



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI  
INDIRIZZO: FISIOPATOLOGIA CLINICA E SCIENZE NEFROLOGICHE  
CICLO XXVI

## **Forme congenite di malattia di von Willebrand senza mutazioni nel gene del fattore von Willebrand: alla ricerca di un nuovo gene e di nuovi meccanismi patogenetici**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Aldo Baritussio

**Supervisore:** Dott.ssa Sandra Casonato

**Dottorando :** Giovanni Barbon



# Indice

<b>Riassunto</b>	- 1 -
<b>Summary</b>	- 3 -
<b>1. Introduzione</b>	- 5 -
1.1. Il fattore von Willebrand	- 6 -
1.2. La malattia di von Willebrand	- 9 -
1.3. La metalloproteasi ADAMTS13	- 12 -
1.4. Test coagulativi per la diagnosi di VWD	- 13 -
1.5. Diagnosi genetica di VWD	- 14 -
<b>2. Obiettivi dello Studio</b>	- 16 -
<b>3. Materiali e metodi</b>	- 17 -
3.1. Test emostatici	- 17 -
3.2. Analisi di <i>linkage</i>	- 17 -
3.3. Analisi del mRNA di VWF, F8 e PDIA3	- 18 -
3.4. Espressione di mutazione in sistema cellulare	- 20 -
3.5. Identificazione di una grande delezione sul DNA genomico	- 21 -
3.6. Sintesi di frammenti di VWF ricombinante e analisi attività proteolitica di ADAMTS13	- 24 -
3.7. Sequenziamento del genoma	- 25 -
3.8. Analisi di <i>linkage genome-wide</i>	- 25 -
3.9. Analisi del gene ADAMTS13	- 26 -
3.10. Ricerca di autoanticorpi anti-VWF	- 26 -
<b>4. Risultati</b>	- 27 -
4.1. Famiglia A: il ruolo dei polimorfismi silenti	- 27 -
4.2. Famiglia B: presenza di una larga delezione	- 30 -
4.3. Famiglia C: fenotipo 2N-like	- 37 -
4.4. Famiglia D: fenotipo Vicenza-like	- 41 -
<b>5. Discussione</b>	- 44 -
<b>6. Bibliografia</b>	- 56 -



## Riassunto

Il fattore von Willebrand (VWF) è una glicoproteina multimerica che svolge una funzione fondamentale nelle prime fasi dell'emostasi. Alterazioni quantitative o funzionali della molecola causano la malattia di von Willebrand (VWD), la più frequente malattia emorragica ereditaria. L'unico gene a tutt'oggi riconosciuto come responsabile della VWD è il gene del VWF. Tuttavia in una percentuale rilevante di casi di VWD (25-30%) non sono identificate mutazioni a carico del gene VWF. In questo lavoro di Dottorato è stata elaborata una *flow-chart* diagnostica per lo studio sistematico di famiglie con VWD che non presentano mutazioni nel gene VWF. Il punto focale della *flow-chart* è l'utilizzo dell'analisi di *linkage* con marcatori VNTR (*variable number tandem repeat*) interni al gene del VWF, per valutare il coinvolgimento del gene stesso: se aplotipo di VNTR e malattia co-segregano l'indagine del gene VWF deve essere approfondita con l'analisi del mRNA o con la Real-Time PCR, in caso contrario viene proposta un'indagine estesa a tutto il genoma per la ricerca di un nuovo gene causativo. Nella prima famiglia studiata (Famiglia A), i marker VNTR segregavano con la malattia e l'analisi del mRNA del VWF ha permesso di evidenziare uno *splicing* aberrante causato da una sostituzione sinonimo (c.7056C>T), già erroneamente classificata come polimorfismo. L'espressione in vitro del VWF mutato, condotta in linea cellulare BHK, ha permesso di dimostrare che la mutazione agisce con un tipico meccanismo di *loss-of-function*. L'analisi del mRNA si è rivelata utile anche per identificare la mutazione responsabile della VWD nella seconda famiglia (Famiglia B): una delezione genomica di 3411 paia di basi che coinvolge tre esoni del gene VWF (c.5456\_5842del). In questo caso, l'espressione transiente in sistema cellulare HEK293T ha evidenziato un effetto dominante-negativo della mutazione nel rilascio del VWF. Lo studio funzionale è stato invece condotto attraverso l'espressione, in batteri E.coli, di frammenti ricombinanti di VWF mutato e normale (A2-B3). Questi frammenti sono stati sottoposti *in vitro* all'azione di ADAMTS13, una metalloproteasi che ha come unico substrato il VWF di cui regola la struttura multimerica. Questi esperimenti hanno dimostrato che la mutazione c.5456\_5842del rende il VWF resistente all'azione proteolitica di ADAMTS13, offrendo così una spiegazione alla presenza di multimeri a peso molecolare abnormemente elevato in pazienti portatori di questa mutazione. Nella terza famiglia (Famiglia C) l'analisi di *linkage* ha escluso il coinvolgimento del gene VWF nell'insorgenza della VWD. Successivamente mediante sequenziamento diretto, è stato escluso anche un possibile ruolo per il gene del FVIII ed è stata quindi effettuata la ricerca di un nuovo gene causativo di VWD, utilizzando simultaneamente due diversi approcci: il sequenziamento dell'intero genoma e l'analisi di *linkage* familiare

*genome-wide*. I dati derivati dalle due strategie sono stati integrati e il risultato ci ha permesso di identificare ~900 variazioni a carico di 396 geni distribuiti su 4 diverse regioni di *linkage* (cromosoma 5, 7, 15, X). Il contributo dei geni “candidati” presenti nelle regioni di *linkage* è stato valutato in maniera approfondita ma fino a questo momento non è stato possibile identificare quello responsabile della patologia emorragica. Il completamento dell’analisi di questa famiglia richiede una nuova fase di sequenziamento. La quarta e ultima famiglia (Famiglia D), le cui ridotte dimensioni non hanno consentito di eseguire l’analisi di *linkage*, è caratterizzata da una riduzione della sopravvivenza del VWF circolante. L’evidenza che anche il VWF esogeno (da emoderivato) presentava una ridotta sopravvivenza, ha escluso il coinvolgimento del gene VWF. Il sequenziamento genico ha permesso anche di escludere il coinvolgimento dell’ADAMTS13, così come la ricerca di anticorpi anti-VWF, in un quadro di malattia autoimmune, ha dato esito negativo. In conclusione, l’utilizzo della *flow-chart* proposta ha permesso di caratterizzare due nuove mutazioni sul gene VWF, responsabili per le forme di VWD delle Famiglie A e B. È opportuno sottolineare che entrambe le mutazioni descritte non potevano essere rilevate con il sequenziamento *standard* per limiti intrinseci della tecnica, mentre il sequenziamento del mRNA suggerito dalla *flow-chart* ha permesso la caratterizzazione di due casi irrisolti di VWD. Nelle famiglie C e D lo studio effettuato ha invece escluso definitivamente il coinvolgimento del gene VWF, confermando l’esistenza di altri fattori/geni responsabili di VWD.

## Summary

The von Willebrand factor (VWF) is a multimeric glycoprotein that plays a key role in the early stages of hemostasis. Quantitative or functional defects of the molecule cause von Willebrand disease (VWD), the most common inherited bleeding disorder. Currently, VWF is the only gene involved in the VWD onset. However, VWF mutations are not identified in a substantial proportion of VWD cases (25-30%) by using the standard sequencing techniques. In this PhD work we elaborated a diagnostic flow-chart for the systematic study of families with no identified VWF gene mutations. The flow-chart core is the accomplishment of a linkage analysis with VNTR (*variable number tandem repeat*) markers within the VWF gene to assess the involvement of the gene itself: if the VNTR haplotype and the disease co-segregate, the investigation of VWF gene must be carried out with the analysis of mRNA or Real-Time PCR; otherwise, the VWF gene involvement is excluded and a whole-genome investigation will be performed to discover a new causative gene. In A Family, VNTR markers co-segregated with the disease and VWF mRNA analysis highlighted an aberrant splicing caused by a synonymous substitution (c.7056C>T). This substitution, which has been described previously, was incorrectly classified as a polymorphism. On the basis of expression experiments performed in BHK cell line, it was also possible to point out the typical *loss-of-function* mechanism of the mutation. The mRNA analysis allowed to identify the mutation responsible for VWD in B Family: a genomic deletion of 3411 base pairs involving three exons of the VWF gene (c.5456\_5842del). In this case, the transient expression in HEK293T cell line showed the mutation has a dominant-negative effect. Furthermore, recombinant fragments of VWF comprising A2-B3 domains were synthesized in E.coli to better characterize the effect of the deletion. These fragments were subjected to *in vitro* proteolysis with recombinant ADAMTS13, in order to verify the susceptibility of mutated VWF to the metalloprotease. These experiments showed that the mutation identified makes VWF resistant to the proteolytic action of ADAMTS13, thus explaining the presence of abnormally large multimers observed in the patient's plasma. In the C Family, linkage analysis excluded the involvement of VWF gene in the VWD onset. Then, the FVIII gene was also ruled out by direct sequencing, so the search for a new causative gene was carried out. We used two different strategies simultaneously: the whole-genome sequencing and the genome-wide linkage analysis. Data derived from the two strategies were integrated and the results allowed us to identify ~900 variations in 396 genes that were spread across 4 different linkage regions (chromosome 5, 7, 15, X). The involvement of the "candidate" genes in the linkage regions was assessed in detail, but it has not been possible to

identify the one responsible for the disease so far. To complete the analysis of this Family C a new sequencing step is required. The D Family, whose small size made impossible to perform the linkage analysis, is characterized by a reduction of circulating VWF survival. The evidence that the exogenous hemoderivative VWF had the same behavior ruled out the involvement of the VWF gene. The intervention of the metalloprotease ADAMTS13 was excluded by direct sequencing, while the search for anti-VWF antibody, in a context of autoimmune disease, was negative. In conclusion, the use of the proposed flow-chart allowed the characterization of two new mutations in the VWF gene, responsible for VWD in Families A and B. It should be emphasized that both mutations described can't be detected with standard sequencing techniques, due to inherent limitations, while the mRNA sequencing suggested in the flow-chart allowed the characterization of two unresolved cases of VWD. In families C and D, the study has definitively excluded the involvement of the VWF gene, confirming the existence of other factors/genes that may cause the VWD .



