

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Medicina e Chirurgia

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN

FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

XXIV CICLO

Anno accademico 2010-2011



**Analisi molecolare e correlazione genotipo-fenotipo in
pazienti con deficit di Antitrombina dell'Italia Meridionale**

Candidato

Dr Nicola Macarone Palmieri

Relatore

Ch.mo Prof Giovanni Di Minno

RIASSUNTO

Abbiamo sequenziato il gene SERPINC 1 in 26 pazienti (15F, 11 M) con deficit di Antitrombina (22 tipo I, 4 tipo II), appartenenti a 18 diverse famiglie, tra loro non imparentate, tutte provenienti dall'Italia meridionale. Mutazioni in eterozigosi sono state identificate in 15 famiglie su 18 (83.3%). Tra queste 8 erano mutazioni "novel", cioè di nuovo riscontro e dunque mai descritte prima in letteratura. 7 mutazioni chiaramente portavano ad un'alterata sintesi proteica (4 frameshift, 1 non-stop, 1 mutazione di splicing e 1 con delezione di 21 paia di basi). Una mutazione, presente in un singolo paziente, era una mutazione missense che sembra essere la causa del deficit di AT perché: a) è assente in 100 cromosomi nei controlli; b) essa coinvolge un aminoacido altamente conservato la cui sostituzione si pensa che possa alterare l'attività antitrombinica; c) nessuna altra mutazione è stata identificata nel paziente in questione.

Mutazioni gravi (es. nonsense, frameshift, delezioni) sono state evidenziate nei pazienti con deficit di AT di tipo I. Al contrario, nei pazienti con deficit di AT di tipo II, 3 mutazioni su 4 erano di tipo missense; la quarta mutazione identificata portava ad uno shift di 19 nucleotidi nel codone di stop.

In aggiunta al tipo di mutazione riscontrata, la coesistenza con altri fattori di rischio predisponenti aiuta a comprendere la severità del quadro clinico nei pazienti con deficit di tipo I (età del primo evento, rischio di recidive durante la profilassi).

Nelle 5 famiglie in cui vi era più di un componente affetto, è stato osservato lo stesso genotipo e un'espressione clinica concordante.

Possiamo concludere che le basi molecolari del deficit di AT nel Sud Italia sono diverse se comparate ad altre aree geografiche, e che l'analisi molecolare e lo studio degli effetti della mutazione sul fenotipo possono aiutare a predire l'espressione clinica della malattia.

INTRODUZIONE

L'antitrombina (AT) è un inibitore delle proteasi seriniche della coagulazione, principalmente della trombina e del fattore Xa (1,2). Essa è sintetizzata dal fegato come una singola catena secreta nel plasma come proteina da 464 aminoacidi. La forma matura è ottenuta dopo un clivaggio di 32 aminoacidi. Il gene che codifica l'AT è noto come SERPINC1 (GenBank X68793.1/MIM 107300) e mappa su 1q23-25 ed è composto da 7 esoni (3). I domini più rilevanti da un punto di vista funzionale dell'AT sono la regione che lega l'eparina, codificata dall'esone 2, e la regione che lega la trombina, codificata dall'esone 7.

Il deficit di AT è un disordine trombofilico autosomico dominante (4,6) associato ad un alto rischio di eventi tromboembolici (7,10), anche ricorrenti (11,12). L'AT ricombinante umana è disponibile per i casi più gravi anche come terapia sostitutiva (13). La prevalenza stimata del deficit di AT varia da 1/500 fino a 1/5.000 nella popolazione generale (14,15). La prevalenza di deficit ereditario di AT è decisamente più alta (da 1/200 fino a 1/20) in pazienti con storia positiva per tromboembolismo venoso.

Più che sul grado del deficit di AT, la natura eterogenea dell'espressione clinica sembra essere correlata agli effetti delle mutazioni del gene SERPINC 1.

Il deficit di AT tipo II è suddiviso in 3 varianti, dipendenti dalla localizzazione della mutazione (2-4,6): i) la mutazione meno comune ma più grave è quella della variante di tipo IIa, spesso causata da mutazioni nella regione che lega la trombina; ii) la più comune ma anche la meno trombogenica è la mutazione della variante 2b, di solito dovuta a mutazioni nella regione che lega l'eparina; iii) variante di tipo 2 c, la cui mutazione determina un effetto pleiotropico su

entrambi i siti. Fino ad oggi sono state descritte più di 200 mutazioni del gene SERPINC1.

