale" e "distale".

Il CACCC box prossimale lega il fattore di trascrizione KLF1 che è stato dimostrato, essere indispensabile per l'espressione tessuto-specifico del gene beta globinico.

Nel corso degli ultimi anni il gruppo di ricerca di cui faccio parte è stato in grado di dimostrare che è possibile attivare il promotore del gene delta globinico creando al suo interno la sequenza consensus per il CACCC box prossimale. Il promotore mutagenizzato è stato sequenziato e introdotto in un vettore plasmidico di 8.4 KB contenente il promotore del gene beta che controlla l'espressione del gene della renilla luciferasi e il promotore del gene delta controlla l'espressione di un secondo gene reporter la firefly luciferasi. I due promotori sono sotto il controllo del sito ipersensitivo HS2 della LCR del cluster beta globinico. Le due luciferasi agiscono su substrati differenti e perciò dal rapporto della loro attività è possibile risalire all'entità dell'attivazione dei due promotori.

Il CACCC box prossimale lega il fattore di trascrizione KLF1, indispensabile per la sua attivazione ed espressione eritroide specifica. Gli esperimenti sono stati condotti in colture cellulari e i risultati in saggi di espressione transiente mostravano che entrambi i CACCC box possono incrementare l'efficienza della trascrizione del promotore del gene δ globinico sia in sistemi di cellule

eritroidi sia in quelle non eritroidi e stato dimostrato inoltre che la presenza di un singolo sito di legame KLF1 (CACCC) è sufficiente per la riattivazione del promoter del gene delta globinico fino all'80% rispetto al promoter del gene β globinico.

Sulla base dei risultati ottenuti in vitro abbiamo intrapreso degli studi in vivo mediante la creazione di modelli murini transgenici contenenti gli stessi costrutti esaminati in vitro (HS2 δ FL β RL).

SAGGIO LUCIFERASI

Gli studi di espressione sono stati condotti su tre linee indipendenti HS2 δ MFL β RL e su tre linee di controllo HS2 δ wtFL β RL anche loro indipendenti .

Su queste linee sono stati portati a termine dissezioni degli organi ematopoietici a diversi stadi di sviluppo e precisamente:

- 10.5 giorni post coitum (pc): corrispondente al periodo embrionale
- 12.5 giorni pc: corrispondente alla prima fase dell'ematopoiesi fetale. È la fase dello switching emoglobinico in cui si ha il passaggio dall'emoglobina embrionale a quella fetale adulta.
- 14.5 giorni pc: corrispondente all'ematopoiesi fetale murina. Questa fase è considerata corrispondente al periodo adulto nell'uomo in quanto il topo non possiede dei geni globinici espressi esclusivamente nel periodo fetale diversi da quelli adulti.
- 16.5 giorni pc: corrispondente all'ematopoiesi adulta murina

Per ogni linea transgenica sono state analizzate tre diverse gravidanze. L'estratto proteico è stato ottenuto mediante omogeneizzazione dei tessuti eritropoietici in buffer di lisi per l'analisi dell'attività luciferasica.

I risultati sono stati espressi come percentuale di espressione del promoter del gene δ globinico rispetto al β .

Considerando le due differenti attività dei due enzimi reporters i nostri risultati indicano che durante l'eritropoiesi embrionale, a 10.5 giorni pc non c'è una differenza significativa da un punto di vista statistico tra l'espressione del promoter del gene δ globinico wt (19,27 \pm 8,3) e il promoter del gene

δ globinico che porta la sequenza consensus per KLF1 ($27,09\% \pm 9,61$) rispetto al promoter del gene β .

Il livello di espressione del promoter del gene δ globinico mutato raggiunge alti livelli di espressione nel fegato fetale a 12.5pc ($85,07\% \pm 15,8$ – t test $1,57164E-06$), 14.5pc ($78,74\% \pm 22,6$ – t test 0.0002) e 16.5pc ($97,35\% \pm 29,3$ – t test 0.0006), figura 6.

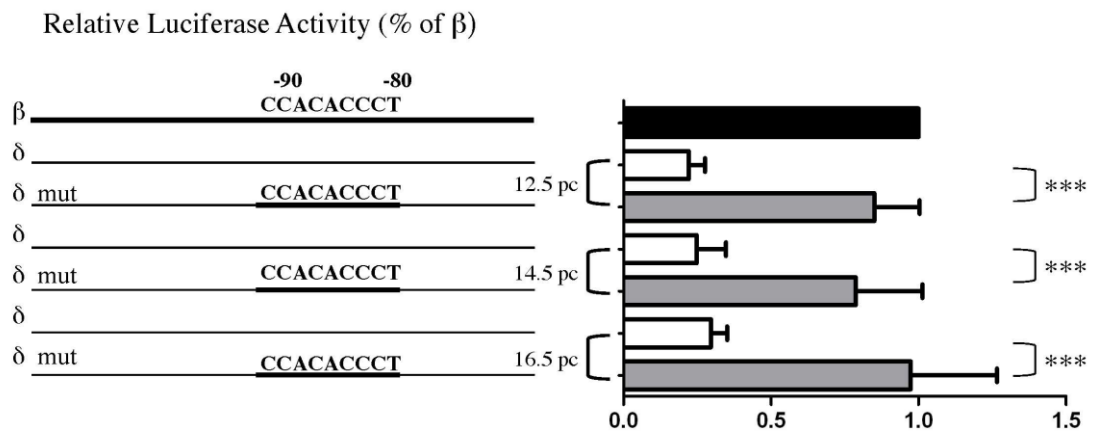


Figura 6: Espressione relativa del promoter wt δ e dei promoter mutanti contenenti il CACCC prox in saggio di espressione luciferasica a diversi stadi dello sviluppo. Il gene β wt, il gene δ e i promoter mutanti sono rappresentati schematicamente a sinistra. Le sequenze derivate dai geni β e δ sono indicati con linee spesse e sottili rispettivamente. Sulla destra, allineata ai costrutti corrispondenti l'attività relativa della Luciferasi (RLA) espressa come percentuale di attività del promoter β globinico wt.

Questi livelli di espressione sono in accordo con i risultati ottenuti in vitro e ci indicano che effettivamente il gene δ globinico può essere attivato in vivo nel periodo fetale e adulto con la semplice inserzione del CACCC prossimale del promoter del gene β globinico.

