



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

Dottorato di Ricerca (XX ciclo)
"Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo"
Coordinatore Scientifico: Prof. Renzo Galanello
(MED 03)

**ETEROGENEITA' MOLECOLARE DEL DIFETTO DI GLUCOSIO-6-
FOSFATO DEIDROGENASI (G6PD) IN SARDEGNA**

Tutor:
Prof. Renzo Galanello

Tesi di dottorato di:
Dott.ssa Maria Carla Sollaino

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 ETEROGENEITA' GENETICA E DISTRIBUZIONE ETNICA.....	6
1.2 ETEROGENEITA' MOLECOLARE DELLA G6PD IN ITALIA.....	12
1.3 ASPETTI CLINICI.....	12
1.4 TERAPIA.....	15
2. OBIETTIVI.....	16
3. MATERIALI E METODI	17
3.1 PAZIENTI	17
3.2 ESAMI DI LABORATORIO	17
4. RISULTATI.....	26
5. DISCUSSIONE.....	28
6. BIBLIOGRAFIA	32

1. INTRODUZIONE

La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è un enzima ubiquitario che catalizza la prima reazione della via metabolica degli esoso-monofosfati o shunt dei Pentoso-fosfati, di cui rappresenta la tappa limitante (Fig 1). La sua funzione consiste nella ossidazione del glucosio-6-fosfato in 6-fosfogluconolattone con produzione di potere riducente sotto forma di NADPH (nicotinamide adenin dinucleotide fosfato ridotta), ma anche di ribosio per la sintesi dei nucleotidi e molecole degradabili nel processo della glicolisi per la produzione di energia.

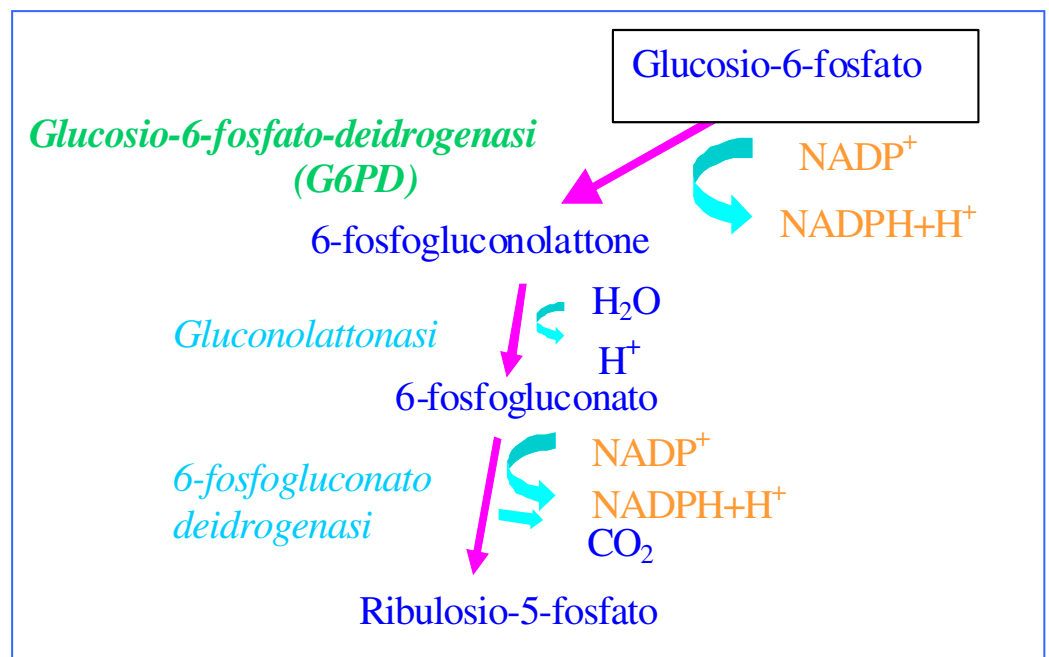


Fig. 1 Via dei pentoso fosfati.

Questa reazione è particolarmente importante per i globuli rossi in quanto è l'unica fonte di NADPH, che viene utilizzato per la detossificazione e protezione dell'eritrocita dai danni ossidativi. Durante il processo di maturazione infatti gli eritrociti perdono nucleo, mitocondri e ribosomi, e quindi non possono sintetizzare né NADPH con altri processi, né altro enzima se questo viene a mancare o è deficitario. Inoltre va sottolineato che la loro stessa funzione porta alla produzione di forme tossiche dell'ossigeno durante il trasporto e quindi si rende necessario NADPH.

La carenza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi è la più frequente enzimopatia conosciuta e riguarda più di 400 milioni di persone nel mondo, con frequenze elevate nelle aree tropicali e subtropicali dell'Africa, in alcune zone del bacino del Mediterraneo fino al Medio Oriente e all'Asia. In Italia le regioni maggiormente interessate sono la Sardegna, la Sicilia e altre regioni meridionali¹.

Tale distribuzione coincide con quella che aveva nei tempi di endemia malarica il Plasmodium Falciparum² ed è dovuta al fatto che il deficit di G6PD conferisce agli individui eterozigoti una relativa resistenza alla malattia. Gli eritrociti carenti rappresentano un luogo inospitale per il merozoita, sia per la ridotta capacità di produrre potere riducente contro i danni ossidativi, che per la ridotta produzione del ribosio necessario alla formazione dei suoi nucleotidi purinici. Il difetto non riduce la probabilità di ammalarsi ma tende a ridurre la frequenza e l'intensità della malattia.

Il locus per l'enzima è localizzato nel braccio lungo del cromosoma X, in posizione Xq28³. Il deficit della G6PD viene trasmesso quindi con modalità legata all' X alla prole. La condizione di deficit enzimatico è più grave nei maschi che, essendo emizigoti, possiedono solo l'allele "mutato". Le femmine eterozigoti presentano quadri clinici variabili giustificati dal fatto che la lyonizzazione, cioè l'inattivazione di uno dei due cromosomi X, permette di avere una popolazione di emazie costituita da cellule prive di attività enzimatica e da cellule con attività normale. Le femmine omozigoti o con

lyonizzazione sbilanciata avranno un quadro clinico simile a quello dei maschi emizigoti.

Il gene della G6PD, che fu clonato e sequenziato da Persico e coll.⁴ è costituito da 13 esoni, di cui il primo non codificante, e 12 introni.

La biosintesi avviene nel citoplasma dei globuli rossi immaturi, che possiedono un nucleo e un apparato biosintetico ancora attivi, e da luogo ad una proteina di 515 aminoacidi costituente la subunità monomerica dell'enzima G6PD.

La struttura tridimensionale della G6PD umana è stata dedotta da quella della G6PD del microrganismo *Leuconostoc Mesenteroides*⁵, che è stata perfettamente definita.

L'enzima è stato ritrovato in forme monomeriche, dimeriche e tetrameriche. La sua forma attiva consiste in un insieme di dimeri (fig. 1) e tetrameri⁷, a seconda dei valori del pH intraeritrocitario, costituiti da subunità monomeriche di uguale struttura.

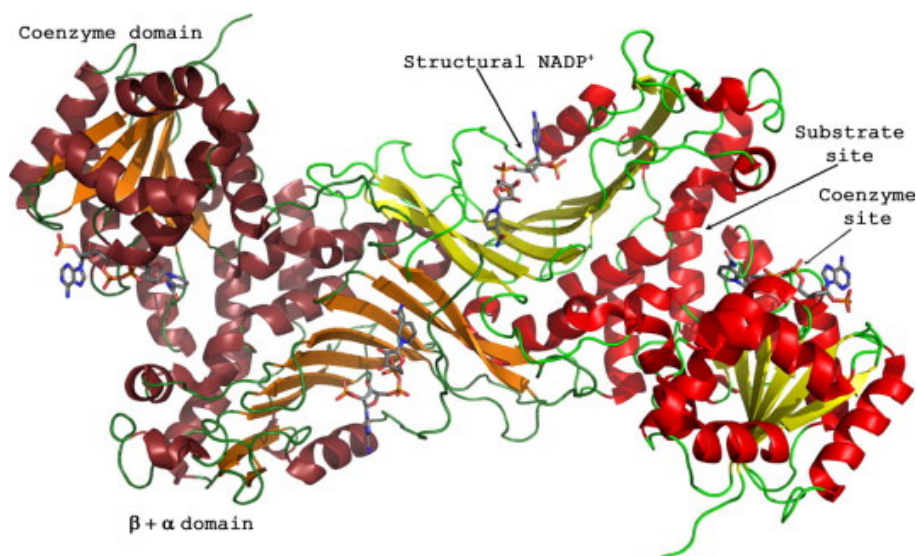


Fig. 2 Modello del dimero G6PD umano.

