

# La diagnosi genetica delle emofilie A e B

Donata Belvini, Roberta Salviato, Paolo Radossi, Alberto Are, Piergiorgio Davoli, , Ercole De Biasi, Renzo Risato, Giuseppe Tagariello

Dipartimento di Laboratorio, Servizio Trasfusionale, Centro per le Malattie del Sangue e Servizio di Assistenza agli Emofilici, Ospedale Civile di Castelfranco Veneto (TV), ASL 8 Regione Veneto (Responsabile Unità Operativa Centro Trasfusionale: Dott. Piergiorgio Davoli)  
Lavoro realizzato con il supporto dell'Associazione Progresso Ematologico (APE)

**Haemophilia A (HA) and haemophilia B (HB) are X-linked bleeding disorders caused by diverse mutations throughout the factor VIII and factor IX genes. To date, genetic analysis is one of the most important support for patients with haemophilia and their families. Mutation type identification represents the main risk factor for inhibitor development and it is crucial in approaching the genetic therapy. The molecular biology and in particular the molecular diagnosis of haemophilia, including the identification of the specific defect responsible for the disease, provides the best possible genetic counselling for patients with haemophilia and their families. Aim of this paper is to describe the state of the art of genetics in the field of haemophilia as well as the experience in the last few years in our Haemophilia Centre.**

**Parole chiave:** consulenza genetica, emofilia A, emofilia B, inversione FVIII, CSGE.

**Key words:** genetic counselling, haemophilia A, haemophilia B, FVIII inversion, CSGE.

## Introduzione

Le emofilie A (HA) e B (HB) sono difetti congeniti della coagulazione caratterizzati dall'assenza o dalla ridotta produzione dei fattori della coagulazione VIII (FVIII) o IX (FIX). Attualmente, la conoscenza del difetto molecolare alla base dell'emofilia rappresenta uno dei più importanti ausili nella gestione dei pazienti affetti da queste coagulopatie<sup>32,38</sup>. L'identificazione della mutazione che determina la malattia permette, infatti, una definizione

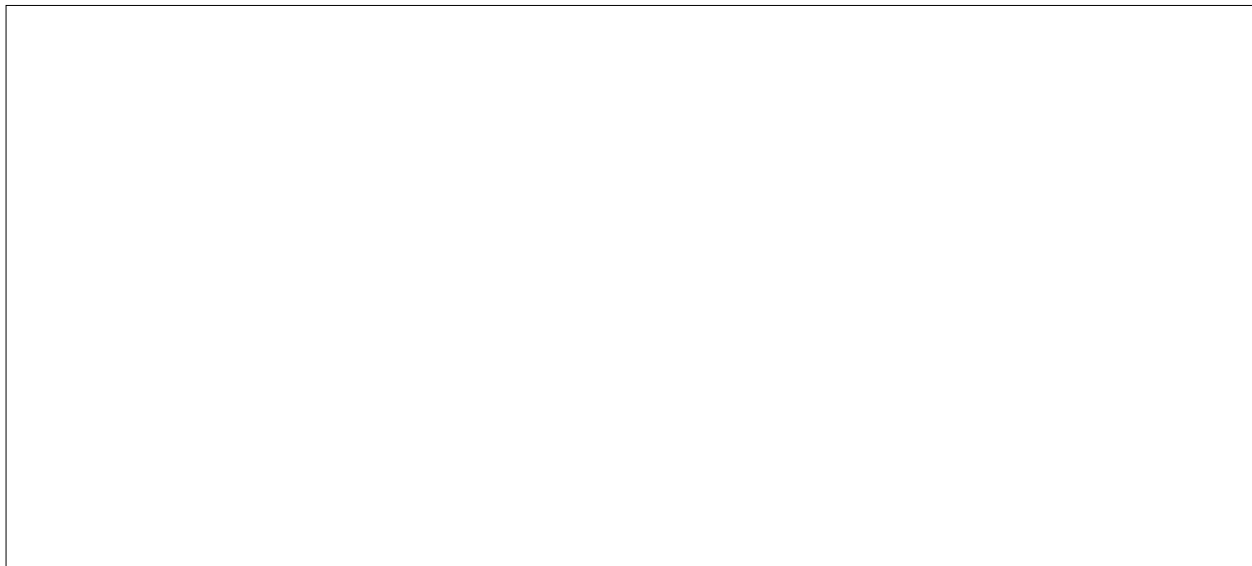
precisa del difetto in ciascun paziente. Inoltre, offre chiarimenti alle più importanti problematiche relative all'emofilia quali la gravità della malattia, il rapporto fenotipo/genotipo o lo sviluppo di inibitori anti-FVIII o IX. L'unico presidio terapeutico in grado di correggere tali difetti è rappresentato dall'utilizzo di concentrati del fattore mancante, di origine plasmatica o ricombinante, somministrati in occasione di episodi emorragici o a scopo profilattico: questi hanno raggiunto oggi standard di elevata purezza e sicurezza in termini di trasmissione di malattie di origine virale. La complicanza più grave del trattamento sostitutivo è lo sviluppo di anticorpi "inibitori" diretti contro il FVIII o FIX infusi. Le cause di tale fenomeno non sono ancora del tutto chiarite, ma numerose evidenze dimostrano come il tipo di difetto molecolare alla base della malattia sia il più importante fattore di rischio per lo sviluppo di tale risposta anticorpale<sup>37</sup>. Ma l'aspetto che ha subito maggiori trasformazioni dall'avvento della biologia molecolare nell'emofilia è stato senz'altro la consulenza genetica alle famiglie dei pazienti emofilici<sup>30</sup>, dapprima con l'analisi in *linkage*, più recentemente con l'identificazione precisa del difetto. Ciò permette di definire con sicurezza la possibilità o meno di trasmettere il gene alterato. Tali conoscenze possono venire applicate anche sul prodotto del concepimento, consentendo di rilevare la presenza della mutazione e, quindi, della malattia nel feto<sup>28</sup>. Di seguito vengono esposte le basi molecolari dell'HA e HB, le procedure e le problematiche in tema di studi familiari applicati a tali malattie genetiche con particolare attenzione all'esperienza maturata presso la nostra istituzione.