Inoltre dai risultati si evince che l'attivazione è "stage" specifica (solo nell'eritropoiesi definitiva) e tessuto specifica.

Tali livelli di attivazione dovrebbero essere sufficienti a compensare la perdita della produzione di catene β globiniche nella beta talassemia.

ANALISI S1 NUCLEASI E PCR QUANTITATIVA

Con il secondo costrutto prodotto, costituito dal micro LCR (HS1-HS4) e dal gene δ globinico umano guidato dal promoter contenente il CACCC abbiamo prodotto tre linee indipendenti singola copia (CACCC δ M-LCR) con le quali abbiamo analizzato il livello di espressione del gene δ globinico. In particolare per verificare e quantificare il livello di espressione del gene δ globinico, abbiamo analizzato, mediante S1nucleasi e RT-qPCR, l'RNA estratto dal sangue di topi omozigoti ed eterozigoti per il transgene.

In particolare, nell'esperimento S1 nucleasi l'obiettivo era quello di analizzare il livello di espressione del gene δ globinico in comparazione con il gene endogeno β major della nostra linea transgenica CACCC δ M-LCR.

Abbiamo utilizzato una probe S1 costituita da un mix di "mouse α e human δ globin". Come controllo negativo per l'espressione del gene δ globinico abbiamo incluso anche RNA di un topo wt. I risultati mostrano i frammenti attesi per il mouse mRNA (nel wt e nel CACCC δ M-LCR sample) e human δ mRNA solo ed esclusivamente nel campione CACCC δ M-LCR.

Inoltre, per quantizzare l'espressione del gene δ globinico abbiamo fatto una RT-qPCR sull'mRNA estratto dal sangue di topi omozigoti ed eterozigoti per il transgene.

Per avere un confronto fra i livelli di espressione del gene δ globinico guidato dal promoter wild-type e quelli dello stesso gene guidato dal promoter mutato con l'introduzione della sequenza CACCC, abbiamo estratto l'RNA anche da un topo di un'altra linea transgenica (Ln72) in cui è presente l'intero cluster β globinico umano.

I risultati della RT-qPCR sono riportati nel grafico (figura 7) dove si può osservare che il livello di espressione è più alto nei topi eterozigoti della linea CACCC δ M-LCR (circa 8.9 fold) rispetto a quello del topo della Ln72.

Il livello di espressione, come ci si aspettava, è quasi raddoppiato nei topi omozigoti rispetto a quelli eterozigoti della linea CACCC δ M-LCR (circa 18-fold).

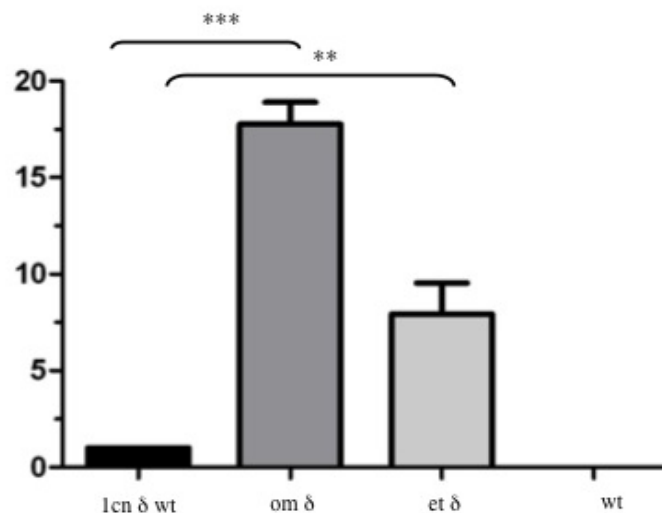


Figura 7: Il grafico mostra i livelli d'espressione in vivo del transgene δ . Come controllo interno è stato utilizzato il gene gapdh.

L'esperimento dimostra in vivo la capacità del promoter mutato di aumentare l'espressione del gene δ globinico, fatto in precedenza dimostrato in vitro dal nostro gruppo di ricerca, (18).

ANALISI EMATOLOGICHE

Analisi degli indici ematici

L'analisi degli indici ematici permette di osservare le variazioni dei diversi parametri nei topi con genotipi differenti e di mettere in luce gli eventuali miglioramenti in quelli in cui è espressa la catena δ globinica.

Il livello di emoglobina nel sangue è stato analizzato sia con l'HemoCue Plasma/Low Hb Photometer che con il contatore ematologico automatico per veterinaria, MS4. Grazie all'MS4 sono stati ottenuti anche i valori di altri parametri ematici, quali:

- RBC (Conta dei globuli rossi),
- HCT (ematocrito),
- MCV (volume corpuscolare medio),
- MCH (valore emoglobinico medio),
- RDW (Red cell Dispersion Width, indice di distribuzione dei volumi

eritrocitari).

Il grafico (Figura 8) mostra le medie dei livelli totali di emoglobina nel sangue e le deviazioni standard, ponendo a confronto i diversi genotipi. Per costruirlo sono state prese in considerazione tutte le misurazioni, sia i dati ottenute utilizzando l'HemoCue che quelle effettuate con l'MS4.

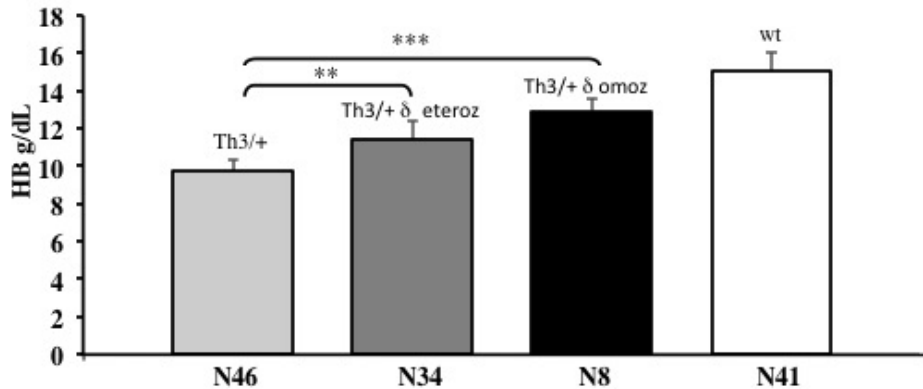


Figura 8: Livelli dell'emoglobina.

