



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche**

**Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Mediche, Cliniche e
Sperimentali**

Indirizzo: Metodologia Clinica ed Ematologia

XX° Ciclo

*Caratterizzazione Molecolare delle
Macrotrombocitopenie Ereditarie a Trasmissione
Autosomica Dominante.*

Direttore: Ch.mo Prof. Silvano Todesco

Supervisore: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

Dottoranda: Dr.ssa Silvia Vettore

31 gennaio 2008

RIASSUNTO

I pazienti affetti da Macrotrombocitopenia ereditaria Autosomica Dominante che secondo l'algoritmo seguito per la diagnosi di queste malattie non sono direttamente riconducibili agli ambiti MRD (Malattie Correlate al gene myh9 della Miosina Non Muscolare di tipo IIA – NMMCH-IIA) o BSS (Sindrome di Bernard Soulier), e non rientrano in nessun'altra classificazione, sono stati assegnati negli anni passati ad un gruppo denominato delle Macrotrombocitopenie Mediterranee o Chronic Isolated Macrothrombocytopenia (CHMT).

In questa tesi verrà presentata una revisione di alcuni casi familiari di Macrotrombocitopenia a trasmissione autosomica dominante che ha avuto lo scopo di caratterizzare meglio queste malattie ricercandone le basi genetiche.

Questo lavoro si è avvalso delle tecniche di analisi genetica recentemente implementate nel nostro laboratorio e della disponibilità di specifici anticorpi monoclonali cui abbiamo avuto accesso per i test di citofluorimetria ed immunofluorescenza su vetrino.

Verranno descritti di seguito i risultati relativi allo studio di 5 famiglie (TP1, TP2, TP3, TP4, TP5) seguite presso il nostro ambulatorio divisionale.

FAMIGLIA TP1

Nei componenti della famiglia TP1, contrariamente alla colorazione May Grunwald/Giemsa che evidenziava macrotrombociti, ma nessuna anomalia nei granulociti, i test di immunofluorescenza hanno dimostrato una distribuzione anomala (microgranulare) della Miosina Non Muscolare di Tipo II (NMMCH-IIA) nei neutrofili, caratteristica di alcune forme di MRD; il sequenziamento del gene myh9 ha successivamente permesso di confermare la diagnosi e di risalire alla mutazione causativa: in entrambi gli affetti è stata rilevata la presenza della sostituzione nucleotidica G3485C nell'esone 25, ultimo esone del gene, che porta alla sostituzione aminoacidica di un'arginina con una treonina (R1162T) nella coda della proteina. Questa mutazione non è descritta in letteratura e non è presente nei 100 soggetti normali vagliati. Queste nuove indagini molecolari hanno quindi permesso di collocare la famiglia TP1 nell'ambito delle "Malattie Correlate alla MYH9" riconoscendo una nuova mutazione causativa per questa patologia, e di seguirla con i relativi protocolli.

FAMIGLIA TP2

La seconda famiglia, TP2, è stata indagata secondo lo schema seguito precedentemente. In questo caso le indagini in immunofluorescenza su striscio di sangue periferico non hanno permesso di escludere con certezza un difetto di NMMCH-IIA, perché più esperimenti hanno rivelato in una delle affette un pattern di distribuzione della proteina non chiaramente omogeneo, come è atteso negli individui normali. L'aspetto dei vetrini era simile ad una distribuzione microgranulare tipica di alcune forme di MRD, anche se nelle diverse sedute di colorazione il risultato non è mai apparso del tutto chiaro. Il sequenziamento degli esoni del gene myh9 sede di mutazioni note nei casi di MRD, ha però escluso la presenza di difetti.

Contemporaneamente per escludere l'ipotesi BSS o altri difetti delle glicoproteine piastriniche di superficie, si è proceduto a testare in citofluorimetria GPIb α , GPIX, GPIa e GPIIb/IIIa. Anche questa analisi non ha rivelato anomalie. Nel caso della GPIb α è stato eseguito anche il sequenziamento del relativo gene, che non ha evidenziato mutazioni. È importante sottolineare in queste pazienti anche l'assenza di difetti nell'espressione di GPIa (CD49), glicoproteina che recentemente è stata trovata ridotta in 18 casi di trombocitopenia autosomica dominante.

Lo studio di questa famiglia dovrà continuare col sequenziamento degli esoni mancanti di myh9 per verificare l'assenza di mutazioni non ancora descritte. Se dovessero essere esclusi nuovi difetti myh9-correlati, si procederà in altre direzioni, per esempio sequenziando i geni degli altri componenti del complesso GPIb/V/IX che non è stato possibile testare. Questo permetterà di rivelare od escludere eventuali mutazioni che rimandino a forme di BSS legate alle catene proteiche minori del complesso GPIb/V/IX. In caso di esito negativo, si procederà ad analisi di linkage, cercando di arruolare un numero maggiore di familiari per rendere possibile l'analisi. Per il momento questi pazienti rimangono assegnati all'ambito CHMT con eziopatogenesi ignota.

FAMIGLIA TP3

Il proposita è un uomo di 64 anni senza diatesi emorragica. Anche sua madre e suo figlio risultavano trombocitopenici all'anamnesi. Nel proposita, la prima aggregazione alla Ristocetina (RIPA), eseguita a 1,5 mg/ml è risultata normale, così come le analisi dirette ad escludere un'eventuale MRD. Questo paziente è stato quindi assegnato al gruppo CHMT. Successive analisi condotte a 1,2 mg/mL di ristocetina hanno mostrato una risposta ridotta nel proposita, e completamente assente in suo figlio. Tali risultati hanno condotto alla diagnosi di BSS, confermata dai dati della citofluorimetria e del Western blot.

Gli anticorpi anti-GPIIb α hanno mostrato una riduzione dell'espressione della glicoproteina nel padre, e la sua completa assenza nel figlio.

L'analisi genetica ha rivelato in questi pazienti una delezione di 4 paia di basi (TGAG) nel gene *gplb α* che porta ad uno stop codon precoce e ad una presunta proteina di soli 50 aminoacidi. Nel padre la delezione è allo stato eterozigote, nel figlio si è rivelata omozigote, costituendo il primo caso di omozigosi di questo difetto, già descritto da altri in un caso di doppia eterozigosi.

E' da notare che il proposita e la moglie sono consanguinei di terza generazione. La signora ha negato il consenso ai prelievi di sangue, ma è stato possibile ottenere del DNA da tampone buccale. Sorprendentemente la signora, che ha una conta piastrinica normale, è risultata eterozigote, al pari del marito trombocitopenico. Tale risultato ha reso necessario precisare che il pattern di trasmissione della macrotrombocitopenia in questa famiglia è di tipo autosomico dominante con penetranza incompleta.

FAMIGLIE TP4 E TP5

Seguendo i percorsi diagnostici presentati precedentemente, queste due famiglie non correlate tra loro, alla fine dell'indagine sono risultate affette da una forma eterozigote di BSS dovuta ad una nuova mutazione del gene *gplb α* . Il sequenziamento, confermando i risultati della citofluorimetria che mostravano la diminuzione del binding di alcuni cloni di mAbs specifici, ha evidenziato in tutti gli affetti una transversione A>C del nucleotide +169, corrispondente ad una sostituzione N41H nella sequenza della GPIIb α . La sostituzione aminoacidica, che abbiamo denominato Variante BSS Padova, è localizzata nel primo repeat ricco di leucina all'N-terminale della proteina, in una posizione molto conservata all'interno del sito di interazione con il vWF. Una mutazione in tale posizione, comporta una variazione strutturale della catena che potrebbe spiegare le riduzioni osservate nei test RIPA e nel legame di alcuni cloni di mAbs anti GPIIb α in citofluorimetria. Tali anticorpi, potranno essere usati come strumento diagnostico per differenziare la Variante Padova da altre Varianti di BSS.

Possiamo quindi concludere che le nuove tecniche implementate ed i nuovi strumenti diagnostici hanno permesso di caratterizzare meglio i pazienti affetti da Macrotrombocitopenia Autosomica Dominante.

Quattro famiglie su cinque inizialmente inquadrare come CHMT sono state riallocate ad altri ambiti noti, quali MRD (Famiglia TP1) e BSS (Famiglie TP3, TP4 e TP5). In tutti questi casi sono state messe in evidenza nuove mutazioni nei geni coinvolti (famiglie TP1, TP4 e TP5), o – nel caso della Famiglia TP3 – un'inedita condizione di omozigosi di una delezione già descritta solo allo stato di omozigosi.

Una famiglia rimane assegnata all'ambito CHMT in attesa di ulteriori indagini.

SUMMARY

Patients with an autosomal dominant inheritance of macrothrombocytopenia and not fitting any other known classification such as Myosin Related Diseases (MRD) or Bernard-Soulier Syndrome (BSS), were in the past years assigned to the group of Mediterranean forms, that we also named as Chronic Isolated Macrothrombocytopenia (CHMT). We performed a systematic review of patients with Autosomal Dominant Macrothrombocytopenia in order to better characterize the disease and investigate the molecular defects responsible for the unclassified forms of macrothrombocytopenia. This work was carried out with the new methods (flow cytometry, genetic tests) and diagnostic tools (specific monoclonal antibodies - mAbs) now available also in our laboratory.

Here we described the results obtained from the investigations performed on 5 families (TP1, TP2, TP3, TP4, TP5).

Family TP1.

The propositus was a 49 years old man, whose thrombocytopenia was at the beginning misdiagnosed as ITP. Some year later, his daughter also was recognized as affected. May-Grunwald staining of peripheral blood and Ristocetin aggregation of both patients didn't showed any defect, and they were first assigned to the CHMT group. When the new methods were implemented, the immunofluorescent staining with mAbs anti Non Muscular Myosin Heavy Chain (NMMCH-IIA) revealed in patients' neutrophil granulocytes an abnormal cytoplasmic distribution of the protein, which is a typical sign of MRD, one of the most common hereditary macrothrombocytopenia.

Genetic analysis revealed in these patients a heterozygous mutation R1162T in the exon 25 of the myh9 gene (coding for the NMMCH-IIA) never described before.

After these results, the diagnosis for TP1 family was changed in MRD.

Family TP2.

The proposita her father and her sister showed lifelong story of macrothrombocytopenia without spontaneous bleeding. Only the proposita refers metrorrhagia without other hemorrhagic symptoms.

The immunostaining of blood smears with anti NMMCH-IIA mAbs showed normal distribution in the proposita, while in her sister, different experiments revealed an ambiguous distribution of the protein. Sequencing analysis of the myh9 exons seat of known mutation gave negative results.

So we performed on both patients flow cytometry tests in order to study platelets surface glycoproteins expression, and exclude BSS deriving from their anomalies, but these tests also didn't revealed any abnormality. Sequence analysis of GPIb α chain of GPIb/V/IX complex (von Willebrand - vWF - Receptor), in which are located the most of the mutations responsible for BSS was normal.

TP2 at the moment remains assigned to the group of uncharacterized forms of CHMT, and the investigations will continue with the sequencing of the remaining exons of myh9 gene and the other chains of vWF receptor in order to definitively exclude MRD and BSS.

Family TP3.

The propositus was a 64 year-old man with no hemorrhagic history. His mother and his son was thrombocytopenic too. In the first test performed in the propositus, Ristocetin aggregation (RIPA) at 1,5 mg/ml was normal, as well as MRD-oriented tests. This lead us toward a provisional diagnosis of CHMT. Conversely, RIPA was reduced lowering the agonist at 1,2 mg/ml. Moreover, in propositus' affected son this test resulted completely impaired both at 1,5 and 1,2 mg/ml. This suggested for this family the diagnosis of BSS, which was confirmed by flow cytometry data on GPIb α mAbs binding, reduced in the father and completely absent in the son.

Genetic analysis showed a four bases deletion (TGAG) in gplb α gene already described in a case of compound heterozygosis, bearing a putative truncated protein of 50 aminoacids. Our patient showing absence of GPIb α was the first exemple described of homozygous state of this TGAG deletion. It is interesting to note that after genetical screening, also the

unaffected mother of the homozygous subject (she and her husband are consanguineous of 3rd generation) carried the mutation at heterozygous state. This result underlines that the autosomal dominance of the trait shows an incomplete penetrance in one of the heterozygous and consanguineous carriers.

Family TP4 and TP5.

Following the previous scheme, we found that the affected members of this two unrelated families were actually heterozygous BSS patients. Sequencing analysis in this cases revealed a novel mutation, a heterozygous A>C transversion at nucleotide +169, resulting in an N41H substitution in the GPIIb α protein sequence. The amino acid substitution, named Padova variant of BSS, is located in the first leucine-rich repeat (LRR) of the protein. Replacement of the asparagine 41 with a histidine (N41H) drastically disturbs the conformational behavior of the first portion of the N-terminal region of GPIIb α , which is directly involved in vWF binding. In fact, the mutant N41H lost two of the three stabilizing interactions during the molecular dynamics simulation.

The two unrelated families described here represent a form of heterozygous BSS with an autosomal dominant inheritance never described before.

We can conclude that the new diagnostic tools allowed to better characterize our patients affected by Autosomal Dominant Macrothrombocytopenia.

Four Families out of five were assigned to the more characterized areas of MRD (1 Family) and BSS (3 Families), but the defects found responsible for the disease are new mutations (families TP1, TP4 and TP5) or are present in an homozygous condition (Family TP3) never described before.

One Family (TP2) remains to be characterized and will be matter of further investigations.

The study also allowed to identified conformational mAbs able to differentiate the newly identified BSS-Padova Variant, from other BSS forms.

INDICE

Abbreviazioni	pag. 5
Introduzione:	pag. 7
Obiettivo della tesi:	pag. 15
Materiali e Metodi:	pag. 17
Pazienti:	pag. 25
Risultati:	pag. 27
Discussione:	pag. 51
Conclusioni:	pag. 59
Bibliografia:	pag. 61

ABBREVIAZIONI

ABP: Actin binding proteins
BSS: Sindrome di Bernard-Soulier
BSS-BZ: Sindrome di Bernard-Soulier variante Bolzano
C: Cisteina
CAMT: Trombocitopenia amegacariocitica congenita
CD42a: Glicoproteina IX
CD42b: Glicoproteina Ib α
CD49: Glicoproteina Ia
CHMT: Macrotrombocitopenia Cronica Ereditaria
c-mpl: Recettore della trombopoietina, anche indicato come TpoR
FIG: Figura
FSC-H: Forward Scatter
GP: Glicoproteina
GPIb/V/IX: Recettore per il Fattore di von Willebrand
gplbα: Gene che codifica per la Glicoproteina Ib α
H: Istidina
GPIIb/IIIa Recettore per il Fibrinogeno
IM:	Indice Megatrombocitario, percentuale di piastrine giganti sul totale
ITP: Trombocitopenia Idiopatica o autoimmune
L: Leucina
LRR: Leucine Rich Repeats, sequenze ripetute ricche di Leucina
MCH: Mean Fluorescence Channel, Canale Medio di Fluorescenza
MGG: Colorazione May Grunwald/Giemsa
MK: Megacariociti
MRD: MYH9 Related Diseases, Malattie Correlate al gene myh9
myh9:	.. Gene della Catena Pesante della Miosina Non Muscolare tipo IIA
N: Asparagina
NMMCH-IIA: Miosina Non Muscolare di tipo IIA
PCR:	.. Polymerase Chain Reaction, reazione a catena della polimerasi
PLTS: Piastrine
R: Arginina
RIPA: Aggregazione alla Ristocetina
T: Treonina
TPO: Trombopoietina
VNTR: Variable Number Tandem Repeats
vWF: Fattore di von Willebrand
WT: Wild Type
X: Codone di Stop
Y: Tirosina

INTRODUZIONE

Il processo di formazione dei megacariociti e la successiva trombopoiesi sono controllati da diversi fattori di crescita. Il più importante di questi è la trombopoietina (TPO), che, attraverso il suo recettore (c-mpl) presente sulla superficie dei MK e delle piastrine, stimola progressivamente la proliferazione, la maturazione e la produzione dei trombociti. La megacariocitopoiesi include molti insoliti processi, dal momento che i megacariociti sono cellule poliploidi, con un particolare contenuto di inclusioni citoplasmatiche quali alfa granuli, corpi densi e complicati sistemi di membrane interne, che vanno incontro a riarrangiamenti e fenomeni di trafficking intracellulare finemente controllati durante tutta la trombopoiesi. I megacariociti maturi infatti, frammentano il loro voluminoso citoplasma in migliaia di singole piastrine circolanti a partire da lunghe estroflessioni cellulari (proplatelets) che sono il risultato di importanti riorganizzazioni del loro citoscheletro (*Shvdasani R., 2001; Chen Z e al., 2007*). Tutti questi processi e le loro eventuali anomalie sono di considerevole interesse e rilevanza non solo per la biologia cellulare, ma anche e soprattutto per l'ematologia clinica, in quanto la loro comprensione può aiutare chiarire le cause delle trombocitopenie di eziopatogenesi ancora incerta, sfruttando le scoperte degli ultimi anni e la disponibilità di nuovi strumenti diagnostici.

Le piastrinopenie rappresentano il più frequente disordine dell'emostasi ed hanno origini diverse. Circa il 5% di esse sembra essere rappresentato da varie forme di trombocitopenia ereditaria (*Gohda F e al., 2007*).

Queste ultime costituiscono un gruppo eterogeneo di entità cliniche che possono essere classificate, oltre che in base al pattern di trasmissione genica, anche rispetto alle dimensioni delle piastrine (usualmente aumentate), al grado di severità della diatesi emorragica e/o all'eventuale associazione sindromica con manifestazioni cliniche diverse (*Balduini CL e al., 2002*).

Una caratteristica comune a tutte le piastrinopenie ereditarie è sicuramente la difficoltà incontrata nella loro identificazione e classificazione, possibile solo in laboratori specializzati (*Balduini CL e al., 2003; Noris P. e al., 2004*).

Queste patologie sono rare e, data la facilità con cui, a parità di sintomatologia, vengono erroneamente diagnosticate come forme autoimmuni (*Kunishima S e al., 2006; Gohda F e al., 2007*), non sono disponibili dati certi sulla loro reale diffusione. Tuttavia, considerando l'incidenza della porpora trombocitopenica autoimmune (ITP), la più comune forma acquisita di trombocitopenia, stimata nella misura di 5,5

casi per 100.000 abitanti/anno (*Frederiksen H e al., 1999*), si può estrapolare un'incidenza delle forme di trombocitopenia ereditaria di circa $0,25 \times 100.000$ abitanti per anno.

La corretta diagnosi di trombocitopenia ereditaria è di enorme importanza al fine di evitare ai pazienti pesanti provvedimenti terapeutici quali ad esempio il massiccio trattamento con steroidi o la splenectomia, che sono certamente indicati nelle piastrinopie acquisite come l'ITP, ma non sono necessari né risolutivi nei casi di trombocitopenia familiare comportando al contrario al paziente inutili e importanti effetti collaterali.

Recentemente sono stati evidenziati i difetti genetici alla base di alcune forme di piastrinopenia ereditaria. Pur non escludendo che nelle forme non ancora caratterizzate di trombocitopenia, anche altri loci possano essere coinvolti, va notato che le mutazioni individuate come causa delle diverse forme sono tutte localizzate su pochi geni, che giocano un ruolo fondamentale nel processo di maturazione delle piastrine e/o sono coinvolti nella loro normale funzionalità.

Per questo, i loci elencati di seguito si possono considerare "hot spot" di mutazione in questo tipo di patologie, ed è su questi che si concentrano gli sforzi per individuare nuove anomalie alla base delle patologie non ancora caratterizzate.

Tra i principali geni interessati dalle mutazioni oggi note quali responsabili di piastrinopatie o piastrinopenie sono il gene del recettore del fibrinogeno (GPIIb/IIIa), quello del recettore della TPO (c-mpl) o dei fattori di trascrizione che regolano l'espressione proteina coinvolte nel processo di maturazione dei MK (per ex GATA1, CBFA-2 o FOG-1), le cui anomalie si riflettono in un'alterata o addirittura assente trombocitopoiesi. Alterazioni del gene della GPIIb/IIIa causano la Trombastenia di Glanzmann (*Seligsohn U., 2002*), mutazioni del gene c-mpl sono, invece, responsabili della Trombocitopenia Amegacariocitica Congenita (CAMT) (*Ballmaier M. e al., 2001*). Difetti di GATA1 stanno infine all'origine di una forma di macrotrombocitopenia X-linked (*Nichols KE e al., 2000; Freson K e al., 2001*).

Restringendo il campo alle Macrotrombocitopenie, ed in particolare a quelle trasmesse per via autosomica, i geni le cui mutazioni sono state finora riconosciute come responsabili della patologia sono i seguenti:

- geni che codificano le diverse catene del recettore per il Fattore von Willebrand (vWF), il complesso GPIb/V/IX. Questo recettore, composto dalle glicoproteine (GP) Ib α , Ib β , V e IX, è intimamente connesso con il citoscheletro attraverso il dominio interno della catena GPIb α , la quale ha un importante ruolo nella

trasduzione del segnale per l'innescò dell'attivazione piastrinica. Sono state finora descritte in letteratura più di 20 mutazioni a carico di GPIb α , 12 su GPIb β e 10 su GPIX. Nessuna mutazione è stata descritta per GPV (Lopez JA e al., 1998).