# 1. Introduzione

Con il termine emostasi si intende l'insieme dei processi fisiologici attivati in risposta al danneggiamento del vaso sanguigno che permettono di arrestare l'emorragia e di ripristinare la continuità dell'endotelio vasale. In condizioni normali il sangue viene mantenuto fluido fintanto che rimane all'interno dei vasi sanguigni ed in questo stato può circolare liberamente e giungere ad ogni distretto dell'organismo, trasportando gas, sostanze nutritive e scarti cellulari. Tuttavia, qualora il vaso venga danneggiato a seguito di un trauma, si assiste in risposta ad una serie di eventi fisiologici concatenati che convergono nella formazione del tappo emostatico, cioè di una struttura organica e transitoria la cui funzione principale è quella di occludere la lesione del vaso nel più breve tempo possibile, interrompendo così l'emorragia. La formazione del tappo emostatico è di norma un evento rapido, ma l'intero processo è piuttosto complesso e richiede l'intervento di diversi elementi: la matrice extracellulare (in particolare il collagene), la componente cellulare (cellule endoteliali, piastrine) e numerose proteine plasmatiche. Vengono comunemente distinte due fasi: nella prima, che è detta emostasi primaria ed è immediatamente successiva al trauma, il collagene della matrice subendoteliale rimane esposto al contatto diretto con il sangue e interagisce ad alta affinità con una proteina multimerica del plasma ad alto peso molecolare, il fattore von Willebrand (VWF). Il VWF interagisce a sua volta con specifici recettori di membrana delle piastrine e questa interazione comporta l'adesione e l'aggregazione delle piastrine circolanti, che vanno a occupare la sede di lesione del vaso. L'aggregato piastrinico, tuttavia, viene stabilizzato solo durante la fase successiva, detta emostasi secondaria. La serie di eventi molecolari che avvengono in questa fase viene comunemente definita "reazione a cascata della coagulazione", e implica il contributo di diversi fattori proteici plasmatici che si attivano in maniera consequenziale, amplificando esponenzialmente la magnitudine del processo che si concretizza nella trasformazione del fibrinogeno circolante in fibrina. La fibrina, polimerizzando in una fitta rete, avvolge e consolida l'aggregato piastrinico e lo trasforma in trombo. L'efficienza e la rapidità del processo emostatico sono garantite dalle numerose proteine plasmatiche: da un lato il VWF circolante interagisce istantaneamente con il collagene quando la matrice subendoteliale rimane scoperta; dall'altro l'attivazione a cascata dei fattori della coagulazione amplifica la risposta al trauma riducendo i tempi di stabilizzazione dell'aggregato piastrinico. Tuttavia, se l'insieme di tutti gli stimoli pro-coagulanti sopracitati non fosse in qualche modo controbilanciato, si assisterebbe ad un aumento rapido e incontrollato del volume del coagulo e di conseguenza alla formazione di un trombo occludente il vaso. Invece, sono gli stessi fattori della cascata coagulativa che, attivando una serie di meccanismi inibitori,

limitano l'estensione del coagulo, dimostrando che l'intero processo emostatico ha la capacità di autoregolarsi. Una volta che l'emorragia è stata bloccata e il normale flusso di sangue all'interno del vaso è ristabilito, l'organismo ha a disposizione tempo sufficiente per procedere alle successive fasi di guarigione e alla rigenerazione del vaso: lentamente, il tappo emostatico viene disgregato e riassorbito, lasciando il posto a tessuto endoteliale di nuova formazione, integro e simile in ogni aspetto a quello presente prima del trauma.

Le proteine coinvolte nelle varie fasi dell'emostasi sono numerose e per ognuna di esse è stato definito un *range* di norma dei livelli circolanti. Quando i livelli di uno o più fattori si discostano dal *range* di norma, può innescarsi un processo patologico: in generale, anomalie dei livelli circolanti o alterazioni funzionali dei fattori pro-coagulanti sono alla base di disturbi di tipo emorragico, di contro i difetti dei fattori che inibiscono la cascata coagulativa predispongono a eventi trombotici. I fattori che possono influire sulla concentrazione plasmatica delle proteine dell'emostasi sono molteplici: dieta, stati infiammatori, infezioni, condizioni patologiche (ad esempio epatopatie o tumori), farmaci, ormoni... Questi fattori di norma alterano in maniera transitoria il sistema coagulativo e i valori rientrano nel *range* di normalità automaticamente una volta che si è intervenuti per eradicare la causa. Su altri fattori, invece, non è possibile intervenire. L'età e il sesso, in particolare, sono condizioni che incidono sensibilmente sull'emostasi e infatti si osserva una maggiore incidenza di eventi trombotici in età avanzata e più frequentemente nell'uomo che nella donna. Infine, la componente genetica ha un'enorme rilevanza nel determinare stati pro-trombotici o pro-emorragici: molto spesso la causa primitiva di un difetto emostatico è da ricercarsi proprio nei geni che codificano per le proteine del sistema emocoagulativo.

### **1.1. Il fattore von Willebrand**

Il VWF è una glicoproteina multimerica plasmatica ad alto peso molecolare che viene sintetizzata esclusivamente da due tipi cellulari: le cellule endoteliali e i megacariociti. Il VWF circolante svolge due funzioni, distinte e ben definite (Sadler J. E., 1998):

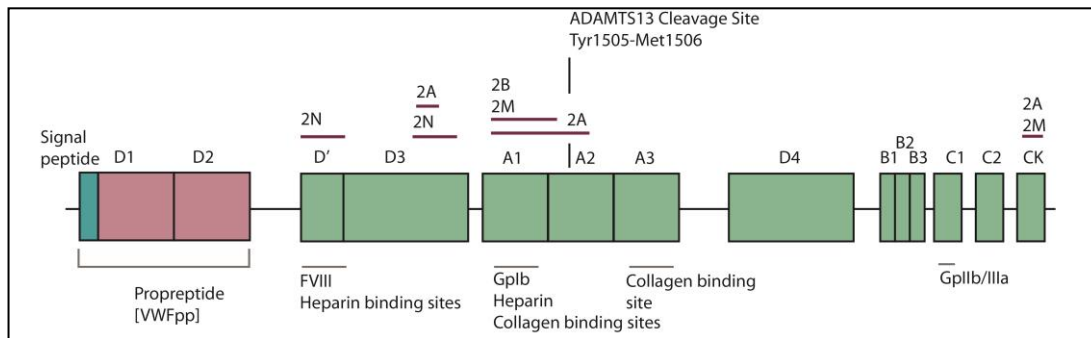
- a) *promuove l'adesione e l'aggregazione piastrinica nel sito di lesione vascolare*, interagendo con il collagene scoperto della matrice extracellulare e con i recettori espressi sulla membrana delle piastrine, che vengono sottratte dal circolo ematico a formare l'aggregato piastrinico;
- b) *lega e funge da carrier per il FVIII*, proteggendolo dall'inattivazione da parte della Proteina C attivata e dalle altre proteasi plasmatiche.

Quindi risulta avere un ruolo cruciale in entrambe le fasi dell'emostasi. Il VWF maturo è presente nel sangue nella caratteristica forma di multimeri: un multimeri è un omopolimero lineare e non ramificato di subunità di VWF, legate covalentemente mediante ponti disolfuro che si instaurano tra i domini C- ed N- terminali del monomero. Il multimeri ha dimensioni eterogenee, con un peso molecolare compreso tra 0,5-20 MDa, proporzionale al numero di subunità che compongono il multimeri stesso. Al microscopio elettronico, il VWF appare come un sottile filamento spiralizzato, mentre appare disteso quando sottoposto a forze di *shear* importanti. Ogni singola subunità è sintetizzata come un precursore di 2813 aminoacidi, detto pre-pro-VWF, che si suddivide in tre parti: un peptide segnale di 22 aminoacidi in posizione N-terminale (pre-) che indirizza la proteina al Reticolo Endoplasmatico (RE), un propeptide di 741 aminoacidi (pro-) necessario al processo di multimerizzazione e il VWF monomero vero e proprio, composto da 2050 aminoacidi, con un peso di circa 250 kDa (Wagner D. D. *et al.*, 1983; Lynch D. C. *et al.*, 1990). Il gene VWF che codifica per l'omonima proteina è situato sul braccio corto del cromosoma 12, in posizione telomerica. È composto da 52 esoni, distribuiti su un'estensione di circa 178 kilobasi (Mancuso D. J. *et al.*, 1991). Sul cromosoma 22, in posizione centromerica, è stata descritta la presenza di uno pseudogene parziale e non trascritto del VWF, in cui si ripresenta la sequenza genomica compresa tra l'esone 23 e il 34, con un'omologia che sfiora il 97% (Bernardi F. *et al.*, 1990; Marchetti G. *et al.*, 1991). Il gene VWF attivo viene trascritto in un RNA messaggero maturo della lunghezza di circa 8,8 kilobasi, che codifica per il pre-pro-VWF. La proteina contiene, non a caso, una percentuale notevole di residui cisteinici, circa il 8,3% (234 cisteine / 2813 residui), che hanno un ruolo cruciale nei processi di dimerizzazione e multimerizzazione. La maturazione del VWF è piuttosto complessa: inizialmente, all'interno del RE delle cellule endoteliali, il pre-pro-VWF va incontro ad una prima N-glicosilazione e, previa proteolisi dei 22 aminoacidi del peptide segnale, alla dimerizzazione mediante ponti disolfuro intercatena tra le cisteine delle estremità C-terminale di due molecole di pro-VWF. La dimerizzazione è il primo *check-point* della maturazione del VWF: solo il VWF dimerizzato può lasciare il RE e giungere all'Apparato di Golgi. Nel Golgi, i dimeri vengono solfatati e O-glicosilati. Successivamente, a livello del Trans-Golgi, l'ambiente particolarmente acido delle cisterne favorisce il processo di multimerizzazione, in cui si formano nuovi legami disolfuro intercatena, questa volta tra le estremità N-terminali dei dimeri. Quindi, il propeptide, necessario nel processo di multimerizzazione per l'appaiamento tra dimeri, viene proteolizzato dall'enzima Furina (Wise R. J. *et al.*, 1988; Misumi Y. *et al.*, 1991; Haberichter S. L. *et al.*, 2000). La resezione del propeptide rappresenta il secondo *check-point* della maturazione del VWF. Lasciato il Golgi, il VWF può seguire due differenti destini: il 90% del