Nel grafico sono rappresentati i diversi livelli dell'emoglobina: in grigio chiaro i Th3/+, sono stati esaminati 46 topi, in grigio scuro i Th3/+ δ /-, 34 topi esaminati, in nero i Th3/+ δ / δ , 8 topi esaminati, in bianco i WT, 41 topi esaminati.

I topi wild type da noi analizzati hanno un livello medio di emoglobina di $14,49 \pm 1,28$ g/dL, mentre i topi Th3, il livello è di $8,75 \pm 0,97$ g/dL. Negli animali con genotipo Th3/+ δ /- il livello di emoglobina è agli $11,31 \pm 0,97$ g/dL, mentre in quelli con genotipo Th3/+ δ / δ si raggiungono i $12,96 \pm 0,59$ g/dL. È stato eseguito il Test di Student (T-test) per verificare la significatività della differenza riscontrata fra i valori dell'Hb fra Th3/+ e Th3/+ δ /- (p.value <0,0001), Th3/+ e Th3/+ δ / δ (p.value <0,0001).

Il grafico mostra valori di emoglobina più alti nei topi in cui è presente il gene δ globinico rispetto ai Th3/+; l'espressione della catena δ globinica porta, quindi, ad un effettivo aumento dell'emoglobina totale che si quantifica in circa 3 g/dL in più nei soggetti con il transgene in omozigosi.

L'RBC è il parametro che indica il numero di globuli rossi presenti in un millimetro cubo di sangue, l'unità di misura è 10^6 cell/mm³. Il grafico (figura

9) mostra i valori dell'RBC e le deviazioni standard e pone a confronto i diversi genotipi analizzati.

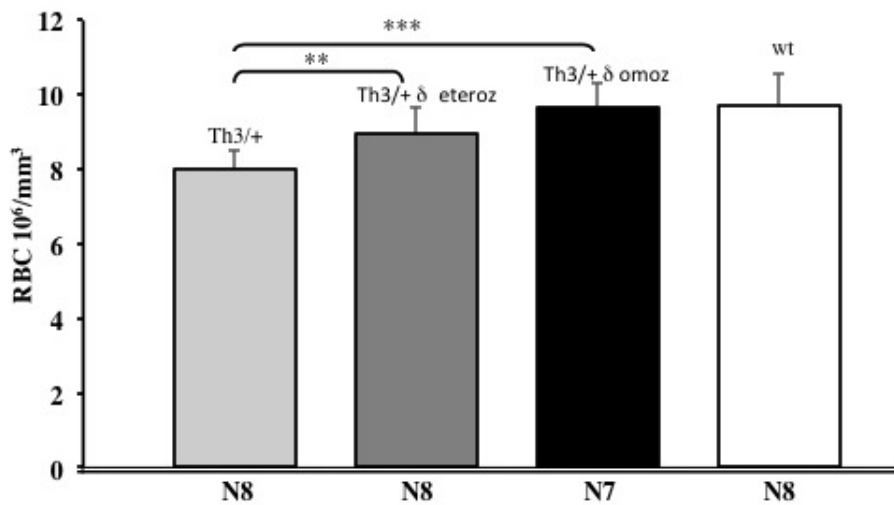


Figura 9: RBC Numero di globuli rossi nel sangue.

Nel grafico sono rappresentati i diversi valori dell' RBC: in grigio chiaro i Th3/+, sono stati esaminati 8 topi, in grigio scuro i Th3/+ δ/-, 8 topi esaminati, in nero i Th3/+ δ/δ, 7 topi esaminati, in bianco i WT, 8 topi esaminati.

Nei topi wt il valore di questo parametro è $9,37 \pm 0,86$ cell/mm³. L'RBC ha valori più bassi nei topi Th3/+, $8,01 \pm 0,51$ cell/mm³. Negli animali che esprimono la catena globinica δ si osserva un numero maggiore di globuli rossi. Il valore dell'RBC aumenta sia nei topi Th3/+ δ/-, con $8,95 \pm 0,73$ cell/mm³, che nei topi Th3/+ δ/δ con $9,68 \pm 0,61$ cell/mm³. Nei topi con il gene δ in omozigosi, il valore del parametro si avvicina molto a quello dei topi wild type. È stato eseguito il Test di Student (T-test) per verificare la significatività della differenza riscontrata fra i valori dell'RBC fra Th3/+ e Th3/+ δ/- (p.value = 0,0019), Th3/+ e Th3/+ δ/δ (p.value < 0,0001).

L'ematocrito è la percentuale di elementi corpuscolati (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine) presenti nel sangue. È un indice molto importante nella valutazione dello stato anemico, poiché in tal caso il valore dell'ematocrito risulta diminuito. Nel grafico (figura 10) sono indicate le medie e le deviazioni standard dei valori dell'HCT dei genotipi analizzati.

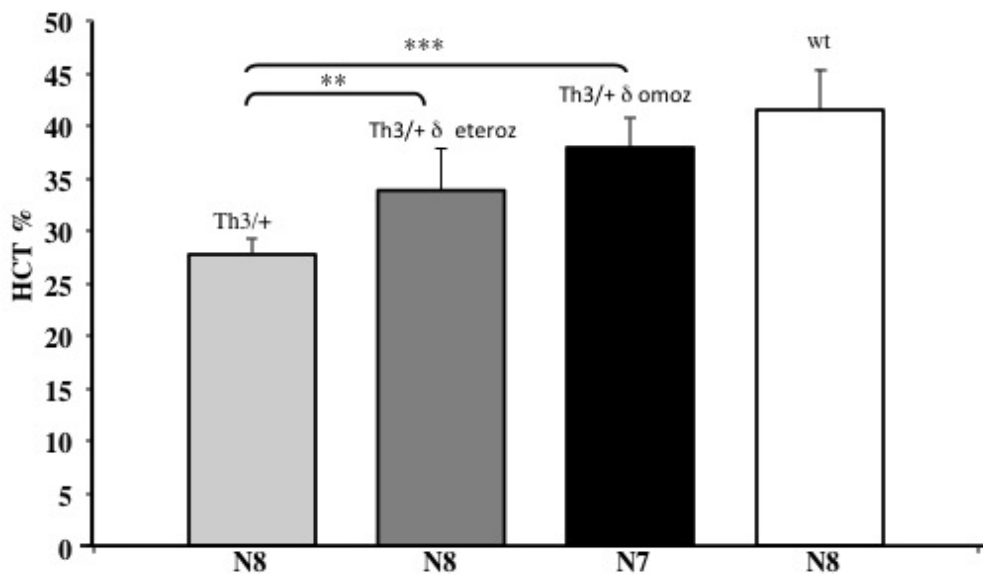


Figura 10: HCT, Ematocrito.