NADP⁺ è uno dei substrati dell'enzima così come il G6P, il cui sito di legame è stato identificato nella lisina 205^{8,9}. I quattro monomeri interagiscono in modo che il legame tra il NADP⁺ e una parte dell'enzima faciliti il successivo

legame con le altre parti della molecola, con un andamento di tipo iperbolico. Il NADPH è, invece, un inibitore a feed-back negativo della G6PD.

1.1 Eterogeneità genetica e distribuzione etnica.

La G6PD è la proteina dotata del maggior numero di varianti geniche. Sono state riconosciute più di 440 varianti¹⁰ diffuse in tutto il mondo, e che interessano i più svariati gruppi etnici. I soggetti che possiedono un enzima diverso da quello “B” selvatico, definito come normale e utilizzato come standard di riferimento, non necessariamente presentano delle manifestazioni cliniche visto che non tutte le varianti comportano una diminuzione dell’attività enzimatica. Le varianti vengono divise in 5 classi¹¹ (WHO) sulla base della loro attività residua rispetto alla G6PD B, ma anche delle loro caratteristiche biochimiche (mobilità elettroforetica, Km per i substrati NADP⁺ e G6P; pH ottimale; termostabilità), e delle loro manifestazioni cliniche:

Classe I. Sono le varianti che presentano una attività residua inferiore al 5% del normale. Si associano di solito ad un quadro clinico piuttosto grave con anemia emolitica cronica non sferocitica (CNSHA).

Classe II. Sono le varianti con attività residua inferiore al 10% del normale. Si associano ad anemia emolitica acuta (AHA) dovuta all’ingestione di fave o all’assunzione di farmaci. La maggior parte sono polimorfiche quali la G6PD Mediterranea¹⁸, diffusissima nell’area del Mediterraneo e nel Medio Oriente. La Sardegna rappresenta la regione d’Italia dove il deficit raggiunge la più alta frequenza media pari a 15.8%, con aree di altissima densità in cui si arriva al 24% (Fig 6).¹²



Fig 6. Percentuali della carenza di G6PD in Sardegna.

Classe III. Sono le varianti con attività residua compresa tra il 10% e il 60% del normale. Solitamente non si associano ad emolisi se non nel caso di gravi stress ossidativi e sono polimorfiche. Le più comuni sono la G6PD A⁻, diffusa tra le popolazioni nere dell’Africa e dell’America, e la Mahitol, diffusa nel Sud-Est asiatico.

Classe IV. Sono le varianti che mantengono una attività residua nella norma, tra il 60% e il 150%, e sono polimorfiche. Non si associano ad emolisi e sono quindi clinicamente silenti. Notevolmente diffusa è la G6PD A⁺ in Africa¹³.

Classe V. Sono le varianti con attività residua superiore alla norma, sono molto rare e tra esse si può menzionare la G6PD Hektoen.

Le caratteristiche di ogni classe possono riassumersi in tabella 1.

Classe	Attività enzimatica(%)	Quadro clinico	Esempio
I	<5	CNSHA, ittero neonatale	Durham
II	<10	AHA, ittero neonatale	Mediterranea
III	10-60	AHA, ittero neonatale	A ⁻
IV	60-150	Nessuno	A ⁺
V	aumentata	Nessuno	Hektoen

Tabella 1: Classificazione delle varianti di G6PD (WHO)

Dalla lettura della tabella risalta chiaramente come ci sia una diretta correlazione tra la ridotta attività enzimatica e i quadri clinici più gravi come la CNSHA e la AHA. Tali varianti sono state scoperte facilmente proprio a causa delle gravi manifestazioni cliniche, mentre le varianti “silenti” vengono tuttora individuate grazie a screening genetici che permettono di risalire a piccole differenze biochimiche come una differente mobilità elettroforetica rispetto all’enzima G6PD “B”. A livello molecolare sono state definite oltre 140 mutazioni¹⁴ responsabili del deficit di G6PD e questo ha consentito di chiarire alcuni aspetti della correlazione genotipo-fenotipo. In altri termini è possibile prevedere in base al tipo di mutazione la gravità del quadro clinico.

La caratterizzazione a livello molecolare ha messo in evidenza che le proprietà biochimiche delle singole varianti possono dipendere dal sistema di purificazione impiegato, e pur cercando di eliminare questa variabile non si può avere la certezza che ogni variante individuata sia unica dal punto di vista strutturale o che varianti con le stesse proprietà, valutate con metodi differenti, possano rivelarsi diverse tra loro. Ad esempio, sulla base delle caratteristiche biochimiche sono state differenziate in Sardegna tre varianti, G6PD Mediterranea, Cagliari e Sassari¹⁵.

Nel gene della G6PD sono stati riscontrati solo alcuni tipi di mutazioni, elencati nella tabella 2.¹⁴

Tipo di mutazione	Numero di casi	Esempio
Puntiforme Missenso	112	Mediterranea
Puntiforme non senso	1	Georgia
Delezione di 1 codon	3	Sunderland
Delezione di 2 codon	2	Stonybrook
Delezione di 8 codon	1	Nara
Delezione di un sito di splicing	1	Varnsdorf

Tabella 2 : Classificazione molecolare delle mutazioni del gene G6PD.

La maggior parte delle mutazioni sono sostituzioni missenso con variazione aminoacidica. Meno frequenti sono le piccole delezioni nucleotidiche . Non sono state trovate mutazioni non senso (se non una in una donna eterozigote) o frameshift che aboliscono completamente la produzione dell'enzima. La completa assenza dell'enzima sarebbe infatti letale.

In base alle mutazioni finora identificate, si è visto che tutti gli esoni possono essere coinvolti nel causare il deficit enzimatico, tranne l'esone 1 che non è codificante. Non è stata trovata una stretta correlazione tra la sede della mutazione e la classe della variante. E' vero, però, che mentre negli esoni 4-5-8-9-12 prevalgono mutazioni che producono varianti delle classi II e III, negli esoni 7-8, 10-11^{16,17} si localizza la maggior parte delle mutazioni che producono varianti di classe I. Dagli studi sulla struttura terziaria si è osservato che tali mutazioni interferiscono sulla formazione di dimeri stabili compromettendo in modo severo la stabilità dell'enzima; di qui la gravità del fenotipo. Nell' esone 6 abbiamo una equa distribuzione delle diverse classi delle varianti, invece negli esoni 2-3-13 sono stati trovati, per ora, solo due o tre siti di mutazione (fig. 7).