## La sindrome emofilica

Le HA e HB sono malattie a trasmissione genetica prodotte rispettivamente da carenza dei FVIII (HA) e FIX (HB) della coagulazione<sup>14</sup>. Il difetto risiede in due geni distinti localizzati sul cromosoma X. Sono colpiti un soggetto

Ricevuto: 5 gennaio 2001 - Accettato: 12 febbraio 2001  
Corrispondenza:  
Dott. Giuseppe Tagariello  
Haemophilia Centre, Ospedale Civile di Castelfranco Veneto (TV)  
31033 Castelfranco Veneto

**Figura 1:** struttura del gene del fattore VIII: a) le linee verticali rappresentano gli esoni, le rimanenti aree rappresentano gli introni; b) le frecce indicano la posizione dei 5 polimorfismi intragenici più comunemente utilizzati; c) i *domains* della proteina, le frecce indicano i punti di clivaggio della trombina



di sesso maschile ogni 5-10.000 per l'HA e ogni 25-30.000 per l'HB. La diagnosi di emofilia viene sospettata sulla base dei sintomi emorragici e compiuta grazie a un semplice test della coagulazione (il tempo di tromboplastina parziale, aPTT) che risulta allungato. Il dosaggio dei singoli fattori coagulanti (FVIII:C e FIX:C) carenti permette poi la distinzione tra le due forme che sono invece indistinguibili dal punto di vista clinico. Entrambe le coagulopatie si caratterizzano per la presenza di emorragie dei tessuti muscolari e delle articolazioni, che insorgono sia in modo spontaneo che in seguito a eventi traumatici. Tradizionalmente, la gravità della malattia è definita sulla base dei livelli dei fattori della coagulazione plasmatici in forme gravi (<2%), forme medie (2-5%) e forme lievi (5-25%). L'entità delle manifestazioni cliniche correla in genere con i livelli di fattore carente.

### **Le basi genetiche dell'emofilia A**

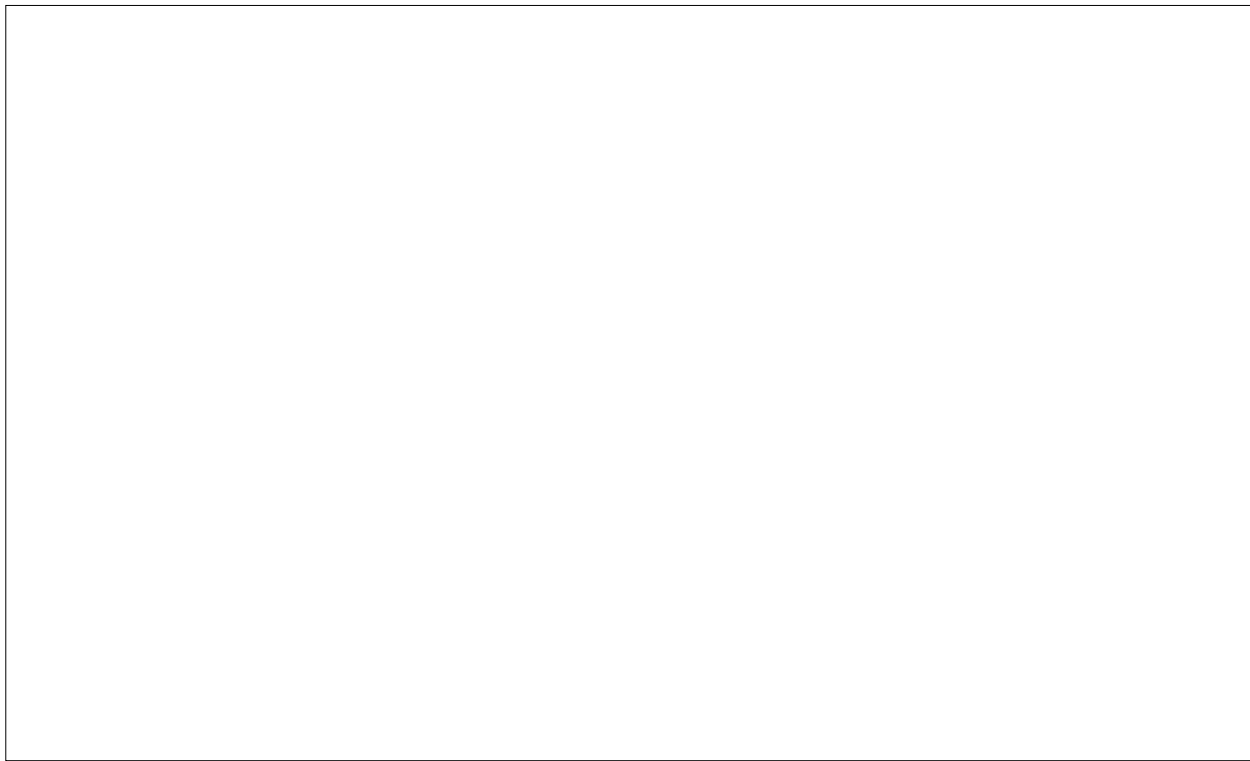
L'HA è trasmessa come carattere recessivo ed è causata da mutazioni nella sequenza del gene che codifica per il FVIII della coagulazione. Tale gene<sup>10,31</sup> è localizzato all'estremità telomerica del braccio lungo del cromosoma X (Xq28), ha una lunghezza di 186 chilobasi (Kb) e comprende 26 esoni, trascritti in un RNA messaggero (mRNA) di circa 9 Kb. La proteina matura è costituita da 2.332 aminoacidi divisi in 5 *domains* (A1, A2, B, A3, C1, C2) (Figura 1). Nel plasma il FVIII circola in associazione al fattore von Willebrand che ha funzione di *carrier* e di protezione dalla degradazione proteolitica. Solo da qualche anno è stata

riconosciuta una mutazione che ricorre nel 20-25% di tutte le HA e soprattutto è presente nel 40-50% dei pazienti affetti da HA grave. Si tratta della mutazione nota come inversione del gene del FVIII. Questo risulta interrotto all'altezza dell'introne 22 e l'inversione è dovuta alla ricombinazione intracromosomica tra una sequenza all'interno dell'introne 22 (*F8A*) ed una sequenza ad essa omologa (*int22h*) presente, in due o più copie, a circa 4-500 Kb dall'estremità 5' del gene, identiche tra loro per più del 99% della loro sequenza<sup>1,22</sup>. I casi che non presentano questa mutazione sono invece prodotti da un insieme assai eterogeneo di alterazioni genetiche<sup>19</sup>. Le mutazioni in questo gruppo di pazienti (circa l'80% di tutti i pazienti emofilici) sono rappresentate da ampie delezioni, grosse inserzioni, piccole delezioni, mutazioni puntiformi. Attualmente sono state identificate circa 500 differenti mutazioni alla base dell'emofilia A riportate sul database internazionale per i difetti genetici dell'HA (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>).

