

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE
INDIRIZZO IN SCIENZE ENDOCRINO-METABOLICHE

XXV Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI DI DOTTORATO

CARATTERIZZAZIONE GENETICA E CORRELAZIONE
GENOTIPO/FENOTIPO DEL DEFICIT CONGENITO DI
ANTITROMBINA IN ITALIA MERIDIONALE

TUTOR

Chiar.mo

Prof. Giovanni Di Minno

CANDIDATA

Dott. ssa Anna Guida

RIASSUNTO

L'antitrombina (AT) è una delle più importanti proteine anticoagulanti naturali il cui ruolo principale è costituito dall'inibizione del fattore secondo attivato (trombina) e del fattore Xa. Il gene di questa proteina SERPINC1 (GenBank X68793.1/MIM#107300), è composto da 7 esoni (1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6), ed è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q23-25). Il deficit ereditario di antitrombina presenta un'ereditarietà autosomica dominante e nella gran parte dei pazienti è presente in eterozigosi, la prevalenza nella popolazione generale è riportata tra 1:500 a 1:500.

Abbiamo valutato il fenotipo di 27 pazienti (14 maschi e 13 femmine) di cui 17 (65%) erano affetti da deficit di tipo I, 3 (11%) tipo II, 4 (23%) non classificati, appartenenti a 18 famiglie non correlate, afferenti al nostro centro di coordinamento regionale per le emocoagulopatie. Ventitré su ventisei avevano presentato eventi trombotici: 20/24 (83%) avevano avuto tromboembolismo venoso (TEV); 3/24 sia eventi arteriosi che venosi, una sola paziente (1/24) aveva presentato esclusivamente trombosi arteriosa. Nel gruppo dei pazienti con tromboembolismo venoso, 10/20 (50%) avevano avuto almeno una recidiva. La presenza di

eventuali ulteriori fattori di rischio protrombotici sia congeniti che acquisiti era stata valutata. il sequenziamento degli esoni 1-7 del gene SERPINC1 ha permesso di identificare 15 mutazioni genetiche di cui 14 non descritte (5 frameshift; 5 nonsense; 3 missense; 1 delezione in frame (tabella 2).

Nel gruppo di pazienti affetti da deficit di tipo I sono stati osservati differenti gradi di severità di malattia, associati al tipo di mutazione genetica piuttosto che al livello antigenico e alla attività antitrombinica.

Tra i pazienti con deficit di tipo 1 le mutazioni dell'esone 2 (codificante per il sito di legame per l'eparina, heparin binding site HBS n=3) e nell'esone 7 (codificante per il sito reattivo per la trombina, thrombin reactive site) erano quantitativamente e qualitativamente indistinguibili da quelli occorsi negli altri esoni supportando il riscontro di valori antigenici e di attività antitrombinica sovrapponibili tra loro.

In conclusione una mutazione nel gene dell'antitrombina funzionalmente rilevante dipende tanto dal sito della mutazione quanto dalla gravità della mutazione stessa.

INTRODUZIONE

Il deficit di antitrombina rappresenta una importante condizione trombofilica, è stata la prima patologia trombofilica studiata, sin dagli anni sessanta. La prevalenza riportata dalla letteratura è molto variabile tra 1:500 e 1:5000 nella popolazione generale. [1-2,27]. L'incidenza annuale stimata di eventi trombotici nei pazienti affetti è stimata intorno al 10.0 % [3,26], tra i pazienti con tromboembolismo venoso afferenti al nostro Centro di Riferimento regionale per le Emocoagulopatie, la prevalenza del deficit ereditario di antitrombina è del 2%, analogamente a quanto riportato dalla letteratura internazionale, in cui la prevalenza è stimata tra 1:20 and 1:200 [4].

Il principale ruolo di questa proteina è legato all'inibizione del fattore II attivato (Trombina) e del fattore X attivato, un effetto enormemente amplificato (circa 1000 volte) dalla presenza di glicosaminoglicani come l'eparan solfato e l'eparina. L' AT è membro della superfamiglia delle Serpine, le Serpine inibiscono il proprio enzima bersaglio agendo da pseudo-substrato, con un rapporto 1:1 questo legame tra enzima e substrato comporta la formazione di un complesso bimolecolare stabile, enzimaticamente inattivo. L'attività anticoagulante dell'AT è minima in

assenza del suo cofattore, l'eparina, costituita da unità disaccaridiche ripetute variamente solfurate il cui peso molecolare oscilla da 3 a 40 kDa [5-6]. Il legame ad alta affinità dipende essenzialmente da una sequenza pentasaccaridica dell'eparina[7]. *In vivo*, altri glicosaminoglicani hanno la capacità di legare l'AT come l'eparan solfato, situate sull'endotelio e l'eparina rilasciata dalle mastcellule dopo interazione con la superficie endoteliale. L'interazione tra AT e l'eparan-solfato endoteliale localizza l'AT sulla parete vascolare mantenendola in forma inattiva.

AT inibisce la trombina attraverso la formazione di un complesso bimolecolare tra due residui del sito reattivo (RS)(Arg 393- Serin394) il legame con il lisil-residuo del sito di legame dell'eparina da parte della sequenza pentasaccaridica accelera enormemente questo processo, circa 1000 volte, in quanto determina una modificazione allosterica espulsione del frammento N-terminale del ansa del sito reattivo (Reactive site loop, RSL) dal beta-foglietto A rendendolo più accessibile al legame con la trombina.