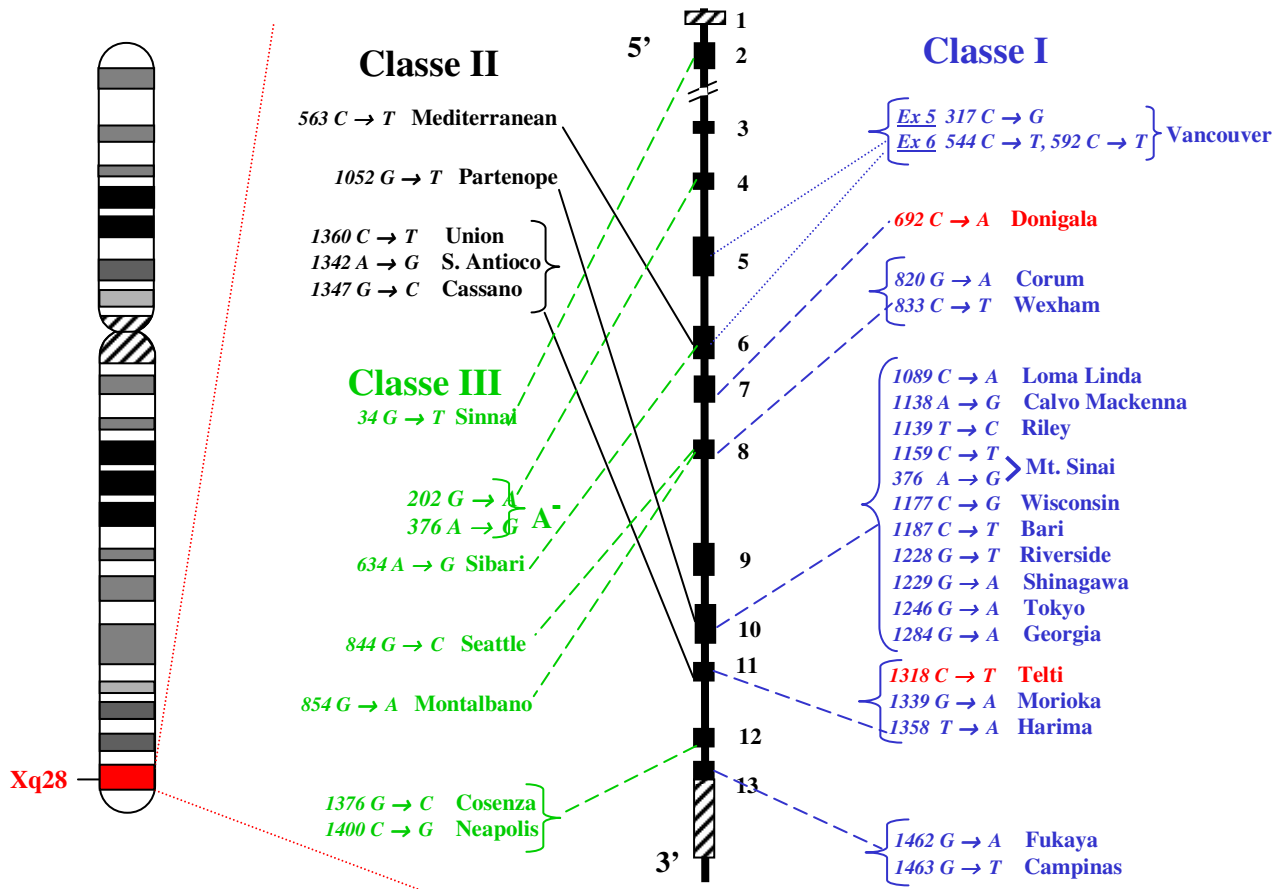


Fig. 7 Localizzazione, struttura ed esempi di mutazioni del gene della G6PD: le mutazioni delle varianti di classe II e III sono quelle descritte in Italia.

L'osservazione che il gene della G6PD sia altamente polimorfico ha prodotto studi riguardanti il fatto che tale variabilità possa essere associata ad una differente via evolutivistica delle principali mutazioni nelle varie popolazioni^{18,19}. L'analisi delle differenti combinazioni di regioni polimorfiche comprese nelle 3 Kb del gene della G6PD ha portato alla definizione di solo 7 di 128 possibili aplotipi, indicando un marcato linkage disequilibrium tra i differenti siti e le mutazioni, dovuto alla loro stretta vicinanza (Fig 8)

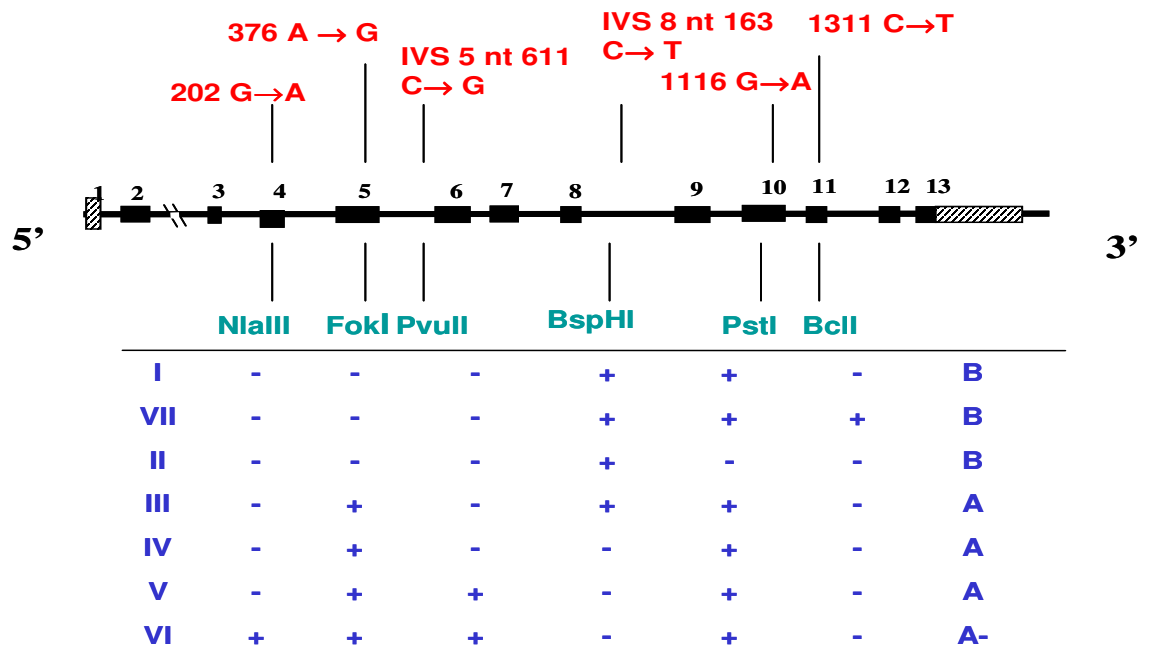


Fig 8. Aplotipi del gene della G6PD.

In studi eseguiti sulla popolazione africana¹⁸ è stata proposta un albero evolutivo per spiegare la genesi delle mutazioni più frequenti, la variante A (nella quale non si ha carenza enzimatica) e la variante A⁻ a partire dal gene ancestrale G6PD B (Fig 9). Il fatto la mutazione A sia trovata nel contesto di 4 differenti aplotipi dimostra come essa sia più “antica”.

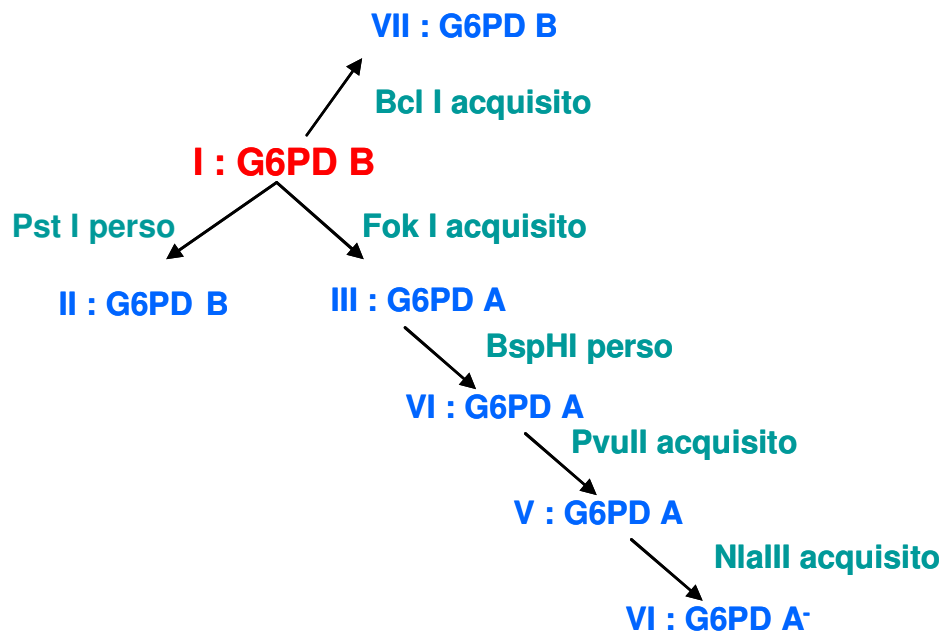


Fig. 9. Sequenza evolutiva delle mutazioni nel gene della G6PD.

Questi studi possono quindi fornire informazioni sul fatto che le mutazioni, cioè la perdita di funzione del gene, siano dovute a selezione (come la malaria) o ad altri meccanismi (per esempio un effetto fondatore).

1.2 Eterogeneità molecolare della G6PD in Italia.

Come già detto precedentemente il difetto della G6PD è piuttosto comune nell' area del Mediterraneo inclusa l'Italia. Sulla base della classificazione biochimica la variante più comune in Italia risulta essere la G6PD Mediterranea²⁰, associata ad anemia emolitica acuta (AHA) e favismo. Sono state inoltre descritte altre varianti polimorfiche di classe II quali la G6PD Cosenza (1376 G→C) e la Union (1360 C→T)²². Le più comuni varianti di classe III sono rappresentate dalla G6PD Seattle (844 G→C)²¹, e altre varianti quali la G6PD Sibari (634 A→G) e la G6PD Montalbano (854 G→A). Sono stati inoltre identificati casi sporadici di numerose varianti sia di classe II che di classe III quali la G6PD Tokio, la G6PD Partenope, la G6PD Santa Maria e la G6PD Cassano.

1.3 Aspetti clinici

Il deficit della G6PD si associa ai seguenti quadri clinici:

- Anemia emolitica cronica non sferocitica (CNSHA)
- Ittero neonatale
- Anemia emolitica acuta (AHA), causata da farmaci, infezioni e ingestione di fave (favismo).