### **Le basi genetiche dell'emofilia B**

L'HB è causata da alterazioni nella sequenza del gene che codifica per il FIX<sup>5,25</sup> della coagulazione, situato sul cromosoma X in una posizione più vicina al centromero rispetto al gene per il FVIII (Xq27). Ha una dimensione di 33,5 Kb e la trascrizione dei suoi 8 esoni produce un mRNA di 1,4 Kb. La proteina matura è costituita da 415 aminoacidi divisi in 6 *domains* (Figura 2). Sono note numerose mutazioni a carico del FIX, ma non esiste una mutazione prevalente con caratteristiche e frequenza simili

**Figura 2:** struttura del gene del fattore IX: a) le linee verticali rappresentano gli esoni, le altre aree rappresentano gli introni; b) le frecce indicano la posizione dei 10 polimorfismi intragenici più comunemente usati; c) i *domains* della proteina del fattore IX, le frecce indicano i siti di clivaggio nell'attivazione del fattore IX



all'inversione del FVIII per l'HA. Le grosse delezioni del FIX sono relativamente rare e interessano solo 1-3% di tutti i casi di HB. Più del 95% delle mutazioni riguardano singoli nucleotidi o piccole delezioni/sostituzioni distribuite lungo tutto il gene e riportate sul database internazionale per i difetti genetici dell'HB (<http://umds.ac.uk./molgen/haemBdatabase>).

### **L'analisi genetica dell'emofilia A e B**

L'indagine genetica applicata all'emofilia per definire il tipo di difetto di un paziente e per lo studio dei soggetti correlati (studio familiare), riceve importanti informazioni da una accurata costruzione e analisi dell'albero genealogico (Figura 3). Questa indagine preliminare ci permette di stabilire se l'emofilia in questione è una forma a carattere familiare o è di tipo sporadico<sup>35</sup>. Sulla scorta di questi dati è possibile, a seconda del grado di parentela con il proposito, definire in ciascun soggetto femminile il rischio di essere portatrice o meno del difetto. Le HA e HB sono malattie recessive legate al cromosoma X. In caso di gravidanza vi sarà, quindi, il 50% di probabilità che una portatrice trasmetta il gene alterato a uno dei figli: solo i soggetti maschi sono affetti, mentre le femmine sono portatrici eterozigoti. Sebbene esista una correlazione tra

lo stato di portatrice e i livelli plasmatici di FVIII o FIX, tale parametro è risultato troppo approssimativo e suscettibile di variazioni nel definire con certezza la diagnosi di portatrice<sup>18,34</sup>. Le donne che appartengono a famiglie in cui è presente la malattia ma che non sono "portatrici obbligate", possono comunque essere potenziali portatrici. In realtà, anche le portatrici obbligate dovrebbero essere analizzate in modo più approfondito: infatti, la presenza di polimorfismi del DNA in forma eterozigote può essere utilizzata nel caso di una diagnosi prenatale. Da queste considerazioni deriva che l'analisi molecolare rappresenta il metodo più accurato per l'identificazione dello stato di portatrice; essa può essere condotta con metodo indiretto o diretto. Il metodo indiretto (analisi di *linkage*) consiste nella valutazione di alcuni polimorfismi della sequenza del DNA posti all'interno o in prossimità (*flanking regions*) dei geni che codificano per il FVIII o per il FIX<sup>11,20</sup>. I polimorfismi sono variazioni naturali della sequenza del DNA presenti nella popolazione normale, non sono causa di malattia ma possono essere utilizzati come marcatori per seguire la trasmissione di un gene difettivo nelle famiglie. Un polimorfismo, per essere utile, deve essere in grado di differenziare i due diversi cromosomi di una donna portatrice. Si tratta per lo più di "polimorfismi biallelici" in cui i

**Figura 3:** albero genealogico di una famiglia con emofilia A. Si tratta di una malattia genetica recessiva legata al cromosoma X. Solo i soggetti maschi sono affetti. La malattia è trasmessa da femmine sane che sono portatrici eterozigoti



frammenti tagliati in siti particolari da enzimi di restrizione possono variare in lunghezza non solo tra soggetti diversi, ma anche tra due cromosomi X. Tuttavia, dal momento che in questo modo non viene individuata la mutazione causativa, tale approccio può presentare limitazioni che rendono talora impossibile fornire un dato definitivo nella consulenza genetica. Nella nostra esperienza, ma anche dai dati della letteratura, queste metodiche consentono di definire lo stato di portatrice in circa la metà delle donne indagate. Le cause di carenza di dati informativi sono per lo più rappresentate dall'assenza di individui chiave per lo studio, dai casi sporadici di malattia, oppure nel caso non sia possibile distinguere tra i due alleli per l'assenza di eterozigosi. Le limitazioni appena descritte sono, invece, superate grazie all'analisi genetica con metodo diretto (ricerca della mutazione) che consiste nell'identificazione del preciso difetto molecolare che causa la malattia. Sebbene questo approccio sia assai più laborioso (a causa delle dimensioni del gene del FVIII e dell'ampia eterogeneità delle anomalie), risulta indispensabile in un'ampia proporzione di pazienti. Prima dell'introduzione della *Polymerase Chain Reaction* (PCR), per l'identificazione delle mutazioni era utilizzata la tecnica del *Southern Blot* (SB). La metodica SB è in grado di identificare la presenza di diverse ampie delezioni o particolari inserzioni soltanto quando sono coinvolti *breakpoints* che permettano l'ibridizzazione dalla sonda su frammenti di grosse dimensioni e con motilità

alterata rispetto al segmento omologo. Piccole delezioni, inserzioni, mutazioni puntiformi possono essere identificate solo se la mutazione coinvolge un sito di restrizione utilizzato per l'analisi molecolare. Con l'avvento della PCR la velocità e l'efficienza dell'identificazione delle mutazioni è enormemente aumentata. L'ampia variabilità delle mutazioni nell'emofilia richiede infatti l'analisi di tutte le regioni essenziali della molecola: gli esoni, le regioni al confine tra introni-esoni, la regione *promoter* e le regioni coinvolte nel controllo della trascrizione, nonché della fine e maturazione dell'RNA<sup>21</sup>.