VWF viene secreto in maniera costitutiva nel circolo ematico, garantendo una concentrazione di VWF circolante media di circa 10 µg/mL, mentre il restante 10% viene condensato e immagazzinato nei corpi di Weibel-Palade (Vischer U. M. and Wagner D. D., 1994), vescicole dotate di membrana che rilasciano il loro contenuto in modo regolato per effetto di sostanze secretagoghe (trombina, fibrina, vasopressina...) (Spom L. A. *et al.*, 1986). In particolare, questa seconda via di secrezione permette di aumentare la concentrazione locale di VWF in risposta a stimoli di natura traumatica. Nelle piastrine, i depositi di VWF sono costituiti dagli  $\alpha$ -granuli che, oltre al VWF, contengono anche fibrinogeno, fattore V, fibronectina, fattore piastrinico IV e fattori di crescita. Il contenuto degli  $\alpha$ -granuli viene rilasciato in seguito ad attivazione piastrinica. Le forme multimeriche di VWF ad altissimo peso molecolare interagiscono con la proteasi plasmatica ADAMTS13, che regola le dimensioni del multimerico operando un taglio proteolitico del VWF. Con l'intervento di ADAMTS13, il processo di maturazione è concluso e i multimeri di VWF circolanti possiedono una capacità emostatica proporzionale al grado di multimerizzazione della molecola.

Le peculiari capacità di dimerizzare, multimerizzare e legare numerose macromolecole, fanno del VWF una delle più grandi e strutturalmente complesse tra le proteine descritte e, in assoluto, il fattore plasmatico circolante più voluminoso. Le capacità sopracitate fanno capo a specifici domini proteici disposti all'interno del pro-VWF. La struttura del monomero è la seguente: D1 - D2 - D' - D3 - A1 - A2 - A3 - D4 - B1 - B2 - B3 - C1 - C2 - CK. L'intera proteina risulta essere composta per la maggior parte da domini ripetuti di 4 diversi tipi denominati A, B, C e D (Fig. 1). Il dominio CK (*Cystine Knot*, in posizione C-terminale) interagisce con il dominio CK di un monomero adiacente mediante ponti disolfuro ed è essenziale per la dimerizzazione. I domini D, all'estremità N-terminale, sono invece implicati nel processo di multimerizzazione. In particolare, i domini D1 e D2 formano il propeptide, che svolge una funzione cruciale nell'appaiamento tra le estremità N-terminali di due diversi dimeri prima di venire clivato dall'enzima Furina. I domini A1 e A3 sono adibiti al legame con il collagene della matrice extracellulare. Normalmente, questi domini rimangono mascherati all'interno della molecola e vengono esposti solo quando un danno vasale disturba il flusso laminare del sangue. Il dominio A1 è anche adibito all'interazione con le piastrine, assieme al dominio C1. I due domini legano due distinte glicoproteine della membrana piastrinica, rispettivamente denominate GP Ib e GP IIb/IIIa. Il dominio A2 ospita il sito di taglio per la proteasi ADAMTS13. Infine il dominio D' interagisce in maniera reversibile con il FVIII circolante sintetizzato e rilasciato dal fegato, che

sfugge così all'azione delle proteasi plasmatiche (Plow E. F. *et al.*, 1984; Dejana E. *et al.*, 1989; Zaverio M. *et al.*, 1992).



**Figura 1.** Suddivisione in domini del pre-pro-VWF.

Affinché il VWF maturo mantenga una funzionalità corretta, i singoli domini proteici devono risultare inalterati. Mutazioni a carico di singoli domini possono comportare una carenza e/o una funzionalità alterata del VWF, causando l'insorgenza della Malattia di von Willebrand (VWD).

## 1.2. La malattia di von Willebrand

Le alterazioni quantitative e/o funzionali del VWF sono associate alla malattia di von Willebrand (VWD), il più comune tra i difetti ereditari di tipo emorragico, con una prevalenza che si attesta attorno all'1% (Sadler J. E., 2005). La malattia denota un'espressione fenotipica piuttosto variabile, ma i sintomi più comuni sono: epistassi, ematomi a seguito di traumi di entità lieve, tempi di sanguinamento prolungati e metrorragia. Alla severa deficienza del VWF circolante o allo specifico difetto dell'interazione tra VWF e FVIII, può corrispondere anche una riduzione del FVIII circolante. Di conseguenza, oltre alle manifestazioni cliniche appena descritte, si aggiungono anche sintomi tipici dell'Emofilia A: in particolare, se la riduzione FVIII causata dalla VWD è drammatica, si possono verificare sanguinamento articolare o muscolare, emorragie gastro-intestinali, emorragie dei tessuti molli, emorragie intracraniche con esito potenzialmente fatale (Ruggeri Z. M., Zimmerman T.S., 1987; Ruggeri Z. M., 1994). In questo caso, la VWD si distingue dall'Emofilia A poiché si manifesta indipendentemente dal sesso degli individui affetti. Le forme di VWD vengono comunemente classificate in tre gruppi: a) VWD di tipo 1, determinata da un riduzione lieve-moderata della quantità di VWF circolante; b) VWD di tipo 2, determinata da difetti funzionali della molecola; c) VWD di tipo 3, in cui il VWF è totalmente assente.

*VWD di tipo 1:* è la forma di VWD più comune e rappresenta circa il 75% dei casi di VWD conclamata (Mazurier C. *et al.*, 1998). La malattia è caratterizzata da un parziale difetto

quantitativo di VWF circolante che si riflette in una riduzione proporzionale di tutti i parametri funzionali della molecola. La riduzione può essere più o meno accentuata ma, sebbene l'intensità degli oligomeri sia diminuita, il *pattern* multimerico è sostanzialmente conservato e dimostra la presenza di tutti i multimeri attesi. Normalmente si evidenzia un tipo di trasmissione autosomica dominante, ma sono stati descritti anche rari casi ad ereditarietà recessiva. Oltre ad essere la forma più comune, è anche la forma che è più difficile diagnosticare, dal momento che l'alterazione dei livelli di VWF può essere dovuta a cause genetiche, a cause acquisite o a effetti sinergici di entrambi i fattori.

*VWD di tipo 2*: i difetti di tipo funzionale rappresentano circa il 20% dei casi di VWD e sono quasi sempre causati da mutazioni del gene VWF. Al difetto funzionale può essere talvolta associata anche una riduzione quantitativa. Il tipo 2 è suddiviso in quattro sottotipi, in base alla funzione che viene danneggiata:

- *Tipo 2A*: è il più frequente tra i difetti di tipo funzionale ed è caratterizzato dall'assenza di multimeri ad alto peso molecolare, che sono quelli emostaticamente più attivi (Zanardelli S. *et al.*, 2005). Ha una trasmissione di tipo dominante e si suddivide in due varianti: la variante I (2A-I) dovuta a mutazioni che alterano la multimerizzazione o la secrezione del VWF, determinando l'assenza degli alti pesi molecolari sia nel plasma che nelle piastrine; nella variante II (2A-II) l'assenza degli alti pesi molecolari è invece causata da mutazioni a livello del dominio A2 che aumentano la suscettibilità del VWF alla proteasi ADAMTS13: in questo caso i multimeri intracellulari, che non hanno ancora interagito con ADAMTS13, risultano normali (Tsai H. M., 2004).
- *Tipo 2B*: in questo caso il VWF ha un'augmentata affinità per la proteina GPIb piastrinica (Moll S. *et al.*, 1998), quindi il VWF viene sequestrato dalle piastrine e rimosso dal circolo. A causare questa forma sono mutazioni puntiformi del dominio A1 che normalmente interagisce con GPIb. Spesso il tipo 2B è associato ad una trombocitopenia secondaria, dal momento che il VWF tende a formare aggregati piastrinici. Anche in questo caso l'ereditarietà è di tipo dominante.
- *Tipo 2M*: l'affinità per la GPIb piastrinica nel tipo 2M è diminuita nonostante il *pattern* multimerico del VWF sia normale, di conseguenza adesione e aggregazione piastrinica risultano alterate. Il tipo di trasmissione ereditaria è dominante e le mutazioni coinvolgono il dominio A1.
- *Tipo 2N*: il VWF non è in grado di legare efficacemente il FVIII a causa di mutazioni a livello del dominio D', quindi il FVIII va incontro a inattivazione ad opera delle proteasi plasmatiche (Nishino M. *et al.*, 1989; Mazurier C. *et al.*, 1990; Casonato A. *et al.*, 1998).