Noi abbiamo sequenziato il gene SERPINC1 in 26 pazienti affetti da deficit di AT appartenenti a 18 famiglie senza legami di parentela tra loro dell'Italia Meridionale e abbiamo correlato la mutazione di ciascun paziente (di cui la metà mai riportate prima) con l'espressione clinica della malattia. Oltre a classificare i pazienti con deficit di AT, il nostro lavoro ha lo scopo di predire l'outcome di questi pazienti e di definire i trattamenti più idonei a livello individuale visto l'alto tasso di recidive nonostante una adeguata profilassi.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Da ciascun individuo arruolato in questa ricerca è stato ottenuto il consenso informato per l'analisi genetica. Lo studio è stato preliminarmente approvato dal comitato Etico locale e ha rispettato Principi della Dichiarazione di Helsinki. Ventisei pazienti con sospetto deficit di AT (11M, 15F), appartenenti a 18 famiglie differenti senza legami di parentela tra loro, afferiti al Centro di Riferimento Regionale di Emostasi e Trombosi, sono stati arruolati nello studio.

Tutti erano caucasici e tutti provenivano dal Sud Italia fino alla seconda generazione (genitori e nonni). Per ciascun paziente sono stati raccolti dati sulla storia clinica personale e familiare e sono stati effettuati tests di laboratorio alla ricerca di eventuali ulteriori mutazioni pro-trombotiche associate (deficit di proteina C e S anticoagulanti, mutazione del fattore V Leiden, mutazione G20210A del gene della protrombina, omocisteina e anticorpi anti-fosfolipidi).

All'arrivo ciascun paziente è stato sottoposto a prelievo per dosaggio dell'AT sia come antigene sia da un punto di vista funzionale. Abbiamo utilizzato un analizzatore automatico per quantificare l'attività funzionale dell'AT utilizzando il kit AT Berichrom diretto all'inattivazione della trombina (CSL Behring, Milano). I livelli di AT sono stati ottenuti con determinazioni immunochimiche utilizzando il kit "turbiquant AT" (Siemens Healthcare Diagnostics, Herlangen, Germania). I valori normali di AT secondo la scala di riferimento variano da 0.19 a 0.31 g/l.

I 26 pazienti con deficit di AT furono classificati in accordo al tipo di deficit di AT in tipo I (22 casi) e tipo II (4 casi).

Analisi genetica delle mutazioni del SERPINC 1

Il DNA è stato estratto da leucociti del sangue periferico utilizzando il sistema automatico "MagNA LC system" (Roche Diagnostics, Milano). Le coppie di nucleotidi (Tabella 1) per amplificare i 7 esoni e le regioni contigue degli introni del gene SERPINC 1 e la regione promoter (fino a 500 coppie di basi all'estremità 5') sono state progettate utilizzando il software Primer 3 (Genbank database NG_122462.1).

La miscela per PCR conteneva 50 mmol/l KCl, 15 mmol/l Tris HCl ad un Ph di 8, 2 mmol/l di MgCl₂, 0.2 mmol/l dNTPs, 0.00002 mmol/l di ciascuna coppia di basi, 1 U di "Ampli Taq Gold DNA polymerase" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 100 ng di DNA genomico in un volume finale di 50 µl. Il primo ciclo di amplificazione prevedeva 95°C per 40 secondi, 60°C per 30 secondi e 72°C per 40 secondi. Successivamente la temperatura veniva ridotta di 0.5°C per ciclo per 10 cicli. Infine, per ulteriori 25 cicli, venivano utilizzate le seguenti condizioni: 95°C per 40 secondi, 55°C per 30 secondi, e 72°C per 40 secondi. I frammenti di DNA amplificati venivano automaticamente sequenziati utilizzando il metodo basato sulla fluorescenza con l'apparecchio Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit e con l'analizzatore di sequenze ABI Prism 377.

I dati così ottenuti dal software di sequenza genica venivano confrontati con quelli della sequenza di riferimento del gene SERPINC 1 utilizzando il programma DNASTAR. Al fine di rilevare grossi riarrangiamenti genici in tutte le regioni codificanti il gene SERPINC1, abbiamo utilizzato il kit SALSA MLPA P227 Serpinc C1 (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands). I prodotti della reazione venivano quantificati utilizzando un analizzatore di DNA ABI prism 3130.

Campioni di DNA di individui normali venivano utilizzati in ogni ciclo. La delezione completa dell'esone 6 in un paziente, fu confermata amplificando 200 ng del DNA genomico con una PCR lunga (94°C per 2', 94°C per 10'', 60°C per 30'' con una riduzione di 0.5°C per ciclo per 10 cicli), poi 94°C per 15'', 55°C per 30'', 68°C per 4' e 20'', il tutto per 25 cicli.

Numerazione delle mutazioni

La numerazione delle mutazioni del DNA si basa sulla sequenza del cDNA (NM 000488.3). Abbiamo utilizzato il sistema di numerazione delle proteine in accordo alle Linee Guida HGVS (l'aminoacido + 1 è la Metionina codificata dalla tripletta ATG). Lo schema di numerazione in cui l'aminoacido + 1 è l'istidina alla 33° posizione della proteina non processata, può essere ottenuta sottraendo alla sequenza aminoacidica 32 aa (gli aminoacidi clivati durante il processo di maturazione della proteina).