Il maggiore componente del complesso è GPIb α , che, come gli altri elementi, appartiene alla superfamiglia delle proteine con sequenze ripetute ricche di Leucina (Leucine Rich Repeats o LRR). I sette LRR di GPIb α sono localizzati all'N-terminale della catena, dove formano dei tratti β -strand che contribuiscono largamente a costituire il sito di legame per il vWF. Sono lunghi tipicamente 22-28 aminoacidi, ed è identificabile una sequenza consenso (LXLSXNXLXXLPXG α /LL/FXXLXXLXX) con diversi residui che risultano conservati in posizioni precise, sia all'interno della superfamiglia delle proteine con LRR, sia tra proteine omologhe delle varie specie animali (Afshar-Kharghan e al., 2000b). Tali aminoacidi sono perciò considerati fondamentali per la stabilità e la corretta funzionalità di questa catena proteica e dell'intero recettore piastrinico per il vWF (Lopez JA., 1994; Lopez JA e al., 1998). Il dominio citoplasmatico della GPIb α , oltre a trasdurre il segnale di attivazione in seguito al legame col vWF, si associa anche ad elementi del citoscheletro piastrinico, le Actin Binding Proteins (ABP). Alterazioni di questa glicoproteina, quindi, possono spiegare anche l'anomala morfologia dei megacariociti, dovuta ad una non corretta interazione col vWF durante la megacariopoiesi o ad un'alterata interazione col citoscheletro.

- Il gene myh9 che codifica per la Catena Pesante della Miosina Non Muscolare di tipo II (NMMCH-IIA). Questa proteina, dotata di attività ATPasica, è un importante costituente del citoscheletro dei MK, dei trombociti e dei granulociti neutrofili in cui è ugualmente espressa. Se alterata, NMMCH-IIA precipita in granuli citoplasmatici senza assolvere al suo ruolo strutturale, compromettendo la trombopoiesi. Il gene è composto da 40 esoni. Finora sono state identificate mutazioni solo a carico di pochi esoni (1, 10, 16, 24, 25, 26, 30, 38, 40), che causano anomalie della funzione ATPasica (mutazioni degli esoni 1, 10, 16) o che comunque inficiano il ruolo strutturale della proteina. Si pensa che difetti della NMMCH-IIA, così come viene ipotizzato per le anomalie del complesso GPIb/V/IX, portino ad un alterato processo di maturazione delle piastrine, dovuto nel primo caso ad una carente riorganizzazione del citoscheletro dei MK, e nel secondo ad una deficitaria interazione col vWF. Difetti in questi processi impediscono una corretta formazione e

maturazione delle proplatelets, causando la conseguente Macrotrombocitopenia (Chen Z. e. al., 2007).

Le Macrotrombocitopenie ereditarie sono caratterizzate da una grande eterogeneità del quadro clinico, che può presentare diversi gradi di diatesi emorragica, così come la presenza o meno di quadri sindromici associati alla piastrinopenia. Per questa ragione l'identificazione di queste malattie su base puramente clinica diventa difficile. Conoscere i difetti genetici alla base della loro eziopatogenesi può essere senz'altro utile ad una migliore classificazione.

Negli ultimi anni l'avvento di nuove tecniche diagnostiche (citofluorimetria, Immunofluorescenza, PCR, sequenziamento) ha permesso di elaborare un algoritmo diagnostico più preciso per classificare le trombocitopenie ereditarie e facilitarne la diagnosi (Balduini CL e al., 2003; Noris P. e al., 2004).

Tale algoritmo si presenta come un diagramma di flusso (Fig. 1 A e B) ad ogni nodo del quale è possibile, seguendo una chiave dicotomica, arrivare ad una diagnosi dirimente usando strumenti sempre più efficaci ed approfonditi, che partono dall'osservazione clinica (anamnesi, modalità di trasmissione), passano attraverso l'osservazione microscopica di preparati su vetrino, fino ad arrivare al livello molecolare con lo studio in laboratorio delle proteine piastriniche e del DNA.

Tale procedura ha permesso di rivedere e riordinare la classificazione di queste malattie proposta in passato.

La malattia di May-Hegglin (Hegglin R., 1945) e la Sindrome di Sebastian (Peterson LC e al., 1985) erano un tempo distinte sulla base delle diverse caratteristiche ultrastrutturali delle inclusioni citoplasmatiche dei loro leucociti, mentre la Sindrome di Fechner (Greinacher A e al., 1990) e la Sindrome di Epstein (Epstein CJ e al., 1972), che presentano entrambe sordità neurosensoriale, nefriti e cataratta, erano divise sulla base della presenza o assenza di inclusioni citoplasmatiche leucocitarie. Oggi si ritiene che le 4 sindromi appena menzionate rappresentino diverse espressioni della stessa entità clinica, che spazia da forme asintomatiche di macrotrombocitopenia con eventuali inclusioni citoplasmatiche leucocitarie, a forme severe e sindromiche, caratterizzate da cataratta, sordità ed ematuria con possibile evoluzione verso gravi disfunzioni renali. Tali malattie vengono oggi complessivamente indicate col nome generico di "Malattie correlate al gene myh9" (MRD o MYH9 related diseases), e risultano da differenti mutazioni del sopra citato gene della catena pesante della Miosina Non Muscolare di Tipo II-A umana (NMMCH-IIA), che causano difetti nell'assemblaggio (Balduini CL e al., 2002; Seri M

e al., 2003) e nella distribuzione delle fibrille citoscheletriche (Marigo V. e al., 2004) dei MK, delle piastrine e dei neutrofili. Proprio la presenza di corpi inclusi (Corpi di Döhle) dovuti alla precipitazione della NMMCH-IIA nel citoplasma dei granulociti neutrofili, che può avere un aspetto macrogranulare o microgranulare a seconda delle manifestazioni della MRD, permette di diagnosticare queste malattie con una semplice colorazione May-Grunwald su strisci di sangue periferico. Non è però sempre possibile evidenziare tali inclusioni con una semplice colorazione: per una diagnosi certa è necessario ricorrere alla marcatura dei neutrofili con anticorpi fluorescenti anti NMMCH-IIA, che ne rendano visibile la distribuzione al microscopio a fluorescenza.

Un altro importante gruppo di Macrotrombocitopenie va sotto il nome di Sindrome di Bernard-Soulier (BSS) (Lopez JA e al., 1998; Savoia A e al., 2001), dovuta a difetti o all'assenza sulla superficie piastrinica del complesso glicoproteico GPIb/V/IX (recettore per il vWF).

La forma classica di BSS è ad ereditarietà autosomica recessiva, ed ha un'incidenza di 1 su un milione. La conta piastrinica varia da 20 a $100 \times 10^9/L$, con aumento di diametro ($>8 \mu m$) e volume ($>12.5 \text{ fL}$) dei trombociti e loro ridotta sopravvivenza. Le piastrine di questi pazienti aggregano normalmente in risposta ad ADP, collagene o epinefrina, ma viene meno la risposta alla ristocetina (RIPA test), cui è sensibile la funzionalità del recettore per il vWF.

Nel 1990 è stata descritta una prima variante di BSS ad ereditarietà autosomica dominante (denominata Variante Bolzano o BSS-BZ), in cui il recettore del vWF è presente, ma mutato nella sequenza proteica. Tale mutazione è macroscopicamente rivelata in diagnostica da un legame ridotto o assente rispettivamente degli anticorpi monoclonali (mAb) LJ-Ib10, LJ-Ib1 (De Marco L. e al., 1990; Ware J e al., 1993) e SZ2 (Savoia A. e al., 2001), diretti contro la subunità GPIb α (CD42b) del complesso GPIb/V/IX, mentre a livello genetico si rileva la comparsa di un sito di taglio per l'enzima HpaI nel locus alterato.

La mutazione genica causa della variante autosomica dominante BSS-BZ è infatti una transizione C>T in posizione 515 nel gene gplb α sul cromosoma 17p2, che crea un nuovo sito di restrizione e porta alla sostituzione aminoacidica Ala156 \rightarrow Val nella proteina corrispondente (De Marco L. e al., 1990; Ware J. E al., 1993; Margaglione M e al., 1999).

Oltre alla variante BSS-BZ sono state individuate recentemente altre mutazioni di GPIb α che causano forme di BSS a trasmissione autosomica dominante (Miller JL e

al., 1992). Infine, sono stati rilevati sul gene $gplb\alpha$ alcuni polimorfismi che non sembrano influenzare l'espressione o la funzionalità della relativa proteina e sono variamente frequenti nella popolazione normale: la sostituzione -5C/T (o polimorfismo Kozak); la presenza di un numero variabile (da 0 a 4) di ripetizioni in tandem di una sequenza di 13 aminoacidi (varianti VNTR D, C, B, A rispettivamente) responsabili dei diversi pesi molecolari attribuibili alla proteina; una sostituzione aminoacidica Thr145Met denominata polimorfismo Hpa2 e una sostituzione silente in terza base nel codone che specifica per Arg358 (*Lopez JA., 1994*).

L'applicazione dell'algoritmo diagnostico citato alle macrotrombocitopenie ereditarie ha permesso in uno studio di catalogare circa il 60% dei pazienti con trasmissione autosomica dominante della malattia (*Noris P. e al., 2004*) (Fig. 1B).

Il restante 40% dei pazienti va invece a costituire un terzo gruppo di trombocitopenie di incerta classificazione. Una parte di queste sono Macrotrombocitopenie ad ereditarietà autosomica dominante, indicate da alcuni Autori con l'eponimo di Macrotrombocitopenia Mediterranea (*Von Behrens WE, 1975*) o Trombocitopenia Genetica con trasmissione Autosomica Dominante (*Najean Y e al., 1990*). Altri autori, invece, si riferiscono a questo gruppo di pazienti catalogandoli come forme "true type" di Macrotrombocitopenia Cronica Ereditaria o Chronic Isolated Hereditary Macro-Thrombocytopenia (CHMT – Macrotrombocitopenia Cronica Isolata Ereditaria) (*Fabris F e al., 1997; Fabris F e al., 2002*).

Per chiarezza in questa tesi sarà usato l'eponimo CHMT.

L'approfondimento dello studio delle Macrotrombocitopenie Autosomiche Dominanti classificate come CHMT e la ricerca dei difetti molecolari alla base di queste patologie costituiscono l'oggetto di questo lavoro.

La malattia presenta dei caratteri clinici che la rendono assai difficilmente distinguibile dalla ITP. La prima osservazione di CHMT avvenne infatti in Cecoslovacchia nel 1967, ma ulteriori studi sulla sopravvivenza piastrinica vennero condotti a Parigi proprio con lo scopo di investigare le cause del fallimento dei classici trattamenti terapeutici (steroidi e splenectomia) su pazienti ritenuti erroneamente affetti da ITP (*Najean Y e al., 1990*).

Il quadro clinico che emerge per CHMT, è caratterizzato da una macrotrombocitopenia lieve ad ereditarietà autosomica dominante, non riconducibile a particolari anomalie cromosomiche, e con una funzionalità e sopravvivenza piastrinica apparentemente nella norma.

Dagli anni Novanta ad oggi nel laboratorio del Prof. F. Fabris sono stati individuati 59 pazienti con CHMT, appartenenti a 17 diverse famiglie.

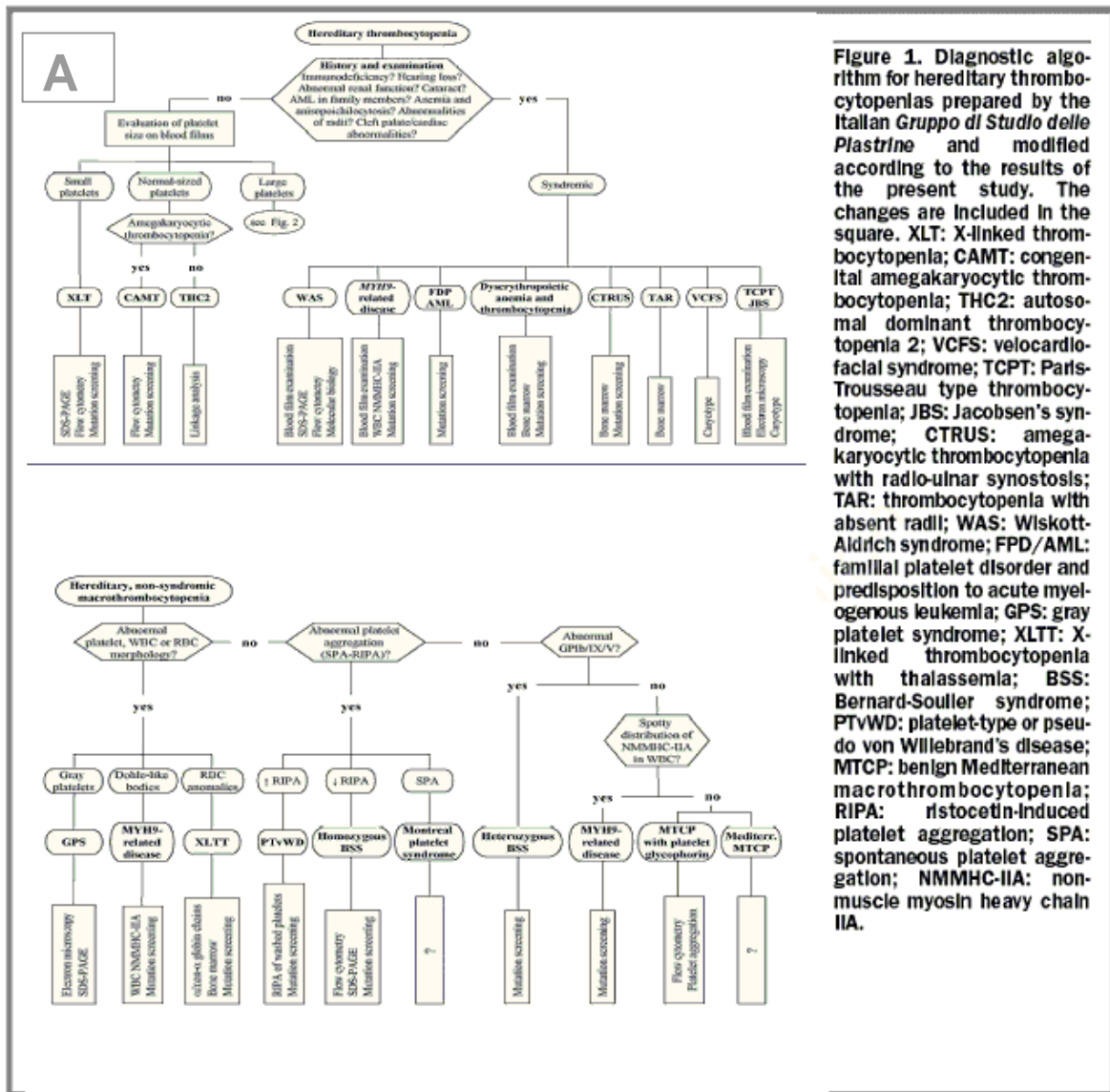


Figure 1. Diagnostic algorithm for hereditary thrombocytopenias prepared by the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine and modified according to the results of the present study. The changes are included in the square. XLT: X-linked thrombocytopenia; CAMT: congenital amegakaryocytic thrombocytopenia; THC2: autosomal dominant thrombocytopenia 2; VCFS: velocardio-facial syndrome; TCPT: Paris-Trousseau type thrombocytopenia; JBS: Jacobsen's syndrome; CTRUS: amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis; TAR: thrombocytopenia with absent radii; WAS: Wiskott-Aldrich syndrome; FPD/AML: familial platelet disorder and predisposition to acute myelogenous leukemia; GPS: gray platelet syndrome; XLT: X-linked thrombocytopenia with thalassemia; BSS: Bernard-Soulier syndrome; PTvWD: platelet-type or pseudo von Willebrand's disease; MTCP: benign Mediterranean macrothrombocytopenia; RIPA: ristocetin-induced platelet aggregation; SPA: spontaneous platelet aggregation; NMMHC-IIA: non-muscle myosin heavy chain IIA.

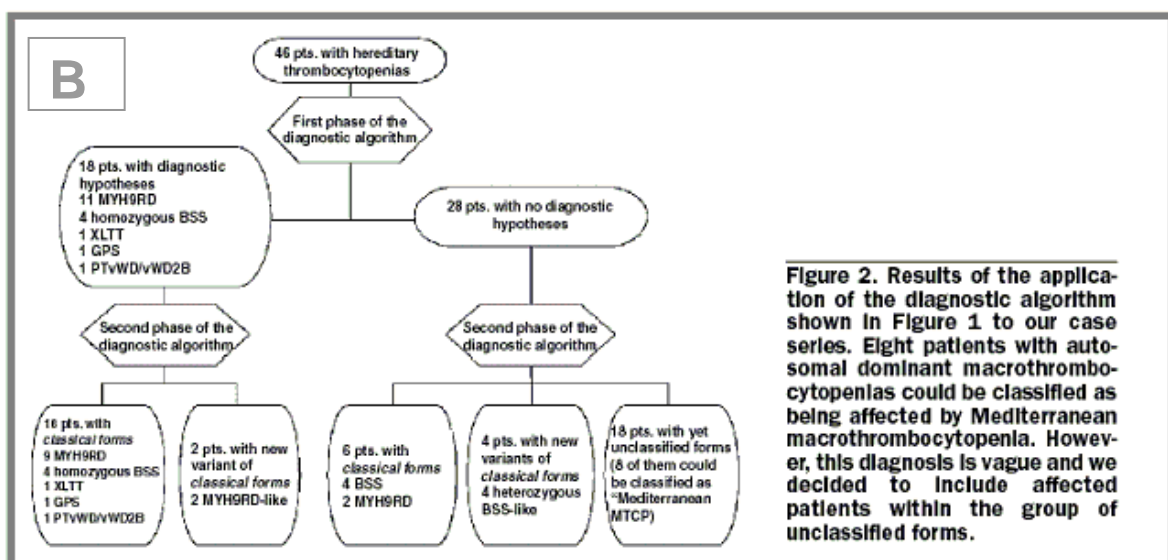


Figure 2. Results of the application of the diagnostic algorithm shown in Figure 1 to our case series. Eight patients with autosomal dominant macrothrombocytopenias could be classified as being affected by Mediterranean macrothrombocytopenia. However, this diagnosis is vague and we decided to include affected patients within the group of unclassified forms.

Fig. 1. Algoritmo diagnostico per la classificazione delle piastrinopenie (da Noris P e al, 2004).

Questi pazienti presentano evidente anisocitosi piastrinica, una diatesi emorragica da lieve a moderata, e nessuna correlazione tra conta piastrinica e tendenza al sanguinamento (*Fabris F e al., 1997*). Nei diversi casi, inoltre, anche tra gli appartenenti ad una stessa famiglia, la conta piastrinica può variare sensibilmente da valori molto bassi (31×10^9 plts/L) a conte vicine ai valori normali (140×10^9 plts/L).

Nel corso degli anni sono stati effettuati presso il nostro laboratorio alcuni studi preliminari. L'aumentata espressione delle glicoproteine GPIb/V/IX e GPIIb/IIIa (recettore per il fibrinogeno) riscontrata con studi di citofluorimetria in quasi tutti i pazienti non sembrava rivestire particolare importanza, dal momento che concorda con l'aumento della superficie delle piastrine. La funzionalità piastrinica saggiata con test di aggregazione risultava normale con i maggiori agonisti (ADP $2 \mu\text{M}$, Collagene $2 \mu\text{g/mL}$, Adrenalina $10 \mu\text{M}$), mentre si è rivelata in alcune famiglie eterogenea la risposta alla Ristocetina.

Altri dati molto preliminari, effettuati su pochissimi pazienti, sembravano suggerire che i megacariociti andavano incontro ad una maturazione asincrona nucleocitoplasmatica; mentre le CFU-MK presentavano una crescita rapida con precoce apoptosi (*Fabris F e al., 2002*).

Per meglio comprendere il meccanismo eziopatogenetico della macrotrombocitopenia in questi pazienti sono stati studiati in passato anche gli indici diretti di trombopoiesi (*TPO, piastrine reticolate e glicocalicina*) (*Fabris F e al., 2000*). I risultati ottenuti sembrano escludere difetti quantitativi nella produzione di TPO e mostravano una normale massa megacariocitica.

Negli ultimi tre anni, il reperimento di nuovi anticorpi monoclonali e la disponibilità di nuove strumentazioni e tecniche di indagine molecolare hanno permesso al nostro laboratorio di riordinare questa casistica e di riprendere lo studio delle famiglie classificate su base clinica come affette da CHMT, utilizzando in modo più completo ed esaustivo l'algoritmo diagnostico che nel frattempo era stato proposto dal Gruppo di Studio Italiano delle Piastrine,

La sua applicazione ci ha permesso di selezionare meglio i casi classificati come Macrotrombocitopenia Ereditaria Autosomica Dominante non ancora caratterizzati, ponendo le basi per la ricerca delle cause molecolari della CHMT.

OBIETTIVO DELLA TESI

Scopo di questa tesi è stata la ricerca delle basi molecolari delle alterazioni riscontrate nei pazienti classificati come affetti da Macrotrombocitopenia Cronica Ereditaria a Trasmissione Autosomica Dominante (CHMT). E' stato seguito un algoritmo diagnostico che prevede l'utilizzo delle nuove strumentazioni e tecniche di indagine a disposizione del nostro laboratorio, anche con la prospettiva di sviluppare specifiche metodologie diagnostiche di facile applicazione per una pronta individuazione di queste patologie.

Le tecniche di amplificazione genica e di sequenziamento, e l'analisi dell'espressione di proteine resa possibile dalla disponibilità di anticorpi monoclonali ben caratterizzati sono gli strumenti che principalmente hanno permesso la percorribilità del progetto.

Saranno qui riportati i risultati degli studi relativi a cinque famiglie.

Gli obiettivi del progetto sono stati perseguiti attraverso i seguenti punti:

1. Richiamo e arruolamento delle diverse famiglie affette da Macrotrombocitopenia Autosomica Dominante (CHMT). Revisione dell'anamnesi clinica e compilazione o aggiornamento degli alberi genealogici.
2. Applicazione dell'algoritmo diagnostico e identificazione del difetto piastrinico: analisi morfologica ed immunomorfologica delle piastrine, studi di espressione di alcune proteine piastriniche tramite tecniche biochimiche (ELISA, Western blot), citometria a flusso, esecuzione di test funzionali (aggregazione), ed esclusione delle mutazioni note.
3. Ricerca ed identificazione di nuove mutazioni nei geni candidati come hot spot di mutazione *myh9* e *gplb α* . Nel caso di quest'ultimo locus sono state esplorate non solo le regioni codificanti, ma anche le sequenze fiancheggiate gli esoni, i siti di splicing e le zone promotoriali.