I pazienti 2N mostrano una fase piastrinica (emostasi primaria) normale ma hanno livelli di FVIII molto bassi, paragonabili a quelli rinvenuti nell'Emofilia A grave/moderata. Il FVIII è un cofattore necessario della reazione a cascata della coagulazione, dunque la sua assenza pregiudica l'emostasi secondaria. Il difetto viene ereditato come carattere recessivo.

*VWD di tipo 3*: è la forma di VWD più grave ma, fortunatamente, anche la più rara (5% dei casi). Il VWF è assente, sia in circolo che all'interno delle piastrine. La sintomatologia di questa forma è particolarmente grave perché anche i livelli di FVIII circolanti sono drasticamente ridotti, dunque risultano pesantemente compromesse entrambe le fasi dell'emostasi. La VWD di tipo 3 mostra un'ereditarietà recessiva, infatti di solito gli affetti sono quasi sempre omozigoti o eterozigoti composti per mutazioni *null*, cioè mutazioni che introducono nel gene VWF un codone di stop prematuro.

La diagnosi differenziale della VWD risulta importante nel momento in cui è necessario impostare una terapia: le differenti forme di VWD devono essere riconosciute e conseguentemente trattate in maniera idonea per correggere efficacemente il difetto. In generale le forma di VWD con fenotipo lieve/moderato possono richiedere terapie a base di farmaci antifibrinolitici, che quindi facilitano la stabilizzazione del coagulo. Per il trattamento della VWD di tipo 1 e di tipo 2A viene comunemente usata anche la Desmopressina (DDAVP), un omologo sintetico delle Vasopressina in grado di stimolare il rilascio di VWF contenuto all'interno dei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali. Il trattamento con Desmopressina aumenta transitoriamente i livelli di VWF circolanti, quindi risulta particolarmente utile nel caso di traumi, o procedure chirurgiche minori. L'efficacia della Desmopressina è inferiore nel caso della VWD di tipo 2M e 2N, mentre non sortisce alcun effetto nel tipo 3, dal momento che il VWF non viene nemmeno sintetizzato dalle cellule endoteliali. La VWD tipo 2B rappresenta un caso particolare, dal momento che la somministrazione di Desmopressina migliora l'emostasi primaria ma contemporaneamente può aggravare il quadro trombocitopenico in maniera transitoria, quindi la situazione deve essere attentamente monitorata. Nei casi più gravi di VWD, come nel tipo 3, è invece necessario ricorrere ad infusioni periodiche di VWF emoderivato (Humate P<sup>®</sup>, Wilfactin<sup>®</sup>, Alphanate<sup>®</sup>...) o a trasfusioni che permettono di ristabilire livelli accettabili di VWF circolante e, di conseguenza, anche i livelli di FVIII. Non di rado assieme al VWF può essere somministrato anche FVIII concentrato. Il VWF emoderivato può essere utilizzato anche nelle forme di VWD più lievi nel caso siano programmati interventi chirurgici maggiori.

### 1.3. La metalloproteasi ADAMTS13

ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) è una metalloproteasi plasmatica capace di legare il multimerico di VWF circolante e di catalizzare il taglio enzimatico in posizione Tyr1605-Met1606 nel dominio A2 del VWF. Il gene ADAMTS13 si trova sul braccio lungo del cromosoma 9 in posizione telomerica. Composto da 29 esoni, il gene si estende per circa 38 kilobasi e codifica per una proteina di 1427 amminoacidi (Levy G. G. *et al.*, 2001). La sintesi di ADAMTS13 avviene principalmente nel fegato e nelle cellule endoteliali vascolari, anche in questo caso sono presenti un peptide segnale di 33 amminoacidi e un corto propeptide di 41 amminoacidi che vengono clivati durante il processo di maturazione della proteina (Majerus E. M. *et al.*, 2003). La proteina matura, di 1353 amminoacidi, viene secreta nel circolo ematico in forma costitutivamente attiva e la sua funzione è quella di regolare le dimensioni dei multimeri di VWF circolanti. I multimeri di VWF al momento della secrezione hanno un peso molecolare ben superiore ai 20 MDa, valore che delimita superiormente il *range* di norma: in queste condizioni il VWF possiede un potenziale pro-trombotico elevato e può causare aggregazione piastrinica indipendentemente dalla presenza di lesioni vascolari. Tuttavia, il VWF appena secreto rimane ancorato alle proteine di membrana delle cellule endoteliali e, in risposta alla forza del flusso laminare del sangue, il multimerico si dispiega, scoprendo così il dominio A2 che, una volta esposto, è pronò all'azione proteolitica di ADAMTS13. Una volta che il taglio enzimatico è stato effettuato, il multimerico si ripiega su sé stesso e assume una conformazione globulare tipica, con il dominio A2 che risulta mascherato e insensibile all'effetto di ADAMTS13. Il *pattern* multimerico che si evidenzia nel plasma normale è dunque il risultato dell'azione regolativa di ADAMTS13 (Zhang XH *et al.*, 2009). Recentemente, è stato suggerito che ADAMTS13 possa anche essere coinvolto nella fase piastrinica dell'emostasi, regolando l'aumento delle dimensioni del tappo emostatico formato in seguito a danno vascolare. A dimostrazione dell'importanza dell'azione della proteasi ADAMTS13, mutazioni che interessano il gene ADAMTS13 causano la forma congenita di Porpora Trombotica Trombocitopenica (TTP), una grave microangiopatia trombotica caratterizzata da trombocitopenia, anemia e sintomatologia ischemica con esordio improvviso, spesso fatale (Moake J. L., 2002). Negli individui affetti da TTP congenita, la ridotta sintesi di ADAMTS13 funzionante causa la mancata regolazione delle dimensioni dei multimeri circolanti di VWF che di conseguenza sequestrano le piastrine e inducono la formazione di trombi piastrinici disseminati a livello dei vasi capillari. La proteina ADAMTS13 matura si compone di diversi domini (Fig. 2): un dominio metalloproteasi (M), un dominio disintegrina-like (D), un ripetizione trombospondina-1 (1), un dominio ricco in cisteine (Cys) un dominio spaziatore



(Spacer), sette ripetizioni trombospodina-1 addizionali (2-8) e si conclude con due domini CUB (Zheng X. *et al.*, 2001).

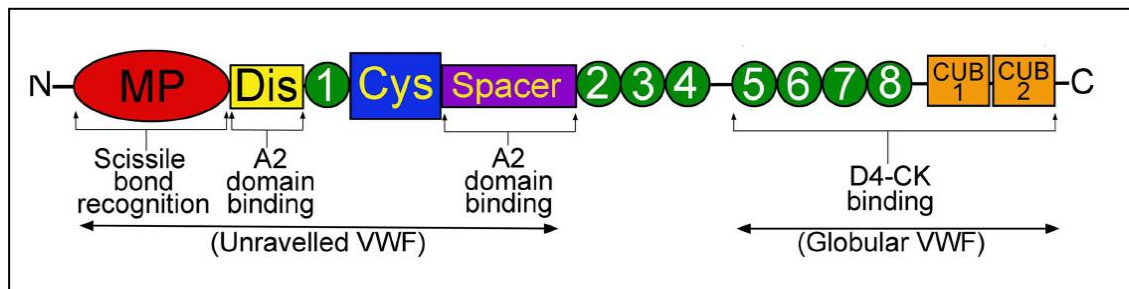


Figura 2. Suddivisione in domini della proteasi ADAMTS13 matura.

I domini di ADAMTS13 implicati nell'interazione con il VWF sono molteplici e distribuiti lungo tutta la molecola. Recentemente è stato dimostrato che ADAMTS13 è in grado formare un complesso circolante già con il multimero globulare di VWF, grazie a legami a bassa affinità che si instaurano tra le porzioni C-terminali delle due molecole: a questa interazione partecipano i domini TSP1 5-8 e i domini CUB1 e CUB2 di ADAMTS13, che legano i domini D4 e CK del VWF. Anche se ADAMTS13 è costitutivamente attivo, in questo caso non può esercitare alcuna proteolisi, poiché il dominio A2, in condizione di normale flusso laminare, è ripiegato e non espone il sito di taglio. Tuttavia, trovandosi all'interno del complesso, ADAMTS13 è pronto ad agire non appena vengano a crearsi le condizioni favorevoli. Quando il VWF viene sottoposto ad elevate forze di *shear*, cioè al momento della secrezione o in presenza di collagene, il multimero perde la sua conformazione globulare e il dominio A2 si dispiega completamente, esponendo non solo il sito di taglio, ma anche siti di legame addizionali per ADAMTS13. Sia il dominio Spacer che il dominio Dis interagiscono con amminoacidi specifici del dominio A2: tali legami sono essenziali per avvicinare il dominio MP al sito di taglio. Infine il dominio MP interagisce a sua volta con i residui prossimali del sito di taglio e il *core* catalitico di MP proteolizza il VWF in posizione Tyr1605-Met1606 (Crawley *et al.*, 2011). In conclusione, la suscettibilità del VWF al taglio enzimatico di ADAMTS13 è strettamente dipendente dallo stato conformazionale del VWF, che cambia da globulare a dispiegata e viceversa in risposta alle forze di *shear* del flusso sanguigno.