Conservazione filogenetica

La conservazione filogenetica dell'aminoacido coinvolto nella mutazione D347G fu documentata come descritto da Luxembourg et al. (22)

Predizione degli splicing

Per predire gli effetti dello splicing della mutazione c.1154-15G>A furono utilizzati i 3 programmi seguenti:

1) Net Gene 2 (www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2;

- 2) GENESCAN (www.genes.mit.edu/genomescan.html);
- 3) NNSPLICE 0.9 (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

RISULTATI

Analisi molecolare

Una mutazione a carico del gene SERPINC 1 fu riscontrata in 15 famiglie su 18 (83.3%), corrispondenti a 22 pazienti su 26 (84.6%) con deficit di AT. Nessun paziente era omozigote né doppio eterozigote per le mutazioni del gene SERPINC 1. Nessuna mutazione riscontrata era presente in più di una famiglia. In 5 casi, più di un membro della famiglia era affetto e la mutazione riscontrata era la stessa in ciascuno di loro.

In 4 pazienti con deficit di AT di tipo I, nessuna mutazione è stata riscontrata nella regione genica sequenziata (tutti gli esoni, i passaggi esoni-introni, e la regione promoter). (Tabella 2).

Tra le 15 differenti mutazioni identificate, 3 coinvolgevano l'esone 2, 4 coinvolgevano l'esone 7 e le altre tutti gli altri esoni. 8/15 erano mutazioni "novel", cioè mai riscontrate prima: 7 sono chiaramente correlate ad un'alterata sintesi proteica (4 frameshift, 2 non senso, 1 delezione di 21 coppie di aminoacidi), un'altra è una mutazione missense.

a) *Mutazione non sense (4)*

Abbiamo identificato 4 mutazioni non senso, tutte dovute ad una transizione C>T, e tutte codificanti un codone di stop prematuro al posto di un residuo di arginina (ARG, R). Come descritto in tabella 2, la mutazione R229X fu identificata nella paziente con il fenotipo più grave del nostro campione (paziente #1). All'età di 6 anni, dopo un episodio di polmonite batterica, la

paziente presentò una trombosi venosa bilaterale complicata da embolia polmonare. Nonostante la profilassi con anticoagulanti orali, sviluppò un nuovo episodio di trombosi venosa profonda agli arti tre anni più tardi.

La mutazione p.R164X fu riscontrata in 5 membri della stessa famiglia che includevano 4 fratelli (pazienti 2,3,4,5) e la figlia del paziente 2 (paziente 6). Tutti hanno sviluppato nella loro vita episodi di TVP. Il paziente 4 ha anche presentato un episodio di embolia polmonare; in tale paziente l'iperomocisteinemia rappresentava un ulteriore fattore di rischio predisponente. Nella suddetta famiglia 2 pazienti su 5 hanno sviluppato recidive nonostante una profilassi antitrombotica adeguata (trombosi superficiali degli arti inferiori).

Gli altri 2 pazienti con mutazioni "non senso" manifestarono, altresì, un fenotipo grave della malattia. La paziente 7, infatti, sviluppò una trombosi cavale subito dopo il parto con recidiva trombotica in corso di profilassi. Nel paziente 8, va riportato un episodio di trombosi venosa profonda all'età di 19 anni e, nonostante la profilassi, una recidiva con tromboflebite superficiale sei anni più tardi.

b) Delezioni frameshift (5)

Abbiamo identificato 5 delezioni frameshift, di cui 4 nei pazienti con deficit di tipo I e una in un paziente con deficit di tipo II (tabella 2). 4 su 5 delezioni portavano ad un codone di stop; 1 (c.1390, 1393 del) causava un non -stop. La completa delezione dell'esone 6 (c.1154-1218) portava ad un codone di stop; tale mutazione fu identificata nel paziente 9 che aveva un'espressione fenotipica molto grave della malattia. Il paziente, anche eterozigote per la mutazione del gene G20210A della protrombina, ebbe due recidive (trombosi

venosa profonda degli arti inferiori a 28 anni, tromboflebite superficiale a 30 anni) nonostante la profilassi.

La delezione c804-807 (di nuovo riscontro) è stata identificata nel paziente 10 che, all'età di 25 anni, fu colpito da una trombosi venosa profonda degli arti inferiori complicata da embolia polmonare. Il paziente 10 presentava anche elevati livelli di omocisteina plasmatica.

La delezione "novel" c.173, che portava alla trascrizione di una proteina tronca di 61 aa (p.P58Rfs3X) fu osservata in una donna (paziente 11) che sviluppò una trombosi venosa profonda dopo il parto all'età di 32 anni, e in suo padre (paziente 12) che ebbe un evento trombotico all'età di 43 anni. Entrambi svilupparono anche recidive arteriose (la figlia uno stroke ischemico durante la sua seconda gravidanza a 37 anni, il padre un ictus a 45 anni e un infarto acuto del miocardio a 57 anni di età). Il padre era un forte fumatore ed era ipercolesterolemico, nessun fattore di rischio cardiovascolare fu riscontrato nella figlia.