L'Antitrombina inibisce anche altre serin-proteasi della cascata coagulativa come il fattore Xa, IXa, XIa, XII, urokinasi tissue plasminogen activator (tPA), kallikreina. Il gene specifico SERPINC1 (GenBank X68793.1MIM#107300) si trova sul braccio lungo del cromosoma uno

(locus 1q23-25) ed è composta da 7 esoni (1, 2, 3, , 4, 5, 6 and 7)[8]. Si tratta di una protein a singola catena di 58,200 Da, sintetizzata negli epatociti come una catena di 464 aminoacidi da cui viene operato il clivaggio di 32 aminoacidi che costituiscono un segnale peptidico necessario affinché la proteina acquisisca la forma matura. Questa forma matura ha 4 catene glucidiche identiche in posizione Asn 96,Asn135,Asn155 e Asn 192 e tre ponti disolfuro. Due forme di Antitrombina circolante sono fisiologicamente presenti, tipo α e tipo β , quest'ultimo tipo rappresenta il 5-10% della forma circolante, è caratterizzato da una catena glicidica in meno, questa isoforma mostra una maggiore affinità per l'eparina ma la sua specifica funzione non è completamente chiarita. [9]

I domini funzionali sono: il sito reattivo (thrombin reactive site RS) codificato dall'esone 7, e il sito di legame per l'eparina (heparin binding site HBS) codificato dall'esone 2.

La struttura terziaria dell'antitrombina è caratterizzata dalla presenza di 9 beta eliche (A-I), e 5 beta foglietti. Nella struttura quaternaria della proteina sono presenti una struttura a loop mobile che nasconde parzialmente all'esterno i due residui funzionali di Arginina (P) e Serina (P') quest'ultimo specifico per il fattore Xa, del sito reattivi, questo loop mobile è in grado di cambiare posizione spostando all'interno il Beta

foglietto A creando *de novo* un beta foglietto sA4, momento cruciale nell'acquisizione di una maggiore affinità con il substrato. La flessibilità di tale molecola è determinata da tre regioni essenzialmente: la regione shutter (sportello) posizionata al centro all'intersezione di elementi strutturali del beta-foglietto A, il suo ruolo è quello di accogliere il "cardine" del sito reattivo, facilitando l'apertura del foglietto. L'importanza di queste regioni a cardine e della regione shutter si evince anche dal fatto che sono estremamente conservate nell'ambito della superfamiglia delle serpine. Mentre il dominio del sito di legame dell'eparina è presente solo nell'antitrombina e nel cofattore eparinico II. il legame della sequenza pentasaccaridica delle eparine, dei glicosaminoglicani e del fondaparinux, determina l'innescò di un minimo ma fondamentale cambio conformazionale, che consente alla proteina di espellere completamente il loop del centro reattivo. Con questa nuova conformazione l'affinità dell'antitrombina per la proteasi coagulativa, Fattore Xa, cresce di circa 300 volte [10] ciò determina il clivaggio da parte del fattore Xa del loop tra i residui P-P' formando così tra serpina e proteasi un legame covalente, in questo modo il loop clivato rientra nella globulina formando un nuovo beta foglietto, sA4, per cui si passa da una struttura a 5 foglietti ad una a sei, questo comporta la distruzione del sito

attivo e lo spostamento del Fattore Xa all'altro polo della serpina, che subisce un cambio conformazionale, il sito di legame dell'eparina cambia, ritornando in uno stato a bassa affinità che consente di rilasciare la struttura pentasaccaridica. Il movimento del loop reattivo consente alla serpina di formare con il suo substrato un complesso stabile (TAT) rapidamente rimosso dal circolo. Nelle fasi iniziali della cascata coagulativa la funzione dell'antitrombina è quella di bloccare il fattore Xa per evitare che si abbia l'attivazione di grandi quantità di trombina, effetto comunque bilanciato da altre serpine come il PAI-1 e l'alfa-2 antiplasmina.

Da questa descrizione si evince come anche minimi cambiamenti nella sequenza aminoacidica possano determinare una alterazione strutturale importante, e tali cambiamenti sono evidenziabili nelle varianti antitrombiniche descritte dalla letteratura.[11]

Questo meccanismo è stato storicamente descritto come un modello a due *step* anche se di recente alcuni autorevoli autori hanno desunto da studi di proteomica un modello a tre step in cui tra il legame dell' AT con il pentasaccaride, e il cambio conformazionale ci sarebbe una tappa intermedia in cui il pentasaccaride e l'AT sono legati ma la regione "cardine" non ha ancora mutato stato per passare definitivamente alla conformazione attiva. L'espulsione del sito reattivo determina un

incremento dell'affinità di legame con il Fattore IXa e Fattore XI di due ordini di grandezza [12]

I livelli plasmatici sono 19-31 mg/dL, con un emivita di 48-72 ore [4]. La diagnosi di deficit di antitrombina si ottiene misurando l'attività funzionale il cui intervallo di normalità è 80-120%, dove 100% corrisponde ad una unità di attività antitrombinica in 1 mL di plasma di riferimento.

I livelli di antitrombina sono più bassi nei neonati e nei lattanti fino a sei mesi, nonché negli anziani. Sono riscontrabili livelli più bassi di antitrombina nelle donne in corso di terapia estro progestinica.

I pazienti con deficit di antitrombina hanno livelli funzionali tra il 40-60%, non è riportata in letteratura correlazione tra livelli antigenici e quadro di gravità di malattia.