CNSHA (Anemia emolitica cronica non sferocitica)

Le varianti appartenenti alla classe I determinano un quadro clinico caratterizzato da anemia emolitica cronica non sferocitica con ittero e splenomegalia, presente già alla nascita in associazione con iperbilirubinemia, emolisi intravascolare ed extravascolare. Si tratta solitamente di soggetti maschi ed in genere di mutazioni "*de novo*". In alcuni casi la mutazione è

presente allo stato eterozigote nella madre. Alcuni soggetti possono richiedere una trasfusione di sangue. L'eritrocita con tale carenza non ha le capacità di resistere ai normali stress ossidativi del metabolismo basale. L'emolisi che ne deriva non è bilanciabile nemmeno con un incremento dell'eritropoiesi midollare, che è insufficiente. Un ulteriore stress ossidativo dovuto all'assunzione di farmaci o all'ingestione di fave può aggravare il quadro clinico ma non esserne la causa scatenante. In alcuni casi si opta per la splenectomia .

Ittero neonatale

L'ittero neonatale compare nel 2°-4° giorno di vita di quasi tutti i soggetti affetti da carenza di varia gravità di G6PD: la bilirubina può raggiungere livelli superiori a 30 mg/dl passando da forma lievi a ittero nucleare. La presenza di una notevole variabilità nella frequenza e gravità dell'ittero nei neonati è dovuta sia a fattori genetici, come il tipo di variante posseduta, sia a fattori ambientali, come l'esposizione della madre a sostanze ossidanti. In realtà l'ittero non è sempre causato da emolisi ma da una alterazione della funzione epatica dovuta ad un deficit relativo di enzimi epatici deputati alla coniugazione della bilirubina come l'UDP-glucuroniltransferasi o alla concomitante presenza della sindrome di Gilbert.²³

AHA (Anemia emolitica acuta).

Le varianti enzimatiche di classe II e III sono legate a manifestazioni cliniche quali la AHA. Dopo un insulto ossidativi dovuto a farmaci o ad agenti ossidanti o infezioni si può instaurare dopo 24-72 ore una crisi emolitica acuta. Clinicamente la crisi emolitica è caratterizzata da anemizzazione con anemia, pallore, astenia, tachicardia, ittero, urine ipercromiche, splenomegalia, febbre, dolori addominali, e pianto e irrequietezza nei bambini più piccoli. Ci sono dei fattori in grado di influenzare tale suscettibilità individuale e sono divisi in fattori ereditari o acquisiti. Tra i fattori ereditari ci sono le differenze genetiche riguardanti l'enzima o il metabolismo delle diverse sostanze, e tra i fattori acquisiti troviamo l'età, la dose e i livelli preesistenti di emoglobina. La crisi

emolitica nella maggior parte dei casi si risolve spontaneamente²⁴ perché nel giro di una settimana il midollo risponde efficacemente mettendo in circolo i reticolociti che matureranno in eritrociti in poco tempo. Nei portatori di varianti di classe II (quale la Mediterranea) l'anemia può essere così grave da richiedere una trasfusione, mentre l'emolisi è meno grave nei pazienti con varianti di classe III. Numerosi farmaci sono ritenuti fattori scatenanti²⁵ a causa della loro tendenza alla produzione di radicali liberi quando vengono metabolizzati. Anche le infezioni batteriche sono in grado di scatenare una crisi perché durante la fagocitosi batterica i granulociti possono rilasciare perossidi²⁶. Non si conoscono ancora i meccanismi che permettono ai virus di causare la crisi emolitica, anche se questa è stata documentata nel corso di epatiti virali²⁷.

Favismo

Il termine favismo indica una crisi emolitica acuta secondaria all'ingestione dei semi di *Vicia Faba*, sovrapponibile a quella indotta da farmaci. Le crisi emolitiche causate dai semi freschi sono molto più violente rispetto a quelle derivanti dai semi secchi o cotti. Il favismo presenta un andamento stagionale, con un picco al momento della fioritura della pianta a Marzo e Aprile, e l'altro picco al momento della comparsa dei semi sul mercato a Maggio e Giugno.

L'instaurarsi delle crisi si può avere in individui che hanno sempre assunto fave senza aver avuto degli effetti, o alla prima ingestione. Possono verificarsi in soggetti di ogni età, ma risultano maggiormente frequenti nei bambini tra i 2 e i 6 anni, solitamente secondarie alla prima ingestione di fave²⁸.

Fra le sostanze tossiche presenti nelle fave ci sono la vicina e la convicina, agliconi dei β -glucosidi, che vengono trasformate dalla β -glucosidasi, presenti negli stessi semi e nel nostro intestino, in divicina e isouramile responsabili della produzione di radicali liberi e sostanze ossidate che devono essere eliminate dalla glutatione-perossidasi già fortemente indebolita dal deficit della G6PD.

Nelle crisi gravi, nelle quali si arriva alla distruzione di circa il 40-50% degli eritrociti circolanti, si ha necessità di trasfusioni, mentre di solito si ha un decorso meno grave che si risolve autonomamente con una stimolazione del midollo alla produzione di nuovi globuli rossi (anemia emolitica autolimitante). Infatti dopo circa 72 ore dall'assunzione di fave, i livelli di glutatione ridotto sono normali, come prima della crisi.

Il favismo presenta una notevole incidenza nelle fasce di terra che si affacciano nel Bacino del Mediterraneo e nel Medio Oriente, ed è particolarmente frequente in Sicilia ma soprattutto in Sardegna¹. Il motivo di tale distribuzione geografica non è stata del tutto chiarita visto che le coltivazione delle fave è quasi ubiquitario a causa delle sue capacità nutritive, ma sembra coincidere fortemente con l'antica distribuzione della malaria.

1.4 Terapia

Non esiste una terapia per il deficit della G6PD, ma è importante individuare i soggetti a rischio per mettere in atto un sistema di prevenzione informativo.

I soggetti con variante di classe I in parte presentano delle carenze che sono ben tollerate, con metabolismo normale, in parte hanno necessità di terapia trasfusionale. E' importante che questi pazienti non vengano a contatto con sostanze ossidanti che possano inasprire il quadro clinico, come farmaci, fave, e anche batteri. Infatti aumenta la suscettibilità alle infezioni virali a causa della carenza dell'enzima presente anche nei granulociti.

I portatori delle varianti di classe II e III conducono in genere una vita normale, ma devono comunque essere informati sugli effetti dannosi di alcuni medicinali, ed evitare le fave, mentre le infezioni batteriche non sono controllabili. Quando questi pazienti hanno una crisi emolitica è necessario operare un'attenta valutazione sulla necessità o meno di trasfusioni.

Coloro che possiedono le varianti di classe IV e V non hanno alcuna manifestazione clinica.

2.OBIETTIVI

La ricerca si propone di:

- a) valutare l'eterogeneità del difetto di G6PD in in Sardegna e la correlazione tra il genotipo ed il fenotipo clinico.
- b) studiare i polimorfismi associati al gene al fine di indagare sull'origine delle mutazioni nella popolazione sarda.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

In questo studio, articolato in due fasi, sono stati studiati dei soggetti maschi con deficit di G6PD, non selezionati e raccolti consecutivamente, nell'ambito di uno screening per l'individuazione dei portatori di β -talassemia nella scuola dell'obbligo, che ha incluso anche l'analisi della G6PD.

Nella prima fase è stata determinata la mutazione nel gene della G6PD in 196 soggetti con difetto di G6PD, esaminati nel centro di Cagliari, mediante analisi del DNA. I campioni sono stati distinti in base all'attività enzimatica residua in 2 categorie. A quella con attività residua inferiore al 10% appartengono la gran parte dei campioni, 185 soggetti, mentre nella seconda sono compresi 11 soggetti con attività compresa tra il 10 e il 60%.

Su questi soggetti è stato inoltre eseguito lo studio dei polimorfismi presenti nel gene che hanno portato alla costruzione specifici aplotipi.¹⁸

Sono state utilizzate metodiche basate sull'amplificazione (PCR), digestione degli amplificati con enzimi di restrizione e la tecnica del DHPLC.

Nella seconda fase lo studio è stato esteso a ulteriori 231 campioni provenienti da altre aree della Regione, in collaborazione con altri Centri Microcitemici dell'isola (Muravera, S. Gavino, Iglesias, Carbonia, Lanusei, Nuoro, Oristano, Sassari, Olbia, Ozieri.).

Anche su questo secondo gruppo è stata eseguita la ricerca delle mutazioni e lo studio dei polimorfismi.