La nuova delezione c.1390-1393 che causa una sequenza 13 aminoacidi più lunga nel sito di legame con la trombina, fu riscontrata in un paziente asintomatico (paziente 13) in cui fu diagnosticato il deficit di AT perché sottoposto ad esami per la sua anamnesi familiare positiva. La delezione frameshift c1332-1333 fu riscontrata in un paziente con deficit di AT di tipo II. A causa di uno shift del codone di stop, la mutazione determina una sequenza più lunga di 19 aminoacidi. Il paziente 23 ha un fenotipo grave con trombosi venosa profonda a carico dell'arto inferiore esordita dopo un trauma minore, seguita da embolia polmonare.

c) *Delezioni “in frame” (1)*

In 2 pazienti appartenenti alla stessa famiglia, la delezione “in frame” di 21 coppie di basi (c. 243-263) è stata identificata. Nonostante essa non determini cambiamenti nella cornice di lettura del genoma, essa causa un marcato deficit dell’attività dell’AT con un fenotipo trombogenico. Dei 2 pazienti con tale mutazione, uno (paziente 15) è asintomatico all’età di 36 anni; il padre (paziente 14) ha sviluppato una trombosi venosa profonda degli arti inferiori post-traumatica a 64 anni.

d) *Mutazioni non –stop (1)*

La mutazione c.1395A > C causa una modifica “non stop” della sequenza genica che porta alla sintesi di una proteina con 28 aminoacidi in più, la p.X465SextX*28. Tale mutazione è stata identificata in due fratelli con deficit di AT di tipo I. Entrambi hanno sviluppato un episodio di embolia polmonare; il primo (paziente 17) all’età di 23 anni come complicanza di una trombosi venosa profonda distale scatenata da un trauma; la sorella (p.16) manifestò l’embolia polmonare a 29 anni durante un trattamento estrogenico.

e) *Mutazioni di splicing(1)*

La mutazione c.1154-1G>A fu identificata in un singolo paziente (p.18) che presentò una trombosi splancnica all’età di 16 anni durante un ciclo chemioterapico per un linfoma.

f) *Mutazioni missense*

Tre mutazioni missense (di cui una di nuova scoperta) sono state riscontrate in pazienti con deficit di AT di tipo II (tabella 2). La mutazione c.235C>T causa

la mutazione nella proteina p.R79C all'interno del sito di legame dell'eparina. Questa mutazione è stata identificata in un forte fumatore (p.24) con un fenotipo lieve. Il paziente, infatti, ha sviluppato una trombosi venosa poplitea dopo un trauma. La nuova mutazione c.1121A > G causa la sostituzione di un aminoacido carico positivamente (Aspartato) con uno non carico (glicina), determinando la mutazione p.D374G. Il fenotipo del paziente era grave (p.25) con uno stroke ischemico giovanile all'età di 43 anni. In questo paziente coesistevano altri fattori di rischio: l'ipertensione arteriosa di grado II e l'eterozigosi del FV Leiden. La mutazione c.1273C > T coinvolge il sito attivo di legame della trombina (p.R425C). Tale mutazione fu riscontrata in un paziente asintomatico (p.26), inquadrato come deficit di tipo II in base alla sua storia familiare.

g) Pazienti senza riscontro di mutazioni

Dopo aver esaminato tutta la sequenza genica inclusa la regione promoter, nessuna mutazione del gene SERPINC 1 è stata riscontrata in 4 pazienti appartenenti a 3 famiglie con deficit di AT di tipo I che esprimevano un fenotipo di malattia molto grave (Tabella 2)

h) Varianti senza effetti

Abbiamo identificato la nuova variante eterozigote c.1154-55 G > A nel paziente 19. Egli non aveva nessun'altra mutazione all'interno del gene SERPINC1. Tre programmi diversi hanno escluso un effetto splicing di tale variante. La variante RS 5877, che non porta nessun cambio nella sequenza aminoacidica, è stata identificata in omozigosi o in eterozigosi in più del 50 % degli alleli del nostro paziente.

i) Varianti del promoter.

Il polimorfismo del promoter RS3138521 è stato identificato in 14 pazienti su 26. Tra questi la mutazione era in omozigosi in 6 casi, in eterozigosi nei restanti 8. La frequenza allelica era 20/52 (38.4%). La variante RS 2227589 è stata identificata in 4 casi su 26, in tutti i casi in forma eterozigote. La variante causa una lieve riduzione dell'espressione di AT (23). Tale variante è stata identificata in un paziente (p.1) con una mutazione non senso (dove il polimorfismo non ha effetti) e in un altro (p.22) che era portatore di una mutazione non identificata. Quest'ultimo aveva un fenotipo molto grave della malattia ma è improbabile che dipenda dalla sola mutazione del promoter. Inoltre il polimorfismo fu riscontrato anche nel paziente 20 che era portatore di una mutazione non riscontrata. Poiché essa non era presente nel paziente 21 (cugino del paziente 20), un ruolo patogenetico della variante RS2227589 è inverosimile.