La misura del complesso trombina antitrombina (TAT) è utilizzata talvolta come un marker di attivazione della coagulazione nella diagnostica degli eventi trombotici [13]. La trombina lega la fibrina, la trombina legata al coagulo è protetta dall'inibizione da parte dell'antitrombina.[14]. Questo fenomeno potrebbe spiegare la re-trombosi dopo terapia fibrinolitica per la liberazione dal coagulo di trombina ancora attiva [15].

Il deficit di antitrombina viene ereditato come malattia autosomica dominante, la maggior parte dei pazienti è eterozigote. Modelli di topi

knock-out con deficit complete di antitrombina morivano per trombosi ed emorragia *in utero* [7]. Attualmente in letteratura sono stati descritti solo 11 casi omozigoti, con quadri clinici estremamente gravi [8,16,28,29].

Il deficit viene classificato in due tipi: tipo I deficit quantitativo, in cui sia l'antigene che l'attività sono ridotti; tipo II deficit qualitativo in cui solo l'attività è ridotta.

Nell'ambito del tipo I Lane et al, in 1992, descrissero un sottotipo definito tipo Ib, in cui la riduzione del livello antigenico non è tale quanto ci si aspetterebbe dal tipo di deficit funzionale, spiegando tale discrepanza come dovuta alla presenza di una quota di protein anomala. Il Tipo II viene convenzionalmente suddiviso in tre categorie: IIa _ compromissione del sito reattivo di legame con la trombina (RS), IIb _ compromissione del sito di legame con l'eparina(HBS), IIc Pleiotropico. Il tipo II HBS viene concordemente descritto come meno trombo genico, allo stato non vengono riportati fenotipi diversi nell'ambito del deficit di tipo I.

Dai dati della letteratura emerge che l'88% dei pazienti portatori di deficit di antitrombina sono di tipo II, mentre il 60% dei pazienti affetti da deficit che hanno un episodio trombotico sarebbero affetti dal tipo I [6]

Il deficit di è generalmente eterozigote, omozigosi del tipo II è stata descritta così come un caso di emizigosi, in un neonato presentatosi con

trombosi arteriosa alla nascita. [16] trombosi acuta in corso di ipertermia è stata descritta in famiglie portatrici di forme termolabili di antitrombina come la variante Rouen-VI [6, 17].

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Chiarire la variabilità osservata tra pazienti affetti da deficit di affetti dallo stesso tipo di deficit era stato l'obiettivo del presente studio. Correlazione genotipo-fenotipo in ventisette pazienti affetti da deficit di antitrombina afferenti al nostro centro di coordinamento regionale per le emocoagulopatie.

MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati ventisette pazienti (14 uomini, 13 donne) appartenenti a 18 famiglie non imparentate tra loro due pazienti erano parenti di secondo grado tra loro, afferenti al nostro Centro di Cordinamento Regionale per le Emocoagulopatie, con diagnosi confermata di deficit congenito di antitrombina. Era stato richiesto ed ottenuto il consenso informato all'effettuazione dei tests di genetica e ai test funzionali da tutti i soggetti. Tutti i pazienti erano di razza caucasica, nati in Italia e appartenenti a famiglie italiane. Eventi trombotici sono stati riscontrati in 24 dei 27 pazienti (88% del campione), i restanti 3 erano asintomatici e la diagnosi in questi individui era stata ottenuta sulla base della storia familiare. I pazienti sono stati altresì sottoposti a ricerca di altre cause di trombofilia: dosaggio di Proteina C, Proteina S, iperomocisteinemia, anticorpi antifosfolipidi, e sono stati ricercati i polimorfismi genetici associati a trombofilia. nessuno dei nostri pazienti era affetto da nefropatie, diabete mellito, neoplasie, solo una paziente era affetta da sindrome da anticorpi antifosfolipidi, non sono state rilevate altre patologie autoimmunitarie. In questi pazienti erano stati effettuati dosaggi dell'attività antitrombinica, dei livelli antigenici di antitrombina e il

sequenziamento del gene SERPINC1 era stato effettuato. DNA genomico era stato estratto dai leucociti del sangue periferico utilizzando il sistema automatizzato MagNA Pure LC system (Roche Diagnostics).

Il livello antigenico dell'antitrombina era stato ottenuto con determinazione immunochimica, utilizzando il kit Turbiquant Antithrombin III, Code No. OWIZ. La standardizzazione è stata praticata con le preparazioni standard di proteine della Siemens Healthcare Diagnostics Products, range di riferimento 0.19-0.31 g/L. analizzatori automatici erano usati per le determinazioni quantitative dell'attività antitrombinica. I materiali utilizzati sono stati Antitrombina III Brichrom* (A), OWWR 15 e Antitrombina Brichrom* (A), OWWR 17. L'intervallo di riferimento è: 75%-125% della norma [18]

Analisi Genomica

Utilizzando il software Primer3 erano state create coppie oligonucleotidiche per amplificare la sequenza degli esoni 1-7 e le flanking intronic regions del gene SERPINC1 (GenBank database NC_000001.10). Si effettuava amplificazione mediante PCR di 100 ng di DNA genomico in un volume finale di 50 µl. la miscela di reazione conteneva 50 mmol/l KCl,

15 mmol/l Tris-HCl a pH 8.0, 2 mmol/l MgCl₂, 0,2 mmol/l dNTPs, 2x10⁻⁴ mmol/l per ogni paio di primers, e 1 U Ampli TAq DNA polimerasi (Ampli TAq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La sequenza genomica veniva amplificata utilizzando Touchdown-PCR a 95 °C per 40 s, a 60°C per 30 s, e a 72°C per 40 s nel primo ciclo, riducendo la temperatura annealing di 0.5°C per ciclo; dopo 10 cicli le condizioni vengono cambiate: 95 °C per 40 s, 55°C per 30 s, 72°C per 40 s per altri 25 cicli.