#### 1.4. Test coagulativi per la diagnosi di VWD

Per la diagnosi della VWD vengono effettuati i seguenti test ematici:

*Test di screening per valutare l'emostasi* (Favaloro E. J. and Koutts J., 1997): conta piastrinica; Tempo di emorragia (TE); Tempo di protrombina (PT) che valuta l'attività dei fattori della via

estrinseca (VII, V e X) e comune (protrombina e fibrinogeno) della coagulazione; Tempo di Tromboplastina parziale (aPTT) che valuta l'attività dei fattori della intrinseca (XII, XI, IX, VIII) e comune.

*Test di valutazione quantitativa e funzionale del VWF:* dosaggio della sua concentrazione nel plasma (VWF:Ag); dosaggio dell'attività del cofattore della ristocetina (VWF:RCo) per valutare la sua funzionalità; test di legame al collagene (VWF:CB) sensibile alla rappresentazione dei multimeri ad alto peso molecolare; dosaggio dell'attività del Fattore VIII (FVIII:C).

*Test di identificazione differenziale del sottotipo di VWD:* analisi del *pattern* multimerico; VWF intrapiastrinico (VWF:Ag intrapiastrinico) valuta la sintesi VWF; aggregazione piastrinica indotta dalla ristocetina (RIPA) valuta il legame con il recettore piastrinico GPIb; binding del FVIII (VWF:FVIII:BA) valuta la capacità di legame al FVIII; test DDAVP valuta la sintesi, il rilascio e la sopravvivenza del VWF.

### **1.5. Diagnosi genetica di VWD**

La diagnosi genetica di VWD congenita viene comunemente effettuata mediante sequenziamento diretto di Sanger dei 52 esoni che compongono il gene VWF e delle relative regioni di *splicing*. Al momento attuale, sono state caratterizzate centinaia di mutazioni differenti distribuite sull'intero gene. Le mutazioni descritte sono riportate nel *database* online ISTH-SSC VWF (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>). Le forme di VWD di tipo 2 sono state ampiamente caratterizzate dal punto di vista genetico: le mutazioni sono solitamente di tipo missenso e la correlazione esistente tra dominio funzionale e il fenotipo è così stretta che spesso è possibile predire su quali esoni è situata la mutazione in base dei test emostatici eseguiti del soggetto. Invece, i soggetti con VWD di tipo 3 sono solitamente omozigoti o eterozigoti composti per mutazioni *null*. Tali mutazioni, introducendo nel gene uno *stop-codon* prematuro, impediscono infatti la formazione di un mRNA integro e conseguentemente la sintesi del VWF. In questo caso la mutazione può interessare qualsiasi dominio, quindi il sequenziamento dell'intero gene è necessario. La diagnosi genetica della VWD di tipo 1 è decisamente la più problematica: i dati riportati in letteratura e l'esperienza del nostro Centro dimostrano che solo nel 70% dei casi il sequenziamento diretto dell'intero gene VWF è in grado di identificare una mutazione causativa. Attualmente, almeno il 30% dei casi di VWD di tipo 1 rimane apparentemente slegato dal gene VWF: tale condizione è sicuramente dovuta in parte a limiti intrinseci della metodologia del

sequenziamento, che non è in grado di esplorare ogni distretto genico, né di identificare tutte le tipologie di mutazione, ma suggerisce anche che possano esistere altri geni coinvolti nell'insorgenza della patologia.

## 2. Obiettivi dello Studio

Questo studio si propone di caratterizzare il difetto genetico che causa la VWD in diverse famiglie nelle quali la precedente analisi della porzione codificante, delle regioni 5'- e 3'-UTR e dei confini esone-introne del gene VWF, non ha permesso l'identificazione di alcuna mutazione genetica. Il lavoro prevede l'utilizzo di una "flow-chart" diagnostica (Fig. 3) il cui primo step consiste nel determinare lo stato di *linkage* tra gene del VWF e la malattia. L'analisi di *linkage* fornisce informazioni importanti riguardo al coinvolgimento del gene VWF: nel caso di *linkage* positivo, ci si aspetta che il difetto sia comunque a carico del VWF, quindi verranno adottate strategie alternative che permettano un'analisi più approfondita del gene VWF; d'altronde, l'assenza di *linkage*, esclude il coinvolgimento del VWF e dunque l'indagine sarà estesa all'intero genoma per evidenziare nuovi geni responsabili del fenotipo VWD.

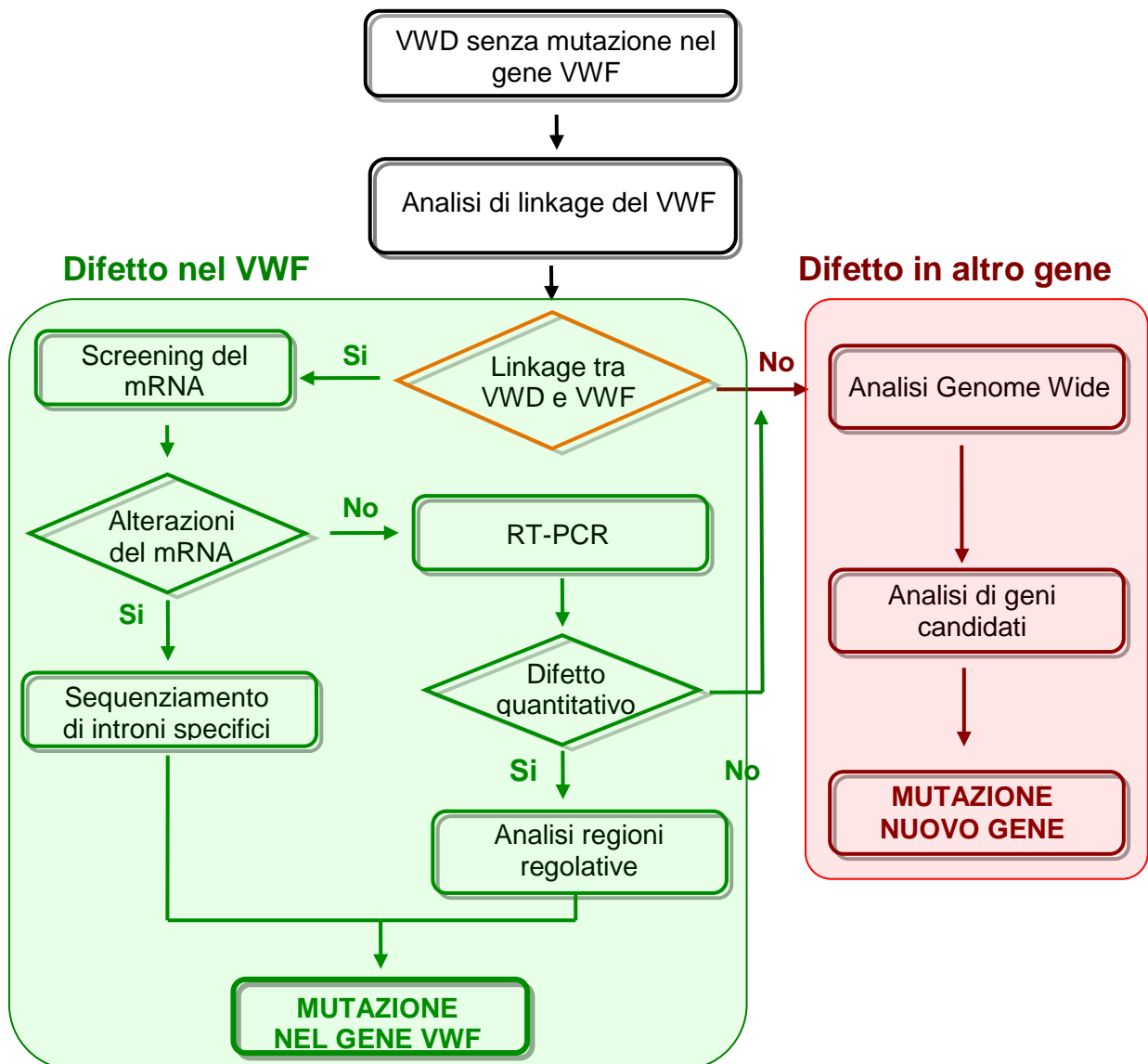


Figura 3. flow-chart diagnostica

## 3. Materiali e metodi

### 3.1. Test emostatici

La diagnosi di VWD è stata ottenuta utilizzando test generali per la valutazione del potenziale coagulativo (PT, aPTT, PFA100) ed i seguenti esami emostatici orientati: aggregazione piastrinica indotta da ristocetina (RIPA), VWF antigene (VWF:Ag) plasmatico e intrapiastrinico, VWF binding al collagene (VWF:CB), VWF cofattore della ristocetina (VWF:RCO), VWF binding del FVIII (VWF:FVIIIb), analisi multimerica del VWF, come già descritto (Casonato A. *et al.*, 2007). Tutte le determinazioni sono state eseguite su campione di sangue anticoagulato in sodio citrato 3,8% (1:10, vol/vol).

### 3.2. Analisi di *linkage*

Lo stato di *linkage* tra VWD e gene del VWF è stato valutato utilizzando 3 marcatori VNTR intragenici del VWF:

- 1 *GT-repeat* nel promotore (a -2144bp da ATG codone di *start*);
- 2 *TCTA-repeat* nell'introne 40 del gene VWF (VNTRI e VNTRII, situate rispettivamente a -564 bp e a -181 bp dall'esone 41).