DISCUSSIONE

Abbiamo valutato 26 pazienti affetti da deficit di AT appartenenti a 18 famiglie. La mutazione del gene SERPINC 1 è stata riscontrata in 15 famiglie su 18 (83.3%). Le mutazioni non senso trovate nei nostri pazienti con deficit di tipo I e due delle tre mutazioni missense trovate nei pazienti con deficit di tipo II sono mutazioni C>T che coinvolgono un'arginina. Più della metà delle mutazioni del gene SERPINC 1 coinvolgono il dinucleotide CpG (3).

Nonostante abbiamo sequenziato tutte le regioni codificanti del gene SERPINC 1, incluse le zone di passaggio introne-esone, la regione promoter fino a 500 coppie di basi e tutto il gene alla ricerca di grossi riarrangiamenti, in 4 pazienti con deficit di tipo I appartenenti a 3 famiglie senza legami di parentela tra loro, non è stato possibile riscontrare mutazioni. In accordo con i nostri dati, Luxembourg et al (22) non furono capaci di riscontrare mutazioni in circa il 20% dei pazienti. Al pari dei pazienti con fibrosi cistica (24), le mutazioni in pazienti negativi all'analisi genetica molecolare potrebbero essere localizzate nelle sequenze introniche.

Patnaik et al (14) riportano che il deficit di AT in pazienti di tipo I è spesso causato da brevi delezioni e inserzioni. Delle mutazioni identificate nella nostra casistica di pazienti con deficit di tipo I, solo 4 su 11 sono brevi delezioni; ben 7 su 11 coinvolgono un singolo nucleotide. Inoltre, le tre mutazioni missense nei nostri pazienti con deficit di tipo II, non coinvolgono siti tipici per mutazioni (19). Luxembourg et al. descrivono che le mutazioni missense sono presenti in circa il 60 % di pazienti con deficit di tipo I. Nessun

paziente con deficit di tipo I aveva tale mutazione nella nostra popolazione. Tra le mutazioni identificate nei nostri pazienti solo la delezione p.80-86 coinvolge una delle tre regioni in cui sono più comuni (codoni 81, 106/107 244/245) le delezioni in pazienti con deficit di AT di tipo I (17). Mutazioni ricorrenti in circa il 15% delle famiglie con deficit di AT sono descritte da Luxembourg et al (22). Nel nostro studio nessuna delle mutazioni descritte è stata riscontrata in più di una singola famiglia. Questi dati supportano la teoria che, così come altri disordini congeniti, la frequenza e il tipo di mutazione responsabile del deficit di AT nell'Italia meridionale è differente da quello osservato un altre realtà geografiche.

I nostri dati, inoltre, confermano (27-29) il concetto che il deficit di AT, almeno nei pazienti sintomatici che hanno altri fattori scatenanti, tipicamente si associa con eventi trombotici venosi e più raramente con quelli arteriosi. I pazienti 11 e 16 manifestarono uno stroke ischemico dopo un episodio di trombosi venosa profonda, ma l'ipercolesterolemia e il fumo di sigaretta (tipici fattori di rischio per eventi trombotici arteriosi) coesistevano in uno di loro. Lo stroke fu anche il primo evento ischemico nel paziente 25 ma in questo caso il paziente era anche iperteso e portatore della mutazione del FV Leiden in eterozigosi. Tuttavia è possibile che mutazioni specifiche del gene SERPINC1 possano contribuire all'insorgenza di eventi trombotici arteriosi come già descritto in Letteratura (11).

I dati attualmente presenti in Letteratura riportano che solo il 50 % dei pazienti con deficit di AT sviluppa un evento trombotico prima dei 50 anni (4). Nella nostra casistica, al contrario, 10 pazienti su 24 hanno manifestato il primo evento trombotico prima dei 25 anni, e solo 2 pazienti hanno sviluppato eventi trombotici sopra i 50 anni. Inoltre va segnalato che quasi la metà dei pazienti ha sviluppato recidive nonostante una corretta profilassi;