I frammenti amplificati di DNA venivano purificati e sequenziati automaticamente utilizzando il metodo a fluorescenza Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing kit e l'ABI Prism 377 Genetic analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I dati erano ottenuti dal software di analisi di sequenza (Sequence Analysis Software, Applied Biosystems) e la sequenza del gene SERPINC1 (GenBank database NC_000001.10) veniva allineata utilizzando il programma Seqman DNASTAR.

RISULTATI

Tre dei nostri pazienti non avevano mai avuto eventi trombotici. L'analisi di altri fattori di rischio trombofilici aveva messo in evidenza che un paziente era portatore in eterozigosi della mutazione G20210 A del gene per la protrombina, ed un altro era portatore in eterozigosi per la mutazione per il fattore V di Leiden tre pazienti erano affetti da iperomocisteinemia; una paziente era affetta da sindrome da anticorpi antifosfolipidi. Nel nostro campione 3 pazienti su 27 avevano avuto un ictus in età giovanile (<50 anni), due di essi erano padre e figlia

Ventiquattro pazienti su ventisette avevano avuto un evento trombotico, di questi 3/24 avevano avuto sia eventi venosi che arteriosi e una paziente aveva avuto solo un evento arterioso (ictus giovanile). L'82% dei pazienti con trombosi invece aveva avuto almeno una trombosi venosa.

Tra i pazienti con tromboembolismo venoso circa il 50% (10/20) aveva avuto almeno una recidiva tromboembolica. Tra i pazienti di sesso maschile il 21% (3/14) aveva avuto una recidiva, l' 11% (2/14) due recidive e solo uno tre recidive per un totale di recidive del 42% (6/14). Tra le pazienti di sesso femminile il 30% (4/13) aveva avuto due recidive, mentre il 15% (2/13) aveva avuto tre eventi totale delle recidive 46%

(6/13,) una paziente aveva avuto due episodi trombo embolici venosi ed una trombosi arteriosa . I dati clinici principali (età del primo evento trombotico, tipo di evento, numero di recidive sono riportati nelle **tabelle A e B.**

Dal dosaggio antigenico dell'antitrombina è stato possibile classificare i nostri pazienti per il tipo di deficit: 18(66%) erano affetti da deficit di tipo I, 3(11%) da deficit di tipo II, in tre casi (22%)non era stato possibile ottenere questo dato per cui restavano inclassificabili.

Dall'amplificazione del gene SERPINC1 sono emerse 14 nuove mutazioni non descritte precedentemente in letteratura, di cui 5 delezioni in frameshift, 5 non-senso, 3 missenso ed una delezione *in frame* insieme a due mutazioni già note. Sulla base di tali dati i seguenti risultati sono emersi.

Inframe deletion (n=1;p=2)

In due pazienti consanguinei (padre e figlia), affetti da deficit quantitativo di antitrombina (Tipo I) è stata identificata una delezione inframe, c.243-263del (p.80-86del) dell'esone 2 che coinvolge quindi il sito di legame per l'eparina. Il deficit tipo II che interessa questo sito (Tipo II HBS) è ritenuto essere associato ad un minore rischio trombotico. I nostri dati

suggeriscono che una mutazione genetica minore, come una delezione che non comporti uno slittamento della cornice di lettura, determini un fenotipo clinico meno grave, dove per grave intendiamo un evento idiopatico, in età giovanile, o una tendenza alla recidiva. Osservando la sequenza dell'antitrombina in diverse specie animali è emerso che il sito interessato dalla delezione contiene due aminoacidi altamente conservati, e che sostituzioni di singoli aminoacidi in questo sito comportano un'alterazione della struttura proteica tale da determinare una polimerizzazione di più proteine che ne comportano una minore attività ed un livello antigenico ridotto ma non quanto ci si aspetterebbe [19].

Missense mutations (n=4;p=4)

Questa mutazione missenso, c.235C>T nell'esone 2 è stata identificata in un paziente affetto da deficit tipo II determinando la sostituzione p. Arg79Cys. Questa mutazione era stata già descritta come variante HBS, ed in maniera concorde con quanto descritto in letteratura, nel nostro paziente presentava un fenotipo clinico lieve.

L'esone 7 codifica per il sito reattivo della trombina e le mutazioni di questo sito determinano profili di rischio trombotico elevato anche nei pazienti affetti da deficit qualitativo. nel nostro campione il paziente che

presentava questo tipo di mutazione nell'esone 7 (c.1273C>T-p.Arg425Cys), considerata "lieve" dal punto di vista genetico presentava una storia familiare di grave patologia trombotica questa sequenza è moderatamente conservata nelle diverse specie animali e presenta omologia di sequenza tra le varie serpini analizzate . il terzo paziente, con deficit tipo I, presentava una mutazione missenso dell'esone 7 in the exon 7, c.1394A>C p. X465Ser che determinava una sequenza proteica più lunga e un fenotipo severo.

L'ultimo caso era una mutazione dell'esone 5 c.1121A>G (p.Asp374Gly)in un soggetto con deficit quantitativo, l'analisi genetica aveva messo in evidenza anche la presenza in eterozigosi del polimorfismo del fattore V di Leiden.il fenotipo di questa paziente era grave, essendo affetta da Ictus giovanile.