3.2 Esami di laboratorio.

- Analisi enzimatica

La determinazione simultanea dell'attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e della 6-fosfogluconato deidrogenasi (6PGD) viene eseguita in campioni di sangue intero in EDTA mediante pHmetria differenziale³⁰ con lo strumento CL-10 micro (EUROCHEM-ROMA). Tabella 3. La concomitante

presenza di una anemia non associata alla deficienza di G6PD, come la carenza di ferro o le α e β talassemie determina un'attività enzimatica maggiore della norma. Da qui la necessità di intervalli di riferimento separati per le diverse sindromi.

<i>Valori di riferimento</i>		
		G6PD/6PGD
➤ G6PD carenti		Inferiore a 0.20
➤ G6PD intermedi	Non β	Inferiore a 0.95
	α -Tal eterozigote	Inferiore a 1.00
	β -Tal eterozigote	Inferiore a 1.20

Tabella 3. Valori di riferimento metodo pH-metria differenziale

Gli emizigoti carenti per le varianti di classe III, quali la Seattle, la Sant'Antioco, la Sinnai, hanno rapporti variabili tra 0.30 e 0.85 a conferma della maggiore attività residua di tali varianti, rispetto alla variante Mediterranea di classe II.

- Analisi del DNA

Il DNA genomico per l'analisi delle mutazioni viene ottenuto dai leucociti di campioni di sangue periferico (in EDTA) col metodo dell'estrazione salina.

La ricerca delle mutazioni del gene della G6PD viene effettuata mediante polimerase chain reaction (PCR), digestione degli amplificati con specifici enzimi di restrizione, DHPLC, ed eventualmente, sequenziamento diretto.

- **PCR (polymerase chain reaction).**

La PCR è una metodica che consente l'amplificazione in vitro di qualunque regione del DNA. Un campione del DNA da analizzare, cui è stata aggiunta una miscela contenente due oligonucleotidi complementari alle due semieliche, è denaturato al calore. Lasciando rinaturare la miscela, i due oligonucleotidi si legano alle rispettive sequenze bersaglio, agendo da primers per la reazione di estensione. Il segmento di DNA compreso tra i due primers

viene amplificato in presenza dell'enzima Taq polimerasi (DNA-polimerasi termoresistente) e di deossiribonucleotidi; proseguendo allo stesso modo con l'alternanza di temperature denaturanti e rinaturanti, il DNA è amplificato in maniera esponenziale.

Per la ricerca della mutazione più frequente nell'area del Mediterraneo, la variante di classe II Mediterranea (563 C→T), viene amplificato un frammento che comprende gli esoni 6 e 7. Il prodotto amplificato di 547 bp viene poi digerito con l'enzima di restrizione Mbo II e sottoposto ad elettroforesi. La mutazione C→T crea un nuovo sito di taglio dell'enzima permettendo quindi una rapida diagnosi della mutazione. (fig 10, 11).



Fig. 10

Esone 6 analizzato per la variante Mediterranea: la mutazione crea un nuovo sito di taglio per l'enzima Mbo II. Il frammento normale di 377 bp viene sostituito da due frammenti di 277 bp e 100 bp.

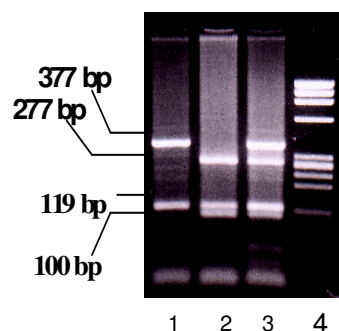


Fig. 11 Elettroforesi su gel di agarosio al 3 % dei prodotti di amplificazione del gene della G6PD, esone 6, per l'identificazione della variante Mediterranea:

1 omozigote normale

3 eterozigote

2 emizigote/omozigote affetto

4 marker phi174 digerito con Hae III

Per l'identificazione della variante di classe III Seattle (844 G→C) viene amplificato l'esone 8. Il prodotto ottenuto di 343 bp viene poi digerito con l'enzima Dde I. La mutazione abolisce il normale sito di taglio (fig. 12).

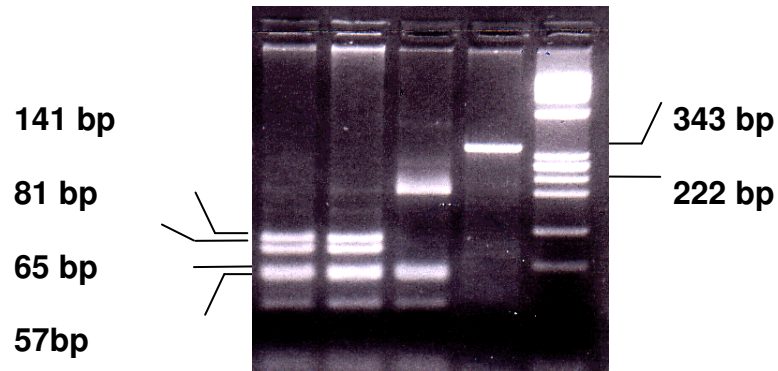


Fig. 12 Elettroforesi su gel di agarosio al 3 % dei prodotti di amplificazione del gene della G6PD, esone 8, digeriti con l'enzima DdeI, per l'identificazione della variante Seattle:

1-2 omozigote normale 3 emizigote/omozigote affetto
4 controllo 5 marker φx174 digerito con Hae III

Per l'identificazione della variante Sant'Antioco (1342 A→G), localizzata nell'esone 11, viene amplificato un frammento di 245 bp che poi verrà digerito con l'enzima Hae III. Anche in questo caso la mutazione crea un sito di taglio(fig. 13).

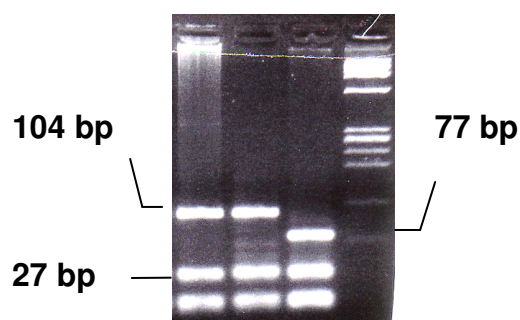


Fig. 13 Elettroforesi su gel al 3% dei prodotti di amplificazione del gene della *G6PD*, esone 11, per l'identificazione della variante Sant'Antioco.

1-2 omozigote normale

3 emizigote malato

4 marker ϕ x174 digerito con Hae III

Anche per l'identificazione della variante Union (1360 C→T)²⁵ viene digerito un frammento di 245 bp originato dall'amplificazione dell'esone 11 con l'enzima Fsp I. La mutazione abolisce il sito di taglio (fig. 14).

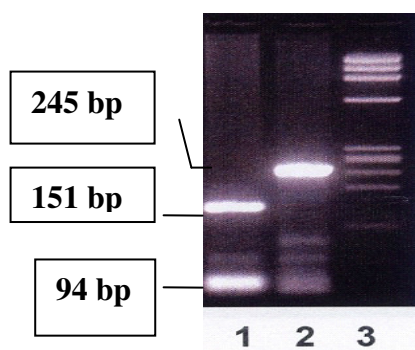


Fig. 14 Elettroforesi per la *G6PD* Union:

1 normale; 2 emizigote; 3 marker ϕ x174 digerito con Hae III

Nella tabella 5 vengono riportate le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione degli esoni 6-7, 8, 11, 2, nei quali sono localizzate le mutazioni più frequenti in Sardegna. Le condizioni di amplificazione sono:

- Per gli esoni 6-7 e 8 il 1° ciclo di 5 minuti a 95°C, seguono 30 cicli di 30 secondi a 94°C, 45 secondi a 68°C e 2 minuti a 72°C.

- Per gli esoni 11 e 2 il 1° ciclo di 5 minuti a 95°C, seguono 30 cicli di 1 minuto a 94°C, 2 minuti a 60°C e 2 minuti a 72°C.

	Primers	5'→3'	Fram. Amplif.
EX 6-7	Oligo B	ACTCCCCGAAGAGGGGTTC AAGG	547 bp
	Oligo J	CCAGCCTCCCAGGAGAGAGGAAG	
EX 11	Oligo 11F	AAGACACTCTCTCCCTCACA	245 bp
	Oligo 11R	CGTATTTTTCACCCCACTGCT	
EX 8	Oligo 8F	ATGCCCTTGAACCAGGTGAA	343 bp
	Oligo 8R	GAAGCCCAAGTTGTCATGGTC	
EX 2	G 678	GTTAACGAGCCTTTCTTCC	196 bp
	G 679	CCTGGCTTTTAAGATTGGG	

Tabella 5: condizioni di amplificazione degli esoni G6PD.