questo dato concorda statisticamente con quanto riportato in Letteratura (16). Ne deriva che la sola profilassi farmacologica antitrombotica potrebbe non essere sufficiente per ridurre il rischio di recidiva e, a onor del vero, non sappiamo se tutti i pazienti hanno seguito la profilassi antitrombotica con una compliance adeguata. Oltre alla gravità delle mutazioni riscontrate nei nostri pazienti (non sense, frameshift, delezioni), la gravità del fenotipo può dipendere dalla coesistenza di altri fattori di rischio (15 casi su 20 nei nostri pazienti con deficit di AT di tipo I), in accordo con i dati presenti in Letteratura (30). Solo 2 dei pazienti con deficit di tipo I erano asintomatici; questi pazienti sono stati sottoposti ai test in quanto alcuni familiari avevano avuto una diagnosi di deficit di AT. Uno di loro (il paziente 13) aveva una mutazione di nuovo riscontro, la delezione c1390-1393 che causa una sequenza più lunga di 13 aminoacidi p.X465Mfs13X. E' prevedibile che questo gene codifichi una proteina funzionalmente valida. Nel paziente 15, la delezione di 21 coppie di basi (c.243-263) non modifica la cornice di lettura (delezione p.80-86). Nonostante questa causi un deficit quantitativo e qualitativo dell'AT, essa ha un limitato effetto trombogenico. Infatti il paziente ha 36 anni ed è tutt'oggi asintomatico (paziente 15); il padre (paziente 14) ha sviluppato un episodio di trombosi venosa profonda degli arti inferiori a 64 anni dopo un trauma.

Una forte correlazione genotipo-fenotipo è stata riscontrata anche nei pazienti con deficit di AT di tipo II (31). 3 casi su 4 avevano una mutazione missense associata con un'attività residua della proteina. La delezione di nuovo riscontro con frameshift (c.1332-1333) a carico dell'esone 7 è la sola mutazione grave riscontrata nei pazienti con deficit di tipo II. Questa mutazione determina la sintesi di una proteina più lunga di 19 aminoacidi e presumiamo che questa rappresenti una forma instabile della proteina

(p.I444Mfs19X). Comunque solo ulteriori studi potranno rivelare l'impatto della mutazione sulla struttura proteica e sulla sua funzionalità (32).

In ogni caso il paziente ha manifestato una trombosi venosa profonda complicata da embolia polmonare dopo un trauma minore all'età di 21 anni. A causa di questo fenotipo così grave il paziente è stato posto in terapia anticoagulante orale e finora nessuna recidiva è stata registrata (età attuale: 28 anni).

Nelle 5 famiglie con più di un paziente affetto, l'espressione fenotipica della malattia era sovrapponibile in tutti i casi. In una famiglia un membro (il paziente 15) era del tutto asintomatico, l'altro (il paziente 14) ha sviluppato il primo episodio di tromboembolismo tardivo, all'età di 64 anni. Due fratelli (pazienti 16 e 17) avevano un'espressione fenotipica molto grave della malattia. Anche nei pazienti 11 e 12 così come nei pazienti 20 e 21 il fenotipo era altamente sovrapponibile.

Qualche discordanza è stata riscontrata nella famiglia che include i pazienti da 2 a 6 per quanto riguarda l'età di comparsa dei sintomi (da 35 a 55 anni). Inoltre, solo due dei 5 familiari hanno sviluppato almeno una recidiva. Abbiamo interpretato questa variabilità più che sulla differente penetranza della malattia nei membri di una stessa famiglia, sulla differente compliance alla trombo profilassi e sulla diversa prevalenza degli altri fattori di rischio in ciascun paziente.

Tra le 15 mutazioni identificate, ben 8 sono mutazioni di nuovo riscontro (novel). Di queste, 7 alterano la struttura proteica in maniera significativa (delezioni e mutazioni frameshift); l'ottava è una mutazione missense (p.D374G) che sembra essere alla base del deficit perché: i) nessun'altra mutazione è stata identificata nel paziente; ii) tale mutazione non è stata

identificata in 100 cromosomi provenienti da individui sani; iii) la mutazione causa la sostituzione di un aminoacido polare con un aminoacido non polare; iv) l'aminoacido coinvolto è altamente conservato nella filogenesi.

Le altre 2 mutazioni missense identificate (nei pazienti con deficit di tipo II) sono note (7) e determinano una riduzione dell'affinità per l'eparina (mutazione p.R79C) e una riduzione dell'attività proteica (p.R425C).

In conclusione, abbiamo riscontrato che le basi molecolari del deficit di AT nell'Italia Meridionale differiscono da quelle presenti in altre aree geografiche; l'analisi molecolare e lo studio degli effetti della mutazione sono fondamentali per predire l'espressione clinica della malattia.

Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione PCR dei differenti esoni del gene SERPINC1

Ciascun primer contiene all'estremità 5' la sequenza universale M13 di 18 paia di basi.