Nei soggetti affetti da emofilia A grave il primo *step* per una indagine genetica è rappresentato dalla ricerca dell'inversione del gene del FVIII, presente in circa il 40-50% di questi casi. Un tempo era eseguita con la tecnica del SB, ma attualmente si va sempre più diffondendo una tecnica in PCR (la *long template PCR*) a partire da DNA genomico. Nei soggetti con HA che non presentano l'inversione del gene del FVIII e in tutti i pazienti con HB, qualora sia necessario identificare la mutazione responsabile del difetto, devono essere usate tecniche in grado di analizzare l'intero gene. Sono riportati in letteratura numerosi metodi che hanno dimostrato capacità di *screening* di ampie regioni di DNA: *Conformation Sensitive Gel Electrophoresis* (CSGE), *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP)<sup>11</sup>. Nel nostro Centro, in particolare,

è stato scelto come metodica di analisi di *heteroduplex*<sup>8</sup> il CSGE, che consente di rivelare la presenza di mutazioni puntiformi, piccole delezioni e duplicazioni nelle porzioni codificanti e regolatrici del gene analizzato.

## Metodi

### Campioni ed estrazione di DNA

Per l'analisi genetica si utilizza comunemente DNA ad alto peso molecolare ottenuto da leucociti di sangue periferico anticoagulato. Il DNA può essere estratto e purificato con diversi metodi, con lisi dei globuli rossi, lisi della membrana cellulare e nucleare dei globuli bianchi. I campioni di DNA così ottenuti possono essere conservati per lungo tempo in congelatore a una temperatura inferiore a -20°C.

### Analisi dei polimorfismi

Tutti i polimorfismi valutati vengono analizzati mediante PCR. Questa reazione permette di produrre moltissime copie di uno specifico segmento di DNA selezionato, fornendo all'enzima due inneschi (*primers*) complementari a sequenze alle estremità del locus di interesse. I prodotti di PCR vengono valutati direttamente o dopo digestione con specifici enzimi di restrizione, secondo il tipo di polimorfismo in esame. L'analisi consiste in una elettroforesi dei prodotti di PCR in gel di agarosio o di poliacrilamide in cui i frammenti di DNA a doppia elica si separano in base alle loro dimensioni. Per il gene del FVIII sono utilizzati nel nostro laboratorio i polimorfismi *Bcl I*RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) nell'introne 18<sup>9</sup>, le sequenze *CA Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) dell'introne 13<sup>12,23,24</sup> e dell'introne 22 e il polimorfismo extragenico VNTR St14 (DXS52)<sup>36</sup>. Quest'ultimo, a causa del rischio di ricombinazione, viene ora usato sempre più raramente. Per il gene del FIX sono utilizzati i polimorfismi RFLPs *Hha I*, *Mnl I*, *Mse I*, *Taq I*, *Xmn I* e *Dde I*<sup>13,44,45</sup>.

### Analisi dell'inversione del gene del FVIII

Tradizionalmente, la ricerca di tale mutazione viene effettuata tramite metodica SB, procedura lunga e laboriosa che spesso richiede l'impiego di sostanze radioattive. È, tuttavia, oggi disponibile anche una metodica basata su PCR, che presenta tempi di esecuzione più brevi, maggior sicurezza per l'operatore evitando l'uso di materiale radioattivo, e che richiede solo modeste quantità di DNA genomico, bersaglio dell'amplificazione enzimatica. Le notevoli dimensioni dei frammenti rendono però necessario il ricorso ad una *long template PCR*, in cui si utilizzano per l'amplificazione

segmenti di DNA di grande estensione<sup>26</sup>. Sono utilizzati quattro *primers*\* con cui è possibile stabilire la presenza o meno del difetto nel proposito, sia in un paziente emofilico che in una donna correlata. Due *primers* (denominati P e Q) sono localizzati entro il gene del FVIII e fiancheggiano la regione int22h1. Gli altri due *primers* (denominati A e B) sono posti al di fuori del gene del FVIII e fiancheggiano a loro volta la regione contenente int22h2 e int22h3 (extrageniche)<sup>27</sup>. Il frammento AB rappresenta un controllo interno della PCR, dato che si genera in tutti i casi a partire dalla copia intatta extragenica di int22h. I prodotti di PCR vengono visualizzati dopo separazione elettroforetica su gel d'agarosio (0,6%) tramite colorazione con etidio bromuro. Nei soggetti normali, siano essi maschi o femmine, si producono i frammenti PQ (12 Kb) e AB (10 Kb). Nei maschi affetti da inversione vengono rilevati i frammenti PB e AQ (11 Kb entrambi) e AB (10 Kb). Le femmine portatrici producono tutti i suddetti frammenti (Figura 4).