Nel grafico sono rappresentati i diversi valori dell'HCT: in grigio chiaro i Th3/+, sono stati esaminati 8 topi, in grigio scuro i Th3/+ δ -, 8 topi esaminati, in nero i Th3/+ δ / δ , 7 topi esaminati, in bianco i WT, 8 topi esaminati. L'HCT nei topi wild type è di $41,46 \pm 3,80$ %, nei topi Th3/+ diminuisce notevolmente a $27,88 \pm 1,34$ %, indicando la forte anemia. Negli animali con genotipo Th3/+ δ - si ha una percentuale del $33,89 \pm 4,07$ %, in quelli Th3/+ δ / δ del $37,90 \pm 2,94$ %. È stato eseguito il Test di Student (T-test) per verificare la significatività della differenza riscontrata fra i valori dell'HCT fra Th3/+ e Th3/+ δ - (p.value = 0,0014), Th3/+ e Th3/+ δ / δ (p.value < 0,0001).

I valori sono quindi più alti nei topi con il gene δ rispetto a quelli dei topi Th3/+, questo denota il miglioramento dello stato anemico. Ciò indica la capacità di risanamento sul fenotipo talassemico dovuto alla presenza della globina δ .

L'MCH indica la quantità media di emoglobina in ciascun globulo rosso, si ottiene dividendo la quantità di emoglobina (per litro di sangue) per il numero di eritrociti (per litro), e si misura in picogrammi pg. Questo parametro si usa per valutare l'anemia e l'ipocromia che sono maggiormente presenti se il valore è basso.

Il grafico (figura 11) mostra le medie e le deviazioni standard dei livelli

dell'MCH nei diversi genotipi e li compara.

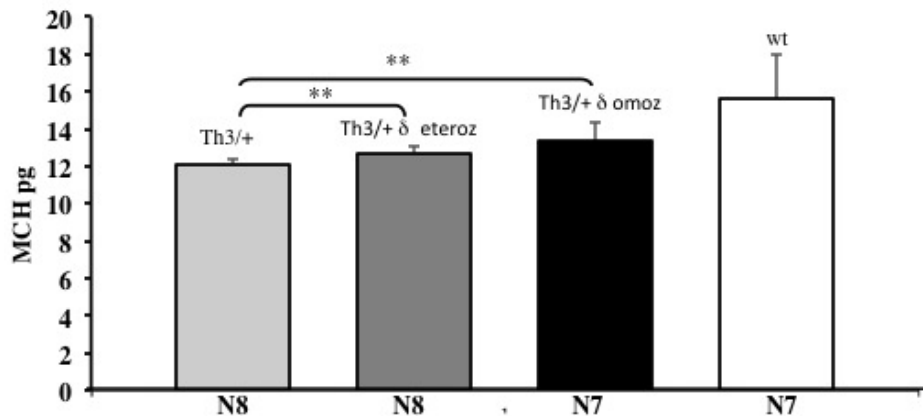


Figura 11: MCH, Livelli di emoglobina in ciascun GR.

Nel grafico sono rappresentati i diversi valori dell'MCH: in grigio chiaro i Th3/+, sono stati esaminati 8 topi, in grigio scuro i Th3/+ δ/-, 8 topi esaminati, in nero i Th3/+ δ/δ, 7 topi esaminati, in bianco i WT, 7 topi esaminati.

Nei topi wt il valore è di 15,61±2,35 pg, mentre nei Th3/+ scende a 12,14±0,28 pg. L'MCH nei topi positivi per il transgene δ aumenta rispetto ai Th3/+: nei soggetti Th3/+ δ/- il valore è di 12,73±0,33 pg, nei Th3/+ δ/δ è di 13,36±0,95 pg. È stato eseguito il Test di Student (T-test) per verificare la significatività della differenza riscontrata fra i valori dell'MCH fra Th3/+ e Th3/+ δ/- (p.value =0,0019), Th3/+ e Th3/+ δ/δ (p.value<0,0040).

L'aumento del numero degli eritrociti e dell'emoglobina totale nei topi che possiedono il gene δ, fa sì che gli stessi topi abbiano un valore più alto di questo parametro.

L'MCV è un parametro che indica le dimensioni medie dei globuli rossi presenti nel flusso sanguigno, l'unità di misura è il micrometro, μm, valori bassi indicano presenza di microcitosi. Nel grafico (figura 12) sono indicati i valori dell'MCV con le devizioni standard e vengono posti a confronto i 4 genotipi analizzati.

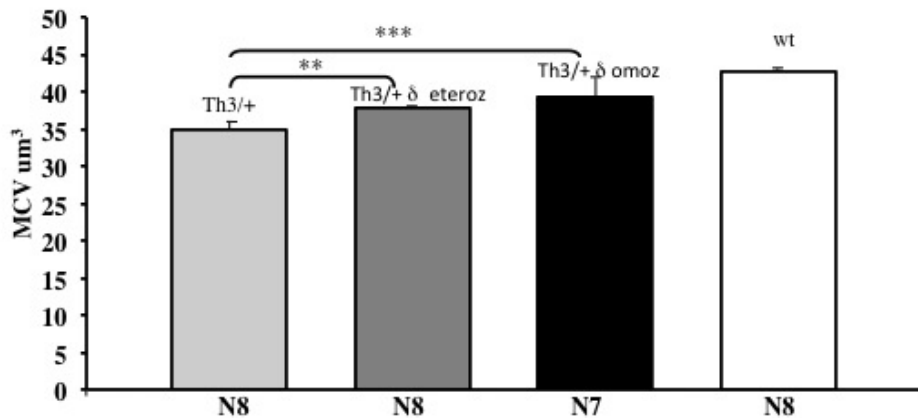


Figura 12: MCV, Volume Corpuscolare Medio.