Amplificazione di

Esone	Sequence	Lunghezza di amplificazione
Promoter F	TGTA AACGACGGCCAGTGGACACCTTGGCACTCAGAT	741
Promoter R	CAGGAAACAGCTATGACCACCCAAGGGGTAGCTTAGGA	
1 forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGGAACCTCTGCGAGATTTAG	240
1 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGCCTGGTCTTCTCAAAGGTG	
2 forward	TGTA AACGACGGCCAGTGGAAATCCTCTGCTTTACTGGG	554
2 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCCTGCAGTGTGGTTGAGG	
3 forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGAGGTGGCTATTAGTCAGAGAC	421
3 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCTTCAGCAGCAAAGCAGTG	
4 forward	TGTA AACGACGGCCAGTCAAATGGTGGGAAAGGACAG	346
4 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCCTCTCAGGGCTTCGGTC	
5 forward	TGTA AACGACGGCCAGTGTGCATATCCCGCCAGTC	619
5 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCCTGACTTGTTGCTCCTTTC	
6 forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGATTAGGTGAAGATTTAGGATTC	325
6 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTTATAGCAGGCCTGTGGAGG	
7 forward	TGTA AACGACGGCCAGTAATCCAACCTGACCCAAATG	435
7 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCCAATAGCATGTTTCCCC	

Table legend: Exon: I 6: intron 6. Mutazione ed effetto: Ns: mutazione non sense; Fs: mutazione frameshift; IF: delezione in-frame; NSM: mutazione nonstop ; Ss: mutazione sito di splicing; Ms: mutazione missense. La nomenclatura della mutazione proteica è basata sulla sequenza di cDNA (NM 000488.3) in accordo alle Linee Guida HGVS, dove l'aminoacido +1 è la Metionina codificata dal codone di iniziazione ATG. L'altra nomenclatura (che si riferisce allo schema solito dove l'aminoacido +1 corrisponde all'Hcy della proteina processata) può essere ottenuto sottraendo 32 as dal nome dell'HGVS. Tipo di evento: Bil: bilaterale; LL: lower limb, arto inferiore; DVT: deep venous thrombosis, trombosi venosa profonda; PE: pulmonary embolism, embolia polmonare; SVT: superficial venous thrombosis, trombosi venosa superficiale; PLL: popliteal lower limb, trombosi poplitea; VTE: venous thromboembolism, tromboembolismo venoso. Fattori predisponenti: Hcys: iperomocisteinemia; FII G20210A: G20210A mutazione del gene della protrombina; Hcol: ipercolesterolemia; APS: sindrome da anticorpi antifosfolipidi; AH: arterial hypertension, ipertensione arteriosa; FVL: Factor V Leiden.

Paziente (sesso ed età)	AT %	Mutazione DNA ed effetto	Mutazione (proteina)	Età del primo evento	Tipo di evento	Fattori predisponenti	Recidive	Esone
1 (F,21)	52	c.685C>T (Ns)	p.R229X	6	Bil LL DVT; PE	Polmonite	1	4
2 (F,61)	36	c.490C>T (Ns)	p.R164X	36	LL DVT	Nessuno	1	3
3 (M, 52)	48	c.490C>T (Ns)	p.R164X	44	LL DVT	Nessuno	0	3
4 (F,55)	66	c.490C>T (Ns)	p.R164X	35	LL DVT; PE	Hcys	0	3
5 (F,58)	60	c.490C>T (Ns)	p.R164X	55	LL SVT	Nessuno	0	3
6 (F,35)	54	c.490C>T (Ns)	p.R164X	17	LL DVT	Nessuno	2	3
7 (F,30)	63	c.481C>T (Ns)	p.R161X	21	caval DVT	Post-partum	1	3
8 (M,42)	57	c.1171C>T (Ns)	p.R391X	19	LL DVT	Hcys	1	6
9 (M,48)	55	c.1154-1218del (Fs)	p.I386Kfs1X	18	LL DVT; PE	Polmonite, FIIG20210 A	2	6
10 (M,29)	58	c.804-807del (Fs)	p.K268Rfs14X	25	LL DVT; PE	Hcys	0	5
11 (F,51)	53	c.173del (Fs)	p.P58Rfs3X	32	LL DVT	Gravidanza	1	2
12 (M,76)	41	c.173del (Fs)	p.P58Rfs3X	43	LL DVT	Hchol, fumo	2	2