### Ricerca di altre mutazioni

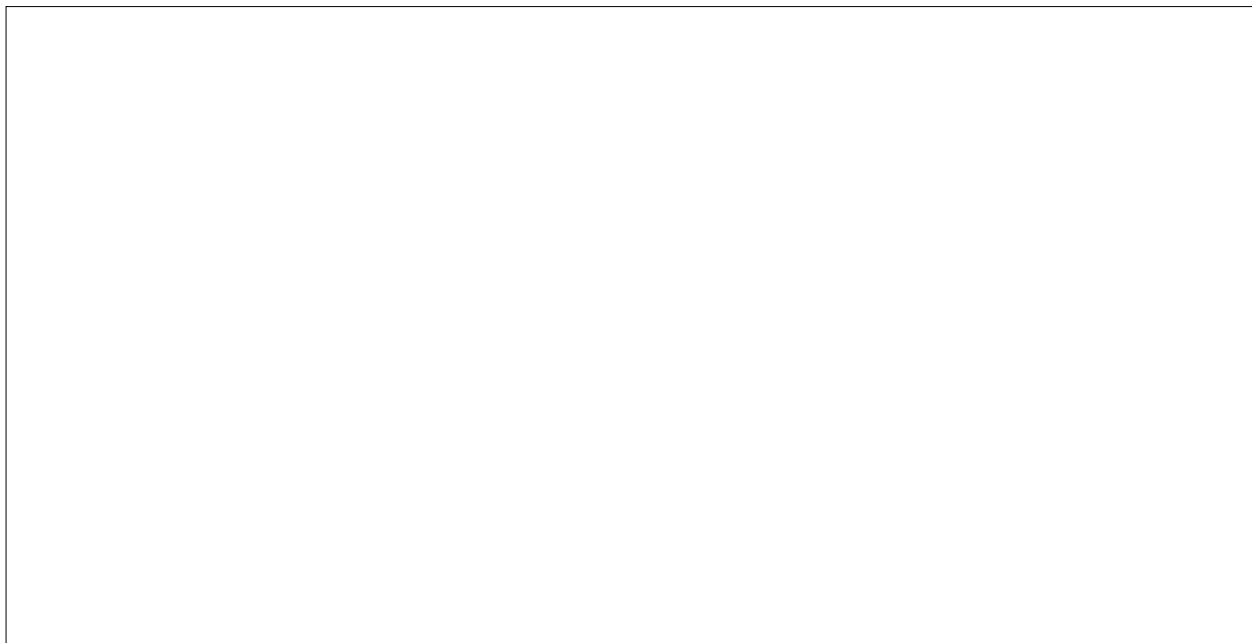
Per tutte le altre mutazioni a carico del gene del FVIII<sup>43</sup> e per le mutazioni del gene del FIX<sup>16</sup> viene utilizzato la tecnica CSGE, che permette di individuare qualsiasi differenza nella sequenza del gene rispetto a un campione di DNA di controllo. Questa metodica consiste nell'amplificare la regione promotore, le sequenze codificanti e le regioni di *splicing* del gene (che sono rappresentate da 39 frammenti per il gene che codifica il FVIII e da 10 per il gene del FIX). I singoli frammenti amplificati vengono mescolati con il corrispondente prodotto ottenuto da un DNA di controllo e sottoposti a denaturazione e rinaturazione (*heteroduplexing*). L'eventuale differenza fra i due DNA viene evidenziata mediante una migrazione in gel di poliacrilamide in un sistema moderatamente denaturante: l'eteroduplex che contiene un errato appaiamento fra le due eliche migra in modo diverso da quello formato da due eliche che si appaiano perfettamente.

Per identificare la natura e la posizione della mutazione, il frammento viene, quindi, sottoposto a sequenziamento utilizzando gli appropriati *primers* marcati con <sup>32</sup>P o fluorescina.

\* Sequenza dei *primers*:

Primer P 5'GCC CTG CCT GTC CAT TAC ACT GAT GAC  
ATT ATG CTG AC3'  
Primer Q 5' GGC CCT ACA ACC ATT CTG CCT TTC ACT  
TTC AGT GCA ATA 3'  
Primer A 5' CAC AAG GGG GAA GAG TGT GAG GGT GTG  
GGA TAA GAA 3'  
Primer B 5' CCC CAA ACT ATA ACC AGC ACC TTG AAC  
TTC CCC TCT CAT A 3'

**Figura 4:** inversione del gene del fattore VIII. I prodotti di PCR vengono visualizzati mediante separazione elettroforetica su gel di agarosio. Si tratta della lesione genetica più frequente, presente in circa il 40-50% dei casi di emofilia A grave. Dall'analisi dei frammenti possiamo distinguere un soggetto normale (N), un maschio affetto (I), una femmina portatrice (C)



## Risultati dell'esperienza nel nostro Centro

### Emofilia A

L'analisi dell'inversione del gene del FVIII ha rilevato la presenza di questa mutazione in 78 (41%) pazienti dei 191 soggetti non correlati, affetti da HA grave. Abbiamo valutato 158 donne appartenenti a 54 famiglie di pazienti affetti da HA (Tabella I). L'inversione è stata rilevata in 32 donne appartenenti a 24 studi familiari, di cui 7 erano portatrici obbligate. L'analisi di *linkage* è stata utilizzata per la diagnosi dello stato di portatrice in tutte le famiglie in cui non era presente l'inversione del gene del FVIII. Tuttavia, non è stato possibile porre la diagnosi mediante analisi di *linkage* in 15 famiglie, per la mancanza di parenti chiave, per l'evidenza di ricombinazione utilizzando *markers* extragenici, per la presenza di malattia sporadica e per la omozigosi di tutti i marcatori di *linkage* utilizzati. Per studiare queste famiglie è stato necessario identificare la mutazione che causa l'emofilia nel paziente mediante la tecnica CSGE<sup>43</sup> e successivo sequenziamento. Da tale *screening*, abbiamo identificato 15 mutazioni. Di queste, 6 erano *missense mutation*, 1 *inframe deletion* di un singolo aminoacido, 1 ampia delezione degli esoni tra 2 e 25, 5 piccole delezioni, 1 *nonsense mutation*, 1 inserzione (Tabella II). Diciannove donne non correlate sono state studiate per la presenza di nuove mutazioni negli esoni 7, 17, 20, 24, 26

con CSGE. In nessuna di queste è stata identificata una di queste mutazioni, confermando che tali alterazioni del DNA sono assenti nella popolazione normale.

### Emofilia B

L'analisi di *linkage* è stata condotta in 12 famiglie con HB ed ha coinvolto 30 donne. Lo studio è risultato informativo in 4 famiglie (9 donne). Nelle restanti 8 famiglie è stato necessario effettuare la ricerca della mutazione causativa. Sono quindi state individuate 8 mutazioni (5 *missense mutation*, 1 *nonsense mutation*, 1 piccola inserzione, 1 piccola delezione) (Tabella III) utilizzando la tecnica CSGE<sup>16</sup> e successivo sequenziamento.