Splicesite (n=1;p=1)

Identificata una mutazione del sito di splicing già descritta in letteratura, nell'esone 6 associata ad un fenotipo grave

Delezioni in frameshift (n=5;p=6)

Delezioni determinanti slittamento della cornice di lettura sono state identificate in 5 famiglie per un totale di sei pazienti. Cinque pazienti erano affetti da deficit tipo I e una sola da deficit tipo II.

Nell'esone 2 è stata identificata una delezione c.173del (p.P58R fs 55X) che determina la formazione di un codone di stop premature, in due pazienti consanguinei (padre e figlia)entrambi con trombosi arteriosa (ictus) e trombosi venosa. Dall'analisi degli ulteriori fattori di rischio emergeva che il padre era affetto da ipertensione arteriosa e tabagismo, nella figlia non erano emersi altri fattori di rischio cardiovascolare.

La delezione complete dell'esone 6 (c.1154-1218del-p.K268R fs14X) era emersa dall'analisi di un paziente con fenotipo clinic severo, eventi trombo embolici venosi recidivanti in età giovanile

L'analisi genetica aveva altresì evidenziato la presenza in eterozigosi della mutazione G20210A del gene della protrombina.

Nell'ambito dello studio dell'esone7 due differenti delezioni in frameshift erano emerse : la prima c.1390-1393del (P.x465Mfs 13X) in una paziente dalla storia familiare di eventi tromboembolici venosi gravi in età giovanile, la seconda era la delezione c.1332-1333del (p.I444M fs19X)in un paziente affetto da deficit di tipo II, in cui si aveva la formazione di una

sequenza più lunga, la regione risultava altamente conservata nelle varie specie animale e confrontata con le altre serpine era conservata nella beta-amiloide, tale mutazione interessa l'esone che codifica per il sito reattivo, determinando anche nei soggetti con deficit qualitativo un fenotipo clinico grave. Dalla revisione della letteratura su mutazioni simili riscontrate in questo sito e dalla storia clinica del paziente è possibile ipotizzare la formazione di una variante instabile della serpina.

Mutazioni "Nonsense" (n=5;p:9)

Sono state identificate 2 mutazioni nell'esone 3, una mutazione nell'esone 4, una nell'esone 5 ed una nell'esone 6, tutte in pazienti con deficit di tipo quantitativo e fenotipo clinico grave.

La prima delle due mutazioni dell'esone 3 (c.490C>T -p.R164X) è stata identificata in una famiglia di cinque pazienti (quattro germani e la figlia di uno di loro), tutti i soggetti avevano fenotipi gravi, eventi recidivanti, idiopatici ed in giovane età, la sequenza in esame era altamente conservata tra le specie animali, ma peculiare della antitrombina rispetto alle altre serpine.

Dalla storia di questi pazienti si evinceva anche una maggiore e più spiccata resistenza all'eparina, sebbene l'esone 3 non codifichi per il sito di

legame con l'eparina; data la peculiarità della sequenza rispetto alla struttura delle serpina e la alta conservazione della sequenza nell'ambito delle specie animali, si potrebbe ipotizzare un ruolo nel cambio conformazionale in risposta al legame con l'eparina [20,23]

La seconda mutazione (c.480C>T -p.R161X) era stata riscontrata in una paziente con una storia familiare e personale drammatica di eventi trombo embolici venosi gravi, in età giovanile e recidivanti, anche in questo caso la delezione avveniva in una regione altamente conservata tra le diverse specie . una mutazione dell'esone 6 (c.1132C>T -p.R391X) è stata identificata in un paziente con un fenotipo severo, anche in questo caso si tratta di una regione altamente conservata tra le specie.

Nell'esone 5 è stata individuata una mutazione nonsense (c.1102C>T-p.Q336>X) in un paziente con un fenotipo clinico grave, in età giovanile, anche in questo caso la struttura era altamente conservata tra le specie.

L'ultima mutazione nonsense c.685C >T (p. Arg229X) è stata identificata nella paziente con il fenotipo più grave, tromboembolismo venoso massivo in età pediatrica, recidivato in corso di terapia anticoagulante orale.

Polimorfismi (n=2; p=4)

Nel nostro campione solo due polimorfismi sono stati identificati, in quattro soggetti non imparentati tra loro: RS5877/RS5878 nell'esone 5; RS2759328/RS677 nell'esone 6 in una paziente con deficit di tipo I, eventi tromboembolici venosi ed arteriosi. Questa paziente era altresì affetta da sindrome da anticorpi antifosfolipidi. Lo stesso tipo di polimorfismo è stato identificato in un paziente anch'egli affetto da deficit quantitativo con un fenotipo molto grave (evento idiopatico in età giovanile) l'ultimo polimorfismo (RS5877/RS5878 nell'esone 5; RS 2759328 nell'esone 6) è stato riscontrato in un paziente con deficit di tipo I, fratello di una paziente con deficit di tipo I ma portatrice di una mutazione missenso, entrambi i soggetti erano affetti dalla patologia ma con un genotipo differente. Il secondo caso era di un paziente con un quadro clinico grave ma il cui tipo di deficit non è stato possibile valutare in quanto uscito dallo studio.

In unico paziente nessuna mutazione genetica, nè polimorfismo è stato riscontrato, sebbene sia affetto da fenotipo moderato e da deficit di tipo quantitativo.