MATERIALI E METODI

Prelievo venoso e preparazione del Plasma Ricco di Piastrine (PRP).

I campioni di sangue venoso periferico sono stati raccolti dai propositi, dai loro familiari e da volontari sani dopo consenso informato. Il sangue è stato anticoagulato con K-EDTA 1,5 mg/mL per effettuare la conta piastrinica automatica e manuale, e per gli strisci su vetrino; con Na Citrato 3,8% per i test di aggregazione piastrinica e per la citofluorimetria e con Citratato Acido-Destrosio (ACD) per l'ottenimento di lisati piastrinici.

Per l'ottenimento del PRP, il sangue dei controlli e dei soggetti non affetti è stato centrifugato a 180 x g per 15' a temperatura ambiente, mentre il sangue degli affetti è stato centrifugato a 70 x g per 6' al fine di evitare la sedimentazione dei macrotrombociti (*Ware J. E al., 1990*). Il surnatante è stato quindi trasferito in provette pulite adeguate alle varie analisi o alle successive fasi di preparazione del campione.

Colorazione con May-Grunwald/Giemsa (MGG) su strisci di sangue periferico.

I vetrini sono stati posti in contatto con il reattivo di May-Grunwald per 2', lavati con acqua di rubinetto per 1' e 30" e colorati con reattivo Giemsa diluito 1:10 in acqua di rubinetto per 10'. Dopo essere stati risciacquati con acqua di rubinetto PER 1', i vetrini colorati sono stati montati ed osservati al microscopio ottico (Leica DMR) con obiettivo 100X ad immersione, equipaggiato con con fotocamera digitale Nikon DS-5M-L1. La percentuale di piastrine grandi sul totale delle piastrine, o Indice Megatrombocitario (IM), è stata valutata durante l'osservazione al microscopio ottico dopo colorazione, e corrisponde alla percentuale delle piastrine il cui diametro risulta uguale o superiore alla metà di un globulo rosso (Valori Normali: 1-6%).

Immunofluorescenza su vetrino.

I vetrini sono stati fissati per 15' con Paraformaldeide (PFA) 4% in PBS e passati in acetone per 30". Dopo un rapido lavaggio in PBS 1X sono stati incubati per 30' a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale (mAb) NMG2 diretto contro MYH9 e cortesemente fornito dal Prof. S. Sartore, diluito 1:250.

Dopo 2 lavaggi consecutivi di 5' ciascuno con PBS1X, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo secondario antimouse IgG-FITC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluito 1:100 per 30' a temperatura ambiente. Adeguati controlli normali ed aspecifici sono stati inseriti ad ogni test eseguito. Dopo i due lavaggi finali con PBS1X di 5' ciascuno, i vetrini sono stati montati con Elvanol e osservati al microscopio a fluorescenza con gli opportuni filtri (Leica DMR). Le immagini sono state realizzate con fotocamera digitale Nikon DS-5M-L1.

Aggregazione alla Ristocetina (RIPA).

Il test di aggregazione alla Ristocetina è stato condotto in tutti i propositi e nei controlli alla concentrazione di 1,5 mg/mL su PRP da sangue citratato. E' stato usato un lumiaggregometro Chronolog (Haverton, PA) seguendo il metodo di Born (*Girolami A. e al., 1980*). Per alcuni pazienti e loro familiari è stato possibile ottenere anche i dati dell'aggregazione a 1,2 mg/mL.

I valori di aggregazione sono stati espressi come differenza percentuale tra la quantità di luce trasmessa dal PRP (0%) e dal Plasma Povero di Piastrine (100%) di ogni paziente o controllo normale.

Anticorpi monoclonali.

Con i test in citofluorimetria è stato valutato il binding di alcuni o di tutti i seguenti mAbs diretti contro le principali glicoproteine della superficie piastrinica:

antiCD41a-FITC (Serotec, Oxford,UK PM6/248) diretto contro la GPIIb/IIIa, quale marker piastrinico specifico non coinvolto nella patologia oggetto dello studio; antiCD42a-FITC (clone GR-P Serotec, Oxford,UK) diretto contro la GPIX, componente del recettore per il vWF GPIb/V/IX; antiCD42b-FITC clone SZ2 (Immunotech) che riconosce un piccolo epitopo (Tyr276-Glu282) localizzato nella regione ricca di solfati anionici, a ridosso dell'estremità C-Terminale della regione LRR di GPIb α (*Ward CM e al., 1996*). SZ2 è usato come anticorpo conformazionale nella diagnosi della variante BSS-BZ, poiché in questi pazienti il binding risulta diminuito (*Savoia A. e al., 2001*). Usato in studi di inibizione, questo mAb inibisce il legame col vWF Botrocetina dipendente, ma ha effetti ridotti o nessun effetto sul legame col vWF dipendente da Ristocetina (*Ward CM e al., 1996*). Inoltre il binding di SZ2 è diversamente influenzato da mutazioni indotte *in vitro* a carico dell'Asn41

nel primo repeat della regione LRR all'N-terminale della GPIIb α , sicuramente coinvolto nel legame col vWF: SZ2 riconosce i mutanti Asn41Ser, ma non si lega ai mutanti Asn41Lys, aventi, al contrario dei primi, una conformazione dell'epitopo molto diversa dalla proteina nativa (*Afshar-Kharghan V e al., 2000b*).

Per meglio caratterizzare la regione N-terminale della GPIIb α , sono stati usati anche altri mAbs anti CD42b precedentemente descritti: i cloni LJ-Ib1 e LJ-Ib10 cortesemente forniti dal Prof. Z.M. Ruggeri (*Ware J. E al., 1990; De Marco e al., 1990; Ware J e al., 1993; Savoia A e al., 2001*); ed i cloni AK2 (Serotec, Oxford,UK) e HIP1 (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA).

LJIb1 riconosce un epitopo localizzato tra i residui 1 e 293 della GPIIb α tipicamente assente nella BSS-BZ (*De Marco L e al., 1990*) ed inibisce il binding del vWF alle piastrine stimolate con ristocetina.

L'epitopo riconosciuto da LJ-Ib10 è situato tra i residui Arg238 e Arg293 della GPIIb α , ed è riconosciuto dal mAb anche in condizioni denaturanti. LJ-Ib10 inibisce il legame con la trombina, ma non ha nessun effetto sul binding del vWF ristocetina-mediato (*Lopez JA., 1994; Shen Y e al., 2000*).

Gli epitopi a cui si legano AK2 e HIP1 sembrano essere localizzati rispettivamente nel primo repeat della LRR e nell'intorno del secondo repeat. Entrambi questi mAbs sono stati segnalati per essere molto sensibili alle mutazioni provocate in vitro in posizione Glu40, nel primo repeat ricco di Leucina della GPIIb α (*Peng Y e al., 2005*).

Tutti i mAbs che lo richiedevano sono stati accoppiati con un secondario antimouse IgG-FITC diluito 1:50 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

Citofluorimetria.

Sono stati effettuati test di citometria a flusso su tutti i propositi per i quali era stata esclusa una malattia correlata a deficit di MYH9, su alcuni loro familiari affetti e non affetti, e su volontari sani.

In un volume finale di 25 μ l sono stati incubati 22,5 μ l di PRP nativo o diluito 1:10 con Tyrode's buffer (nel caso in cui la conta piastrinica fosse inferiore a 50 $\times 10^9$ plts/L) con 2,5 μ l dell'appropriato mAbs. L'incubazione è avvenuta a temperatura ambiente (TA) per 15'. Nel caso degli anticorpi non direttamente coniugati con FITC, si è resa necessaria una seconda incubazione a TA per 15' con 2,5 μ l di secondario anti mouse IgG-FITC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluito 1:50. Appropriati

controlli (bianco ed aspecifico) sono stati realizzati ad ogni seduta per tutti i soggetti in esame ed i controlli sani.

Le piastrine marcate sono state risospese in 500 μ l di Tyrode's buffer a pH 7,4 e analizzate con un citofluorimetro BD FACScan (BD Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) ed il relativo software CellQuest versione 3.1.

Per ogni campione sono stati acquisiti 10000 eventi. L'eccitazione dei fluorocromi è affidata ad un Argon laser con filtro a banda passante di 530 nm. La popolazione piastrinica è stata individuata in base alle dimensioni (forward scatter) ed alla granularità (side scatter) delle particelle, nonché in base al legame dell'anticorpo anti-CD41a (marcatore piastrinico). Per la quantificazione della fluorescenza risultante dal binding dei diversi anticorpi sono stati usati i rispettivi istogrammi di fluorescenza ed i valori del Canale Medio di Fluorescenza (Mean Fluorescence Channel o MCH) elaborati dal software. In ogni istogramma, le regioni soglia sono state impostate in modo che includessero almeno il 98% degli eventi positivi registrati.

Quando necessario, i valori registrati per il binding dei vari cloni diretti contro GPIIb α (SZ2, LJIb1, LJIb10, AK2 e Hip1) sono stati arbitrariamente normalizzati attribuendo ai valori di MCH dei controlli sani il 100% di espressione.

Per comparare le differenze tra i livelli di binding ottenuti per i diversi mAbs nei pazienti e nei controlli sani, e stabilirne la significatività, è stato usato il test statistico T di Student a due code. Per valori di $p < 0,05$ le differenze sono state considerate significative.

Preparazione dei lisati piastrinici.

Per prevenire l'attivazione piastrinica, al PRP ottenuto come sopra descritto dal sangue anticoagulato con ACD sono stati aggiunti 0,2 volumi di PBS/EDTA 2%. Per limitare la contaminazione da globuli rossi, i campioni di PRP dei pazienti e dei controlli sono stati centrifugati una seconda volta per 5' rispettivamente a 70 x g e a 180 x g, e trasferiti in provette pulite. Le piastrine così ottenute sono state separate dal Plasma Povero di Piastrine (PPP) centrifugando a 800 x g per 20', e risospese in un appropriato volume di Tyrode's buffer.

Aliquote di 1×10^7 piastrine sono state lisate con 2X Laemmli sample buffer [10% glycerol, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% β -mercaptoethanol, 50 mmol/l Tris

HCl pH 6.8, and 0.05% bromophenol blue] e bollite per 5'. Le aliquote sono state conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Western blot.

I lisati piastrinici sono stati separati su un gel SDS-page al 7,5% di poliacrilammide, corso a TA all'ampereaggio costante di 25mA per 1 ora e 30'. Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) in un buffer contenente Tris (25 mmol/L), glicina (192mmol/L) e metanolo 20% a 350 mA a TA per 2 ore e 30'. La membrana è stata saturata overnight a 4°C con una soluzione di 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L cloruro di sodio (pH 7.6) e 1% Tween 20 (Tampone di lavaggio TBST) addizionata con il 3% di BSA. Il giorno seguente, la nitrocellulosa è stata lavata tre volte per 10' con TBST ed incubata 1 ora a TA con il mAb LJ1b10 alla concentrazione finale di $6\mu\text{g}/\text{mL}$ in TBST. Dopo la rimozione dell'anticorpo primario, il blot è stato lavato due volte per 15' con TBST ed una volta in TBS [10 mmol/L Tris, 150 mmol/L cloruro di sodio (pH 7.6)], ed incubato per 1 ora con un secondario anti-mouse coniugato con HRP (GE Healthcare, UK) diluito 1:8000 in TBST.

Le membrane, dopo due lavaggi in TBST ed uno in TBS sono state trattate con un kit per la rivelazione della luminescenza (GE Healthcare, UK) ed esposte per 30" ad una lastra fotografica (Kodak).

L'espressione relativa delle bande apparse sulla lastra è stata quantificata con la densitometria usando il programma per PC Scion Image Beta 4.02 (Scion Corp. Maryland USA) attraverso il calcolo dei rapporti tra le aree dei picchi ottenuti nei pazienti e nei controlli.

Estrazione del DNA genomico.

Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero, fresco o congelato, utilizzando il kit Wizard Genomic DNA Extraction (Promega Corp. Madison, WI, USA), seguendo le indicazioni del produttore.

Amplificazione PCR del gene *gplb α* .

L'intera regione codificante, il promotore e parte delle regioni fiancheggianti i 2 esoni del gene sono stati amplificati usando 3 coppie di primers: 1F/2R, 3F/3R, 4F/5R, descritte da A. Savoia et al. (*Savoia A e al., 2001*). Le tre reazioni PCR sono state preparate in 25 μ l di volume finale con 200ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X PCR Master Mix (Promega Corp. Madison, WI, USA). Il profilo di amplificazione usato, uguale per le tre reazioni è il seguente: 5' di denaturazione a 94°C seguiti da 32 cicli di amplificazione strutturati come segue: 30" di denaturazione a 94°C, 45" di ibridazione con i primers a 60°C e 1' di elongazione a 72°C. Il tutto completato da un'elongazione finale di 5' A 72°C alla fine del 32° ciclo. La strumentazione usata è un termociclatore GeneAmp 2400 (Applied Biosystem, Foster City, CA; USA). Gli ampliconi ottenuti di 1300 (1F/2R), 330 (3F/3R) e 1200 paia di basi (4F/5R) sono stati controllati con una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% colorato con Etidio Bromuro.

Amplificazione PCR degli esoni 1, 10, 16, 24, 25, 26, 30, 38, 40 del gene *myh9*.

Sono stati utilizzati i primer e le condizioni descritti da Heath et al. (*Heath KE e al., 2001*). Gli amplificati ottenuti, tutti compresi tra le 329 e le 500 paia di basi, sono stati controllati con una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% in presenza Etidio Bromuro.

Sequenziamento del DNA

I frammenti amplificati sono stati purificati dai primers presenti dopo digestione enzimatica con ExoSap (GE Healthcare,UK) per 15' a 37°C seguiti da in attivazione dell'enzima ad 80°C per altri 15'. Dopo tale trattamento, i frammenti sono stati sequenziali con il metodo diretto usando i reagenti Big Dye Terminator Cycling Method (Applied Biosystem, Foster City, CA; USA) secondo le indicazioni del produttore. Di ogni amplificato sono stati sequenziati entrambi i filamenti.

Per le diverse reazioni sono state usate 1,5 pmol di primer secondo il seguente schema:

- sequenziamento del gene $Ib\alpha$: sono stati utilizzati i primer 2F, 2R, 3F, 3R, 4F, 5R, 7F descritti da Savoia et al. (Savoia et al., 2001) e 3'HPA2 descritto da Unkelbach e al. (Unkelbach K e al., 1995).
- Sequenziamento del gene $myh9$: sono stati utilizzati i primer MY1F, MY1R, MY10F, MY10R, MY16F, MY16R, MY24F, MY24R, MY25F, MY25R, M26F, MY26R, MY30F, MY30R, MY38F, MY38R, MY40F, MY40R descritti da Heath et al. (Heath KE e al., 2001).

Modelli molecolari.

Tutte le simulazioni dinamiche ed i modelli molecolari sono stati realizzati con l'aiuto del Prof. Stefano Moro del Dip. di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova (Molecular Modeling Section), usando un cluster Linux 12 CPU (PIV-3.0 GHZ e AMD64) e la suite MOE (Molecular Operating Environment) versione 2006.08.

Per lo studio di modeling sono stati usati i dati cristallografici relativi al dominio N-terminale della GPIb α depositati in banca dati (PDB code:1P9A) (Celikel R, e al., 2003) ad una risoluzione di 17 Angstrom. Il mutante N41H è stato generato grazie al protocollo "Mutate" presente nelle opzioni della suite MOE. Lo stesso programma ha permesso, prima di iniziare la simulazione dinamica, di aggiungere gli atomi di idrogeno sia nel modello wild type che nel mutante. Per minimizzare i contatti tra gli atomi di idrogeno, entrambe le strutture sono state sottoposte a riduzione di energia Amber94 (Cornell W.D.C. e al., 1995) fino a che il valore di rms del gradiente coniugato non è risultato $<0.15 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, mantenendo gli atomi pesanti fissati alle loro posizioni originali.

Il comportamento conformazionale di entrambe le proteine è stato calcolato usando la suite MOE associata al campo di forza Amber94. Per il solvente è stato usato il modello Generalized Born implicit water model (Tsui V. e al., 2001). È stata assunta una permittività dielettrica $\epsilon = 1$ e per le interazioni di Van der Waals si è posto il limite di 0,8 nm. A tutti i legami è stato applicato l'algoritmo SHAKE (Ryckaert J.P. e al., 1977) con una tolleranza 0.0005 \AA . Inoltre per la simulazione è stato usato un incremento temporale di 2 fs ed è stata mantenuta una temperatura di 300 K durante il processo di Berendsen temperature coupling. La lunghezza delle simulazioni dinamiche è stata fissata ad 1 nanosecondo.

PAZIENTI

Nel nostro laboratorio sono state richiamate e seguite negli ultimi 3 anni una dozzina di famiglie in passato classificate come CHMT. In questa tesi saranno presentati i risultati più interessanti ottenuti su 5 famiglie provenienti da diverse zone del Triveneto e non apparentate fra loro: TP1; TP2; TP3; TP4; TP5. La famiglia TP4 riferisce origini del Sud Italia. Da tutti i componenti di cui riportiamo i dati è stato ottenuto il consenso allo studio, ed il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova (Prot. 1192P del 26 Gennaio 2006).

Tutti i propositi presentavano all'anamnesi familiarità per piastrinopenia con trasmissione autosomica dominante (Figg. 2; 5; 7; ,12;17), non mostravano nessuna manifestazione sindromica, e riferivano diatesi emorragica lieve o assente. Il numero di piastrine variava spaziando da valori molto bassi (17×10^9 plts/L) a valori vicini alla normalità (130×10^9 plts/L). Per tutti gli affetti studiati in questo lavoro è stata esclusa l'ipotesi di ITP con la ricerca di anticorpi antiplastrine, risultati assenti.

Nella Tabella 1 sono riassunti i dati anamnestici dei propositi di ogni famiglia.

La numerazione si riferisce ai rispettivi alberi genealogici, ai quali si rimanda.

Tabella 1. Alcuni dati anamnestici riferiti ai Propositi delle Famiglie coinvolte nello studio.

Famiglia	Proposito	Età	N° di piastrine (Coulter)	N° di piastrine (conta manuale)	Diatesi emorragica
• TP1:	II-1 (Fig 2)	49	31×10^9 Plts/L	101×10^9 Plts/L	Ecchimosi dopo microtraumi
• TP2:	II-2 (Fig 11)	43	96×10^9 Plts/L	130×10^9 Plts/L	Metrorragia
• TP3:	III-3 (Fig 14)	63	102×10^9 Plts/L	122×10^9 Plts/L	Assente
• TP4:	IV-2 (Fig 5)	18	73×10^9 Plts/L	75×10^9 Plts/L	Rare Epistassi
• TP5:	III-13 (Fig 6)	73	47×10^9 Plts/L	64×10^9 Plts/L	Epistassi

RISULTATI

FAMIGLIA TP1.

Il proposito, 49 anni, è giunto alla nostra osservazione alla fine del 2007 con documentazione relativa ad una diagnosi, emessa nel 1997 da altra struttura ospedaliera, di “Piastrinopenia da aumentata distruzione periferica tipo porpora trombocitopenica idiopatica cronica”, senza segnalazione di piastrine giganti. Nel 1998, a seguito di accertamenti presso la stessa sede seguiti al riscontro della piastrinopenia, viene segnalata la presenza di macrotrombociti, e contestualmente viene riscontrata la macrotrombocitopenia nella figlia di 7 anni. Non è rilevato alcun quadro sindromico.

La patologia non viene ulteriormente indagata fino ai nostri riscontri.

Le conte piastriniche degli affetti (automatiche e manuali) e le notizie sulla loro diatesi emorragica, sono riportate in Tabella 2.

L'albero genealogico della Famiglia TP1 è riportato in Fig. 2. La sua analisi, nonostante l'esiguo numero di affetti, mostra una trasmissione della Macrotrombocitopenia compatibile con il carattere autosomico dominante.

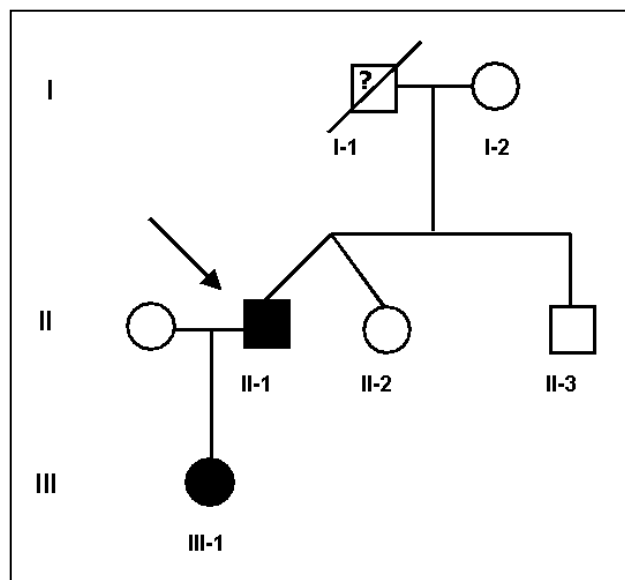


FIGURA 2. Albero genealogico della Famiglia TP1. (O: femmine; □:maschi) In nero sono rappresentati gli affetti; la barra trasversale indica un individuo deceduto; la freccia evidenzia il proposito.

Tabella 2: conte piastriniche e dati anamnestici della Famiglia TP1.