## Conclusioni e discussione

Riteniamo che la diagnostica genetica debba essere parte essenziale di quello che, con termine anglosassone, si definisce *Comprehensive Care Haemophilia Centre*. Infatti, la conoscenza della genetica molecolare permette la gestione più completa di queste coagulopatie consentendo di rispondere in modo adeguato alle esigenze dei pazienti e delle loro famiglie su problematiche cruciali per la salute dei singoli, ma anche per l'armonia e la serenità familiari. Le emofilie sono patologie caratterizzate da molteplici aspetti

**Tabella I:** indagine eseguita su 158 donne appartenenti a famiglie di pazienti affetti da emofilia A, in rapporto alla mutazione

	Inversione	Altra mutazione nota	Altra mutazione non nota	Totali
Portatrici	25	19	4	48
Portatrici obbligate	7	14	4	25
Non portatrici	27	39	5	71
Indeterminato	/	/	14	14
<b>Totali</b>	<b>59</b>	<b>72</b>	<b>27</b>	<b>158</b>

**Tabella II:** mutazioni identificate presso il nostro Centro in pazienti affetti da emofilia A

Paziente	Gravità	Inibitore	Dominio	Esone	Nucleotide	Aminoacido	Database*
CF 35	grave	no	A1	1	103T>C	Tyr16His	no
CF 389	grave	si	A1	2	209-212del	frameshift	si
CF 45	grave	no	A1	5	665-670+5del11	splicing	no
CF 209	media	si	A1	7	883T>C	Phe276Leu	no
CF 150	grave	no	A1	7	920T>G	Ile288Ser	no
CF 165	media	no	A1	7	958-60del	Met 301del	no
CF 483	grave	si	A1	8	1073-1074insT	frameshift	no
CF 38	grave	no	A2	11	1682A>C	Asp542Ala	no
CF 431	grave	no	A2	13	2056-2057del	frameshift	no
CF 24	grave	si/no	B	14	4372-4379del1A	frameshift	si
CF 93	grave	no	B	14	4296-4300 del	frameshift	no
CF 15	grave	si	B	14	5177G>A	Trp1707Stop	no
CF 238	grave	no	A3	IVS15	5374-2 A>T	splicing	no
CF 124	grave	no	A3	16	5405A>C	Tyr1783Arg	no
CF 334	media	no	A3	17	5726A>G	Tyr1890Cys	no
CF 254	grave	no	C1	20	6172G>C	Ala2039Pro	no
CF 49	media	si	C1	23	6506G>A	Arg2150His	si
CF 47	grave	no	C2	24	6683G>A	Arg2209Gln	si
CF 149	grave	no	C2	26	6994T>C	Trp2313Arg	no
CF 432	grave	si	A1-C2	-	del 2-25	large deletion	no
CF 294	grave	si	A1	-	del Prom-6	large deletion	no

\* si: mutazione già riportata nel database per i difetti genetici dell'HA

no: mutazione non riportata in precedenza nel database per i difetti genetici dell'HA

**Tabella III:** mutazioni identificate presso il nostro Centro in pazienti affetti da emofilia B

Paziente	Gravità	Dominio	Esone	Nucleotide	Aminoacido	Database*
CF 116	grave	Pre	A	107-110del	frameshift	no
CF 494	grave	EGF-b	D	10464G>A	Cys71Tyr	si
FI-CF	grave	EGF-b	D	10430G>A	Gly60Ser	no
CF 324	grave	EGF-a	E	17741G>C	Cys109Ser	si
CF 227	grave	Catal.	F	20519G>A	Arg180Gln	si
CF 26	grave	Catal.	F	20562G>A	Trp194Stop	si
CF 372	grave	Catal.	H	31118C>T	Arg333Stop	si
CF 539	grave	Catal.	H	31119G>T	Arg333Gln	si

\* si: mutazione già riportata nel database per i difetti genetici dell'HA

no: mutazione non riportata in precedenza nel database per i difetti genetici dell'HA

legati al trattamento sostitutivo, alla loro interazione con la risposta immunitaria, alla trasmissione familiare del difetto e, più recentemente, soprattutto relativi alle complesse questioni sorte intorno alla terapia genica.

La maggior parte dei pazienti, a prescindere dalla gravità del difetto, non sviluppano una risposta immune "evidente" e in grado di inibire l'attività coagulante del FVIII e FIX

infusi. Nonostante questo, una grave complicanza del trattamento sostitutivo è lo sviluppo di anticorpi diretti contro il FVIII o FIX infusi (anticorpi inibitori) che si verifica, rispettivamente, in circa il 20-30% e il 5% dei pazienti. Numerose esperienze ormai identificano un legame tra lo sviluppo di inibitore e il tipo di difetto genico alla base della malattia emofilica<sup>17,37</sup>. In rapporto alla gravità del

difetto<sup>3,7,41</sup>, i pazienti affetti da una grossolana alterazione genetica (inversione, grosse delezioni, *stop mutation*) hanno una maggiore probabilità di sviluppo di inibitore (21-52%) che scende in caso di malattia moderata o di difetti genetici minori (*missense mutation*, piccole delezioni) a 5-12%. I pazienti con difetti severi (ampie delezioni, inversione e *nonsense mutation*) hanno maggior rischio di sviluppo di inibitore per la mancanza effettiva della molecola circolante e, quindi, il mancato sviluppo di una "fisiologica" immunotolleranza. Che il difetto genetico fosse implicato nel meccanismo di sviluppo di inibitore è noto da tempo, dal momento che è osservazione comune che pazienti emofilici appartenenti a famiglie con storia di inibitore hanno una maggiore probabilità di sviluppare una risposta immune nei confronti del fattore infuso. I geni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA) rappresentano un altro fattore che può essere chiamato in causa nella predisposizione genetica a produrre anticorpi contro il FVIII o FIX. Lo sviluppo di inibitore è stato messo in relazione a particolari aplotipi HLA, anche se non è stato possibile dimostrare con chiarezza un ruolo decisivo degli antigeni HLA-correlati<sup>15,33</sup>. Occorre, infine, ricordare che la conoscenza della mutazione in pazienti affetti da HB può permettere di prevedere il rischio di sviluppo di anticorpi contro il FIX infuso, soprattutto in relazione alla concreta possibilità di incorrere in una reazione anafilattica grave: essa è stata dimostrata in almeno il 26% di pazienti con completa delezione del gene del FIX<sup>40,42</sup>.

L'identificazione precisa della mutazione permette la diagnosi dello stato di portatrice anche nei casi in cui l'analisi di *linkage* non è informativa e nelle forme di emofilia sporadica. Queste informazioni potranno essere utilizzate, se richieste, anche nell'eventualità di una diagnosi prenatale. Le conoscenze in tal modo acquisite diventano decisive nel *counselling* dei membri della famiglia e, in particolare, alle donne e alla loro aspettativa di avere figli. La possibilità di generare un figlio affetto da emofilia è il motivo che induce le donne in età fertile a richiedere una consulenza genetica. La conoscenza degli eventi molecolari alla base del difetto consente, inoltre, di supportare queste famiglie anche per quanto riguarda il rischio di avere un figlio con alta probabilità di sviluppo di inibitore o di anafilassi e quindi di una malattia più grave con cui cimentarsi. Come abbiamo già ricordato, dall'analisi del *pedigree* è possibile innanzitutto definire il tipo di malattia. Se nella famiglia esiste o è esistito più di un soggetto affetto da emofilia, la malattia è definita familiare. Se esiste invece un unico caso in famiglia, la malattia è definita sporadica.