Il *linkage* è stato verificato anche con il gene F8 (che codifica per il Fattore VIII), utilizzando i seguenti marcatori VNTR intragenici:

- 1 *GT-repeat* nell'introne 13 (a -4413 bp dall'esone 14) (Machado F. B. *et al.*, 2009);
- 1 *GT-repeat* nell'introne 21 (a -405 bp dall'esone 22) (Machado F. B. *et al.*, 2011).

Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero anticoagulato in Sodio citrato 3.8% (1/10 vol/vol) utilizzando il kit QIAamp<sup>®</sup>DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). I marcatori sono stati amplificati mediante PCR utilizzando l'enzima AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, AB, Foster City, CA, USA), un termociclatore GeneAmp<sup>®</sup>PCR System 2700 (AB) e 5 coppie di *primer*. Il *primer forward* è coniugato in posizione 5' con fluoroforo FAM o HEX (Tab. 1). La corsa dei frammenti, denaturati a 95°C per 2' in presenza di formammide, è stata effettuata con sequenziatore automatico ABI 3100 Genetic Analyzer (AB) e la lunghezza delle varianti alleliche è stata determinata mediante il programma Peak Scanner 1.0 (AB). L'analisi dei singoli marcatori effettuata in tutti gli individui, affetti o sani, del nucleo familiare ha permesso di ricostruire gli aplotipi (GT)<sub>n</sub>/VNTRI/VNTRII per il VWF e (GT)<sub>int13</sub>/(GT)<sub>int21</sub> per il gene F8 dei singoli individui e di valutare la co-segregazione tra malattia e gene considerato.

**Tabella 1.** Sequenza dei primer e condizioni di amplificazione dei marcatori VNTR utilizzati.

Primer	Sequenza (5'-3')	Fluoroforo	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)
GT F	tgcccattgcatcagttactt	FAM	63	229-243
GT R	tggggagtgatggttgagt	-		
VNTRI F	agctatatactattatcat	FAM	50	99-135
VNTRI R	agatacatacatagatatagg	-		
VNTRII F	caaatctatctcatgtatctagttatc	HEX	55	228-256
VNTRII R	cactgggtcacacactgagg	-		
F8int13F	ttgtgtaattcccatttgcac	FAM	60	134-154
F8int13R	gcctagagaatgccaagtaaca	-		
F8int21F	gtttcaggagagggaggaa	HEX	55	187-203
F8int21R	agcctgctcttgacaaacc	-		

T<sub>A</sub>=Temperatura di annealing

L= Lunghezza del frammento amplificato

### 3.3. Analisi del mRNA di VWF, F8 e PDIA3

*Estrazione del RNA totale da piastrine:* le piastrine sono state isolate a partire da 20 mL di sangue periferico anticoagulato in sodio citrato 3.8% (1/10 vol/vol), mediante 2 step successivi di centrifugazione: 10' a 180 x g e 10' a 1.000 x g. Il pellet di piastrine è stato trattato con 1 mL di Trizol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e al lisato così ottenuto sono stati aggiunti 200µL di cloroformio. Dopo centrifugazione a 12.000 x g per 15' a 4°C, la fase acquosa del campione contenente l'RNA è stata prelevata e ad essa è stato aggiunto un ugual volume di alcool isopropilico. Il campione è stato poi incubato 10' a temperatura ambiente e centrifugato a 12.000 x g per 10' a 4°C. Previa lavaggio con etanolo 75%, l'RNA totale è stato reidratato in 20 µL H<sub>2</sub>O milliQ.

*Analisi del cDNA del gene VWF:* il cDNA è stato retrotrascritto da RNA totale utilizzando l'enzima SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase e random primers (Life Technologies Corporation), secondo protocollo indicato dalla ditta produttrice. Il cDNA del gene VWF è stato amplificato in 12 frammenti di circa 800-1000bp, mediante l'utilizzo di primer specifici, disegnati con il software Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) sulla sequenza di riferimento NM\_000552 (Tab. 2). In questo caso, per l'amplificazione è stata utilizzata la Hot Start Master mix (Qiagen) e il termociclatore GeneAmp<sup>®</sup>PCR System 2700 (AB).

**Tabella 2.** Condizioni di amplificazione e primer per l'analisi del cDNA del VWF.

Mix di amplificazione*	Programma di amplificazione	
cDNA [50ng/µL]	0.25µL	95°C 15'
Master mix	6.25µL	94°C 45"
Primer (F + R) [10µM]	1µL	T <sub>A</sub> °C 45"
H <sub>2</sub> O milliQ	5µL	72°C 1'
		72°C 12'
		4° C ∞

} 40 cicli

\* Per frammenti 3 e 4, aggiunto DMSO 10%

Primer	Sequenza (5'-3')	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)	Primer	Sequenza (5'-3')	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)
1F	gtggttggtgagatgacag	60	884	7F	cactgccagattgccact	60	913
1R	cacaggccctctgcattt			7R	tcacctctccatgaactcc		
2F	ggggaccaaaagagtctccat	60	922	8F	aagcccctctctactctg	60	1081
2R	actggcagatcccactgaag			8R	aacactgtcactctgttggga		
3F	tgcagctgccctgaggga	60	992	9F	aaagccaatatagggcctcg	60	1125
3R	aggtacacctggccttctg			9R	attggctccgttctcatcac		
4F	tcaaccgcgcatgacca	55	924	10F	acatggagggtgacggtgaa	60	874
4R	cgctgaaggtaggtagtg			10R	gctacttcacacagccaca		
5F	catgtccggcatgagaa	60	998	11F	gatttctgtctatgcatgcc	60	1024
5R	agcgcactcacactcatc			11R	ccttctactcgacacactca		
6F	actgcaacaagctggtggac	60	838	12F	cagaagccctgtgaggaca	55	1176
6R	tacttcactggctggaat			12R	gccttttgcagataagagc		

T<sub>A</sub>=Temperatura di annealing

L= Lunghezza del frammento amplificato

Per determinare la presenza di *splicing* aberranti del mRNA del gene VWF, l'elettroforesi in gel di agarosio al 2% dei frammenti di cDNA amplificati è stata confrontata con il *pattern* di migrazione ottenuto da individui di controllo. Successivamente, per verificare la presenza di eventuali piccole alterazioni di *splicing* non visibili mediante elettroforesi, i frammenti di cDNA sono stati sequenziati utilizzando il kit Big Dye Terminator Sequencing v.2.5 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) e un sequenziatore automatico ABI 3100 Genetic Analyzer (AB).

*Analisi del cDNA del F8*: il cDNA del F8 è stato amplificato utilizzando 13 coppie di *primer* specifici costruiti sulla sequenza di riferimento NM\_000132 con Primer3 v.0.4.0 (Tab. 3).

**Tabella 3.** Sequenza dei primer e condizioni di amplificazione per il cDNA del F8.

Primer	Sequenza (5'-3')	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)	Primer	Sequenza (5'-3')	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)
1F	gcaagaatgggactttca	60	848	8F	aagcaaacagacctggaaaagt	60	787
1R	cagcatccctatctgcac			8R	ccttgcctctgatctctc		
2F	ggccaaggaaagacaca	60	826	9F	cagccctataccgtggaga	60	756
2R	gtctccaactcccataaag			9R	ccaaattccagcttggatg		
3F	ctcagcggattgtaggaag	60	779	10F	ggcagaatgaaacatcc	60	815
3R	tctgagaatgggaataggg			10R	caggcattactctccctg		
4F	gtttgcatgaggtggcact	60	798	11F	tgggaatggagagtaaaagca	60	810
4R	ctgccaatgtctgatgga			11R	agtttttctacaacagaggaagtgg		
5F	tcacagtggggacatgtatt	60	801	12F	gctgctcccagattactcct	60	836
5R	atccacttgctgattctgg			12R	cccctgttacattttgtgtg		
6F	cattccaccagatgcacaaa	60	773	13F	tgtggaatatgaggaaaatcca	58	826
6R	tggaccactgggtgagg			13R	ttcatgaacatttgagaaatagaga		
7F	tctcctaatacaagccagcaga	60	818				
7R	tggttatccaagcaagagg						

T<sub>A</sub>=Temperatura di annealing

L= Lunghezza del frammento amplificato

Amplificazione, corsa elettroforetica in gel di agarosio e successivo sequenziamento dei frammenti di PCR sono stati effettuati secondo la procedura già descritta precedentemente per l'analisi del cDNA di VWF.

*Analisi del cDNA del PDIA3:* il cDNA del gene PDIA3 è stato amplificato utilizzando 4 coppie di primer specifici costruiti sulla sequenza di riferimento NM\_005313 con il software Primer3 v.0.4.0 (Tab. 4).

**Tabella 4.** Sequenza dei primers per l'analisi del cDNA del gene PDIA3.

Primer	Sequenza (5'-3')	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)
1F	acctccggctgcagtc	62	1189
1R	gcaggaacctctccagagcc		
2F	cgctctcacatctcactaacaagttt	62	961
2R	ccaatggtttcccatctctga		
3F	gccttccatgaagtcagagg	62	1018
3R	agtgtcagcaattctgaacaac		
4F	aggcctaccctggtgattagaac	62	741
4R	aatctccaaggcagatggttc		

T<sub>A</sub>=Temperatura di annealing

L= Lunghezza del frammento amplificato.

Amplificazione, corsa elettroforetica e sequenziamento sono stati effettuati secondo la procedura già descritta precedentemente.