Le sequenze omologhe dell'antitrombina sono raccolte nella tabella C, mentre nella tabella D sono evidenziate le sequenze omologhe tra

antitrombina e altre serpine (ovalbumina, Alfa-1-antitripsina e beta-amiloide) nelle diverse specie animali.

Le mutazioni descritte sono riepilogate nella tabella E.

DISCUSSIONE

Abbiamo definito “severo” o “grave” il fenotipo clinic di pazienti con trombosi idiopatica, età giovanile del primo evento, recidiva; fenotipo moderato quando l’evento sia occorso in seguito all’esposizione a uno o più fattori di rischio, oppure in età avanzata, oppure in assenza di recidive.

Nel nostro campione i pazienti con deficit di tipo I presentavano mutazioni nonsense, delezioni come riportato dalla letteratura internazionale [9,25], ritenute dal punto di vista genetico mutazioni gravi.

Osservando questi pazienti in base non solo al tipo di mutazione genetica osservata ma tenendo anche conto della sede della mutazione è stato possibile in parte capire meglio questa notevole variabilità dei quadri clinici tra pazienti che abbiano lo stesso tipo di deficit e livelli sovrapponibili di antigene e attività antitrombinica.

Allo stato attuale i pazienti affetti da deficit di antitrombina sono considerati appartenenti alla stessa classe di rischio, l’unica distinzione viene fatta per i deficit di Tipo II HBS dai nostri dati clinici e dall’osservazione dei risultati dello studio genomico si evince una variabilità, ad esempio tra pazienti con un substrato genetico differente (mutazione di tipo diverso in siti diversi) anche nell’ambito dei deficit quantitativi presentano un differente profilo di rischio trombotico.

Negli ultimi 20 anni molte varianti antitrombiniche sono state descritte: AT Cambridge, AT Rouen, AT A Budapest etc. [19,21-23] normalmente non rilevabili con le normali metodiche di laboratorio, in particolare la AT Cambridge II è stata descritta da molti autori come la più diffusa causa di compromissione funzionale della serpina nella razza caucasica. Si tratta per lo più di sostituzioni di singoli aminoacidi, che determinano però delle alterazioni funzionali che possono determinare la polimerizzazione, possono compromettere la secrezione dal citoplasma, e oppure determinare la formazione di serpine "congelate" in uno stato latente [24], incapaci di andare incontro a quelle modificazioni conformazionali necessarie per l'effetto anticoagulante. Sebbene nessuno dei nostri pazienti presentava mutazioni genetiche corrispondenti a quelle varianti funzionali descritte precedentemente, in letteratura era stato possibile osservare che le nostre mutazioni erano avvenute in regioni della proteina altamente conservate e che molte di queste sequenze erano mediamente conservate anche nelle altre serpine (ovalbumina, alfa1-antitripsina, e beta-amiloide (vedi discussione) supportando la nostra ipotesi di studio, ossia che anche le mutazioni che non interessino il sito di legame con l'eparina o il sito reattivo, possano avere un ruolo patologico fondamentale [25,30].

Alla luce delle attuali conoscenze di genetica di proteomica non è più possibile considerare tutti i pazienti affetti da deficit di AT “uguali”, anche nel campo dell’emofilia studi degli ultimi anni, hanno evidenziato come nei pazienti affetti da emofilia grave esistano diversi fenotipi emorragici, e come tali fenotipi siano funzione della mutazione genetica sottostante, e/o di fattori genetici protettivi (ad esempio mutazioni genetiche trombofiliche etc). nell’ambito del deficit congenito di antitrombina si può ipotizzare che lo studio genetico possa orientare verso la diagnosi in pazienti che abbiano varianti qualitative dell’antitrombina, non rilevabili con i comuni mezzi di diagnostica biochimica ma che hanno un rischio trombotico molto elevato, oppure pazienti che risultano affetti da un deficit quantitativo di AT che abbiano una mutazione associata ad una migliore prognosi e per i quali sarebbe ipotizzabile una diversa durata della terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Tait RC., Walker ID, Perry DJ, Prevalence of antithrombin deficiency in healthy. *Br J Haematol* 1994; 87: 106-12.
2. Wells PS, Blajchman MA, Henderson P et al, Prevalence of antithrombin deficiency in healthy blood donors: a cross-sectional study. *Am J Haematol* 1994; 45:321-4.
3. Brouwer JLP, Lijfering WM, Kate MKt, Kluin-Nelemans HC, Veeger NJGM, van der Meer J. High long-term absolute risk of recurrent thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C, or antithrombin *Thromb Haemost* 2009; 101:93-99
4. Maclean PS., Campbell Tait R. Hereditary and acquired antithrombin deficiency. *Drug* 2007;67 (10):1429-1440
5. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, Fitches AC, Cooper DN, Millar DS, Jochmans K, Perry DJ, Okajima K, Thein SL, Emmerich J Antithrombin mutation database 2° (1997) Update. *Thromb Haemost* 1997;77:197-211
6. Patnaik MM, Moll S inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008;14,1229-1239
7. Belzar KJ et al, The effect of reducing-end extension on pentasaccharide binding by antithrombin *JBC* 2000;275:8733-41
8. Picard V., Novak_Gottl, Biron-Andreani, Fouassier M., frere C., Goualt_Heilman m., de Maistre E., Regina S., Rugeri L., Ternisien C., Trichet C., Vergnes C., Aiach M Alhenc-Gelas M. Molecular basis of antithrombin deficiency: Twenty-two novel mutation in the AT gene. *Human mutation* DOI: 10.1002. 2006
9. Ritches A., Lewandowsky K., Olds R. Creation of additional glycosylation site as a mechanism for type I antithrombin deficiency *Thromb Haemost* 2001; 86:1023-7