Una "portatrice obbligata" è per definizione una donna:

- il cui padre è un paziente emofilico;
- che ha avuto più di un figlio emofilico (esclusi i gemelli) o ha un figlio emofilico e una figlia che ha avuto un figlio emofilico;
- ha un figlio emofilico e ci sono casi documentati di emofilici nella linea materna della famiglia.

Al di fuori di queste definizioni, se la donna ha parenti affetti da emofilia da parte materna e non ha figli emofilici, o se ha un unico figlio affetto e non vi sono altri parenti malati (emofilia sporadica) può essere una "portatrice possibile". In questi casi, lo stato di portatrice può essere solo escluso, mediante l'analisi di *linkage*, quando non è presente l'aplotipo dell'emofilico nel *propositus*. In tutti i casi in cui la diagnosi di esclusione non sia possibile sarà necessario identificare il difetto genetico. Una situazione che desta notevole interesse è rappresentata dall'emofilia di tipo sporadico. Questa insorge generalmente per la trasmissione di un gene alterato da parte di una donna in cui la sua presenza è rimasta misconosciuta e che in genere è stato ereditato attraverso la via germinale paterna. In rari casi, la malattia si sviluppa per una nuova mutazione materna o una nuova mutazione nell'emofilico stesso (la vera mutazione *de novo*). A questa schematica descrizione va aggiunto una ulteriore variabile rappresentata dalla possibile presenza di un mosaicismo germinale o somatico, in cui la mutazione è presente solo in una certa proporzione dei gameti femminili o in una proporzione delle cellule somatiche. Alcuni studi hanno dimostrato che nella maggior parte dei casi sporadici di HA o HB la madre del probando è una portatrice in virtù di nuova mutazione insorta nel gamete maschile, nel nonno da parte materna del proposito<sup>4,29</sup>. Nella nostra esperienza, una piccola percentuale delle madri di pazienti emofilici (17,6%) risulterebbe non portatrice della mutazione (Tabella IV). È probabile che gli studi di genetica sulla trasmissione intrafamiliare del difetto possano in futuro chiarire meglio lo sviluppo delle forme di emofilia sporadica.

Una delle opzioni terapeutiche, speriamo nell'immediato futuro, per il trattamento dell'emofilia sarà la terapia genica (i primi *trials* sono già iniziati)<sup>6,39</sup>: questa si avvale dell'introduzione di un gene normale e funzionante all'interno delle cellule dell'ospite. In tal caso, devono necessariamente essere note le caratteristiche dei geni che dovranno essere introdotti e le possibili interazioni della proteina circolante con il sistema immune del paziente. È ormai consolidata l'osservazione che il tipo di difetto molecolare dei pazienti condiziona una differente predisposizione allo sviluppo di anticorpi inibitori. La scelta, quindi, dei pazienti che possono in futuro usufruire della



**Tabella IV:** tabella riassuntiva delle madri di pazienti affetti da emofilia A sporadica per i quali è nota la mutazione. In realtà si tratta di "assenza di mutazione nei linfociti del sangue periferico" ma non siamo in grado di escludere la presenza di mosaicismo germinale

	Inversione	Altra mutazione nota	Totali
Portatrici	9	5	14 (82,4%)
Non portatrici	2	1	3 (17,6%)
<b>Totali</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>17</b>

terapia genica può essere guidata dalla approfondita conoscenza del difetto molecolare alla luce del rischio di sviluppare inibitore. La conoscenza del difetto molecolare potrà forse permettere un trattamento individuale nel quale sia possibile, anziché l'introduzione dell'intero gene del FVIII o FIX, la riparazione del danno genetico specifico del singolo individuo.

## Riassunto

*Le emofilie A e B sono difetti congeniti della coagulazione a trasmissione recessiva legata al cromosoma X. Attualmente l'analisi genetica del difetto molecolare rappresenta uno dei più importanti ausili nella gestione dei pazienti affetti da tali coagulopatie e nel servizio rivolto alle loro famiglie. L'identificazione della mutazione permette di chiarire problematiche relative allo sviluppo di anticorpi inibitori che rappresenta una delle più gravi complicanze del trattamento sostitutivo. La terapia genica, che si avvale dell'introduzione di un gene normale, richiede che tutte le caratteristiche del gene stesso siano note. La biologia molecolare permette di compiere con sicurezza la diagnosi dello stato di portatrice della mutazione: queste informazioni possono essere fornite alle donne nell'eventualità di una diagnosi prenatale in tema di counselling genetico offerto alle famiglie degli emofiliaci. Questo elaborato espone le basi molecolari dell'emofilia A e B, i comuni approcci nella diagnosi genetica, le problematiche in tema di studi famigliari con particolare riguardo alla esperienza del nostro Centro.*

## Bibliografia

1) Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M et al.: *Factor VIII gene inversion in severe haemophilia A: results of an International Consortium Study*. Blood, **86**, 2206, 1995.