Paziente (Età)	N° di piastrine (Coulter)	N° di piastrine (conta manuale)	IM	Diatesi emorragica
II-1 (Proposito) (49 a)	31 x 10 ⁹ plts/L	101 x 10 ⁹ plts/L	19%	Ecchimosi dopo microtraumi
III-1 (16 a)	17 x 10 ⁹ plts/L	128 x 10 ⁹ plts/L	35%	Ecchimosi dopo microtraumi

L'esame degli strisci di sangue periferico colorati con May Grunwald/Giemsa (MGG) ha confermato negli affetti la presenza di piastrine grandi (il cui diametro eguaglia o supera la metà di quello di un globulo rosso). Gli Indici Megatrombocitari (IM), cioè le percentuali di piastrine giganti sul totale delle piastrine dei soggetti studiati, sono risultati essere i seguenti: 19% nel proposito e 35% in sua figlia. L'analisi dei preparati non ha permesso di evidenziare nei granulociti neutrofili le inclusioni citoplasmatiche spesso presenti nei casi di MRD o Malattie Correlate a difetti del gene myh9 (Fig 3.A,B). Al contrario, l'analisi in immunofluorescenza dei vetrini marcati con un anticorpo anti Miosina Non Muscolare di Tipo IIA (NMMHC-IIA), ha evidenziato un pattern microgranulare di distribuzione della NMMHC-IIA, tipico di alcune manifestazioni della MRD (Fig. 3).

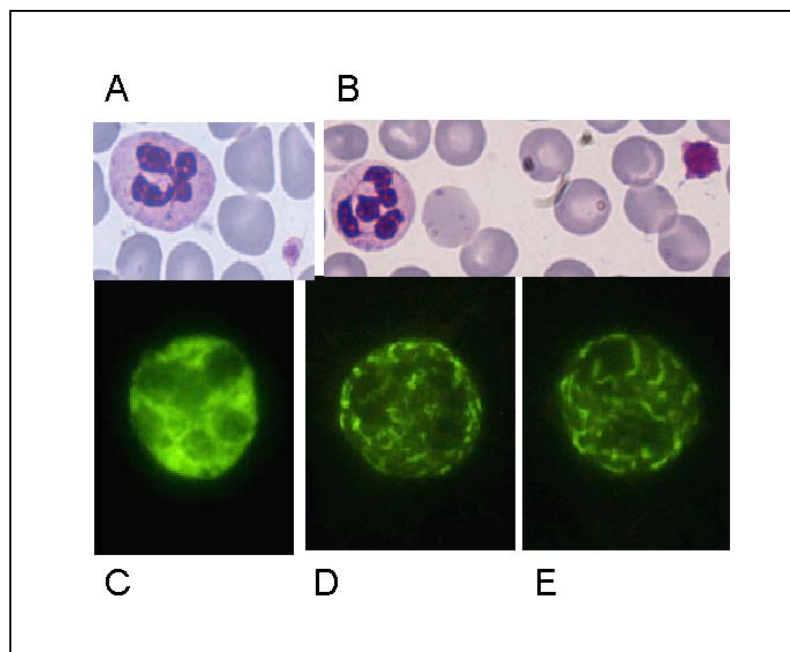


Fig. 3: Strisci di sangue periferico. A. Colorazione May-Grunwald/Giemsa nel controllo normale; **B.** May Grunwald/Giemsa nel proposito. Si notino le dimensioni aumentate delle piastrine rispetto al controllo. Nel citoplasma del granulocita neutrofilo non sono presenti corpi Dohle-simili; **C.** Colorazione in immunofluorescenza con anticorpo NMG2 anti NMMHCIIA nel controllo: la proteina è uniformemente distribuita nel citoplasma; **D** ed **E.** Distribuzione della NMMHCIIA rispettivamente in II-1 e III-1. La proteina è precipitata in numerosi microgranuli sparsi nel citoplasma, come è tipico in alcune manifestazioni delle MRD.

Dati i risultati dell'immunofluorescenza, è stata formulata per questa famiglia la diagnosi di MRD, e si è proceduto con l'analisi della sequenza del gene myh9 per caratterizzare meglio la malattia. Sono stati analizzati tutti gli esoni del gene per i quali fosse stata segnalata in letteratura almeno una mutazione, e precisamente gli esoni 1, 10, 16, 24, 25, 26, 30, 38, 40. Tra questi, l'esone 25 è risultato mutato sia nel proposito, che nella figlia. Si tratta di una mutazione in eterozigosi che consiste nella sostituzione nucleotidica G3485C corrispondente, a livello della proteina, nella sostituzione di un Arginina con una Treonina (R1162T) (Fig.4) nella porzione di coda del polipeptide. Tale mutazione a nostra conoscenza non è mai stata descritta precedentemente, né è stata rilevata nei 100 soggetti normali vagliati come controllo.

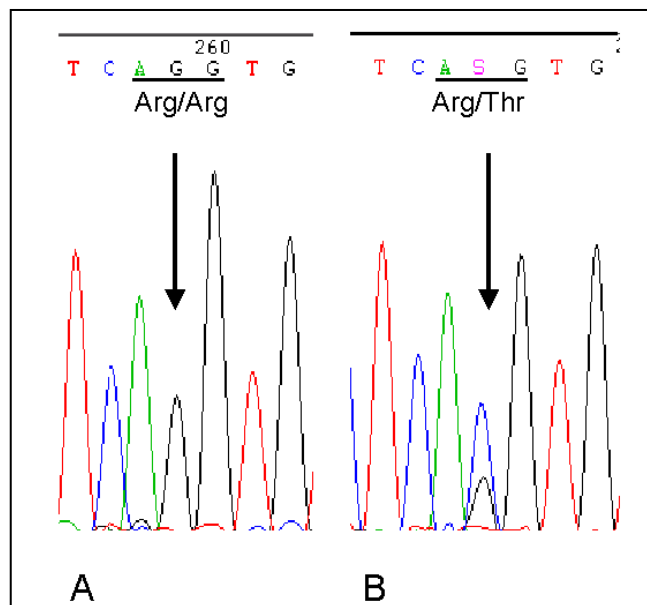


FIGURA 4. Sequenza dell'esone 25 del gene myh9.

Pannello A: Esone 25 wild type; Pannello B: Mutazione G3485C (R1162T) in eterozigosi

FAMIGLIA TP2

L'albero genealogico della Famiglia TP2 è riportato in Fig. 5, ed evidenzia il pattern di trasmissione autosomico dominante della Macrotrombocitopenia.

Solo due componenti della famiglia hanno acconsentito allo studio: la proposita (II-1) e sua sorella (II-2). (Fig 5)

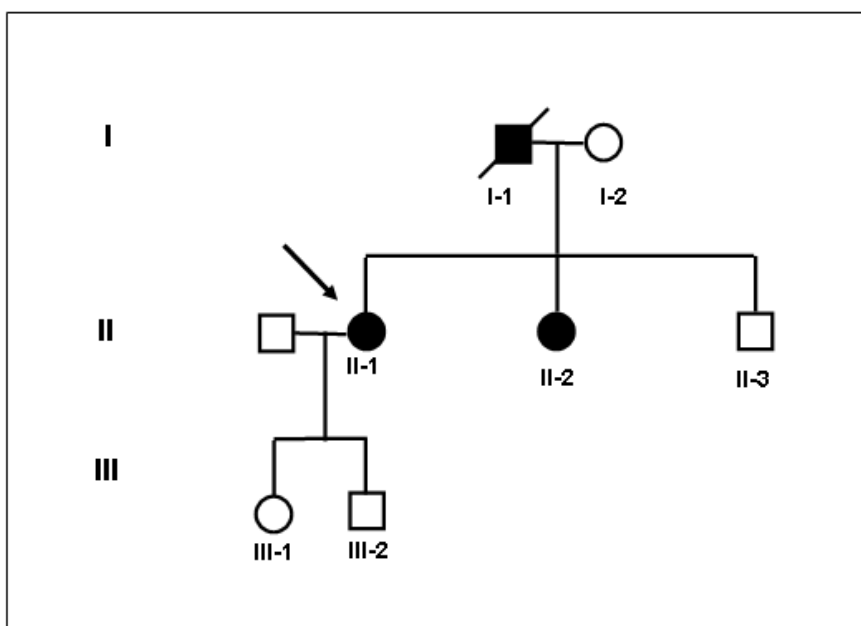


FIGURA 5. Albero genealogico della Famiglia TP2. (O: femmine; □:maschi) In nero sono rappresentati gli affetti; la barra trasversale indica un individuo deceduto; la freccia evidenzia la proposita.

Le conte piastriniche sono riportate in Tabella 3.

Tabella 3: conte piastriniche e dati anamnestici della Famiglia TP2.

Paziente (Età)	N° di piastrine (Coulter)	N° di piastrine (conta manuale)	IM	Diatesi emorragica
II-1 (Proposita) (43 a)	96x10 ⁹ plts/L	130x10 ⁹ plts/L	10%	Metrorragia
II-2 (41 a)	101x10 ⁹ plts/L	109x10 ⁹ plts/L	8%	Nessuna

L'analisi degli strisci di sangue periferico colorati con May-Grunwald/Giemsa ha rivelato in entrambe la presenza di macrotrombociti con un IM rispettivamente di 10% e 8%.

Nei granulociti non sono stati osservati corpi di Döhle.

L'aggregazione alla ristocetina a 1,5 e 1,2 mg/ml è risultata normale in entrambe le pazienti.

Le indagini sono continuate con l'immunofluorescenza su vetrino per escludere malattie correlate alla NMMCH-IIA. Nella proposita i vetrini non hanno mostrato alcuna anomalia (Fig.6.B). Al contrario, nella sorella (II-2) la distribuzione della NMMHC-IIA presentava un pattern di non chiara interpretazione, risultante da diversi esperimenti ripetuti (Fig.6.C.1 e C.2): a differenza dei vetrini di controllo o del soggetto II-1, in più sedute sperimentali è stata ottenuta in II-2 una colorazione a spot che - pur non ottimale - non permetteva di escludere la distribuzione microgranulare tipica di alcune forme di malattie correlate a difetti di NMMHC-IIA.

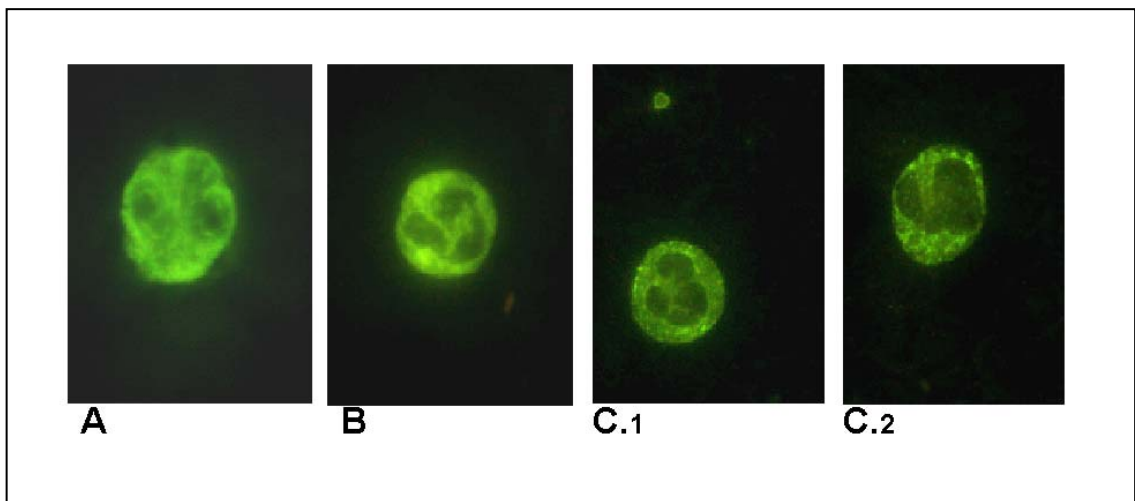


Figura 6. Immunofluorescenza striscio di sangue periferico. Distribuzione della NMMCH-IIA marcata con mAb NMG2. Pannello A: Controllo sano. Pannello B: Proposita (II-1). La distribuzione della Miosina appare normale. Pannelli C.1 e C.2: Soggetto II-2: I due vetrini provengono da sedute sperimentali diverse. Si noti la presenza di microgranuli nel citoplasma simili ai precipitati che si osservano nel pattern microgranulare, caratteristico di alcune manifestazioni di MRD. I microgranuli appaiono poco definiti, ma la distribuzione della miosina non sembra diffusa al pari del controllo normale.

Per chiarire il risultato ambiguo ottenuto con l'immunofluorescenza nel soggetto II-2, e nonostante i risultati normali ottenuti sulla proposita, si è comunque proceduto all'analisi della sequenza degli esoni del gene myh9 riconosciuti sede di mutazioni note nelle malattie correlate a difetti della Miosina Non Muscolare di Tipo IIA (esoni 1, 10, 16, 24, 25, 26, 30, 38, 40). La ricerca ha dato esito negativo sia in II-1, che in II-2.

Esclusi difetti noti di MYH9, si è proceduto allo studio in citofluorimetria di GPIIb α e GPIX, per testare la presenza di forme note di Bernard-Soulier autosomico

dominante (per es. BSS-BZ), o rivelare eventuali difetti di espressione di altri recettori piastrinici.

Le indagini al citofluorimetro, condotte con gli anticorpi mAb SZ2 e LJ1b1, capaci di evidenziare la presenza di BSS-BZ, e con anticorpi anti-GPIa, anti-GPIX e anti-GPIIb/IIIa, hanno rivelato un immunofenotipo normale in entrambe le pazienti.

Per escludere definitivamente l'ipotesi di una mutazione non descritta su *gplb α* , questo gene è stato sequenziato completamente.

Non è stata rilevata alcuna mutazione in nessuna delle due pazienti.

Lo studio di questa famiglia è quindi ancora in corso con il sequenziamento dei geni relativi agli altri componenti del complesso GPIb/V/IX e degli altri esoni del gene *myh9*, per escludere definitivamente gli ambiti BSS e MRD prima di procedere ad altre analisi. Per il momento quindi, queste pazienti rimangono classificate come CHMT.

FAMIGLIA TP3

Questa famiglia, giunta alla nostra osservazione alla fine del 2005, è caratterizzata dalla consanguineità di terza generazione degli individui III-1 (Proposito) e III-2 (Fig. 7).

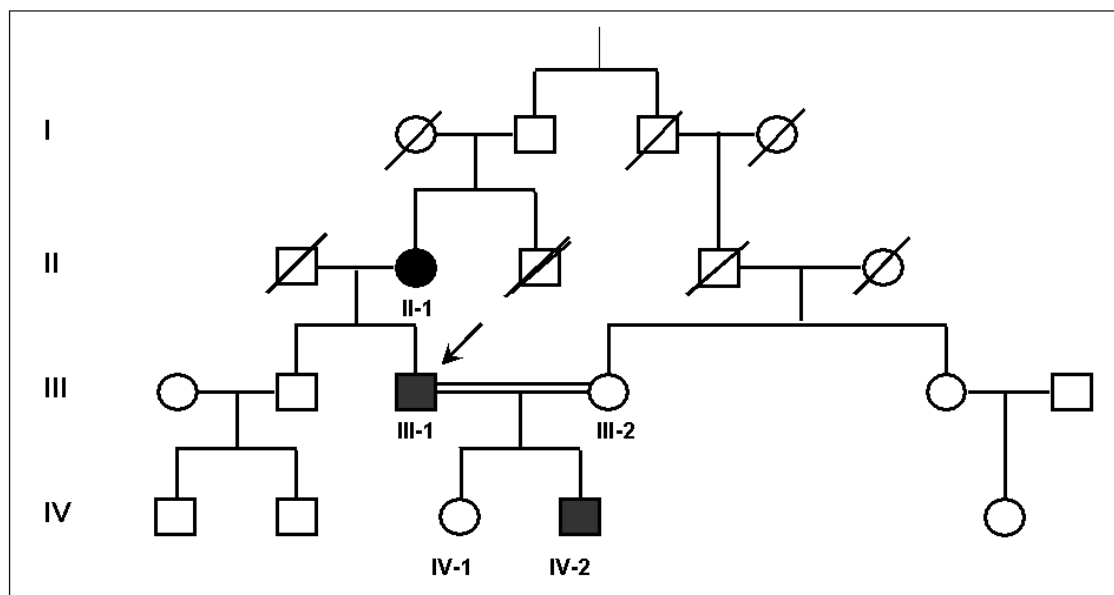


FIGURA 7. Albero genealogico della Famiglia TP3. (O: femmine; □:maschi) In nero sono rappresentati i soggetti affetti da macrotrombocitopenia; la barra trasversale indica gli individui deceduti; la freccia evidenzia il proposito. La doppia barra indica la consanguineità dei soggetti III-1 e III-2.

Hanno dato il completo consenso allo studio solo il proposito (III-1) e suo figlio (IV-2). La moglie (III-2) ha rilasciato il consenso solo per l'estrazione di DNA da tampone orale, consegnando alcuni referti di indagini di laboratorio eseguite precedentemente da cui risultavano conte piastriniche normali.

Le conte piastriniche disponibili e alcuni dati anamnestici sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4: conte piastriniche e dati anamnestici della Famiglia TP3.

Paziente (Età)	N° di piastrine (Coulter)	N° di piastrine (conta manuale)	IM	Diatesi emorragica
II-1 (84 a)	Riferita 120×10^9 plts/L	ND	ND	Assente
III-1 (Proposito) (64 a)	102×10^9 plts/L	122×10^9 plts/L	14%	Assente
III-2 (58 a)	260×10^9 plts/L	ND	ND	Assente
IV-2 (20 a)	12×10^9 plts/L	40×10^9 plts/L	30%	Assente

L'analisi dei vetrini colorati con May-Grünwald/Giemsa ha evidenziato la presenza di piastrine molto grandi (Fig 8) con un IM pari al 14% nel proposito (II-1), e al 30% in suo figlio (IV-2). In entrambi i casi non erano presenti Corpi di Döhle nei granulociti.

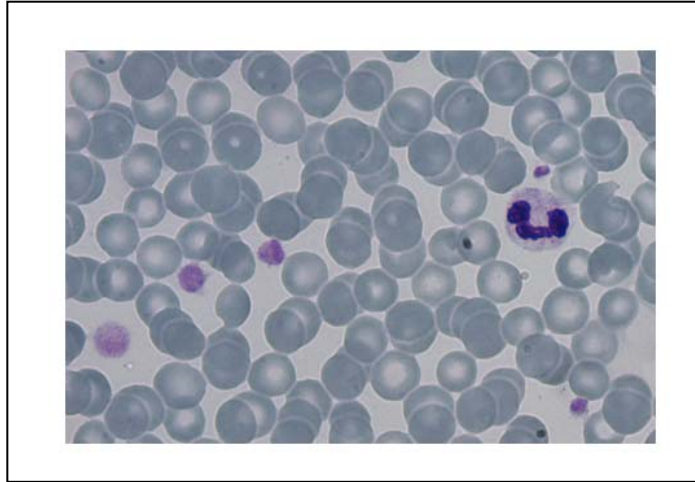


FIGURA 8. Striscio di sangue periferico. Piastrine giganti nel Proposito II-1 (Colorazione May-Grünwald/Giemsa). Simile appare lo striscio di sangue periferico del soggetto IV-2.

L'aggregazione alla Ristocetina nel proposito è risultata normale a 1,5 mg/mL, ma un ulteriore test effettuato abbassando il dosaggio dell'agonista a 1,2 mg/mL ha evidenziato una risposta ridotta (32,7%).

L'aggregazione alla Ristocetina è risultata invece completamente assente (0%), sia a 1,5 che a 1,2 mg/mL, nel soggetto IV-2.

Con le analisi al citofluorimetro (Fig.9) è stato testato il profilo di espressione di alcuni recettori piastrinici nei soggetti III-1 (Fig. 9.A) e IV-2 (Fig. 9.B), usando anticorpi monoclonali diretti verso le glicoproteine GPIIb/IIIa (CD41a), GPIX (CD42a) e GPIb α (CD42b). Contro GPIb α sono stati testati 3 diversi cloni di mAbs anti-CD42b: SZ2, LJ1b1 ed LJ1b10.

L'espressione di GPIIb/IIIa è risultata in entrambi i pazienti leggermente aumentata, compatibilmente con le aumentate dimensioni piastriniche evidenziate anche dal Forward Scatter (Fig 9.A;B). La GPIX, tenuto conto delle maggiori dimensioni piastriniche, si è rivelata leggermente ridotta nel proposito e francamente ridotta nel figlio (Fig 9.A;B). Per la GPIb α sono stati ottenuti risultati sovrapponibili per tutti e tre gli anticorpi monoclonali testati: tale glicoproteina è risultata ridotta in III-1 (Fig. 9.A) per il quale l'intensità del canale medio di fluorescenza (MCH) era pari a 77.38 unità

arbitrarie contro il MCH di 99.70 del controllo normale, mentre si è rivelata completamente assente nel figlio IV-2 (Fig. 9.B).