Nel grafico sono rappresentati i diversi valori dell'MCV: in grigio chiaro i Th3/+, sono stati esaminati 8 topi, in grigio scuro i Th3/+ δ⁻, 8 topi esaminati, in nero i Th3/+ δ/δ, 7 topi esaminati, in bianco i WT, 8 topi esaminati.

Il topi WT hanno un volume corpuscolare medio di 42,69±0,45 μm Nei topi Th3/+ le dimensioni degli eritrociti sono variabili, molti di essi sono più piccoli della norma, questo porta ad un valore dell'MCV di 34,89±1,0 μm, più basso rispetto al wt.

Nei topi Th3/+ δ⁻ il valore è di 37,81±1,97 μm, in quelli Th3/+ δ/δ è di 39,24±2,60 μm. Questi numeri sono più simili a quelli dei topi wt, questo indica che anche la microcitemia è minore grazie alla presenza del gene δ. È stato eseguito il Test di Student (T-test) per verificare la significatività della differenza riscontrata fra i valori dell'MCV fra Th3/+ e Th3/+ δ⁻ (p.value =0,0019), Th3/+ e Th3/+ δ/δ (p.value=0,0027).

Il parametro RDW indica la distribuzione dei volume eritrocitari, dà quindi un'idea dell'omogeneità delle dimensioni di queste cellule. L'aumento del valore è indice di anemie sideropeniche, Il grafico (figura 13) mostra le medie e le deviazioni standard dei valori dell'RDW, confrontando i genotipi analizzati.

Nel grafico sono rappresentati i diversi valori dell'RDW: in grigio chiaro i Th3/+, sono stati esaminati 8 topi, in grigio scuro i Th3/+ δ⁻, 8 topi esaminati, in nero i Th3/+ δ/δ, 7 topi esaminati, in bianco i WT, 8 topi esaminati.

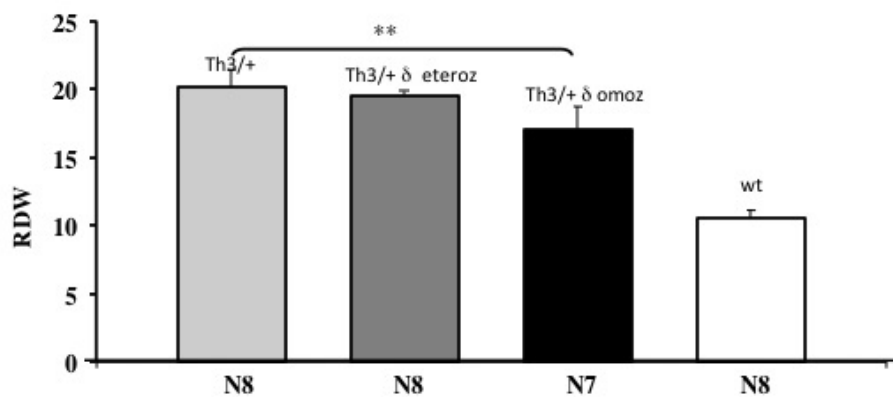


Figura 13: RDW, distribuzione dei volume eritrocitari

Nel sangue dei Th3/+ i globuli rossi hanno forme e dimensioni variabili (anisocitosi), quindi il parametro ha un valore di $20,14 \pm 1,25$, quasi il doppio del valore osservato nei topi wt, che è di $10,49 \pm 0,67$. Nei topi Th3/+ δ /- cala leggermente a $19,56 \pm 1,65$, in quelli Th3/+ δ/δ il valore scende ulteriormente a $17,09 \pm 1,62$. È stato eseguito il Test di Student (Ttest) per verificare la significatività della differenza riscontrata fra i valori dell'RDW fra Th3/+ e Th3/+ δ/δ (p.value=0,0012).

Morfologia globuli rossi

Lo striscio di sangue è stato utilizzato per un controllo dello stato di salute delle cellule ematiche e per eseguire un confronto fra i diversi soggetti in studio.

Il vetrino (figura 14) mostra lo striscio di sangue di un topo wild type in cui si osserva normocromia, assenza di cellule a bersaglio, assenza di schistociti ed omogeneità delle forme e dei volumi dei globuli rossi.

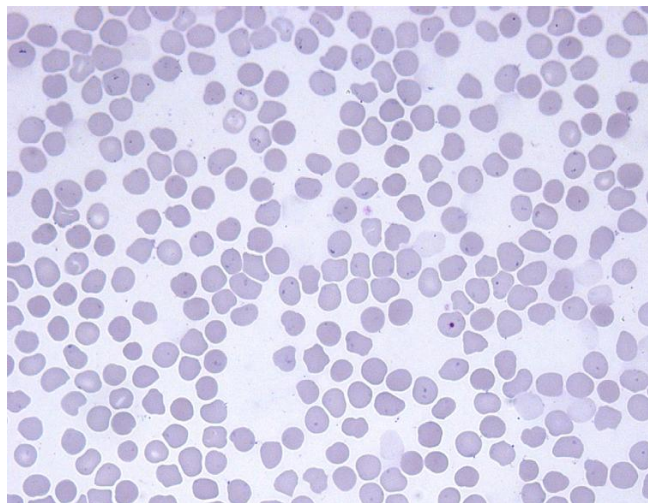


Figura 14: Striscio di sangue di un topo wt. Ingrandimento 63X

Il vetrino (figura 15) mostra lo striscio di sangue di un topo Th3/+ che presenta una situazione del tutto simile a quella descritta in letteratura; si nota ipocromia, anisopoichilocitosi, presenza di schistociti, reticolociti e cellule a bersaglio.