- **DHPLC**

La DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) è una tecnica in grado di rilevare la presenza di mutazioni nel DNA che utilizza un particolare tipo di colonna per HPLC in grado di separare frammenti di DNA che differiscono di sole poche coppie di basi (con dimensioni comprese tra 50 e 700 bp) in soli 6 minuti. Le applicazioni del DHPLC includono: ricerca di polimorfismi, mappatura di geni, analisi di mutazione in geni candidati.

Il metodo, temperatura-dipendente, è basato sulla separazione di molecole di DNA, contenenti basi non appaiate formatesi durante l'amplificazione di un frammento tramite PCR. Quando una mutazione puntiforme o un polimorfismo è presente su uno solo dei 2 cromosomi omologhi e questi vengono denaturati e poi lasciati ricombinare, la combinazione del filamento mutato con quello normale (wild type) forma nel punto di mutazione una

“bolla” in quanto le basi, non essendo complementari, non possono appaiarsi. Questa nuova molecola viene chiamata ETERODUPLEX. La DHPLC si basa sulla differente velocità di migrazione tra eteroduplex e omoduplex non mutato all'interno della colonna HPLC che si comportano cromatograficamente in modo differente e da ciò si può caratterizzare la presenza di una mutazione in un campione.

La presenza di una mutazione si evidenzia sotto forma di picchi ulteriori rispetto al cromatogramma del wild type.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato questo metodo di screening per la ricerca dei polimorfismi del gene della G6PD.

Fig 15. Cromatogramma di un soggetto normale o omozigote per la mutazione nt 1311 (C→T).

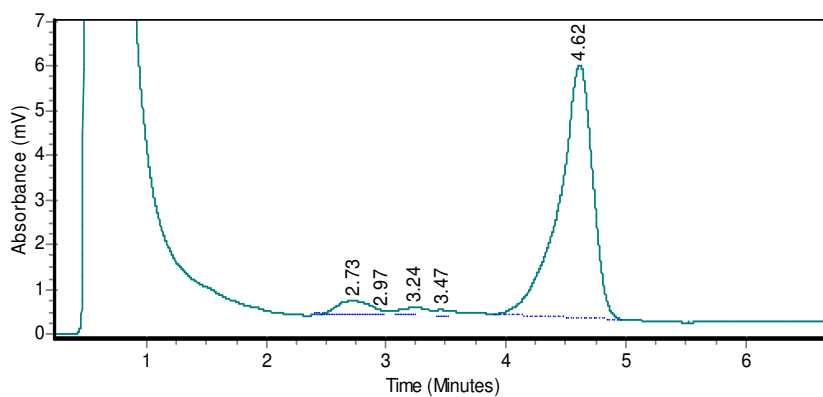
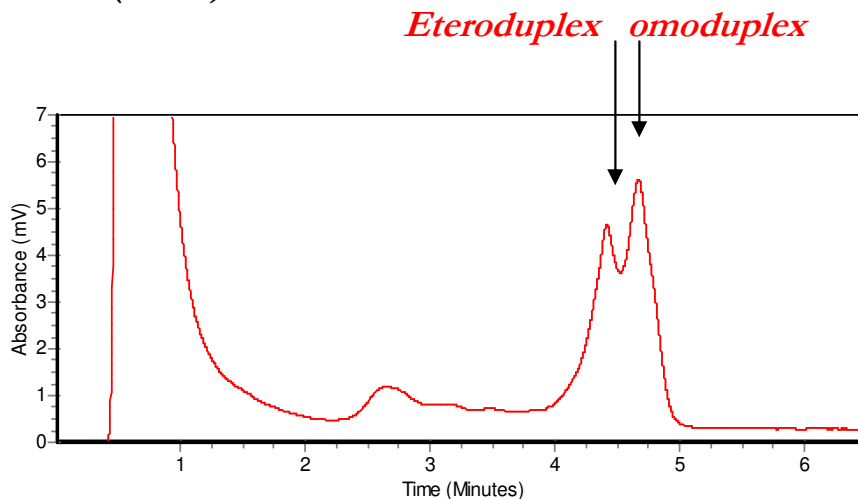


Fig 16: Cromatogramma di un soggetto eterozigote per la mutazione nt 1311 (C→T).



- **Sequenziamento diretto**

Una volta amplificata la regione che si intende studiare è necessario, al fine dell'analisi delle sequenze, eseguire una reazione chiamata cycle sequencing. Il sequenziamento ciclico o "cycle sequencing" comprende come la PCR tre fasi ripetute per 25 cicli: denaturazione, annealing, estensione. L'unico primer presente nella reazione si lega al template in modo tale da permettere alla DNA-polimerasi di iniziare a copiare la sequenza. In questo modo il prodotto della reazione si accumula con modalità lineare e non esponenziale come avviene nella PCR.

Tale metodo di sequenziamento si basa sul principio di terminazione precoce del filamento (Metodo di Sanger). Durante l'estensione vengono incorporati casualmente sia i dNTPs che i ddNTPs marcati con 4 fluorocromi diversi. Alla reazione di sequenziamento segue la purificazione. Un'aliquota del purificato viene esaminata sull'analizzatore ABI Prism 3100 che è uno strumento multicolor basato sull'analisi fluorescente del DNA. In questo strumento è presente una serie di 16 capillari lunghi 36 cm riempiti di un polimero che funge da setaccio e durante l'elettroforesi separa i frammenti di DNA in base alla loro dimensione. Durante l'elettroforesi i frammenti raggiungono la cella di rilevazione dove una luce laser incide sui frammenti analizzati eccitando i fluorocromi legati ai nucleotidi che li compongono, che emettono fluorescenza.

La variante di classe III Sinnai (34 G→T)³⁰ è localizzata nell'esone 2. Il frammento amplificato viene sottoposto a sequenziamento diretto. L'ABI 3100 identifica le diverse basi utilizzando i loro specifici picchi di assorbimento. Il cromatogramma che ne risulta (fig. 17) è un insieme picchi di differente altezza, in base all'intensità del segnale dato dai fluorocromi. Ogni singolo picco viene elaborato dallo strumento con un colore diverso che corrisponde ad una base azotata diversa: il blu identifica la citosina, il rosso la timina, il nero la guanina, il verde l'adenina. La sequenza ottenuta deve essere

confrontata con una di riferimento. La mutazione in questo caso è una timina che sostituisce una guanina.

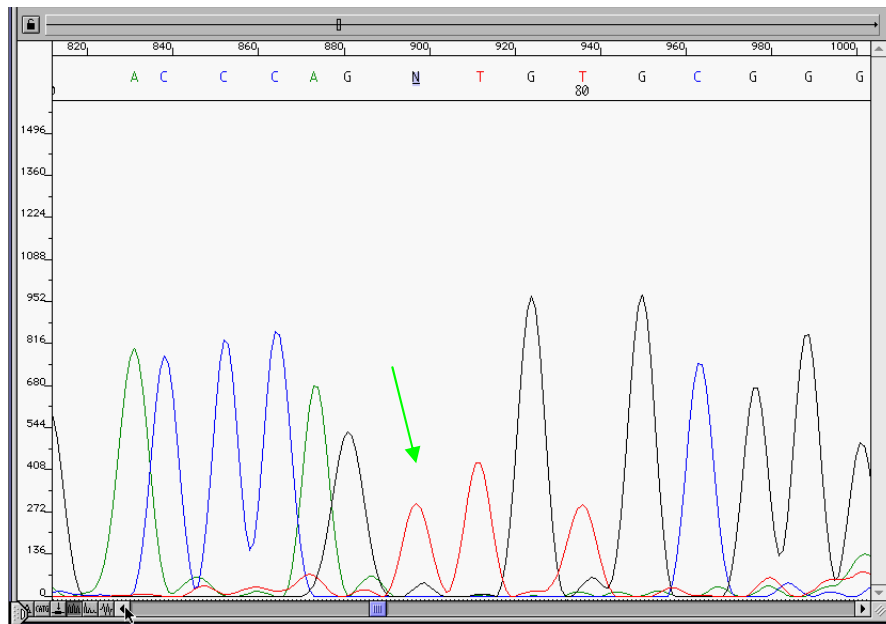


Fig.17 Risultato dell'analisi della sequenza che evidenzia la presenza della variante Sinnai all'esone 2, nucleotide 34. L'esempio mostrato è riferito ad un maschio emizigote.

Il metodo del sequenziamento diretto si utilizza in tutti quei casi nei quali, escluse le mutazioni conosciute, si voglia identificare una variante rara o non descritta, come di solito sono le varianti di classe I (CNSHA)

4. RISULTATI

Studi sulla eterogeneità molecolare delle varianti di G6PD in Sardegna hanno portato all'identificazione delle mutazioni più frequenti.