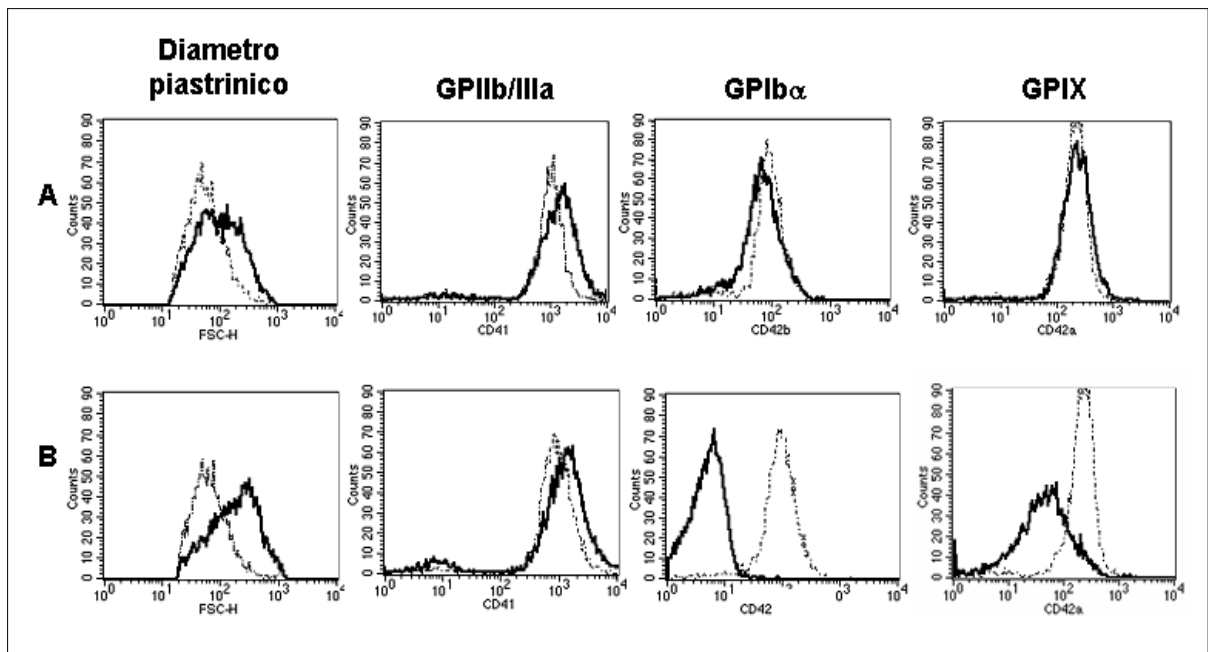


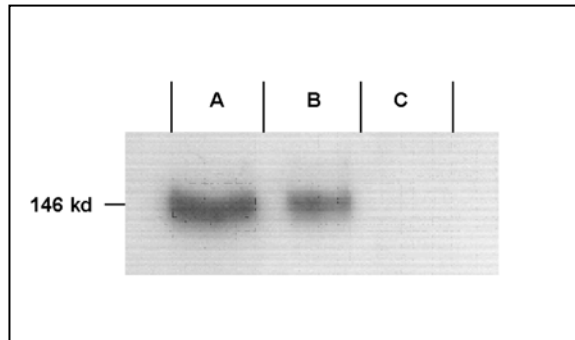
FIGURA 9. Analisi citofluorimetrica delle glicoproteine piastriniche. La linea tratteggiata rappresenta il controllo normale, la linea spessa e continua rappresenta il profilo degli affetti.
Pannello A: Proposito III-1. Il Forward Scatter (FSC-H) mostra un aumento delle dimensioni piastriniche correlato con un aumento dell'espressione della GPIIb/IIIa (CD41), mentre è presente una diminuzione dell'espressione della GPIb α (CD42b). GPIX (CD42a), tenuto conto delle aumentate dimensioni piastriniche, è da considerare leggermente diminuita.
Pannello B: Soggetto IV-2. L'aumento della GPIIb/IIIa (CD41) è compatibile con le aumentate dimensioni piastriniche (FSC-H). Negli ultimi due riquadri sono chiare la completa assenza della GPIb α e la marcata riduzione della GPIX, altro componente del complesso GPI/VI/IX.

I dati ottenuti in citofluorimetria riguardanti l'espressione della GPIb α sulla superficie piastrinica, sono stati confermati dal Western blot eseguito sui lisati piastrinici totali ottenuti da 1×10^7 piastrine di ciascun soggetto, e testati con il clone LJB10 del mAb anti CD42b.

La banda a 146 Kd presente nel controllo sano è risultata ridotta nel soggetto III-1 e completamente assente in IV-2 (Fig.10).

L'analisi densitometrica della lastra, ha confermato che la riduzione dell'espressione della glicoproteina in III-1 (82% rispetto al controllo normale) è compatibile con la riduzione del MCH evidenziata in citofluorimetria. I risultati del Western Blot inoltre hanno dimostrato che la riduzione e l'assenza della GPIb α osservate rispettivamente in III-1 e in IV-2 non erano il frutto di una mancata esposizione sulla superficie piastrinica della glicoproteina, quanto piuttosto l'effetto di una sua mancata produzione.

Figura 10. Western blot. Ogni lane contiene i lisati totali ottenuti da 1×10^7 piastrine. La banda a 146 kdalton corrisponde alla glicoproteina Iba riconosciuta dal mAb LJ1b10.
Lane A: controllo normale; Lane B: Soggetto III-1. GPIba è ridotta (82%); Lane C: Soggetto IV-2. GPIba è assente.



Tali risultati hanno inequivocabilmente condotto per questi pazienti alla diagnosi di Sindrome di Bernard-Soulier.

Per meglio caratterizzare la variante della malattia si è proceduto al sequenziamento dell'intero gene *gplb α* nei soggetti III-1 e III-2 (consanguinei) e nel soggetto IV-2. L'indagine genetica ha rivelato nel proposito III-1 una delezione di 4 paia di basi (TGAG) in eterozigosi, già descritta in letteratura (*Afshar-Kharghan V e al., 2000a*) (Fig. 11.B). Questo difetto comporta a livello della proteina uno scorrimento del quadro di lettura a partire dall'aminoacido Ser39, e lo Stop prematuro del polipeptide dopo 11 residui, diversi da quelli che occupano le stesse posizioni nella proteina nativa.

In questa famiglia, la mutazione presente in III-1 è riscontrabile, sempre allo stato di eterozigosi, anche nella moglie asintomatica (III-2). Questa particolarità porta a definire meglio il pattern di trasmissione genica della malattia come ereditarietà *autosomica dominante a penetranza incompleta*.

Il figlio piastrinopenico della coppia (IV-2) è risultato invece omozigote per la delezione TGAG (Fig 11.C), condizione che spiega l'assenza di GPIba riscontrata nelle indagini precedenti.

Il soggetto IV-2 rappresenta dunque, a nostra conoscenza, il primo caso di omozigosi riguardante questa mutazione, dal momento che nel caso descritto in letteratura (*Afshar-Kharghan V e al., 2000a*) la delezione TGAG si presentava in stato di doppia eterozigosi, e l'assenza della glicoproteina nelle piastrine della proposta era il risultato dell'associazione con un'altra mutazione nonsense nel secondo allele del gene *gplb α* .

Il sequenziamento genico dei componenti della famiglia TP3 ha anche permesso di confermare la consanguineità dei genitori, rivelando in entrambi lo stesso pattern

polimorfico per l'allele mutato (-5T; HPA2a; VNTR c) ereditato poi in omozigosi dal figlio.

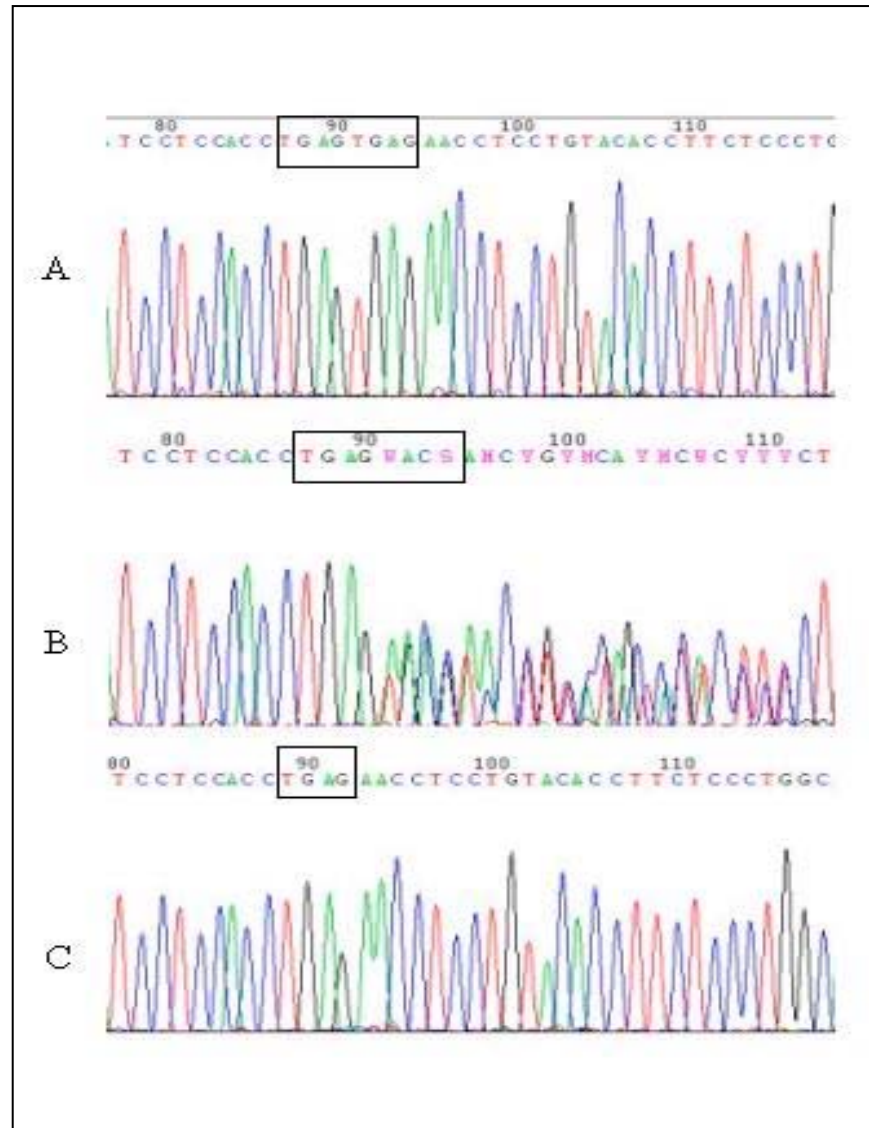


Fig. 11. Sequenziamento genico Fam TP3. Nei riquadri è evidenziata la sede della delezione TGAG. Pannello A. Sequenza controllo wild type. Pannello B. Sequenza del soggetto eterozigote III-1. Identica sequenza è stata ottenuta per III-2 (non riportata). Pannello C. Sequenza del soggetto IV-2, omozigote per la delezione TGAG.

FAMIGLIA TP4

Questa famiglia, seguita presso la nostra struttura dal 2001, è stata richiamata per nuove indagini nel 2005. L'albero è illustrato in Figura 12.

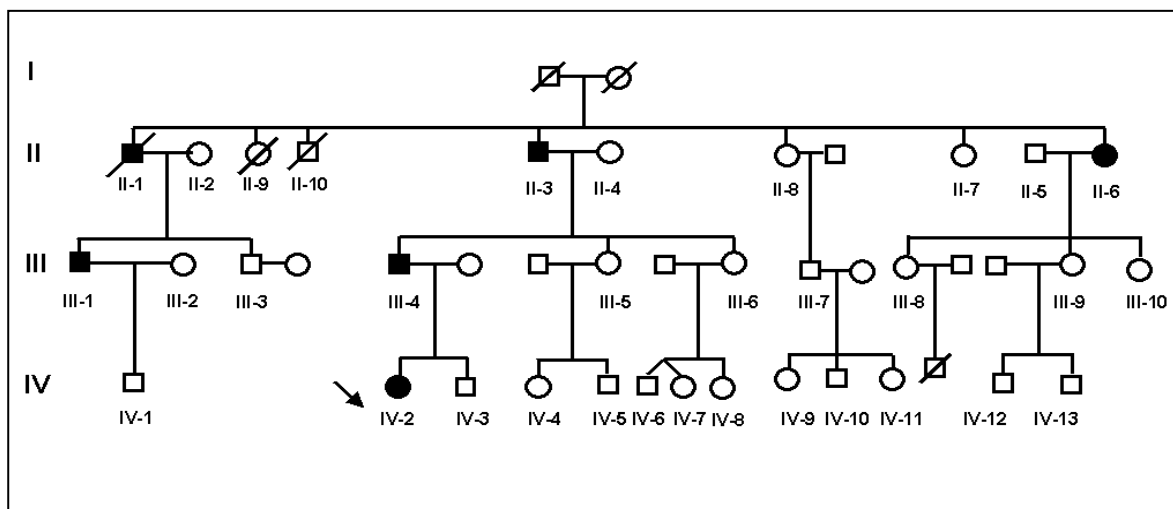


FIGURA 12. Albero genealogico della Famiglia TP4. (O: femmine; □:maschi) In nero sono rappresentati gli affetti; la barra trasversale indica gli individui deceduti; la freccia evidenzia la proposita.

E' stato possibile ottenere il consenso allo studio da parte di 7 componenti della famiglia, 4 affetti e 3 sani. La Tabella 5 riassume le conte piastriniche ed alcuni dati anamnestici di questi soggetti.

Tabella 5: conte piastriniche e dati anamnestici della Famiglia TP4.

Paziente (Età)	N° di piastrine (Coulter)	N° di piastrine (conta manuale)	IM	Diatesi emorragica
IV-2 (Proposita) (18 a)	73 x 10 ⁹ plts/L	75 x 10 ⁹ plts/L	20%	Sanguinamento profuso durante intervento di chirurgia addominale
II-3 (73 a)	40 x 10 ⁹ plts/L	74 x 10 ⁹ plts/L	28%	Assente
III-1 (54 a)	87 x 10 ⁹ plts/L	94 x 10 ⁹ plts/L	15%	Assente
III-3 (53 a)	291 x 10 ⁹ plts/L	ND	4%	Assente
III-4 (53 a)	57 x 10 ⁹ plts/L	88 x 10 ⁹ plts/L	20%	Assente
IV-1 (29 a)	234 x 10 ⁹ plts/L	ND	7%	Assente
IV-3 (16 a)	209 x 10 ⁹ plts/L	ND	6%	Assente

L'analisi degli strisci di sangue periferico colorati con May-Grunwald/Giemsa ha portato all'individuazione di piastrine grandi in tutti i soggetti affetti (Fig. 13A, B), con un IM uguale a 20% nella proposita IV-2 ed in suo padre (III-4), 28% nel nonno (II-3), e 15% nel soggetto III-1.

I non affetti III-3, IV-1 e IV-3 avevano un IM nella norma, rispettivamente di 4%, 7% e 6%.

I granulociti degli affetti non presentavano formazioni simili ai Corpi di Döhle, e l'immunofluorescenza ha mostrato un pattern di distribuzione della MYH9 normale (Fig.13.C).

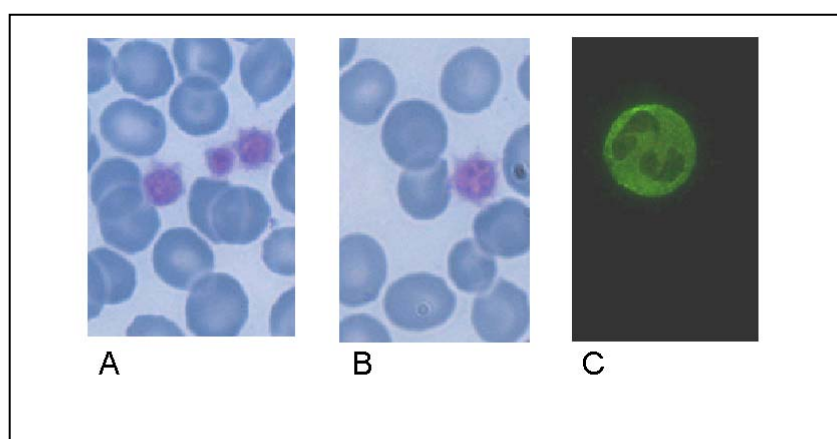


Figura 13. Colorazione May-Grunwald/Giemsa e Immunofluorescenza con mAb NMG2 su strisci di sangue periferico. Pannello A: Piastrine giganti nel soggetto III-4; Pannello B: Piastrine giganti nel soggetto IV-2 (Proposita); Pannello C. Immunofluorescenza sul soggetto IV-2: la distribuzione di NMMCH-IIA risulta normale.

Dopo aver escluso la presenza di una patologia legata a difetti della MYH9, si è proceduto alle indagini per l'esclusione della BSS.

L'aggregazione alla Ristocetina nella proposita risultava normale a 1,5 mg/mL (79,7%). Diminuendo l'agonista a 1,2 mg/mL, la risposta si riduceva al 58%, indirizzando l'ipotesi diagnostica verso la BSS.

I dati del test RIPA ottenuti sugli altri affetti della famiglia sono riportati in Tab.6.

Tabella 6: Risultati delle aggregazioni alla ristocetina (RIPA) sugli affetti della famiglia TP4.

Paziente	RIPA 1,5 mg/mL	RIPA 1,2 mg/mL
II-3	42%	6%
III-1	40,6%	4%
III-4	84%	81%

I risultati delle aggregazioni sono risultati contrastanti: uno degli affetti presentava valori normali di aggregazione anche riducendo l'agonista a 1,2 mg/mL (soggetto III-4). Negli altri soggetti pastrinopenici, invece si osservava una marcata riduzione dell'aggregazione già a 1,5 mg/mL di Ristocetina.

Si è quindi proceduto ai test citofluorimetrici per lo studio dell'immunofenotipo piastrinico con particolare riguardo all'espressione di GPIIb α /V/IX, recettore del vWF, le cui alterazioni sono spesso rivelate dal test RIPA.

L'analisi del PRP nativo in citofluorimetria è stata effettuata su 4 pazienti affetti della famiglia TP4 (II-3; III-1; III-4; IV-2).

Come controllo normale, oltre ad un volontario sano, è stato inserito nella seduta di analisi anche un familiare non affetto (IV-3). I controlli volontari e affetti hanno sempre rivelato dimensioni piastriniche e profili di binding esattamente sovrapponibili.

I risultati sono sintetizzati nelle Figure 14a, 14b e 15.

Il dato relativo al Forward Scatter (FSC-H) misurato negli affetti confermava l'incremento del volume piastrinico. Si sono calcolate le medie dei valori di MCH ottenuti in affetti e controlli, considerando il valore medio ottenuto per questi ultimi pari al 100% di espressione. Fatto questo assunto, l'espressione delle glicoproteine GPIIb/IIIa (CD41a) e GPIX (CD42a) mostrava in tutti i soggetti affetti un incremento correlato all'aumento delle dimensioni delle piastrine, rispettivamente del 174,9% e 127,8% rispetto al normale.

Il binding del monoclonale SZ2, diretto contro un piccolo epitopo localizzato nella regione ricca di solfati anionici della GPIIb α , risultava leggermente aumentato nei pazienti rispetto ai controlli, anche se non in modo significativo (109,7%). Questo aumento è infatti probabilmente minore di quanto atteso in relazione alle maggiori dimensioni piastriniche.

Al contrario, gli altri cloni anti-CD42b testati (LJ1b1 e LJ1b10), diretti contro diversi epitopi dell'estremità N-terminale della catena Ib α , hanno rivelato una diminuzione del segnale che negli affetti è pari rispettivamente all'80,1 e all'89,2% del normale (Figg 14a, 15).

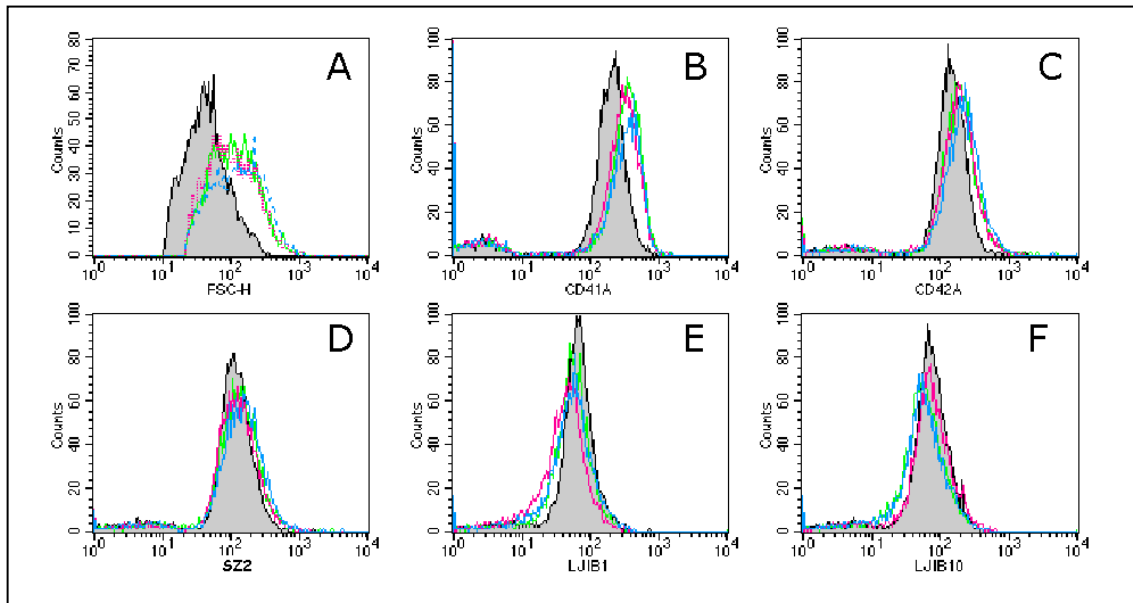


Figura 14a. Analisi citofluorimetrica delle glicoproteine piastriniche negli affetti della famiglia TP4. La curva ombreggiata è riferita al familiare non affetto (IV-3). I tracciati blu, rosa e verde sono riferiti rispettivamente ai membri affetti II-3, III-4 e IV2 (Proposita).

Pannello A. Il Forward Scatter (FSC-H) aumentato rivela un incremento delle dimensioni piastriniche in tutti gli affetti. Pannello B. CD41a risulta maggiormente espresso negli affetti in conseguenza delle aumentate dimensioni piastriniche. Pannello C. Analogamente, CD42a risulta maggiormente espresso nei pazienti. Pannello D. CD42b testato con il clone SZ2. L'espressione di GPIb α risulta normale o solo leggermente aumentata nei trombocitopenici. Pannello E. Il binding del clone LJ1b1a1 CD42b risulta ridotto. Pannello F. Il clone LJ1b10 mostra un binding ridotto al CD42b in II-3 e IV-2. Meno apprezzabile la riduzione nel soggetto III-4.