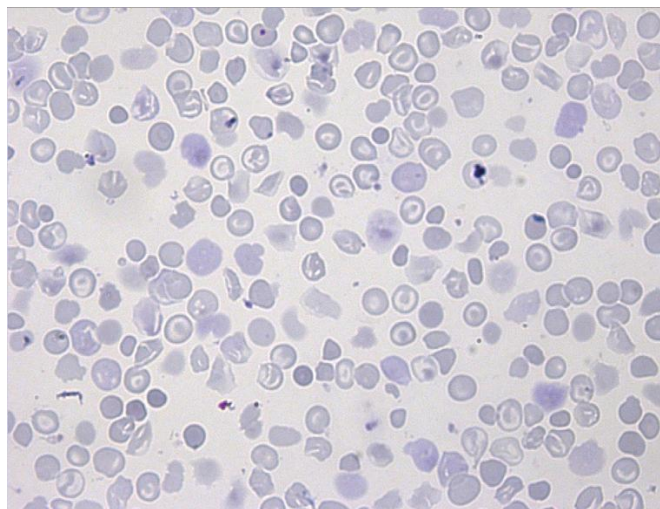


Figura 15: Striscia di sangue di un topo Th3. Ingrandimento 63X

Nello striscio di sangue di un topo Th3/+ eterozigote per il transgene δ , si notano diversi miglioramenti rispetto allo stato ematologico del Th3/+; tra cui la normocromia dei globuli rossi, grazie alla presenza di più emoglobina nel loro interno, lieve anisopoichilocitosi, la presenza di pochi schistociti e poche cellule a bersaglio. Il terzo vetrino (figura 16) mostra lo striscio di sangue di un topo Th3/+ omozigote per il transgene δ , in cui si osservano degli ulteriori miglioramenti rispetto al Th3/+ δ /-; si può notare la normocromia, la leggera anisopoichilocitosi e le poche cellule a bersaglio.

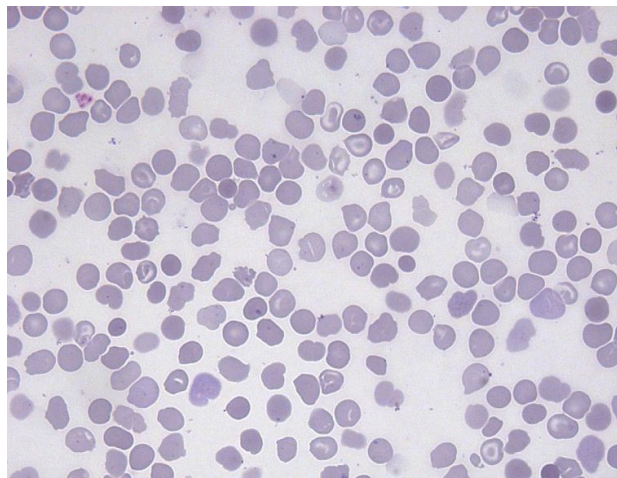


Figura 16: Striscio di sangue di un topo Th3/+ δ / δ ingrandimento 63X

High Performance liquid Chromatography (HPLC)

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) permette di identificare e quantizzare le globine presenti nel sangue dei topi analizzati.

L'immagine mostra il grafico risultante dall'HPLC, in effettuata su sangue di topi Th3/+ δ/δ .

Nel grafico (figura 17) oltre al picco della catena β si evidenzia la presenza del picco del δ umano che indica la corretta espressione di questa globina da parte del topo.

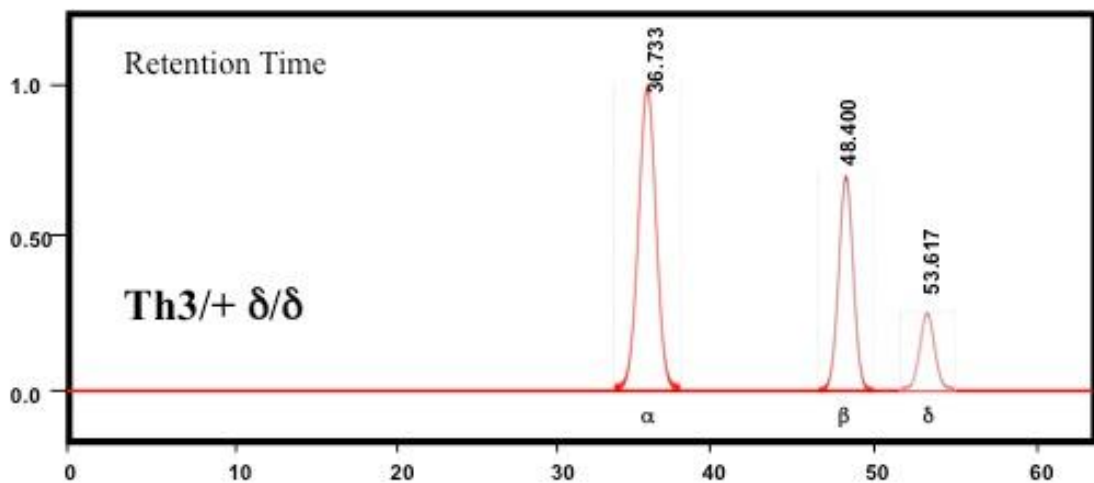


Figura 17: Hplc del sangue di un topo Th3/+ δ/δ con aplotipo singolo. Il grafico mostra picchi della globine α , β , δ ed i tempi di ritenzione.

DISCUSSIONE

Le beta talassemie sono malattie diffuse in tutto il mondo. Nonostante i numerosi passi avanti nella conoscenza, sia a livello molecolare sia fisiopatologico, e nelle terapie per trattare la malattia, la β talassemia rimane un'emergenza medica mondiale, (24).

Com'è noto la beta talassemia è la malattia genetica più diffusa in Sardegna, con un'incidenza di portatori che, in alcune zone, può raggiungere punte del 20% della popolazione. L'impatto di questa malattia in termini socio-economici e sanitari sul territorio è rilevante, e da molti anni le ricerche e gli studi per la prevenzione e la cura rappresentano uno degli obiettivi primari della ricerca scientifica. L'identificazione di nuovi approcci terapeutici in grado di migliorare le condizioni di vita dei pazienti talassemici è quindi un obiettivo fondamentale nella ricerca scientifica, e di particolare interesse in quella sarda. I pazienti con Talassemia Major e, in determinati casi, quelli con Talassemia intermedia richiedono trasfusioni di sangue al fine di portare la quantità di emoglobina nel sangue a livelli normali, 13-14 g/dl.