Sono stati esaminati in totale 427 soggetti maschi G6PD carenti .

I campioni sono stati distinti in base all'attività enzimatica residua in 2 categorie:1) attività residua inferiore al 10% (classe II) ; 2) attività compresa tra il 10 e il 60% (classe III).

Nel primo gruppo di 405 soggetti, 401 (94%) sono risultati essere portatori della variante Mediterranea (563 C->T) di gran lunga la più frequente. La frequenza più bassa è stata trovata ad Iglesias, quelle più alte a Nuoro e Sassari. . Negli alti 4 soggetti con attività inferiore al 10% è stata identificata la variante Union (1360 C->T). Nei campioni appartenenti alla seconda categoria sono state identificate 9 Seattle (844 G->C), 11 S. Antioco (1342 A->G), e 2 Sinnai (34 G->T). I risultati globali sono illustrati in tabella 6.

CENTRO	N°	VARIANTE Med (%)	UNION	S. ANTIOCO	SEATTLE	SINNAI
CAGLIARI	196	183 (93,4%)	2	7	4	-
NUORO	22	22 (100%)	-	-	-	-
ORISTANO	20	19 (95%)	-	1	-	-
SAN GAVINO	42	39 (92,9%)	1	1	1	-
IGLESIAS	17	15 (88,2%)	-	-	2	-
CARBONIA	20	19 (95%)	-	1	-	-
LANUSEI	27	23 (88,9%)	1	1	-	2
MURAVERA	21	21 (100%)	-	-	-	-
SASSARI	20	20 (100%)	-	-	-	-
OLBIA	25	24 (96%)	-	-	1	-
OZIERI	17	16 (94,1%)	-	-	1	-

Tabella 6. Numero assoluto e frequenze percentuali delle mutazioni identificate nei diversi Centri coinvolti nel Progetto.

Su un campione di 156 soggetti è stato eseguito lo studio dei polimorfismi presenti nel gene che ha portato alla costruzione di aplotipi. Tale studio è stato esteso anche ad un gruppo di 30 soggetti di controllo che non presentavano il difetto (GDB), cioè portatori dell'allele selvatico. I soggetti normali (GDB) esaminati per i siti polimorfici BspH I (IVS-8, nt 163), Pst I (Ex 10 nt 1116), Bcl I (Ex 11 nt 1311), sono risultati appartenere tutti all'aplotipo I (BspH I +; Pst I +;Bcl I -), come pure i portatori delle varianti Seattle, S.Antioco, Union e Sinnai. Tra i portatori della variante Mediterranea, che rappresenta il gruppo più cospicuo, sono stati analizzati 130 campioni. Di essi solo il 18% è risultato portatore dell'aplotipo I, mentre nel restante 82% è stato identificato l'aplotipo VII (BspH I +; Pst I +;Bcl I +). I dati numerici sono illustrati in tabella 7.

VARIANTE	N° SOGGETTI	APLOTIPI	
		I	VII
GDB	30	30	-
Med	130	23(18%)	107(82%)
Union	4	4	-
Seattle	9	9	-
S.Antioco	11	11	-
Sinnai	2	2	-

Tabella 7. Risultato dello studio dei polimorfismi del gene della G6PD.

5. DISCUSSIONE.

Il difetto di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è la più comune enzimopatia ereditaria, che in Sardegna raggiunge una frequenza media nei maschi del 15,8%¹². Tale difetto è correlato a quadri clinici di gravità variabile come l'anemia emolitica acuta da farmaci e fave, l'ittero neonatale e l'anemia emolitica cronica non sferocitica. Il difetto di G6PD è risultato eterogeneo nelle varie popolazioni. Di qui l'importanza di definire l'eterogeneità molecolare della carenza di G6PD in Sardegna e correlarla al quadro clinico. Ci siamo quindi proposti di operare uno studio a livello regionale, finora mai realizzato, al fine di tracciare una mappa della distribuzione del difetto di G6PD in Sardegna.

I risultati ottenuti sia nella prima che nella seconda fase del nostro studio dimostrano che in Sardegna la variante G6PD Mediterranea (563 C→T), è di gran lunga la più frequente con una prevalenza media del 94%, che risulta significativamente maggiore ($p < 0.005$) di quella riscontrata sia nel nord che nel sud Italia (rispettivamente il 57.8% e 63.1%).²⁰ A tale mutazione sono pertanto dovute la stragrande maggioranza delle crisi emolitiche da farmaci, ingestione di fave o infezioni varie che talvolta possono richiedere l'ospedalizzazione del paziente.

L'eterogeneità molecolare in Sardegna è notevolmente più bassa di quella osservata nell'Italia continentale poiché è stato identificato un ridotto numero di varianti quali la G6PD Seattle²¹ e la G6PD Union,²² trovate anche nel resto d'Italia, e varianti proprie della popolazione sarda quali la G6PD Sant'Antioco²¹ e la G6PD Sinnai.²⁹ Esiste inoltre una certa variabilità interregionale ; a Cagliari e nei Centri del sud dell'isola l'eterogeneità molecolare è infatti maggiore che al nord (fig 16).



Fig 16. Distribuzione delle mutazioni G6PD in Sardegna

Ciò è valido per tutte le varianti identificate con particolare riferimento alla G6PD Sinnai la quale, benchè identificata per la prima volta in un soggetto con tale provenienza, è stata di seguito ritrovata in numerosi soggetti della zona di Lanusei, mostrando inequivocabilmente un effetto fondatore ed un origine relativamente recente (dati non pubblicati).

Questo dato potrebbe esser influenzato dal numero dei campioni, molto alto a Cagliari rispetto agli altri Centri, ma è sovrapponibile ai dati sulla frequenza del difetto di G6PD in Sardegna ottenuti durante lo screening regionale per la beta talassemia¹², che ha indicato nel sud dell'isola percentuali di maschi carenti ben più elevate che al nord.

Ad aumentare l'eterogeneità concorrono due varianti sporadiche, la G6PD Donigala (dati non pubblicati) e la G6PD Telti³⁰, di classe I associate ad anemia emolitica cronica non sferocitica (CNSHA), presenti in famiglie isolate (Fig. 17).