13 (F,33)	58	c.1390-1393del (Ns)	p.X465Mfs13X	-	Nessuno	-	-	7
14 (M,68)	55	c.243-263del (IF)	p.80-86del	64	PLL DVT	Trauma	0	2
15 (F,36)	49	c.243-263del (IF)	p.80-86del	-	Nessuno	-	-	2
16 (F,41)	50	c.1394A>C (NSM)	p.465SextX*28	29	PE	Estrogeni	0	7
17 (M,39)	45	c.1394A>C (NSM)	p.465SextX*28	23	LL DVT; PE	Trauma	0	7
18 (M,38)	44	c.1154-1G>A (Ss)	-	16	splancnic VTE	Linfoma	0	16
19 (M,22)	50	NON rilevata	-	19	PE	Nessuno	0	-
20 (F,41)	65	Non rilevata	-	29	PE	Chirurgia	0	-
21 (F,46)	63	Non rilevata	-	26	PE	Estrogeni, APS	2	-
22 (F,28)	60	Non rilevata	-	21	PE	Polmonite	0	-
		TYPE 2						
23 (M,28)	49	c.1332-1333del (Fs)	p.I444Mfs19X	21	LL DVT; PE	Trauma Minore	0	7
24 (M,57)	64	c.235C>T (Ms)	p.R79C	52	PLL DVT	Trauma, Ictus	0	2
25 (F,49)	65	c.1121A>G (Ms)	p.D374G	43	Ictus	AH, FV Leiden	0	5
26 (F,31)	68	c.1273C>T (Ms)	p.R425C	-	Nessuno	Nessuno	-	7

Tabella 2

Mutazioni del gene SERPINC 1 identificate nei pazienti con deficit di AT

In grassetto le mutazioni di nuovo riscontro.

BIBLIOGRAFIA

1. Corral J, Vicente V, Carrell RW. Thrombosis as a conformational disease. *Haematologica* 2005;90:238-46.
2. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 2008;299:1306-14.
3. Perry DJ, Carrel RW. Molecular Genetics of Human Antithrombin Deficiency. *Hum Mutat* 1996;7:7-22.
4. Simioni P, Sanson BJ, Prandoni P, et al. Incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1999;81:198-202.
5. Sanson BJ, Simioni P, Tormene D, et al. The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, protein C, or protein S: a prospective cohort study. *Blood* 1999;94:3702-6.
6. De Stefano V, Leone G, Mastrangelo S, et al. Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. *Thromb Haemost* 1994;72:352-58.
7. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998;92:2353-8.
8. De Stefano V. Inherited thrombophilia and life-time risk of venous thromboembolism: is the burden reducible? *J Thromb Haemost* 2004;2:1522-5.
9. Vossen CY, Conard J, Fontcuberta J, et al. Familial thrombophilia and lifetime risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:1526-32.
10. Vossen CY, Conard J, Fontcuberta J, et al. Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *J Thromb Haemost* 2005;3:459-64.
11. Dentali F, Gianni M. VTE recurrence in patients with inherited deficiencies of natural anticoagulants. *Thromb Haemost* 2009;101:5-6.
12. Ho WK, Hankey GJ, Quinlan DJ, et al. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: a systematic review. *Arch Intern Med* 2006; 166: 729-36.

13. Rodgers GM. Role of antithrombin concentrate in treatment of hereditary antithrombin deficiency. An update. *Thromb Haemost* 2009;101:806-12.
14. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008;14:1229-39.
15. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 1994;87:106-12.
16. Brouwer JLP, Lijfering WM, Ten Kate MK, et al. High long-term absolute risk of recurrent thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C, or antithrombin. *Thromb Haemost* 2009;101:93-9.
17. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007;5S1:102-15.
18. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2011;105:635-46.
19. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1997;77:197-211.
20. Lee ST, Kim HJ, Kim DK, et al. Detection of large deletion mutations in the SERPINC1 gene causing hereditary antithrombin deficiency by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *J Thromb Haemost* 2008;6:701-3.
21. Picard V, Nowak-Göttl U, Biron-Andreani C, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency: Twenty-two novel mutation in the AT gene mutation. *Hum Mutat* 2006;27: 600 (Mutation in brief#896).
22. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2011;105:635-46.
23. Antón AI, Teruel R, Corral J, et al. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. *Haematologica* 2009;94:589-92.
24. Castaldo G, Fuccio A, Cazeneuve C, et al. Detection of five rare cystic fibrosis mutations peculiar to Southern Italy: implications in screening for the disease and phenotype characterization for patients with homozygote mutations. *Clin Chem* 1999;45:957-62.
25. Elce A, Boccia A, Cardillo G, Three novel CFTR polymorphic repeats improve segregation analysis for cystic fibrosis. *Clin Chem* 2009;55:1372-9.

26. Di Minno G, Davi G, Margaglione M, et al. Abnormally high thromboxane A2 biosynthesis in homozygous homocystinuria. Evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanisms. *J Clin Invest* 1993;92:1400-6.
27. Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 2009;124:14-8.
28. Maclean PS, Tait R. Hereditary and acquired antithrombin deficiency. *Drug* 2007;67:1429-40.
29. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 2008;299:1306-14.
30. Roldàn V, Ordonez A, Marin F, et al. Antithrombin Cambridge II (A348S) supports a role for antithrombin deficiency in arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2009;101:483-6.
31. Franchini M, Mannucci PM. Interactions between genotype and phenotype in bleeding and thrombosis. *Haematologica* 2008;93:649-52.
32. Huntington JA. Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost* 2011;S1:26-34.