Le trasfusioni provocano un aumento del ferro nel sangue che deve essere chelato per evitare danni ossidativi a cellule e tessuti. Le proteine preposte all'up-take non sono sufficienti a sequestrare tutto il ferro in eccesso, per questo motivo si pratica la terapia ferrochelante. Ancora oggi, l'unica terapia risolutiva è il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, questa però è una tecnica che richiede la difficile ricerca di un donatore istocompatibile non sempre rintracciabile e con effetti collaterali che possono essere anche letali, (25). Finora la maggior parte degli studi si è focalizzata sulla riattivazione del gene γ globinico tramite l'uso di farmaci che ne aumentino l'espressione, con lo scopo ultimo di aumentare i livelli di emoglobina fetale HbF. I lavori degli ultimi anni hanno consentito di rilevare anche se in modo incompleto il meccanismo molecolare della transizione HbF \rightarrow A.

Studi recenti (27) hanno evidenziato che i fattori di trascrizione KLF1 e

BCL11A giocano un ruolo fondamentale nella transizione HbF→A.

KLF1 è capace di attivare l'espressione del gene β -globinico ma anche di BCL11A. BCL11A è un regolatore negativo dell'espressione dei geni γ . Nel periodo fetale si osservano basse concentrazioni di KLF1. Ne consegue ridotta espressione di β -globina e di BCL11A che determina elevata espressione di catene γ .

Nel periodo postnatale aumenta la produzione di KLF1. La produzione di β -globina viene attivata e contemporaneamente KLF1 stimola l'espressione di BCL11A che a sua volta silenzia i geni γ -globinici.

Alla luce di queste conoscenze si possono postulare due alternative potenzialmente capaci di attivare farmacologicamente la produzione di HbF:

- Inibizione controllata di KLF1 con conseguente riduzione dell'espressione di BCL11A ed aumentata produzione di catene γ ;
- Inibizione diretta di BCL11A, con aumento di espressione dei geni γ -globinici probabilmente preferibile per evitare eventuali effetti negativi nell'espressione dei geni β -globinici in seguito all'inibizione di KLF1.

In alternativa potrebbe essere sperimentata una terapia genica con costrutti contenenti shRNA inibenti BCL11A in accordo agli esperimenti coronati da successo su cellule CD34.

Un'altra linea di ricerca è impegnata nel valutare la possibilità di applicare la terapia genica per correggere il difetto molecolare tramite l'inserimento di un gene β normale in cellule staminali ematopoietiche (HSCs).

Nel 2000 il gruppo di ricerca guidato da Sadelain ha pubblicato il primo lavoro dove un modello murino di talassemia intermedia è stato curato utilizzando un vettore lentivirale, (28).

Subito dopo, la reale efficacia terapeutica è stata dimostrata in un modello murino di anemia falciforme e anche in un modello murino di beta talassemia (29, 30).

Dopo molti esperimenti portati avanti con l'utilizzo di modelli murini, nel 2006 in Francia c'è stato il primo studio di terapia genica per β -talassemia e dell'anemia falciforme sull'uomo. Questo primo studio però non diede i risultati sperati. Invece, il secondo paziente in cui è stato eseguito il trapianto a

diciotto anni (nel giugno del 2007) dopo quaranta mesi dal trapianto non esegue più trasfusioni (12).

In questo scenario il nostro progetto di ricerca si presenta come un progetto alternativo per la cura della beta talassemia e dell'anemia falciforme.

Il nostro lavoro puntava all'ottenimento di una maggiore espressione del gene δ globinico e ad un conseguente aumento dell'emoglobina adulta HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$).

I motivi che hanno portato alla scelta del gene δ globinico risiedono nel fatto che l'HbA₂ possiede proprietà biochimiche e funzionali simili a quelle dell'HbA e cioè:

- stessa affinità per l'ossigeno,
- stesso effetto Bohr,
- simile risposta al 2,3-bifosfoglicerato.

Inoltre l'HbA₂ ha una distribuzione pancellulare nel sangue, a differenza dell'HbF che è presente solo in particolari eritrociti, le cellule F, (26).

I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che il gene δ globinico umano può essere attivato in vivo nel periodo murino fetale (corrispondente al periodo adulto umano) ad un livello sufficiente a compensare lo sbilancio delle catene α/β nella beta talassemia. Il livello di attivazione ottenuto è anche sufficiente a produrre un effetto antifalcemico ed è quindi potenzialmente terapeutico nell'anemia falciforme.

Inoltre nel nostro lavoro viene avvalorata la capacità terapeutica del gene δ globinico di migliorare il fenotipo clinico in un topo affetto da talassemia intermedia (Th3/+).

Gli strisci di sangue dei topi nati dall'incrocio indicano un miglioramento del quadro ematologico rispetto ai topi Th3/+, infatti, nei vetrini dei topi con genotipo Th3/+ δ^- o Th3/+ δ/δ si nota una diminuzione di caratteristiche patologiche come l'ipocromia o l'anisopoichilocitosi.

Le analisi del sangue confermano tale miglioramento mostrando:

l'aumento del numero dei globuli rossi, circa $1,67 \text{ cell/mm}^3$ in più nei topi Th3/+ δ/δ rispetto ai Th3/+;

l'aumento dell'emoglobina presente nei globuli rossi, oltre 1 pg di emoglobina in più nei globuli rossi dei topi Th3/+ δ/δ rispetto ai Th3/+;

l'aumento dei livelli di emoglobina totale, nei topi Th3/+ δ/δ , sono presenti in media ≈ 3 g/dL in più rispetto ai topi Th3/+;

I risultati da noi ottenuti, in particolare l'aumento di emoglobina di circa 3 g/dL, potrebbero evitare le trasfusioni ai malati di talassemia intermedia.

Questo studio apre nuove prospettive di ricerca sulla conoscenza della malattia e sulla sua cura. Il gene δ globinico potrebbe diventare target di nuovi farmaci che ne aumentino l'espressione.