- 2) Bowen DJ, Thomas P, Webb CE et al.: *Facile and rapid analysis of three DNA polymorphisms within the human factor IX gene using the polymerase chain reaction*. Br J Haematol, **77**, 559, 1991.
- 3) Brackmann HH, Schwabb R, Effenberger W et al.: *Antibodies to factor VIII in hemophilia A patients*. Vox Sang, **78** (suppl 2), 187, 2000.
- 4) Casey GJ, Rodgers SE, Hall JR et al.: *Grandpaternal mosaicism in a family with isolated haemophilia A*. Br J Haematol, **107**, 560, 1999.
- 5) Choo KH, Gould KG, Rees DJH, Brownlee GG: *Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX*. Nature, **299**, 178, 1982.
- 6) Franchini M, Gandini G, de Gironcoli M et al.: *La terapia genica dell'emofilia A e B*. La Trasf del Sangue, **45**, 1, 2000.
- 7) Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Roberts JR et al.: *Localisation of human factor VIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments*. Proc Natl Acad Sci USA, **82**, 7728, 1985.
- 8) Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ: *Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes*. Proc Natl Acad Sci USA, **90**, 10325, 1993.
- 9) Gitschier J, Drayna D, Tuddenham EGD et al.: *Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene*. Nature, **314**, 738, 1985.
- 10) Gitschier L, Wood WI, Goralka TM: *Characterization of the human factor VIII gene*. Nature, **312**, 326, 1984.
- 11) Goodeve AC: *Laboratory methods for genetic diagnosis of bleeding disorders*. Clin Lab Haemost, **20**, 3, 1998.
- 12) Goodeve AC, Tagariello G, Chuansumrit E et al.: *A rapid and cost effective method for analysis of dinucleotide repeat polymorphisms in the factor VIII gene*. Blood Coagul Fibrinol, **7**, 672, 1996.
- 13) Graham JB, Kunkel GR, Tennyson GS, et al.: *The Malmö polymorphism of factor IX: establishing the genotypes by rapid analysis of DNA*. Blood, **60**, 727, 1982.
- 14) Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, Giannelli F: *Genetics and molecular biology of haemophilias A and B*. Blood Coagul Fibrin, **2**, 539, 1991.
- 15) Hay CRM, Ollier W, Pepper L et al.: *HLA Class II profile: a weak determinant of Factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A*. Thromb Haemost, **77** (2), 234, 1997.
- 16) Hinks JL, Winship PR, Makris M et al.: *A rapid method for haemophilia B mutation detection using conformation sensitive gel electrophoresis*. Br J Haematol, **104**, 915, 1999.
- 17) Joan Cox G: *The role of genetics in inhibitor formation*. Thromb Haemost, **82**, 500, 1999.
- 18) Kadir RA, Economides DL, Sabin C et al.: *Variations in coagulation factors in women: effects of age, ethnicity, menstrual cycle and combined oral contraceptive*. Thromb Haemost, **82**, 1456, 1999.
- 19) Kemball-Cook G, Tuddenham EG: *The Factor VIII mutation database on the World Wide Web: the haemophilia A mutation, search, test and resource site. HAMSTeRS update (version 3.0)*. Nucleic Acids Res, **25**, 128, 1997.
- 20) Kenwrick S, Bridge P, Lillicrap D et al.: *A Taq I polymorphism adjacent to the factor VIII gene (F8C)*. Nucleic Acids Res, **19**, 2513, 1991.

- 21) Kogan SC, Doherty M, Gitschier J: *An improved method of prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequence. Application to haemophilia A.* N Engl J Med, **317**, 985, 1987.
- 22) Lakich D, Kazazian H Jr, Antonarakis SE: *Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A.* Nat Genet, **5**, 236, 1993.
- 23) Lalloz MRA, McVey JH, Pattison JK, Tuddenham EGD: *Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene.* Lancet, **338**, 207, 1991.
- 24) Lalloz MRA, Schwaab R, McVey JH et al.: *Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene.* Br J Haematol, **86**, 804, 1994.
- 25) Lillicrap D: *The molecular basis of haemophilia B.* Haemophilia, **4**, 350, 1998.
- 26) Liu Q, Nopzari G, Sommer SS: *Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A.* Blood, **92**, 1458, 1998.
- 27) Liu Q, Sommer SS: *Subcycling-PCR for multiplex long distance amplification of regions with high and low GC content: application to the hotspot in the FVIII gene.* Biotechniques, **25**, 1022, 1998.
- 28) Ljung RC: *Prenatal diagnosis of haemophilia.* Haemophilia, **5**, 84, 1999.
- 29) Ljung RC, Sjorin E: *Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A.* Br J Haematol **106**, 870, 1999.
- 30) Miller R: *Counselling about diagnosis and inheritance of genetic bleeding disorders: Haemophilia A and B.* Haemophilia, **5**, 77, 1999.
- 31) Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F: *Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A.* Lancet, **340**, 1066, 1992.
- 32) Oldenburg J, Brackmann HH, Handfland P, Schwab R: *Molecular genetics in haemophilia A.* Vox Sang, **78** (suppl 2), 033, 2000.
- 33) Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH et al.: *HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 Inversion with and without inhibitors of factor VIII.* Thromb Haemost, **77**, 238, 1997.
- 34) Orstavik KL, Scheibel E, Ingerslev J, Schwartz M: *Absence of correlation between X chromosome inactivation pattern and plasma concentration of factor VIII and factor IX in carriers of haemophilia A and B.* Thromb Haemost, **83**, 433, 2000.
- 35) Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V et al.: *Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis.* Blood Coagul Fibrinolysis, **4**, 313, 1993.
- 36) Richards B, Heilig R, Oberle I et al.: *Rapid PCR analysis of the St14 (DXS52) VNTR.* Nucl Ac Res, **19**, 1994, 1991.
- 37) Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C et al.: *Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation.* Thromb Haemost, **74**, 1402, 1995.
- 38) Tagariello G, Belvini D, Salviato R et al.: *Experience of a single Italian center in genetic counselling for haemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis.* Haematologica, **85**, 525, 2000.
- 39) Thompson AR: *Gene therapy for the haemophilias.* Haemophilia, **6** (suppl 1), 115, 2000.
- 40) Thorland EC, Drost JB, Lusher JM et al.: *Anaphylactic response to factor IX replacement therapy in haemophilia B patients: complete gene deletions confer the highest risk.* Haemophilia, **5**, 101, 1999.
- 41) Vianello F, Radossi P, Tison T et al.: *Prevalence of anti-FVIII antibodies in severe haemophilia A patients with inversion of intron 22.* Br J Haematol, **97**, 807, 1997.
- 42) Warrier I, Ewenstein BM, Koerper MA et al.: *Factor IX inhibitors and anaphylaxis in hemophilia B.* J Pediatr Hematol Oncol, **19**, 23, 1997.
- 43) Williams IJ, Abuzenadah A, Winship PR et al.: *Precise carrier diagnosis in families with haemophilia A: use of Conformation Sensitive Gel Electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis.* Thromb Haemost, **79**, 723, 1998.
- 44) Winship PR, Peake IR: *A clinically useful RFLP in the 5' flanking region of the factor IX gene.* Br J Haematol, **80**, 26a (abstract), 1992.
- 45) Winship PR, Rees DJG, Alkan M: *Detection of polymorphisms at cytosine phosphoguanidine dinucleotides and diagnosis of haemophilia B carriers.* Lancet, **1**, 631, 1989.