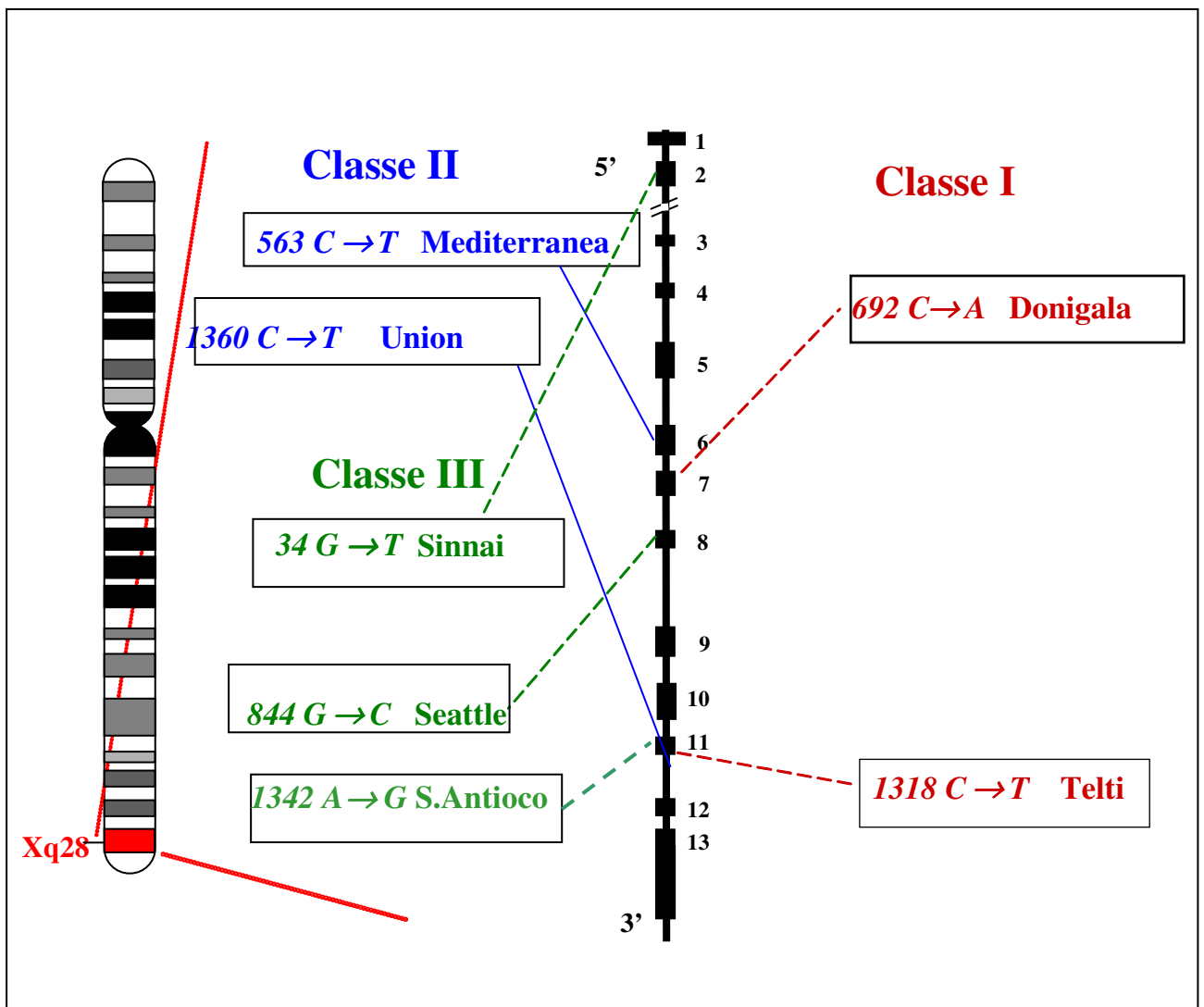


Figura 17. Localizzazione genica delle mutazioni G6PD identificate in Sardegna.

I risultati ottenuti dallo studio dei polimorfismi del gene della G6PD indicano che la maggior parte dei campioni con la mutazione Mediterranea (82%), hanno l'aplotipo VII, mentre tutte le altre mutazioni sono associate all'aplotipo I. Questo dato può portare a speculare che in Sardegna la mutazione Mediterranea possa essere riportata ad un effetto fondatore, selezionandosi su un normale allele GDB con aplotipo VII, e che successivamente sia stata sottoposta ad un meccanismo di selezione naturale ad opera della malaria. Infatti il deficit della G6PD, rappresenta un vantaggio selettivo nei confronti

dell'infezione del Plasmodium Falciparum² dato che gli eritrociti carenti rappresentano un luogo inospitale per il merozoita.

La costruzione di aplotipi associati al gene^{18,19} nei diversi gruppi di campioni appartenenti alle varie aree geografiche consente di valutare la presenza di linkage disequilibrium tra mutazioni e polimorfismi nella popolazione sarda, fornendo anche suggestive ipotesi sull'andamento e l'età dei flussi migratori già messi in evidenza dalle differenti percentuali del difetto di G6PD nelle singole zone.

Sarebbe comunque importante correlare il grado di variabilità genetica con quella clinica, valutando l'incidenza delle crisi emolitiche nei portatori dei vari difetti molecolari.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Calabro V., Giacobbe A., Vallone D., et al. Genetic heterogeneity at the glucose-6-phosphate dehydrogenase locus in southern Italy: a study on a population from the matera district. *Hum Gen* 1990; 86:49-53.
2. Luzzato L., Usanga E.A., Reddy S.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarian parasites. *Science* 164, 839-841, 1969.
3. Pai GS, Sprenkle JA, et al: Localization of the loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of non random X-autosome traslocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:2810.
4. Persico MG, Viglietto G, Martino G, Toniolo D, Pavonessa G, Moscatelli C, Dono R, Vulliamy T, Luzzato L, D'Urso M: Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure or the protein and unusual 5' non coding region. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14,2511.
5. Luzzato L, Mehta A: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, et al (eds): *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7th ed. New York, McGraw-Hill Book Co., 1995, pp3367-3398.
6. Testa U, Luzzato L: Human erythrocytes glucose-6-phosphate dehydrogenase: structure and function in normal and mutant subjects.

In: <<Current Topics in Hematology>>, Piomelli S, Yachnin S ed s, pp 2-70; Alan Liss Inc., New York, 1978.

7. Naylor CD, Rowland P, et al: Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of tertiary structure of the human enzyme. *Blood* 1996; 87: 2974.
8. Camardella L, Caruso C, Rutigliano B, Romano M, Di Prisco G, Descalzi-Cancedda F: Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Identification of a reactive lysyn residue labelled with pyridoxal 5'-phosphate. *Eur J Biochem* 171: 485, 1988.
9. Bhadbhade MM, Adams MJ, Flynn TG, Levy HR: Sequence identify between a lysine-containing peptide from *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase and an active site peptide from human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett* 211:243, 1987.
10. Beutler E., Vulliamy T.J. Hematologically important mutations: Glucose-6-phosphate dehydrogenase . *Blood cells, molecules and diseases* 28(2), 93-103,2002
11. Yoshida A, Beutler E, Motulsky AG. Table of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Bull WHO* 1971, 45: 243-253.
12. A Cao, R Congiu, MC Sollaino et al: Thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase screening in 13-14 year old students of the Sardinian population: preliminary findings. *Community Genetics* 2007 (in press).

13. B Kurdi-Haidar, PJ Mason, A Berrebi, G Ankra-Badu, A Al-Ali, A Oppenheim, L Luzzatto: "Origin and spread of the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East". *Am. J. Hum. Genet.* 47;1013-1019,1990.
14. Porter HI, Boyer SH, Watson-William EJ: Variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different populations. *Lancet* 1, 895-897, 1964.
15. De Vita G, Alcalay M, Sampietro M et al.: Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 133-140, 1989.
16. Fiorelli G., Martinez di Montemuros F., Cappellini MD. Chronic non-spherocytic hemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants; *Baillière's Clinical Haematology*, vol 13, N°1. pp.39-55, 2000.
17. Zimmerman SA, Russel EW et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Durham: A de novo mutation associated with chronic hemolytic anemia. *The J of Pediatrics* vol 131 N°2, 284-287,1997.
18. Vulliamy T.J., Otham A. e coll.(1991) Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. *PNAS* vol 88, pag 8568-8571.

19. Xu W, Westwood B, Bartsocas CS, Malcorra-Azpiazu JJ, Indrak K, Beutler E: G6PD mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood* 1995.
20. Martinez di Momontemuros F.,Dotti C.,Tavazzi D, Fiorelli G, Capellini MD.: Molecular Heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Italy. *Hematologica* 1997; 82: 440-445.
21. D. Cappellini, F. Martinez di Montemuros, G. De Bellis, S. Debernardi. C. Dotti, G. Fiorelli: Multiple G6PD mutations are associated with a clinical and biochemical phenotype similar to that of G6PD Mediterranean. *Blood*, Vol 6. No 9 (May 1), 1996; pp 3953-3958.
22. A. Rovira, T. Vulliamy, A. Pujades, L. Luzzato, JL Vives Corrons: The G6PD deficiency variant G6PD Union (454 Arg→Cys) has a worldwide distribution possibly due recurrent mutation. *Human Molecular Genetics* 1994, vol 3 No 5 833-835.
23. Galanello R, Cipolliina MD, Carboni G, e coll.: Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome *Eur J Pediatric*.1999; 84: 99-102.
24. Tarlov AR, Brewer GJ, et al: Primaquine sensitività. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: an in born error of metabolism of medical and biological significance. *Arch Intern Med* 1962; 109-209.
25. Szeinberg A, Marks PA. Substances stimulating glucose catabolism by the oxidative reactions of the pentose phosphate pathway in human erythrocytes. *J Clin Invest* 1961; 40:914.

26. Baehner RL, Nathan DG, Castle WB: Oxidant injury of caucasian glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency red blood cells by phagocytosing leukocytes during infection. *J Clin Invest* 1971; 50:2466.
27. Kattamis CA, Tjortjatou F: The haemolytic process of viral hepatitis in children with normal or deficient glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *J Pediatr* 1970; 77:422.
28. R. Galanello: Deficit di G6PD. 12.3 Malattie Genetiche, molecole e gene, (diagnosi, prevenzione e terapia). Piccin 2003.
29. Cappadoro M, Girigaldi G: Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium Falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* 1998; 92: 2527-34.
30. Mosca A, Paleari R, Rosti E, Luzzana M, Barella S, Sollaino C, Galanello: Simultaneous automated determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in whole blood. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996 ; 34 :431-438
31. R. Galanello, D. Loi, C. Sollaino, S. Dessì, A. Cao, M.A. Melis: A new G6PD variant, G6PD Sinnai (34 G→T). *Human Mutation* 1998.
32. Mason P.J, Sonati M.F., Mac Donald D. et al. New glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations associated with chronic anemia. *Blood*, vol 85, pp 1377-1380, 1995.