### 3.4. Espressione di mutazione in sistema cellulare

*Preparazione del Plasmide di Transfezione:* il plasmide pSVvWFA contenente l'intero cDNA del gene VWF è stato mutagenizzato per esprimere le mutazioni identificate: nel primo caso è stata inserita la delezione c.7055\_7081del27 utilizzando il kit QUIKCHANGE II XL (Stratagene, La Jolla, CA, USA), primers fosforilati *delex41(F)* 5'- cctgcaggaaggaggagtgcaaaagagtgtcccc -3' e *delex41(R)* 5'- cagggttggtcagtggtggctggaggccacgttc -3' e DNA ligasi T4 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Successivamente, lo stesso plasmide *wild-type* pSVvWFA è stato mutagenizzato per esprimere la mutazione c.5456\_5842del per mezzo dello stesso kit di mutagenesi e i seguenti primers: *del32-33-34(F)* 5'- gcgtgtgcacaggcagctccactcggcacatcg -3' e *del32-33-34(R)* 5'- tgttgacctggcggcactcagctgctcatcc -3'.

*Transfezione delle cellule BHK:* le cellule FUR4-BHK (Baby Hamster Kidney, stabilmente transfettate con furina) sono cresciute in Opti-MEM (Life Technologies Corporation) al 2% FBS e sono state transfettate transientemente in fiasche T25 utilizzando 2µg totali di DNA per fiasca e il transfettante Fugene 6 (Promega Corp., Madison, WI, USA). Al fine di mimare lo stato di



eterozigosi dei pazienti, sono state eseguite co-transfezioni con 1µg di pSVvWFA *wild-type* e 1µg di pSVvWFA mutagenizzato (Hilbert L. *et al.*, 1994). Dopo 72 ore il mezzo contenente il VWF prodotto dalle cellule transfettate è stato rimosso, concentrato circa 5 volte con filtri Centricon (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) e dosato mediante saggio ELISA. Dopo la rimozione del mezzo le cellule sono state tripsinizzate (0,25% di tripsina per 8'), pellettate (800 x g per 15') e lisate con una soluzione contenente 2% Tryton-X 100 in presenza di antiproteasi. I residui di membrane sono stati eliminati per centrifugazione (12.000 x g per 4') e il surnatante è stato infine raccolto per la quantificazione del VWF contenuto nelle cellule.

*Transfezione delle cellule HEK293T:* le cellule HEK293T (Human Embryonic Kidney) sono state mantenute in DMEM + 10% FBS e transfettate transientemente in fiasche T25 con 4µg totali di DNA plasmidico per fiasca (2µg di pSVvWFA *wild-type* e 2µg di pSVvWFA mutagenizzato per mimare lo stato di eterozigosi). Il reagente di trasfezione utilizzato è Lipofectamine 2000 (Life Technologies Corporation), che offre migliori risultati per questa linea cellulare, diluito in Opti-MEM *serum-free*. Dopo 8 ore il mezzo di transfezione, tossico per le cellule, viene rimosso e sostituito con Opti-MEM + 2% FBS. A 48 ore dall'inizio della transfezione il mezzo contenente il VWF prodotto dalle cellule transfettate è stato raccolto e dosato mediante saggio ELISA. Il VWF intracellulare è stato recuperato con il protocollo precedentemente descritto per le cellule FUR4-BHK.

### 3.5. Identificazione di una grande delezione sul DNA genomico

*PCR Real-Time:* la tecnica della Real-Time PCR è stata utilizzata al fine di quantificare il numero di copie, per genoma, degli esoni 32, 33 e 34 del gene VWF nel proposito della Famiglia B oggetto di studio. In corrispondenza di tali esoni e dell'introne 33, dove si ipotizzava la presenza di una delezione (vedi risultati 4.2. Pag. - 30 - ), sono state disegnate 4 differenti coppie di *primers* in grado di amplificare frammenti di circa 60-140 bp (Tab. 5). In questo caso è stato utilizzato il *software* RealTimeDesign ([www.biosearchtech.com/realtimedesign-software-access.aspx](http://www.biosearchtech.com/realtimedesign-software-access.aspx)).

**Tabella 5.** Sequenza dei primers e condizioni di amplificazione per RT-PCR.

<u>Mix di amplificazione</u>		<u>Programma di amplificazione</u>		
DNA [1ng/µL]	1µL	95°C	15'	
TaqMan Master Mix (2x)	5µL	95°C	15''	} 40 Cycles
Primer (F + R) [0,6µM]	1µL	T <sub>A</sub> °C	60''	
H <sub>2</sub> O milliQ	3µL	95°C	15''	
		60°C	15''	
+2% Temperature Ramping Speed		95°C	15''	

Primer	Sequenza (5'-3')	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)	Primer	Sequenza (5'-3')	T <sub>A</sub> (°C)	L (bp)
RT_Ex32_F	gcaaagaaattgggactttca	60	75	RT_Ex34_F	aagcaaacagacctggaaaagt	60	67
RT_Ex32_R	cagcatccctatcctgcatc			RT_Ex34_R	ccttgctctgatctcctc		
RT_Ex33_F	ggccaaggaaaagacaca	60	108	RT_Int33_F	agccctataccgtggaga	60	136
RT_Ex33_R	gtctccaactcccataaag			RT_Int33_R	ccaaattccagcttggatg		

T<sub>A</sub>=Temperatura di annealing

L= Lunghezza del frammento amplificato

La reazione di amplificazione è stata eseguita con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Monza, Italia) e il risultato è stato analizzato mediante ABI PRISM 7900HT Sequence Detector System (AB) in grado di rilevare la fluorescenza del SYBR green (Nolan T. *et al.*, 2006). Il valore del ciclo soglia è stato definito automaticamente dal *software* SDS v. 2.4. I dati sono stati analizzati utilizzando una curva *standard*, elaborata mediante amplificazione del locus genico GPR situato sul cromosoma 19 (sequenze dei primers: qGPR4F 5' – aggaacataagaccgcaat - 3'; qGPR4R 5' - tgccttcacttgagttctg - 3'). I valori della fluorescenza rilevati sono stati elaborati in foglio di calcolo Microsoft Excel. La presenza o meno della delezione è stata dedotta in base al *ratio amplificato bersaglio / Locus GPR*: un valore di *ratio* attorno a 1 indica la presenza di entrambi gli alleli, mentre un *ratio* ~0,5 suggerisce la presenza di un allele singolo, confermando presenza di delezione.

*Long-PCR*: per effettuare la Long-PCR sono state disegnate con *Primer3* diverse coppie di primers, i primers *forward* sull'esone 31 e i *reverse* sull'esone 35 del gene del VWF, in modo da amplificare l'intera regione ipoteticamente deleta (compresa tra le 2 e le 20 kb). Inoltre, sono stati sintetizzati alcuni *primer reverse* intermedi ed alternativi, a circa 15 kb e 11 kb dal *primer forward* (Tab. 6).

**Tabella 6.** Sequenza dei primer e condizioni di amplificazione per l'allestimento della Long-PCR.

Programma di amplificazione

93°C	2'	}	10 cicli
93°C	10"		
60°C	40"		
68°C	5'-15'		
93°C	10"	}	30 cicli
60°C	40"		
68°C	5'-15'+ 20" x ciclo		
68°C	10'		
4°C	∞		

<b>Primer F</b>	<b>Sequenza (5'-3')</b>	<b>Primer R</b>	<b>Sequenza (5'-3')</b>
31F	accggtgagacaggggtgctg	35R	gctcctaacaagagcatc
31-35F	atacttgacttcagaaatgcatggt	31-35R	gctcctgttttgaataggacata
31-35F2	cctcaaaaggcggtggtcatcctggtcacggac	31-35R2	tgccagtcagcttgaattctgccatcaaagg
		15kbR	gagaagcaaggagacattggtag
		11kbR	tcacagataatgagctaatagtca

Per le reazioni di Long-PCR è stato utilizzato il kit Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim, Germany) e il termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (AB) secondo le condizioni consigliate dalla ditta produttrice, utilizzando il Buffer 1 in presenza di DMSO 3%. La successiva elettroforesi è stata eseguita in gel di agarosio allo 0,8% con corsa di almeno 4 ore, confrontando il pattern di migrazione delle bande ottenute dal paziente con gli stessi amplificati ottenuti da individui di controllo.

*Definizione dei confini della delezione:* una volta evidenziata l'esistenza di una delezione, occorre definire l'esatto *breakpoint* del doppio filamento di DNA genomico. Sono stati elaborati un singolo *primer reverse* e diversi *primers forward* "a scalare", costruiti cioè a distanze ravvicinate di circa 500 bp all'interno dell'introne 31, in modo da ottenere almeno un frammento di DNA abbastanza corto da poter essere facilmente sequenziato. I *primer* sono stati costruiti con Primer3, l'amplificazione è stata condotta con AmpliTaq Gold (Roche) secondo il protocollo consigliato dalla ditta produttrice, ma con un programma di amplificazione modificato con tempo di *extension* aumentato per permettere l'amplificazione di frammenti di 4-5 kb (Tab. 7).

**Tabella 7.** Programma di amplificazione e primer per la definizione della delezione.

Programma di amplificazione

93°C	12'	} 38 cicli
93°C	15"	
60°C	30"	
72°C	5'	
72°C	10'	
4°C	∞	

<b>Primer F</b>	<b>Sequenza (5'-3')</b>	<b>Primer R</b>	<b>Sequenza (5'-3')</b>	<b>Dimensioni attese</b>
1F	gtagggccttgagaaccaatg	R	gaatgtaaagtgggtgcg	6209 bp
2F	actgggagttctttgaaggc			5738 bp
3F	gcacattctctgggctcag			5308 bp
4F	acctttgtcccctgcagat			4865 bp
5F	gtttgtgtttgttctctatc			4396 bp

È stato utilizzato un termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (AB). La corsa elettroforetica è stata effettuata in gel di agarosio al 1%, confrontando l'amplificato ottenuto con un individuo di controllo, e il sequenziamento come precedentemente illustrato nel paragrafo 3.3.