10. Corral J, Vicente V., Carrel R thrombosis as a conformational disease. *Haematologica* 2005;90:238-246
11. Langdown J, Belzark K, Savory WJ, Baglin TP, Huntington JA. The Critical Role of Hinge Region Expulsion in the Induced-fit Heparin Binding Mechanism of Antithrombin *J Mol Biol.* 2009 March 13; 386(5): 1278–1289.
12. Haverkate F. Levels of haemostatic factors, arteriosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2002;39:109–12.
13. Hogg PJ, Jackson CM. Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3619–23
14. Weitz JI. Activation of blood coagulation by plaque rupture: mechanisms and prevention. *Am J Cardiol* 1995;75:18B-22B
15. Rosenberg RD, Armand G, Lam L *Structure function relationships of heparin species Procl Nat Acad Sci USA* 1978;75:3065-9
16. 10. Kristensen SR, Kaehne M, Petersen NE. Hemizygous antithrombin-deficiency (Budapest III) in a newborn presenting with a thrombosis at birth. *BMJ* 2007;138,396-403
17. Picard v., Bauters A., Kahiri M., Ochat N., Jude B., Aiach M., Ahlenc-Gelas M Conformational sn187Asp/Lys antithrombin variants and thrombosis
18. Frantzen Handeland G, Abildgaard U, Aasen AO. Simplified assay for antithrombin III activity using chromogenic peptide substrate. *Scand J Haematol.* 1983; 31: 427 – 36.
19. Hernandez-Espinosa D., Ordonez A., Vicente V., Corral J. Factors with conformational effects on haemostatic serpins: implication in thrombosis. *Thromb Haemost* 2007;98:557-563
20. J. C. RAU,¹ L. M. BEAULIEU,¹ J. A. HUNTINGTON F. C. CHURCH Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis *J Thromb Haemost.* 2007 July ; 5(Suppl 1): 102–115.

21. Perry DJ., Daly M., Harper P.L., Tait R.C., Price J, Walker ID., Carrell RW.,
Antithrombin Cambridge II384 Ala to Ser. (1991) FEBS.285-90
22. Owen, Borg NY, Soria C, Soria J, Caen J, Carrel RW: Heparin binding defect in
a new antithrombin variant: Rouen 47 Arg to Hys. Blood 1987: vol69;5;5
23. Carrell RW., Huntington JA, Mushunje A, Zhou A. The Conformational Basis
of Thrombosis Thromb Haemost 2001; 86: 14–22
24. Beauchamp NJ, Pike R.N., Daly M., Butler L., Makris M., Dafforn T.R, Zhou
A., Fitton H.L.,
Preston F.E., Peake I.R., Carrell R.W. Antithrombins Wobble and Wobble
(T85M/K): Archetypal Conformational Diseases With In Vivo Latent-
Transition, Thrombosis, and Heparin Activation Blood 1998 92: 2696-2706
25. Bulato C, Tognin G, Spiezia L, Fadin M, Gavasso S, Simioni P. Identification of
a novel frameshift mutation causing a premature stop codon in a young
Nigerian man with type I antithrombin deficiency. Thromb Res. 2013 Feb
18.
26. Tufano A, Guida A, Coppola A, Nardo A, Di Capua M, Quintavalle G, Di
Minno MN, Cerbone AM, Di Minno G. Risk factors and recurrent thrombotic
episodes in patients with cerebral venous thrombosis. Blood Transfus. 2013
Feb 6:1-6.
27. Fischer R, Sachs UJ, Heidinger KS, Eisenburger D, Kemkes-Matthes B..
Prevalence of hereditary antithrombin mutations is higher than estimated
in patients with thrombotic events. Blood Coagul Fibrinolysis. 2013 Feb 21
28. Deng H, Chen J, Xie H, Gu Y, Yuan K, Wang P, Shen W, Liang W, Zhang H,
Zhang J, Xie J, Zhang L. Rare double heterozygous mutations in
antithrombin underlie hereditary thrombophilia in a Chinese family. J
Thromb Thrombolysis. 2012 Nov 2
29. Kumar R, Moharir M, Yau I, Williams S A novel mutation in the SerpinC1
gene presenting as unprovoked neonatal cerebral sinus venous thrombosis
in a kindred. Pediatr Blood Cancer. 2013 Jan;60(1):133-6.

30. Martínez-Martínez I, Johnson DJ, Yamasaki M, Navarro-Fernández J, Ordóñez A, Vicente V, Huntington JA, Corral J. Type II **antithrombin deficiency** caused by a large in-frame insertion: structural, functional and pathological relevance. *J Thromb Haemost.* 2012 Sep;10(9):1859-66.