In un secondo tempo, ed in un solo rappresentante della famiglia (III-1), è stato possibile testare altri due anticorpi monoclonali, HIP1 ed AK2, diretti verso epitopi situati a livello dei primi due Leucine Rich Repeats di GPIb α . La loro affinità per la glicoproteina è risultata ulteriormente ridotta: 76,2 e 71,9% rispetto al controllo normale (Figg.14b, 15).

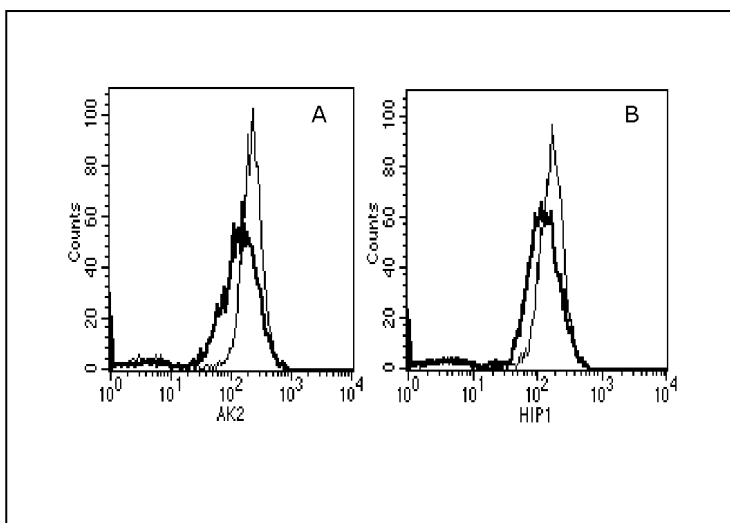


Figura 14b. Analisi citofluorimetrica dell' N-terminale di GPIb α con mAbs anti CD42b-AK2 e HIP1. La linea sottile corrisponde al tracciato del controllo normale, il tratto più spesso si riferisce al paziente. Pannello A. mAb AK2. Si nota una diminuzione dell'affinità dell'anticorpo nel paziente rispetto al controllo. Pannello B. mAb HIP1. Analogamente al precedente si nota una diminuzione della fluorescenza nel paziente. Il dato si riferisce al paziente III-1. I profili degli altri monoclonali testati su questo soggetto risultavano sovrapponibili a quelli degli altri familiari affetti e mostrati in Fig.14a.

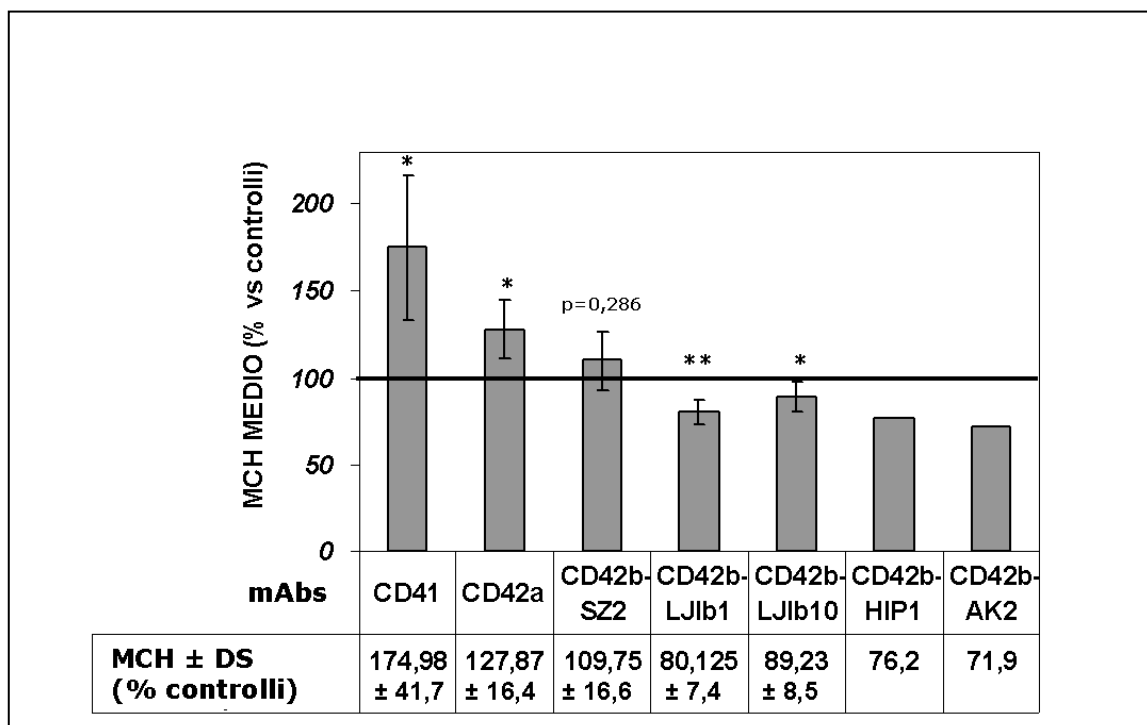


Figura 15. Valori medi di Mean Fluorescent Channel (MCH) e relative deviazioni standard (DS) ottenuti negli affetti della Famiglia TP4 per il binding dei diversi mAbs usati in citofluorimetria (percentuale rispetto al normale). Dati ottenuti dallo studio di 4 pazienti (II-3; III-1; III-4; IV-2) tranne che per AK2 e HIP1, relativi al solo paziente III-1. La retta evidenzia il 100% di espressione. La significatività delle variazioni è stata calcolata con il test T di Student a due code, considerando significative le differenze che mostravano un valore di $p < 0,05$ (*). Sono risultati statisticamente significativi i dati relativi ai segnali degli anticorpi anti-CD42b LJlb10 e LJlb1 [(**)= $p < 0,002$], così come il dato relativo alla sovraespressione del CD41.

Contemporaneamente alla citofluorimetria, si è proceduto all'analisi molecolare del gene *gplb α* . E' stato effettuato il sequenziamento di tutta la sua regione codificante, delle regioni introniche e di quelle promotoriali in tutti i componenti della famiglia che avevano dato l'assenso - affetti e non affetti - ed in 100 volontari sani.

L'analisi genetica ha rivelato in tutti gli affetti una mutazione in eterozigosi, mai descritta precedentemente e non presente nei familiari sani e nei controlli. Si tratta di una transversione A>C al nucleotide +169 (Fig.16), che comporta la sostituzione di un'Asparagina (Asn o N) con un'Istidina (His o H) in posizione 41, molto conservata tra le specie (*Afshar-Kharghan V e al., 2000b*), posta livello del primo dei sette Leucine Rich Repeats (LRR), in una zona che è implicata nel sito di interazione del recettore GPIb/V/IX con il suo ligando naturale, il Fattore di von Willebrand (vWF). Una tale mutazione può far supporre un mutamento conformazionale che può spiegare la diminuita affinità per la glicoproteina osservata in citofluorimetria con gli anticorpi monoclonali LJlb1, LJlb10, AK2, HIP1, i quali, a differenza di SZ2, riconoscono epitopi posizionati proprio in questa regione.

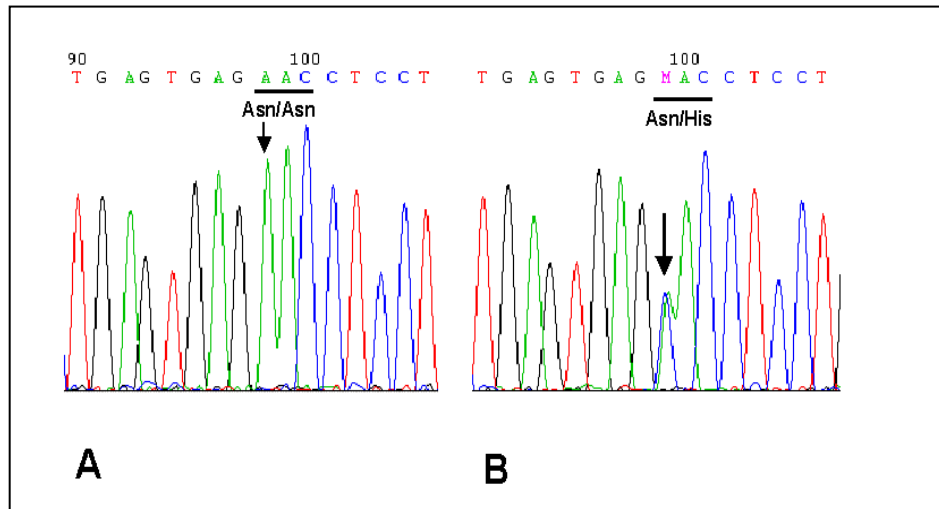


Figura 16. Sequenza del gene GPIIb/IIIa. Pannello A: Sequenza del controllo wild type; Pannello B: La sequenza come appare nei soggetti eterozigoti per la mutazione A169C (Asn41His o N41H). La freccia indica il nucleotide mutato.

I risultati del sequenziamento ottenuti sui membri della Famiglia TP4 hanno confermato il pattern di ereditarietà autosomico dominante della mutazione.

L'analisi del gene, inoltre, ha evidenziato che la mutazione è in linkage disequilibrium con un determinato pattern degli altri polimorfismi del gene *gplb α* : il difetto è sempre associato con le varianti -5T, HPA2a e VNTRc.

Incidentalmente è anche da rilevare che il soggetto III-1, omozigote per la variante VNTRc, presenta un ulteriore polimorfismo genico mai descritto precedentemente e situato nel secondo VNTR repeat. Si tratta di una sostituzione silente C>T che interessa la terza posizione del codone Thr419 senza alterare la proteina. Tale variante non è presente nei 100 soggetti normali vagliati come popolazione di controllo, anche è stata evidenziata in uno dei pazienti affetti da malattia MYH9 correlata, durante gli screening di routine che hanno dimostrato l'assenza di altre alterazioni nel suo gene *gplb α* .

FAMIGLIA TP5

Questa famiglia, classificata come CHMT nel 1997, è stata richiamata presso le nostre strutture per nuove indagini nel 2006. Sono stati studiati 10 componenti della famiglia che hanno dato il loro assenso, 7 affetti e 3 non affetti. L'albero genealogico è illustrato in Figura 17.

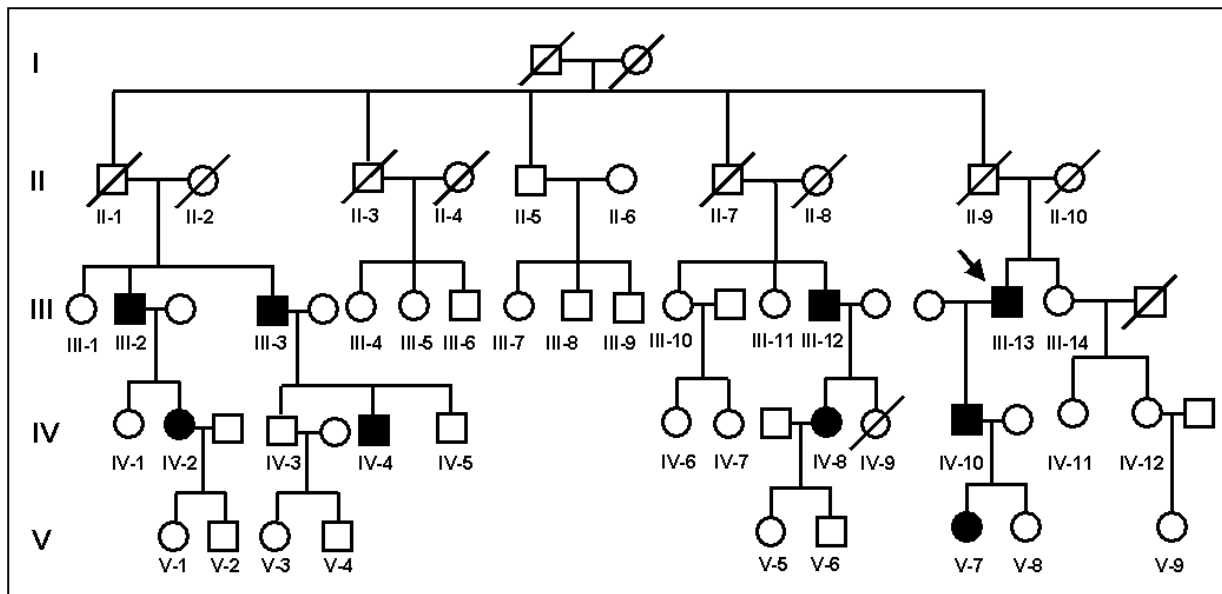


FIGURA 17. Albero genealogico della Famiglia TP5. (O: femmine; □:maschi) In nero sono rappresentati gli affetti; la barra trasversale indica gli individui deceduti; la freccia evidenzia il proposito.

Le rispettive conte piastriniche ed alcuni dati anamnestici sono riassunti in Tabella 7. L'osservazione dei vetrini al microscopio ha evidenziato la presenza di macrotrombociti in tutti gli affetti, con un IM variabile dal 10 al 40%.

La distribuzione della NMMCH-IIA testata in immunofluorescenza è risultata normale.

L'indagine è proseguita con il test di aggregazione alla Ristocetina. Nel proposito, al dosaggio di 1,5 mg/ml la risposta è stata del 60,8%, ai limiti inferiori del range di normalità.

L'aggregazione risultava entro i limiti di normalità anche negli altri due componenti della famiglia in cui è stato eseguito il test: nel soggetto IV-2 si è registrato una percentuale di aggregazione pari al 63,1%, mentre in IV-10 si è ottenuto un valore di 69,3%.

Tabella 7: conte piastriniche, Indici Megatrombocitari e dati anamnestici della Famiglia TP5.

Paziente (Età)	N° di piastrine (Coulter)	N° di piastrine (conta manuale)	IM	Diatesi emorragica
III-13 (Proposito) (73 a)	47 x 10 ⁹ plts/L	64 x 10 ⁹ plts/L	30%	Epistassi. Operato per aneurisma aortico senza complicanze.
III-3 (71 a)	43 x 10 ⁹ plts/L	62 x 10 ⁹ plts/L	36%	Due episodi emorragici - durante sindrome influenzale - emorroidi
III-12 (71 a)	74 x 10 ⁹ plts/L	99 x 10 ⁹ plts/L	10%	Assente
IV-2 (44 a)	64 x 10 ⁹ plts/L	92 x 10 ⁹ plts/L	40%	Assente
IV-8 (43 a)	50 x 10 ⁹ plts/L	70 x 10 ⁹ plts/L	22%	Assente
IV-10 (44 a)	64 x 10 ⁹ plts/L	89 x 10 ⁹ plts/L	17%	Epistassi.
V-7 (16 a)	49 x 10 ⁹ plts/L	80 x 10 ⁹ plts/L	32%	Epistassi.
III-1 (75 a)	693 x 10 ⁹ plts/L	ND	2%	Assente
III-14 (64 a)	312 x 10 ⁹ plts/L	ND	1%	Assente
V-8 (5 a)	221 x 10 ⁹ plts/L	ND	3%	Assente

Successivamente si è proceduto alle indagini citofluorimetriche sulle glicoproteine piastriniche (Fig. 18).

I risultati si sono rivelati molto simili a quelli ottenuti per la famiglia TP4 descritta precedentemente. Elaborando i dati come precedentemente descritto, le glicoproteine GPIIb/IIIa e GPIX risultavano aumentate negli affetti concordemente alle maggiori dimensioni piastriniche: 143,8% e 124,3% rispettivamente.

Il binding del clone SZ2 dell'anti-CD42b era leggermente aumentato rispetto al normale (110,1%), mentre per gli anticorpi diretti verso l'N terminale della proteina (LJ1b1, LJ1b10, AK2, HIP1) il segnale risultava ridotto, a seconda del clone, dal 14,6 al 31,5%.

I risultati, riportati in dettaglio in Fig. 19, hanno quindi confermato anche negli affetti della famiglia TP5 la presenza di una riduzione di affinità per gli anticorpi che riconoscono la regione LRR N-terminale di GPIIb α .

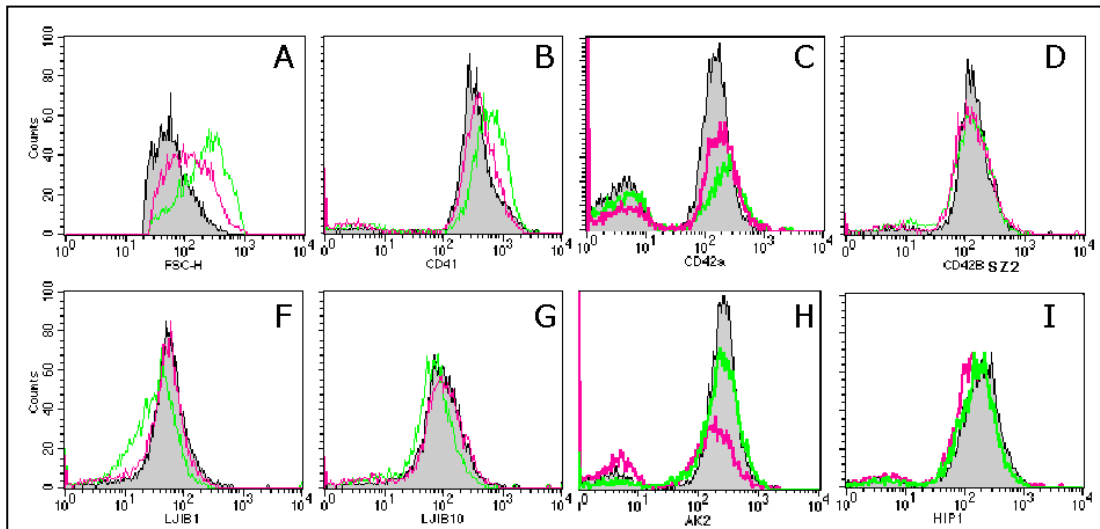


Figura 18. Analisi citofluorimetrica delle glicoproteine piastriniche negli affetti della famiglia TP4.

La curva ombreggiata è riferita a un familiare non affetto (III-14). I tracciati rosa e verde sono riferiti rispettivamente ai membri affetti III-2, III-13 (Proposito).

Pannello A. Il Forward Scatter aumentato rivela un incremento delle dimensioni piastriniche nei piastrinopenici. Pannelli B e C. CD41a risulta maggiormente espresso negli affetti in accordo con le aumentate dimensioni piastriniche. Analogamente, anche CD42a risulta sovraespresso. Pannello D. CD42b testato con il clone SZ2. L'espressione di GPIb α risulta leggermente ridotto negli affetti, rispetto alle maggiori dimensioni piastriniche. Pannelli E, F, G, H. Il segnale dei cloni LJB1, LJB10, AK2 e HIP1 al CD42b è sensibilmente ridotto nei pazienti.

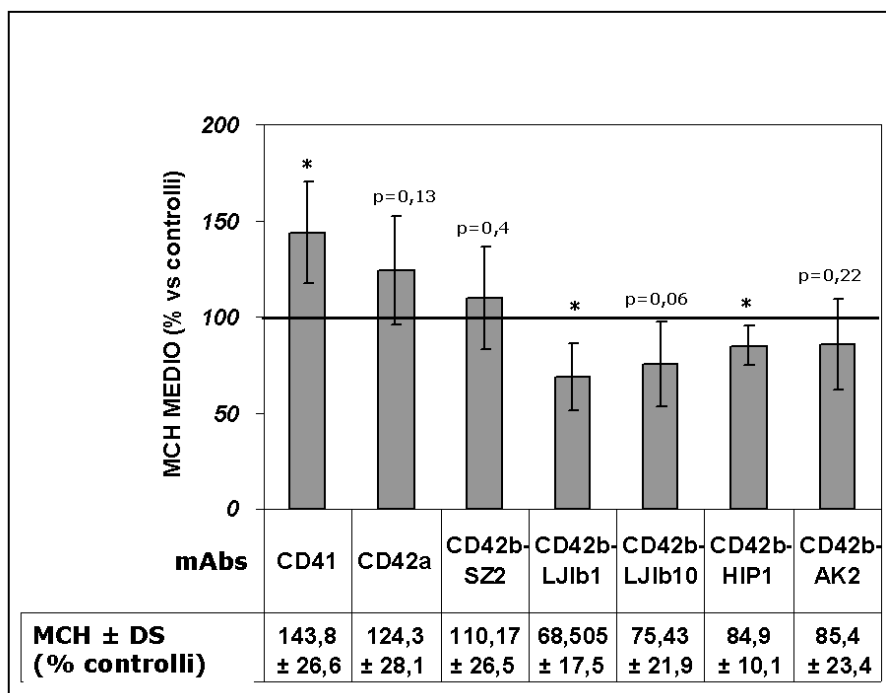


Figura 19. Valori medi di Mean Fluorescent Channel (MCH) e relative deviazioni standard (DS) ottenuti negli affetti della Famiglia TP5 per il binding dei diversi monoclonali usati in citofluorimetria (percentuale rispetto al normale). Dati ottenuti dallo studio di 4 pazienti (III-2; III-13; IV-10; V-7). La significatività è stata calcolata con il test T di Student a due code, considerando significative le differenze che mostravano un valore di $p < 0,05$ (*). Sono risultati statisticamente significativi i dati relativi ai segnali degli anticorpi anti CD42b LJB1 e HIP1, così come il dato relativo alla sovraespressione del CD41. Si conferma la diminuzione del segnale relativo ai cloni LJB10 e AK2, anche se non statisticamente significativa.

Successivamente, il sequenziamento del gene $gplb\alpha$ ha confermato anche nella famiglia TP5 la presenza della transversione A169C in tutti gli affetti, escludendola nel contempo in tutti i familiari sani. Come si è visto, questa mutazione si traduce a livello della proteina nella sostituzione aminoacidica N41H all'estremità N-terminale. A livello genico non sono state evidenziate altre anomalie.