Ciò che ha reso più alta l'espressione del gene δ è l'inserimento nel promoter δ della sequenza CACCC, che permette il legame del fattore di trascrizione KLF1. Nell'applicazione pratica l'attivazione del gene δ globinico potrebbe essere ottenuta con l'utilizzo di molecole che siano in grado di svolgere lo stesso compito di KLF1 selezionate attraverso high throughput screening. Per selezionare molecole in grado di attivare il promoter del gene δ globinico potrebbe essere utilizzata la linea transgenica HS2 δ FL β RL contenente i promoter wt dei geni δ e β precedentemente descritta e utilizzare cellule di fegato fetale e di midollo osseo adulto di topi di questa linea come materiale biologico su cui effettuare un high throughput screening alla ricerca di molecole capaci di attivare l'espressione del gene δ . Si potrebbe anche mutare il promoter δ tramite terapia genica.

Un altro gruppo di ricerca ha da poco pubblicato un lavoro su una proteina di fusione, KLF1-GATA1, in cui sono presenti il dominio trans attivatore N-terminale di KLF1 ed il dominio Zinc-Finger di GATA1, capace di legarsi a sequenze consensus presenti nei promotori dei geni β - γ - δ globinici ed aumentarne l'espressione. L'espressione del gene δ globinico è quella più influenzata dal legame con questa particolare proteina, (31).

In conclusione, con il nostro lavoro siamo riusciti a dimostrare che il gene δ globinico può essere considerato un gene terapeutico per la cura della beta talassemia e dell'anemia falciforme, inoltre dimostrando che la sua attivazione non è tossica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) I principi di biochimica di Lehninger (David L. Nelson, Michael M. Cox) Zanichelli Quinta edizione, (2010).
- (2) CAO A, GALANELLO R. "Le emoglobinopatie" in "Trattato italiano di medicina di laboratorio, Vol.II Biochimica clinica speciale. Piccin .
- (3) Qiliang Li, Kenneth R. Peterson, Xiangdong Fang, and George Stamatoyannopoulos
Locus control regions, *Blood*. 2002 November 1; 100(9): 3077–3086.
- (4) Stamatoyannopoulos G and Grosveld F (2001) Hemoglobin switching. In Stamatoyannopoulos,G., Majerus,P., Perlmutter,R. and Varmus,H. (eds), *The Molecular Basis of Blood Diseases*. W.B.Saunders, Philadelphia, PA.
- (5) Genes IX
Benjamin Lewin, Jones & Bartlett Publishers; 9 edition (March 5, 2007).
- (6) Harju S, McQueen KJ, Peterson KR: *Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. Exp Biol Med (Maywood)*. 2002 Oct;227(9):683-700. Review.
- (7) J.Weatherall and J.B.Clegg ,The Thalassaemia Syndromes,
Fourth edition Blackwell Science.
- (8) CASTOLDI GL, CUNEO A. "Sindromi talassemiche" in CASTOLDI G, LISO V, "Malattie del sangue e degli organi ematopoietici", Sec. Ed., cap 3 pagg 71-84, (1997).
- (9) Sadelain M., Lisowski L., Samakoglu S., RIVELLA S., May C., Riviere I.,

Progress Toward the Genetic Treatment of the β -Thalassemias (2005).

(10) New York Academy of Sciences, n°1054, pp 78-91 (Sadelain M. et al., 2005).

(11) Persons D.A., Hematopoietic stem cell gene transfer to the treatment of hemoglobin disorders (2009) American society of hematology vol .1 pp.690-695 (Persons D.A., 2009).

(12) Cavazzana-Calvo M. et al, Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia (2010) Nature, vol. 467, pp. 318-323 (Cavazzano-Calvo et al., 2010).

(13) Bieker JJ. Putting a finger on the switch. Nature Genet. 2010;42:733-4.

(14) Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Gene Reviews 2010.

(15) Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A. Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1202:64-8.

(16) Yang B., Kirby S., Lewis J., Detloff P.J., Maeda N. and Smithies O., A mouse model for β^0 -thalassemia (1995) Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS), vol 92 pp 11608-11612..

(17) Hempe J.M., Ory-Ascani J. and Hsia D., Genetic variation in mouse beta globin cysteine content modifies glutathione metabolism : Implications for the use of mouse models (2007) Experimental biology and medicine, vol. 232, no3, pp. 437-444.

(18) RISTALDI MS, CASULA S, PORCU S, MARONGIU MF, PIRASTU M, CAO A. "Activation of the delta-globin gene by the beta-globin gene CACCC motif", *Blood Cells Mol Dis*. 1999 Jun-Aug;25(3-4):193-209.

- (19) SARKAR G, SOMMER SS. “The “megaprimer” method of site-directed mutagenesis”, *Biotechniques* 8:404–407 (1990).
- (20) TRUDEL M, MAGRAM J, BRUCKNER L, COSTANTINI F. “Upstream G gamma-globin and downstream beta.globin sequences required for stage.specific expression in transgenic mice”, *Mol Cell Biol* 1987;7:4024-9).
- (21) Berry M, Dillon N, Grosveld F. A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature* 1992;358(6386):499-502.
- (22) Stroubulis J, Dillon N, Grosveld F. Developmetal regulation of a complete 70kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev.* 1992;6(10):1857-1864.
- (23) Livak K.J. and Schmittgen T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method (2001) *Methods*, vol 24, n°4, pp. 402-408.
- (24) Weatherall D.J. and Clegg J.B., Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem, (2001) *Bulletin of World Health Organization*, vol 79, pp. 704-712. (Weatherall D.J. and CleggJ.B.,2001.
- (25) Antonio Cao, Paolo Moi, Renzo Galanello Recent advances in β -thalassemias
Pediatr Rep. 2011 June 16; 3(2).
- (26) Steinberg M.H. and Adams III J.G., Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath (1991) *Blood*, vol 78, n° 9, pp. 2165-217. (Steinberg M.H. and Adams III J.G., 1991).
- (27) Zhou D, Liu K, Sun CW, et al.

KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*, 2010;42:742-4.44.

(28) May C, Sadelain M.

A promising genetic approach to the treatment of beta-thalassemia.

Trends Cardiovasc Med, 2001;11:276-80.

(29) Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, et al.

Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy.

Science 2001;294:2368-71.138.

(30) Rivella S, May C, Chadburn A, et al. M.

A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood* 2003;101:2932-9.

(31) Zhu J., Chin K, Aerbajinai W., Trainor C., Gao P. and Rodgers G.P.

Recombinant erythroid Kruppel-like factor fused to GATA1 upregulates globin expression in erythroid cells (2011) *Blood* (Zhu J. et al., 2011).