I_D	MUTATION/Codon Aminoacid Change	EX	Type of mut	AT (mg/dl)	AT %	AGE (1st ep.)	TYPE
ATIII-2	c.243-263del p.80-86del	2	ID	15.8	55%	64	I
ATIII-5	c.235C>T p. Arg79Cys	2	MM	24.9	64	52	II
ATIII-7	c.243-263del p.80-86del	2	ID		49,3	-	I
ATIII-16	c.173del p.P58Rfs3X	2	FS	10.8	53	32	I
ATIII-26	c.173del p.P58Rfs3X	2	FS	10.8	41	43	I
ATIII-13	c.490C>T p.R164X	3	NM		36	36	I
ATIII-14	c.490C>T p.R164X	3	NM	17.3	57	17	I
ATIII-24	c.490C>T p.R164X	3	NM	16.7	48	44	I
ATIII-25	c.490C>T p.R164X	3	NM		66	35	I
ATIII-28	c.490C>T p.R164X	3	NM		60	55	I
ATIII-31	c.480C>T p.R161X	3	NM	NP	63	21	nd
ATIII-4	c.685C >T p. Arg229X	4	NM	15.4	52	6	I
ATIII-8	c.804-807del	5	FS	14.3	58	25	I
ATIII-20	c.1121A>G p.Asp374Gly	5	MM	19.7	65	43	I
ATIII-32	c.1102C>T p.Q 336>X	5	NM	11.7	60	21	I
ATIII-6	c.1154-1218del p.I386Kfs1X	6	FS	11	55	18	I
ATIII-15	c.1132C>T p.R391X	6	NM	13.7	57	19	I
ATIII-23	c.1218+1 G>A	6	SS	NP	44	16	nd
ATIII-3	c.1332-1333del p.I444Mfs19X	7	FS	28	49	21	II
ATIII-9	c.1394A>C p. X465Ser	7	MM	17.7	50	29	I
ATIII-12	c.1273C>T p.Arg425Cys	7	MM	25.5	68	-	II
ATIII-30	c.1390-1393del	7	FS	12	58	-	I
ATIII-11	-		-	10	65	29	I
ATIII-17	RS5877/5878 RS2759328/RS677	5,6	POL	18.3	63	26	I
ATIII-21	RS5877/5878 ;RS2759328	5,6	POL	11	45	23	I
ATIII-22	RS5877/5878; RS2759328	5,6	POL	NP	63	19	nd
ATIII-29	RS5877/5878 ;RS2759328/RS677	5,6	POL	13.4	50	55	I

Tabella E. I_D codice identificativo, ID inframe deletion, MM missense mutation, NM nonsense mutation, FS frameshift deletion SS splice site, POL polymorphism, EX esone, AT antitrombina.

Tabella A.

Fenotipo	ID	età (1° evento)	1° Evento	FR	Commenti/Recidive	Trombofilia
Lieve	AT-2	64	TVP Poplitea	Trauma	Non recidivata.	-
Grave	AT-3	21	TVP A I+TEP	Trauma lieve	Non recidivata.	-
Grave	AT-4	6	TVP A .I Bilaterale +TEP	Polmonite	TVP AI a 9 anni, in corso di TAO non in range terapeutico	-
Lieve	AT-5	52	TVP Poplitea	Trauma fumo	Non recidivata.	-
Grave	AT-6	18	TVP A I	Polmonite	Due recidive:TVP AI a 28anni e TVS AI a30 anni	PRTH +/-
Grave	AT-8	25	TVP A I+EP	Idiopatica	Non recidivata.	↑Hcys
Grave	AT-9	29	TEP	Estrogeni	Non recidivata.	-
Grave	AT-11	29	TEP	Chirurgia	Non recidivata.	-
Grave	AT-13	36	TVP A I	Idiopatica	TVS AI a 50 anni	-
Grave	AT-14	17	TVP A I	Idiopatica	Due recidive:TVS AI a 24 e a 27 anni, in corso di TAO non in range terapeutico, S.post trombotica	-
Grave	AT-15	19	TVP AI	Idiopatica	TVS AI a 25 anni,sindrome post trombotica	↑Hcys
Grave	AT-21	23	TVP A I+TEP	Trauma	Non recidivata.	-
Grave	AT-23	16	TVP splancnica	Linfoma	Non recidivata.	-
Grave	AT-24	44	TVP AI	idiopathica	Non recidivata. Sindrome post trombotic a	-
Grave	AT-25	35	TVP A I+TEP	idiopathica	Non recidivata.	↑Hcys
Moderato	AT-28	55	TVS AI	idiopathica	Non recidivata.	-
Grave	AT-29	19	TEP	idiopathica	Non recidivata.	-
Grave	AT-31	21	TVP Cavale	Post partum	TVP AI Post partum a 26 anni	-
Grave	AT-32	21	TEP	Polmonite	Non recidivata.	-

TABELLA A. TVP:trombosi venosa profonda; TVS: tromboflebite; TEP:Tromboembolia polmonare; AI arti inferiori TAO terapia anticoagulante orale; PRTH protrombina g20210a; FVL: Fattore V Leiden Hcys: omocisteina.

Tabella B.

Fenotipo	ID	Età (1° evento)	1° evento	RF	Commenti/recidive	Trombofilia
Grave	AT-16	32	TVP AI	Pregnancy	Ictus a 37 anni in gravidanza	-
Grave	AT-26	43	TVP AI	-	Ictus a 44 anni, ipert art, fumo, ↑ colesterolo, IMA a 57anni, in TAO	.
Grave	AT-17	26	TEP	EP	TVP AI a 27anni; trombo Intracardiaco a 33 anni	S.APA
Lieve	AT-22	55	IMA+ TVP AI	PCI	Non recidiva	-
grave	AT-20	43	ICTUS	Ipert.art	Non recidiva	FVL +/-

Tabella B. TVP:trombosi venosa profonda; TEP:Tromboembolia polmonare;EP: estro progestinici, AI arti inferiori TAO terapia anticoagulante orale; ipert. Art. ipertensione arteriosa; FVL: Fattore V Leiden; S.APA:s. da antifosfolipidi.