Anche in questa famiglia la mutazione risulta in linkage disequilibrium con le varianti polimorfiche -5T, HPA2a e VNTRc del gene.

Dopo aver riscontrato nella famiglia TP5 la presenza della stessa mutazione che caratterizzava la famiglia precedente, TP4, sono stati rielaborati i dati della citofluorimetria: si sono ricalcolate le medie e le deviazioni standard dei valori di MCH ottenuti coi diversi anticorpi riunendo i dati relativi ad entrambe le famiglie.

I risultati confermano la riduzione dell'affinità dei cloni di mAb diretti contro l'N-terminale della GPIb α (LJlb1, LJlb10, AK2, HIP1, ridotti dal 18 al 25,7% a seconda del clone) osservata nelle singole famiglie, attribuendo alle differenze rispetto alla risposta dei normali notevole significatività statistica. I dati sono riassunti in Fig. 20.

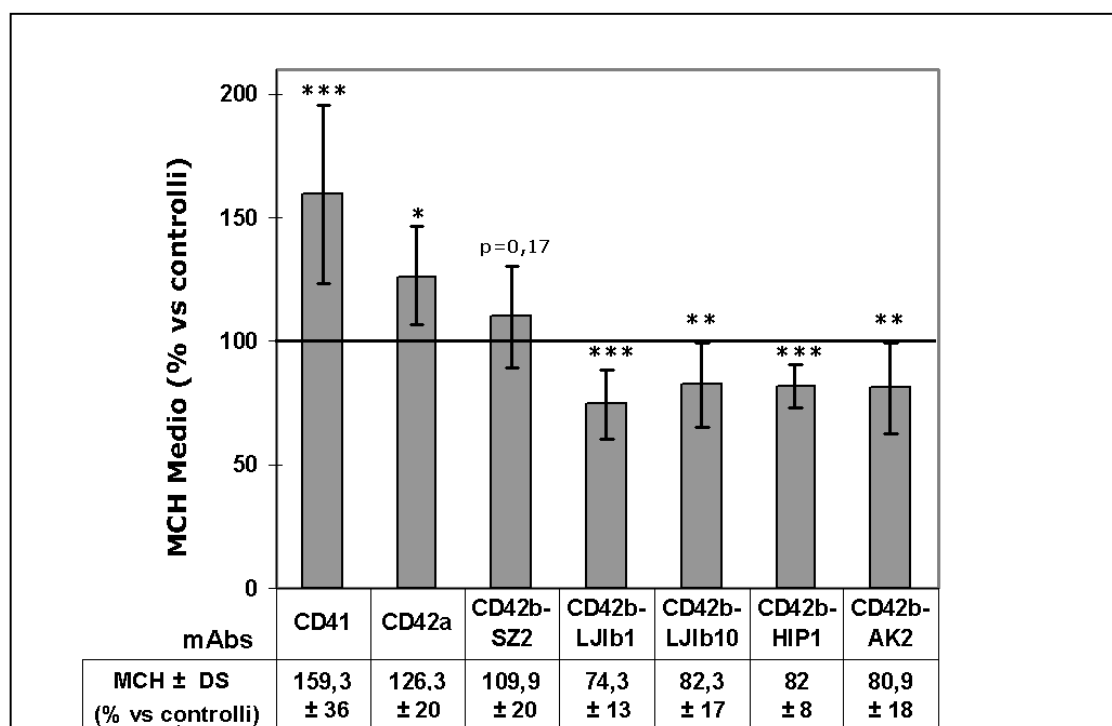


Figura 20. Valori medi di Mean Fluorescent Channel (MCH) e relative deviazioni standard (DS) ottenuti negli affetti delle Famiglie TP4 e TP5 in citofluorimetria (percentuali rispetto al normale).

Dati ottenuti su un totale di 8 pazienti (II-3; III-1; III-4; IV-2 di TP4 e III-2; III-13; IV-10; V-7 di TP5).

Il test T di Student a due code, considerando significative le differenze che mostravano un valore di $p < 0,05$ (*), ha mostrato la significatività maggiore per le riduzioni del binding degli mAbs LJlb1, LJlb10, HIP1 ed AK2 dell'anti-CD42b [(**) $p < 0,098$], (***) $p < 0,0001$].

Non è statisticamente rilevante la variazione registrata per il clone SZ2. Significative sono risultate invece le differenze di espressione correlate alle aumentate dimensioni piastriniche delle glicoproteine CD41 e CD42a. La linea orizzontale evidenzia il 100% di legame riferito al controllo normale.

Dopo aver riscontrato la presenza della nuova mutazione N41H in entrambe le famiglie, è stato realizzato un modello molecolare della proteina mutata basato sulla struttura cristallografica dell'N terminale della GPIIb α nativa (PDB code: 1P9A), pubblicata nel 2003 da Ruggeri e collaboratori (*Celikel R, et al., 2003*) (Fig 21).

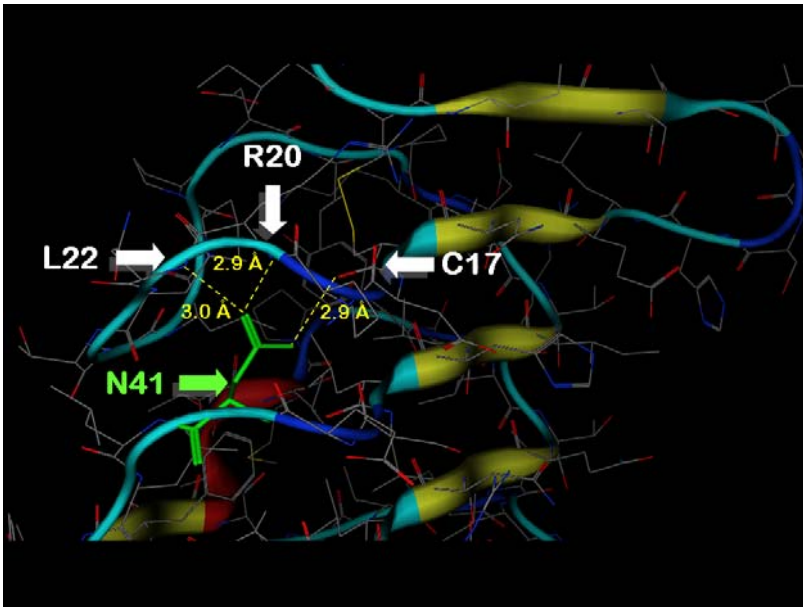


Figura 21. Struttura dell'estremità N-terminale della GPIIb α nativa (PDB code: 1P9A, Ruggeri et al 2003). Sono evidenziati con il tratteggio giallo i tre legami a idrogeno intracatena che il residuo N41 forma con i residui C17, R 20 e L22.

Una plausibile struttura del mutante GPIIb α -N41H è stata ottenuta al computer mediante un procedimento di rilassamento molecolare operato partendo dal modello wild type (WT) di Ruggeri et al.

Questa elaborazione è stata condotta con l'aiuto del Prof. Stefano Moro, Sezione Molecular Modeling del Dip. di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova.

Dopo aver simulato al computer la sostituzione aminoacidica N41H sul modello della GPIIb α nativa, si è ottenuta una struttura ad alta energia che è stata lasciata evolvere nel tempo fino al raggiungimento di un minimo energetico tale da consentire una plausibile collocazione della catena laterale dell'istidina in posizione 41 nella tasca molecolare delimitata dal loop C17-T23, interessato ai legami idrogeno intracatena formati nella proteina WT dal residuo N41 (Fig. 22).

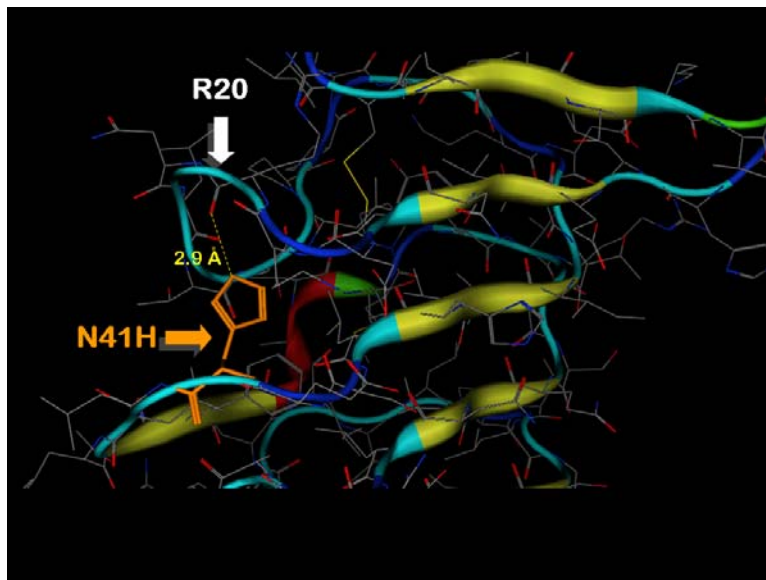


Figura 22. Struttura presunta dell'estremità N-terminale della variante mutata N41H di GPIIb α . L'istidina presente nel mutante in posizione 41 ha un anello rigido e voluminoso rispetto al gruppo R dell'N presente nel WT. Dei tre legami a idrogeno permangono solo quello con R20, evidenziato con il tratteggio giallo. Queste caratteristiche comportano un probabile rilassamento della struttura della proteina mutata rispetto al WT.

Confrontando le strutture molecolari della proteina nativa e del mutante (Fig.23), si nota in quest'ultimo che il segmento corrispondente al loop C17-T23 varia macroscopicamente la sua posizione nello spazio, alzandosi per far spazio alla più voluminosa catena dell'istidina e variando di conseguenza la conformazione della proteina. Inoltre la sostituzione con tale residuo dell'asparagina 41 comporta la perdita di due dei tre legami a idrogeno intracatena che quest'ultima formava con i residui C17, R20, L22 stabilizzando la propria struttura. Rimane infatti possibile solo l'interazione col residuo R20, mentre vengono meno i ponti a idrogeno esistenti nel WT tra l'aminoacido 41 ed i residui C17 e L22.

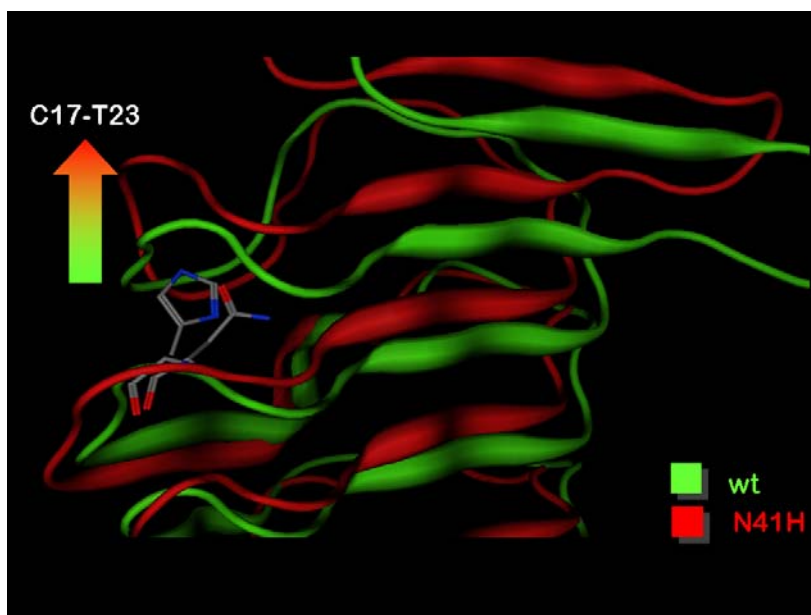


Figura 23. Confronto tra le strutture di GPIIb α WT e N41H. Sono stati sovrapposti gli stati conformazionali del WT (in verde) e del mutante N41H (in rosso). La freccia enfatizza il movimento del loop C17-T23 che si rende necessario nel mutante per accomodare nella relativa tasca molecolare l'anello dell'istidina 41.

DISCUSSIONE

I propositi delle 5 famiglie oggetto di questa tesi presentavano tutti una macrotrombocitopenia congenita ad ereditarietà autosomica dominante senza complicazioni sindromiche, con una lieve o assente diatesi emorragica, normale aggregazione piastrinica a 1,5 mg/ml di ristocetina. In base all'algoritmo diagnostico messo a punto dal Gruppo Italiano di Studio delle Piastrine (*Balduini CL e al., 2003*) queste caratteristiche non permettevano alcuna sicura classificazione tra le macrotrombocitopenie ereditarie autosomiche dominanti di eziopatogenesi nota (BSS, MRD). I metodi di indagine in uso negli anni passati non avevano infatti evidenziato nei propositi alcun segno caratterizzante di tali patologie (alterata RIPA nell'ipotesi della BSS, e inclusioni citoplasmatiche simil-Döhle nei neutrofilo dei pazienti con sospetta MRD). Per questo motivo BSS e MRD state inizialmente escluse, e i pazienti sono stati classificati come affetti da Macrotrombocitopenia Mediterranea o Cronica Ereditaria (CHMT) (*Fabris F e al., 1997; Fabris F e al., 2002*), denominazioni che raggruppano tutte le macrotrombocitopenie di origine sconosciuta che sfuggono ad altre classificazioni.

Per individuare il difetto o i difetti alla base di questo gruppo di malattie abbiamo ricontattato alcune delle famiglie che seguite presso le nostre strutture negli anni passati, per le quali era stata formulata diagnosi di CHMT.

La disponibilità di nuovi test di laboratorio e di nuovi anticorpi monoclonali ha permesso di intraprendere una caratterizzazione più fine di questi pazienti, a livello microscopico e molecolare, permettendo non solo di riformulare o approfondire la diagnosi in alcuni casi, ma anche di individuare in alcune famiglie delle nuove mutazioni geniche responsabili del loro quadro clinico.

I nuovi strumenti diagnostici implementati presso il nostro laboratorio consistono in particolare in test di immunofluorescenza su strisci di sangue periferico eseguiti usando l'anticorpo NMG2 contro la catena pesante della Miosina Non Muscolare di Tipo IIA (NMMCH-IIA), nell'utilizzo in citofluorimetria di monoclonali specifici diretti contro vari epitopi di GPIIb α (SZ2, HIP1, AK2, LJIb1, LJIb10) ora disponibili (alcuni anche commercialmente) e nel sequenziamento genico, reso possibile dal riconoscimento e dalla mappatura dei geni coinvolti in questo tipo di patologie.

Di seguito verranno discussi i risultati ottenuti dalle indagini sulle varie famiglie.

FAMIGLIA TP1

Nei componenti della famiglia TP1 (Fig. 2), i test di immunofluorescenza hanno dimostrato una distribuzione anomala (microgranulare) della Miosina Non Muscolare di Tipo II (MYH9) nei granulociti neutrofili, caratteristica di alcune forme di malattia correlata ad anomalie della NMMCH-IIA (Myosin Related Diseases); il sequenziamento del gene myh9 ha successivamente permesso di confermare la diagnosi e di risalire alla mutazione causativa: in entrambe le famiglie è stata rilevata la presenza della sostituzione nucleotidica G3485C nell'esone 25, ultimo esone del gene, che porta alla sostituzione aminoacidica di un arginina con una treonina (R1162T) nella coda della proteina. Questa mutazione non è descritta in letteratura e non è presente nei 100 soggetti normali vagliati. Queste nuove indagini molecolari hanno quindi permesso di collocare la famiglia TP1 nell'ambito delle "Malattie Correlate alla MYH9" riconoscendo una nuova mutazione causativa per questa patologia, e di seguirle con i relativi protocolli.

FAMIGLIA TP2

La seconda famiglia, TP2 (Fig.5), è stata indagata secondo lo schema seguito precedentemente. In questo caso le indagini in immunofluorescenza non hanno permesso di escludere con certezza un difetto di NMMCH-IIA, perché rivelavano in una delle affette un pattern di distribuzione della proteina non chiaramente omogeneo, come è atteso negli individui normali. L'aspetto dei vetrini era simile ad una distribuzione microgranulare tipica di alcune forme di MRD, anche se nelle diverse sedute di colorazione il risultato non è mai apparso del tutto chiaro. Il sequenziamento degli esoni 1; 10; 16; 24; 25; 26; 30; 38; 40 del gene myh9, in cui si concentrano i difetti noti nei casi di MRD, ha però escluso la presenza di mutazioni. Si è contemporaneamente proceduto a testare in citofluorimetria le glicoproteine piastriniche di superficie GPIIb α , GPIX, GPIa e GPIIb/IIIa. Anche questa analisi non ha rivelato alcuna anomalia. Nel caso della GPIIb α è stato eseguito anche il sequenziamento del relativo gene, che non ha evidenziato mutazioni. È importante notare qui anche l'assenza di difetti nell'espressione di GPIa (CD49), glicoproteina che recentemente è stata trovata ridotta in 18 casi di trombocitopenia autosomica dominante (Noris P e al., 2006).

Lo studio di questa famiglia dovrà essere quindi approfondito con il sequenziamento degli esoni mancanti del gene myh9 per verificare l'effettiva assenza di mutazioni non ancora descritte in letteratura.

Se dovessero essere escluse nuove mutazioni in questo gene si procederà in altre direzioni, per esempio sequenziando i geni degli altri componenti del complesso GPIb/V/IX che non è stato possibile testare. Questo permetterà di rivelare od escludere eventuali mutazioni che rimandino a forme di BSS legate a queste due catene proteiche minori del complesso GPIb/V/IX.

Se queste ulteriori indagini dovessero dare esito negativo, si dovrà cercare di arruolare un numero maggiore di familiari in modo da rendere possibile un'analisi di linkage, per individuare un gene candidato responsabile della macrotrombocitopenia. Per il momento questi pazienti rimangono assegnati all'ambito CHMT con eziopatogenesi ignota.

FAMIGLIA TP3

I risultati ottenuti per la famiglia TP3 (Fig 7) in citofluorimetria, correlano perfettamente con i dati dell'aggregazione alla ristocetina a 1,2 mg/mL, ed hanno permesso di formulare per questi pazienti una diagnosi di Sindrome di Bernard Soulier.

La citofluorimetria ha mostrato in modo inequivocabile la riduzione della GPIb α sulla superficie piastrinica nel proposito (77% rispetto al controllo normale), e la sua totale assenza nel figlio di questi, spiegando i rispettivi deficit di aggregazione alla ristocetina, un test che verifica proprio la funzionalità del recettore del vWF.

Tali dati sono stati confermati dal Western Blot effettuato sui lisati piastrinici totali di entrambi i soggetti. Anche la densitometria ottica effettuata sul Western mostra una riduzione dell'espressione della GPIb α (82%) nel proposito (III-1) e la completa assenza della banda di 146 Kdalton nel figlio (IV-4).

Questi risultati permettono di stabilire che il deficit di proteina rivelato dalla citofluorimetria non è dovuto ad una mancata esposizione sulla superficie piastrinica della GPIb α eventualmente prodotta, ma corrisponde ad una effettiva assenza (soggetto IV-4) o riduzione (soggetto III-3) di questa catena proteica nelle piastrine.

L'indagine genetica ha permesso di confermare questa osservazione e di comprendere il meccanismo patogenetico alla base di questo difetto. Il sequenziamento ha infatti rivelato in questi pazienti la presenza di una delezione di

4 basi (TGAG) nel gene della GPIIb α in corrispondenza del codone che codifica per la Ser39. La mutazione è presente in eterozigosi nei soggetti III-1 e III-2, ed in omozigosi nel soggetto IV-4. Il frameshift che ne deriva porta ad uno slittamento del quadro di lettura che causa l'arresto prematuro della catena polipeptidica 11 aminoacidi a valle della mutazione, causando la completa assenza della proteina nel soggetto omozigote e la sua riduzione negli eterozigoti, che esprimono correttamente l'allele sano.

La delezione TGAG del gene gplb α è già stata descritta in un caso di doppia eterozigosi, associata alla mutazione Y492X da Afshar-Kharghan V e al., nel 2000 (*Afshar-Kharghan V e al., 2000a*).

Il nostro paziente IV-2 rappresenta però il primo caso descritto di omozigosi di questa mutazione. Inoltre è interessante notare come la completa mancanza del recettore non comporti in IV-2 alcuna diatesi emorragica. Questa circostanza è in contrasto con tutti i casi simili riportati in letteratura. I casi descritti di pazienti che non esprimono la glicoproteina sulla superficie piastrinica (*Afshar-Kharghan V e al., 1994; Kunishima S e al., 1994; Noda M e al., 1995; Li C e al., 1996; Lopez JA e al., 1998; Kenny D. e al., 1998; Mitsui T e al., 1998; Margaglione M e al., 1999; Gonzalez-Manchon C e al., 2001*), primo fra tutti il caso riportato da Afshar-Kharghan, sono infatti caratterizzati da una severa diatesi emorragica, completamente assente nel nostro paziente (non ha riportato nessun episodio di particolare sanguinamento, neanche in occasione di una ferita lacero contusa al cuoio capelluto che ha richiesto sutura chirurgica). Per cercare di chiarire questa discrepanza per il soggetto IV-2 è stato richiesto presso una struttura esterna uno screening genetico (Fattore V Leiden, Proteina C, Proteina S, Antitrombina III e MTHSR) per ricercare eventuali difetti protrombotici che potessero in qualche modo contrastare la tendenza emorragica solitamente ascrivibile al Bernard-Soulier, ma gli esami effettuati hanno escluso qualsiasi predisposizione genetica alla trombofilia. Sarà quindi importante continuare ad indagare questa famiglia per mettere in luce eventuali meccanismi compensatori che spieghino l'assenza di diatesi emorragica in questo paziente privo di GPIIb α . Si potrebbe per esempio ipotizzare che in sostituzione della via GPIIb/V/IX-vWF venga potenziata qualche altra via di attivazione normalmente silente o minoritaria, ma in grado in questo caso di vicariare la funzione del recettore mancante. Recentemente sono state rilevate alcune evidenze di vie alternative a GPIIb α che portano all'attivazione piastrinica

mediata da trombina (Lova P e al., 2007) e che potrebbero costituire una direzione di indagine privilegiata.

Il sequenziamento genico dei familiari disponibili ha infine permesso di confermare la consanguineità di III-1 e III-2, rivelando per l'allele mutato lo stesso pattern polimorfico (-5T; HPA2a; VNTR c) ereditato in omozigosi dal figlio IV-2.

Questo pattern è dunque in linkage disequilibrium con la mutazione.

Infine è importante sottolineare che, a dispetto dell'iniziale classificazione autosomica dominante della macrotrombocitopenia inizialmente fatta in base alle conte piastriniche e ai dati anamnestici dei vari componenti della famiglia, dalle analisi genetiche è risultato eterozigote per la mutazione anche il soggetto III-2. Poiché, a differenza del marito, questa signora risultava avere una conta piastrinica normale, tale evidenza ha reso necessario precisare la modalità di trasmissione della malattia, che in questa famiglia è quindi da definire a carattere autosomico dominante con penetranza incompleta.

In base a questi risultati, la famiglia TP3 è stata pertanto riallocata all'ambito Bernard-Soulier, con la segnalazione tra i suoi componenti del primo caso descritto di omozigosi della delezione TGAG del gene GPIb α e la conseguente assenza della proteina sulla superficie piastrinica del soggetto IV-2, sorprendentemente non associata a diatesi emorragica.

FAMIGLIE TP4 E TP5

I dati relativi alle ultime due famiglie, TP4 (Fig. 12) e TP5 (Fig.17), verranno trattati in un'unica discussione, essendo stato evidenziato in entrambe lo stesso difetto genico alla base della macrotrombocitopenia.

In questi pazienti le indagini con l'immunofluorescenza su strisci di sangue periferico hanno evidenziato un pattern normale di distribuzione della NMMCH-IIA, che ha subito portato ad escludere malattie legate a difetti di MYH9.

I primi risultati delle agglutinazioni alla ristocetina, che in qualche componente delle due famiglie avevano restituito valori normali anche a 1,2 mg/mL, e i primi rilievi citofluorimetrici effettuati usando il clone SZ2 dell'anticorpo monoclonale contro la GPIb α che rivelava livelli di binding simili in pazienti e controlli, sembravano escludere difetti di espressione questa glicoproteina.

Anche un altro dato andava in questa direzione: in citofluorimetria il segnale degli anticorpi diretti contro GPIX non variava rispetto ai controlli, suggerendo una corretta esposizione sulla superficie dei trombociti del complesso GPIb/V/IX.

Si è comunque proceduto con l'analisi genetica per escludere definitivamente in questi pazienti qualsiasi variante della Sindrome di Bernard-Soulier.

Il sequenziamento del gene GPIb α , a sorpresa, ha rivelato in tutti gli affetti di entrambe le famiglie una nuova mutazione, assente nei 100 normali di controllo.

Si tratta della transversione A169C, che, a livello della proteina, si traduce in una sostituzione aminoacidica dell'asparagina in posizione 41 con un'istidina (N41H).

La mutazione viene a trovarsi all'interno del primo dei 7 repeats ricchi di leucina posti all'N-terminale della GPIb α , che sono coinvolti nell'interazione con il vWF (Huizinga EG e al, 2002). In particolare, l'aminoacido mutato è l'asparagina che si trova in sesta posizione nella sequenza consenso dei LRR (LXLSX**N**LXXLPXG α /LL/FXXLXXLXX). Questo residuo è molto conservato sia nei repeats di GPIb α , che tra i membri della superfamiglia delle LRR proteins e tra le specie animali (Afshar-Kharghan V e al., 2000b; Whisstock JC e al., 2002; Celikel R, e al., 2003), e questo fa supporre che sia molto importante per il mantenimento della struttura così come della corretta funzionalità della glicoproteina e dell'intero complesso recettoriale GPIb/V/IX.

Il modello molecolare ha avvalorato queste considerazioni. Infatti, osservando la struttura della catena proteica, si nota come l'asparagina 41 svolga un ruolo critico nel mantenimento dell'appropriata conformazione del dominio di GPIb α compreso tra gli aminoacidi 1 e 40. La sua catena laterale ha un ruolo strutturante comune a tutte le asparagine in sesta posizione degli altri repeats, dal momento che forma tre legami a idrogeno intracatena attraverso l'interazione con i gruppi CO-NH degli aminoacidi coinvolti (Fig.21). In particolare, i residui di GPIb α implicati nei ponti a idrogeno con l'asparagina 41 sono C17, R20, L22. Tali interazioni sono importanti nel mantenimento dell'organizzazione strutturale di tutto il dominio N-terminale della catena, al quale conferiscono compattezza e rigidità, ed in particolare questi legami stabilizzano la struttura a solenoide appartenente al sito di legame col vWF. In particolare, una piccola superficie di circa 900 Angstrom che include il primo LRR all'N-terminale di GPIb α , lega i tre loop α 1 β 2, β 3 α 2 e α 3 β 4 posizionati sulla faccia inferiore del dominio A1 del vWF.

L'istidina 41, che nel mutante sostituisce l'asparagina, perturba drasticamente l'equilibrio conformazionale della glicoproteina. Questo residuo ha una catena laterale con un anello rigido che lo rende più voluminosa dell'asparagina, tanto da non consentirgli l'accomodamento nello stesso solco molecolare a causa di forti repulsioni steriche. Inoltre, il residuo di istidina, rispetto all'asparagina, perde la

capacità di formare due dei tre legami a idrogeno intracatena presenti nella molecola wild type, e precisamente quelli con i residui L22 e C17. L'unico legame a idrogeno che rimane, R20, conferisce quindi alla proteina una struttura più rilassata, che consente una maggiore mobilità. Il loop definito dall'asparagina 17 e dalla treonina 23 cambia la sua posizione, allontanandosi dall'Asparagina 41 e provocando un cambiamento conformazionale dell'intero dominio proteico, come mostrato in Figura 25.

Questa nuova configurazione, meno strutturata, diventa presumibilmente compatibile con la collocazione della voluminosa catena laterale dell'istidina nella più ampia tasca molecolare che si viene a formare. Ciò implica sicuramente un cambio conformazionale rispetto alla proteina nativa tale da spiegare la ridotta affinità degli anticorpi monoclonali specifici per questa regione, ma lascia anche presumere importanti variazioni nelle modalità di interazione della GPIb α con il Fattore di von Willebrand: uno dei residui di GPIb α direttamente coinvolti nell'interazione col vWF è infatti H37, molto vicino ad N41, ed il nostro modello lascia supporre che la sostituzione N41H possa compromettere il corretto allineamento di H37 con la sua controparte nel vWF.

Gli effetti di tale mutazione sono quindi in grado di giustificare sia i riscontri dei test di laboratorio, sia la clinica di questi pazienti, i quali sono quindi da ritenere affetti da Sindrome di Bernard-Soulier eterozigote, ma ne rappresentano una nuova variante, da noi denominata "Variante Padova" ad ereditarietà autosomica dominante, caratterizzata dalla mutazione N41H della GPIb α .

CONCLUSIONI

Il lavoro eseguito per meglio caratterizzare dal punto di vista molecolare i pazienti affetti da Macrotrombocitopenia Cronica Isolata Ereditaria (CHMT), ha innanzitutto permesso, di riallocare alcune famiglie agli ambiti noti MRD o BSS, evidenziando nuove mutazioni nei geni coinvolti e confermando l'estrema variabilità individuale che caratterizza le manifestazioni proprie di queste due patologie.

In particolare, la famiglia TP1 è stata riconosciuta affetta da un nuovo difetto della NMMCH-IIA, la mutazione R1162T, ed è ora inserita nel Registro Nazionale delle Malattie Correlate alla NMMHC-IIA e seguita all'interno dei relativi protocolli.

Per la famiglia TP2 non si è giunti a nessuna conclusione. L'analisi degli strisci di sangue periferico hanno dato risultati contrastanti, ed il sequenziamento di parte del gene *myh9* e dell'intero gene *gplb α* non hanno evidenziato mutazioni. Per il momento TP2 rimane catalogata nell'ambito CHMT e lo studio dovrà continuare con il sequenziamento dei restanti esoni del gene *myh9* e degli altri geni dei componenti del complesso GPIb/V/IX.

La famiglia TP3 è risultata affetta da BSS, ma con la particolarità di presentare un'ereditarietà autosomica dominante con penetranza incompleta. Il difetto riscontrato è una delezione TGAG del gene *gplb α* che causa la produzione di una proteina tronca di 50 aminoacidi. Due dei suoi componenti, una dei quali asintomatica, sono portatori della mutazione in eterozigosi, mentre il terzo rappresenta, a nostra conoscenza, il primo caso descritto di omozigosi per questa delezione.

Le ultime due famiglie, TP4 e TP5, infine, sono risultate affette da una nuova variante della BSS eterozigote ad ereditarietà autosomica dominante, caratterizzata dalla sostituzione aminoacidica N41H all'N-terminale della GPIb α , a livello del primo LRR repeat, in una posizione molto conservata tra le specie animali. Tale condizione è caratterizzata da un ridotto binding degli anticorpi monoclonali LJ1b1, LJ1b10, HIP1 e AK2, i quali possono essere usati come strumenti diagnostici per l'individuazione di questa nuova variante di BSS con tecniche citofluorimetriche.

Si può quindi concludere che le nuove metodologie di laboratorio hanno portato a ridimensionare il numero delle famiglie un tempo classificate come affette da CHMT. Le tecniche utilizzate sono in grado di far emergere ed indagare nuovi difetti alla base di questa patologia nelle famiglie che ancora rimangono assegnate a questo ambito, e permettono di riconoscere queste malattie anche nei casi erroneamente

classificati come ITP (come è stato il caso, per esempio, della Famiglia TP1), evitando loro trattamenti terapeutici inutili o inopportuni.

La caratterizzazione delle CHMT dovrà continuare anche con lo studio di altre famiglie e con l'approfondimento delle indagini che riguardano la famiglia TP2, al momento non ancora caratterizzata.

BIBLIOGRAFIA

- Afshar-Kharghan V and Lopez JA. Bernard-Soulier Syndrome caused by a dinucleotide deletion and reading frameshift in the region encoding the glycoprotein Ib α transmembrane domain. *Blood* 1997;90:2634-43
- (a) Afshar-Kharghan V, Craig FE, Lopez JA. Bernard-Soulier syndrome in a patient doubly heterozygous for two frameshift mutations in the glycoprotein Ib α gene. *Br. J. Haemat.* 2000,110:919-924.
- (b) Afshar-Kharghan V, Gineys G, Schade AJ, Sun L, Li CQ, McIntire LV, Dong JF and Lopez JA. Necessity of conserved Asparagine residues in the Leucine-Rich Repeats of platelet glycoprotein Ib α for the proper conformation and function of the ligand-binding region. *Biochemistry*; 2000,39:3384-3391
- Balduini CL, Iolascon A, Savoia A. Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy. *Haematologica* 2002, 87: 860-80
- Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, Gresele P, Iolascon A, Pulcinelli FM, Savoia A; Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica*. 2003;88:582-92
- Ballmaier M., Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauß G, and Welte K. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*, 2001;97:139-146
- Celikel R, McClintock R.A., Roberts J.R., Mendolicchio G.L., Ware J., Varughese K.I., Ruggeri Z.M. Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ib α *Science* 2003, 301:218-221
- Chen Z; Naveiras O; Balduini A; Mammoto A; Conti AM; Aldestein R; Ingber D, Daley GQ; Shivdasani RA. The May-Hegglin anomaly gene myh9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by Rho-ROCK pathway. *Blood* 2007; 110:171-179
- Cornell W.D.C., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117:5179-5196
- De Marco L, Mazzuccato M, Fabris F, De Roia D, Coser P, Girolami A, Vicente V, Ruggeri ZM. Variant Bernard – Soulier Syndrome Type Bolzano. A Congenital Bleeding Disorder Due to a Structural and Functional Abnormality of the Platelet Glycoprotein Ib-IX Complex. *J Clin Invest* 1990, 86:25-31
- Drachman J.G. Inherited Thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood* 2004; 103:390-398
- Epstein CJ, Shaud MA, Piel CF, Goodman JR, Bernfield MR, Kushner JH, Ablin AR. Hereditary macrothrombocytopenia, nephritis and deafness. *Am J*

Med. 1972;52:299-310

- Fabris F, Cordiano I, Salvan F, Ramon R, Valente M, Luzzatto G, Girolami A. Chronic isolated macrothrombocytopenia with autosomal dominant transmission: a morphological and qualitative platelet disorder. *Eur J Haematol* 1997;58:40-45
- Fabris F, Cordiano I, Steffan A, Ramon R, Scandellari R, Nichol JL, Girolami A. A direct study of thrombopoiesis (TPO, reticulated platelets, glycofibrin) in patients with hereditary macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2000;64:151-156
- Fabris F, Fagioli F, Basso G, Girolami A. Autosomal dominant macrothrombocytopenia with ineffective thrombopoiesis. *Haematologica* 2002, 87: ELT27
- Frederiksen H, Schmidt K. The incidence of the idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 1999;94:909-913
- Freson K, Devriendt K, Matthijs G, Van Hoof A, De Vos R, Thys C, Minner K, Hoylaerts MF, Vermeylen J, Van Geet C. Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood*. 2001, 98:85-92
- Girolami A.; Randi ML; Casonato A; Pasini L; Boccatto C; Fabris F. A study of platelet function and morphology in a new family with May Hegglin anomaly. *Folia Haemat* 1980;2:256-268
- Gohda F; Uchiumi H; Handa H; Matsushima T; Tsukamoto N; Morita K; Amagai H; Murakami M; Murakami H; Nojima Y; Karasawa M. Identification of inherited thrombocytopenia based on mean platelet volume among patients diagnosed with idiopathic thrombocytopenia. *Thrombosis Research*, 2007;119:741-746.
- Gonzalez-Manchon C, Larrucea S, Pastor AL, Butta N, Arias-Salgado EG, Ayuso MS, Parrilla R. Compound Heterozygosity of the *gplb α* gene associated with Bernard-Soulier Syndrome. *Thromb Haemost* 2001;86:1385-91
- Greinacher A, Nieuwenhuis HK, White JG. Sebastian platelet syndrome: a new variant of hereditary macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *Blut*. 1990, 61: 282-288
- Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozennfeld-Granot G, Carlsson LE, Savage J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Baker DF, Greinacher A, Epstein CJ, Gluksman MJ and Martignetti J. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias; May-Hegglin anomaly and Fetchner, Sebastian, Epstein, and Alport Syndromes. *Am J Hum Genet*.2001;69:1033-1045
- Hegglin R. Gleichzeitige konstitutionelle Veränderungen an Neutrophilen und Thrombocyten. *Helv. Med. Acta* 1945, 12: 439-440

- Huizinga EG; Tsuji S; Romijn RA; Shiphorst ME; de Groot PG; Sixma JJ and Gros P. Structures of Glycoprotein Ib α and its complex with von Willebrand Factor A1 domain. *Science* 2002; 297, 1176-1179
- Kenny D., Jonsson OG, Morateck PA, Montgomery RR. Naturally occurring mutations in glycoprotein Ib alpha that result in defective ligand binding and synthesis of a truncated protein. *Blood* 1998,92:175-183.
- Kunishima S, Miura H, Fukutani H, Yoshida H, Osumi K, Kobayashi S, Ohno R, Naoe T. Bernard-Soulier syndrome Kagoshima: Ser 444>Stop mutation of GP Ib α resulting in circulating truncated GPIb α and surface expression of GP Ib β and GPIX. *Blood* 1994;84:3356-62
- Kunishima S, Imai T, Hamaguchi M, Saito H. Novel heterozygous missense mutation in the second leucine rich repeat of GPIb α affects GPIb/IX/V expression and results in macrothrombocytopenia in a patient initially misdiagnosed with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006,74:348-355
- Li C, Pasquale DN, Roth GJ. Bernard-Soulier syndrome with severe bleeding: absent platelet glycoprotein Ib alpha due to homozygous one-base deletion. *Thromb Haemost* 1996;76:670-4
- Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood coagul and Fibrinol* 1994;5:97-119
- Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 1998, 91:4397-418
- Lova P, Campus F, Mancini F, Balduini C, Torti M. Evidence for thrombin-induced platelet activation independent of PAR1 PAR4 and GPIb/V/IX. *J Thromb Haemost* 2007;5 Supplement 2:P-W-251
- Margaglione M, D'Andrea G, Grandone E, Brancaccio V, Amoriello A, Di Minno G. Compound heterozygosity (554-589 del, C515-T transition) in the platelet glycoprotein Ib alpha gene in a patient with a severe bleeding tendency. *Thromb Haemost*. 1999, 81:486-92
- Marigo V.; Nigro A.; Pecci A.; Montanaro D.; Di Stazio M.; Balduini C. & Savoia A. Correlation Between the clinical phenotype of MYH9-related disease and tissue distribution of class II non muscular myosine heavy chains *Genomics* 2004, 83:1125-1133
- Miller JL, Cunningham D, Lyle V., Finch CN. Mutation in the gene encoding the α chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease. *PNAS*,1991 88:4761-4765.
- Miller JL, Lyle VA, Cunningham D. Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib α leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood* 1992;79:439-446

- Mitsui T, Yokoyama S, Yazaki N, Hayashi T, Suzuki K, Shimizu Y, Kawakami T, Kanazawa C, Katsuura M, Ikegami T, Hayasaka K. Severe bleeding tendency in a patient with Bernard-Soulier syndrome associated with a homozygous single base pair deletion in the gene coding for the human platelet glycoprotein Iba gene. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1998;20:246-51
- Molecular Operating Environment, version 2006.08; Chemical Computing Group: Montreal, Canada, 2006
- Najean Y, Lecompte T. Genetic thrombocytopenia with autosomal dominant transmission: a review of 54 cases. *Br J Haematol.* 1990, 74:203-8
- Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, Weiss MJ. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA 1. *Nature Genetics* 2000, 24:266-270
- Noda M, Fujimura K, Takafuta T, Shimomura T, Fujimoto T, Yamamoto N, Tanoue K, Arai M, Suehiro A, Kakishita E et al. Heterogeneous expression of glycoprotein Ib, IX and V in platelets from two patients with Bernard-Soulier syndrome caused by different genetic abnormalities. *Thromb Haemost* 1995;74:1411-15.
- Noris P., Pecci A., Di Bari F., Di Stazio MT., Di Pumpo M., Ceresa IF., Arezzi N., Ambaglio C., Savoia A., Balduini CL. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica* 2004;89:1219-1225
- Noris P, Guidetti GF, Conti V, Ceresa IF, Di Pumpo M, Pecci A, Torti M, Savoia A, Balduini CL. Autosomal dominant thrombocytopenias with reduced expression of glycoprotein Ia. *Thromb Haemost* 2006; 95:483-9
- Peng Y, Shrimpton CN, Dong FJ and Lopez JA. Gain of von Willebrand factor binding function by mutagenesis of a species-conserved residue within the leucine-rich repeat region of platelet glycoprotein Ib α . *Blood.* 2005;106:1982-1987
- Peterson LC, Rao KV, Crosson JT & White JG. Fechtner syndrome: a variant of Alport's syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia. *Blood* 1985, 65: 397-406
- Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 1977, 23:327-341
- Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, Del Vecchio M, Perrotta S, Belletti S, Poggi V, Iolascon A. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2001;97:1330-1335
- Seligsohn U. Glanzmann thrombasthenia: a model disease which paved the way to powerful therapeutic agents. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 216-7

- Seri M, Pecci A, Di Bari F, Cusano R, Savino M, Panza E, Nigro A, Noris P, Gangarossa S, Rocca B, Gresele P, Bizzaro N, Malatesta P, Koivisto PA, Longo I, Musso R, Pecoraro C, Iolascon A, Magrini U, Rodriguez Soriano J, Renieri A, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Balduini CL, Savoia. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine* 2003;82:203-15
- Shen Y, Romo GM, Domg J, Schade A, McIntire LV, Kenny D, Whisstock, Berndt MC, Lopez JA and Andrews RK. Requirements of leucine-rich repeats of glycoprotein GPIb α for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex. *Blood*. 2000;95:903-910
- Shvdasani RA. Molecular and transcriptional regulation of megacaryocyte differentiation. *Stem Cells* 2001; 19:397-407
- Tsui V., Case D.A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* 2001, 56:275-291
- Unkelbach K, Kalb R, Santoso S, Kroll H, Mueller-Eckhardt and V. Kiefel. Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw(PI^A), Ko, Bak and Br (HPA-1,2,3,5). *Br J of Haemat*,1995;89:169-176
- Von Behrens WE Mediterranean macrothrombocytopenia. *Blood* 1975; 46:199-208
- Ward CM, Andrews RK, Smith AI and Berndt MC. Mocharagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand Factor Receptor Glycoprotein Ib α . Identification of the sulfated Tyrosine/anionic sequence Tyr276-Glu282 of glycoprotein Ib α as a binding site for von Willebrand Factor and α -thrombin. *Biochemistry*, 1996,35:4929-4938
- Ware J., Russel S.R., Vicente V., Scharf R., Tomer A., McMilland R., Ruggeri Z. Nonsense mutation in the glycoprotein Ib α coding sequence associated with Bernard-Soulier syndrome. *PNAS* 1990; 87:2026-2030
- Ware J, Russell SR, Marchese P, Murata M, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest*. 1993, 92:1213-20
- Whisstock JC; Shen Y; Lopez JA; Andrews RK; Berndt MC. Molecular modeling of the seven tandem Leucine-Rich Repeats within the ligand-binding region of platelet glycoprotein Ib α . *Thromb Haemost* 2002; 87:329-33