### **3.6. Sintesi di frammenti di VWF ricombinante e analisi dell'attività proteolitica di ADAMTS13**

*Preparazione del Plasmide di Espressione:* la sequenza *wild-type* del cDNA del gene del VWF che si estende dal nucleotide 4438 al 7197 è stata inserita nel plasmide pEXP5-NT/TOPO® vector (Invitrogen). Il cDNA codifica per il frammento proteico compreso tra l'amminoacido 1480 e l'amminoacido 2399 del VWF, che comprende diversi domini funzionali del VWF maturo (A2-A3-D4-B1-B2-B3), in particolare quelli interessati dall'interazione e dalla proteolisi effettuata da ADAMTS13. Parallelamente, in un plasmide dello stesso tipo, è stata inserita la medesima sequenza di cDNA contenente la mutazione c.5456\_5842del. L'utilizzo del plasmide pEXP5-NT/TOPO® vector permette di posizionare all'N-terminale del frammento una "sequenza *tag*" di 6 istidine, utile alla successiva purificazione del frammento, e pone l'inserito sotto il controllo dell'operone inducibile *Lac*, che risponde alla concentrazione di IPTG (isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside). La possibilità di indurre la sintesi proteica dell'inserito è di fondamentale importanza, dal momento che le proteine eterologhe spesso rallentano la crescita batterica.

*Sintesi dei frammenti ricombinanti in E. coli Origami:* batteri *E. coli Origami*, ceppo commerciale specificatamente indicato per l'espressione di proteine eucariotiche ricche di ponti disolfuro, sono stati trasformati con i plasmidi di espressione ingegnerizzati. Le colonie ottenute mediante comune selezione in Ampicillina sono state inoculate in terreno LB e incubate *overnight* a 37°C. Il giorno successivo, quando il terreno ha raggiunto un valore di Densità Ottica  $OD_{600nm} = 0,6$ , i batteri sono stati trattati con IPTG alla concentrazione finale di 1 mM e incubati a 16°C per 8 ore. Tali condizioni inducono la sintesi dei frammenti. I batteri sono stati quindi centrifugati (6,000 g per 1' a 4°C), risospesi in buffer Tris con SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e lisati in FrenchPress a 1.34 psi (*pound per square inch*). I lisati sono stati successivamente centrifugati a 20,000g per 30' a 4°C per separare la frazione solubile dalle componenti insolubili. Entrambe le proteine di interesse, *wild-type* e mutato, sono risultate precipitare nel pellet ed è stato effettuato uno *step* di denaturazione per riportarle in soluzione. Per la denaturazione il pellet è stato trattato con 8M UREA, 50 mM Tris pH 8, 50 mM DTT.

*Refolding e purificazione di frammenti ricombinanti:* i frammenti denaturati sono stati rifoldati chimicamente utilizzando specifici *buffers* del QuickFold™ Protein Refolding Kit (Athena Enzyme System™, Baltimore, MD, USA). La successiva purificazione dei frammenti è stata effettuata mediante *Ion Metal Affinity Chromatography* (IMAC), utilizzando una colonna HisTrap HP (5 ml) contenente una resina di agarosio accoppiata ad acido nitrilotriacetico (NTA).

NTA è un chelante per ioni Nichel, i quali a loro volta interagiscono reversibilmente con la “sequenza tag” di 6 istidine (His-Tag) posta nella regione N-terminale dei frammenti ricombinanti. La resina permette la selezione dei frammenti che possiedono la sequenza His-Tag, a discapito delle altre proteine di origine batterica e delle sostanze chimiche che potrebbero inficiare successive manipolazioni dei campioni. I frammenti vengono infine eluiti per competizione con imidazolo.

*Proteolisi con ADAMTS13*: i frammenti ricombinanti purificati sono stati sottoposti a proteolisi *in vitro* mediata da ADAMTS13. La digestione con ADAMTS13 ricombinante è stata effettuata in *buffer* di TRIS 15 mM contenente Urea 1.5 M e con pH 8.0. I campioni sono stati incubati per 2 ore a 37°C e la digestione è stata bloccata aggiungendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alla concentrazione finale di 0.825 M (Casonato *et al.*, 2013). Per identificare i prodotti di proteolisi è stato effettuato un SDS-PAGE (gel al 9% poliacrilammide) seguito da *western-blot*. La membrana in polivinilidenefluoruro (PVDF) è stata sviluppata con anticorpo policlonale anti-VWF coniugato con HRP (*horse-radish peroxidase*) alla diluizione di 1:200 (Dako, The Netherlands).

### **3.7. Sequenziamento del genoma**

*SOLiD™ System V 3.0 plus*: Il sequenziamento genomico è stato effettuato presso la struttura CRIBI dell’Università di Padova sotto la direzione del gruppo di ricerca del Prof. Valle su piattaforma SOLiD™ (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection). In breve, il DNA genomico è stato frammentato in maniera casuale e i frammenti ottenuti sono stati selezionati e circolarizzati mediante l’utilizzo di adattatori interni. Il costrutto è stato quindi sottoposto a taglio enzimatico e manipolato per formare una libreria Mate-Paired. La libreria, adsorbita a biglie paramagnetiche è stata amplificata mediante PCR ad emulsione, secondo protocollo suggerito da Applied Biosystem. Il sequenziamento è stato effettuato con metodo “2 base encoding”. Il dato grezzo è stato elaborato con il *software Human Genome Variation* sviluppato dal CRIBI, che ha permesso di evidenziare differenze tra genoma del proposito e genoma di riferimento (*re-sequencing*), e di integrare il risultato con informazioni disponibili nei maggiori database biologici.

### **3.8. Analisi di linkage genome-wide**

*Genotipizzazione mediante array di SNPs*: il DNA di ogni singolo individuo appartenente alla Famiglia C in fase di studio è stato estratto da cellule leucocitarie circolanti del sangue e

successivamente genotipizzato mediante *chip high-density SNPs* GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array (Affymetrix, KFB Regensburg, Germany), che analizza circa 238,000 SNPs uniformemente distribuiti su tutto il genoma. La genotipizzazione è stata compiuta presso la ditta AROS Applied Biotechnology (<http://www.arosab.com/inhouse.htm>, Denmark).

*Analisi di linkage Genome-Wide*: i dati ottenuti con la genotipizzazione degli individui sono stati filtrati per eliminare SNPs non informativi ed errori di segregazione mendeliana. Successivamente, il *software* EasyLINKAGE v5.08beta (<http://nephrologie.uniklinikum-leipzig.de>) (Hoffmann K., Lindner T. H., 2005) è stato utilizzato per l'analisi dei dati ed il calcolo del *LOD-score*. EasyLINKAGE ha permesso anche la ricostruzione degli aplotipi familiari nelle regioni di linkage.

### **3.9. Analisi del gene ADAMTS13**

Il gene ADAMTS13, con riferimento NM\_139025, è stato completamente sequenziato utilizzando primer già descritti in letteratura (Levy G. G. *et al.*, 2001; Kokame K. *et al.*, 2002). L'amplificazione è stata effettuata mediante PCR utilizzando l'enzima AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, AB, Foster City, CA, USA) in un termociclatore GeneAmp® PCR System 2700 (AB); il solo esone 7, il cui contenuto in GC sfiora l'80%, è stato invece amplificato con AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies). Il sequenziamento è stato effettuato come già descritto precedentemente.

### **3.10. Ricerca di autoanticorpi anti-VWF**

La ricerca di anticorpi anti-VWF è stata effettuata mediante saggio immunoenzimatico. Il plasma del paziente è stato incubato per 60' in piastra per microtitolazione, precedentemente coattata con VWF (purificato o ricombinante) e saturata con PBS/albumina 2% (1<sup>a</sup> incubazione). Il plasma è stato eliminato e successivamente sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS. Segue ulteriore incubazione di 60' con anticorpo secondario anti-Ig umane coniugato con HRP (2<sup>a</sup> incubazione, Dako). L'anticorpo è stato eliminato e seguono 3 lavaggi con PBS ed è stata aggiunta una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% e o-fenilendiammina (OPD), substrato della reazione di chemiluminescenza. La reazione è stata stoppata dopo 10' con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M e la lettura dell'assorbanza è stata effettuata a 492 nm in VICTOR plate reader (Perkin Elmer). Il risultato del campione è stato confrontato con una curva *standard* creata con le assorbanze di diluizioni a scalare di plasma appartenente a controlli positivi per la presenza di anticorpi anti-VWF.

## 4. Risultati

Sono state inizialmente reclutate nello studio 20 famiglie non correlate, affette da VWD e caratterizzate dall'assenza di mutazioni putative nel gene del VWF a livello di porzioni esoniche, regioni di *splicing* e UTR. Tra queste sono state selezionate 4 famiglie particolarmente interessanti, 2 con VWD tipo 1 e 2 famiglie con VWD tipo 2. Per 3 di queste famiglie (Famiglia A, B, C) è stato possibile condurre un'analisi di *linkage* utilizzando marcatori VNTR distribuiti all'interno del gene VWF. La quarta famiglia (Famiglia D), di dimensioni troppo ridotte, è stata studiata con metodi alternativi. Di seguito (Tab. 8) vengono riportati i valori emostatici di riferimento per i propositi delle 4 famiglie indagate.

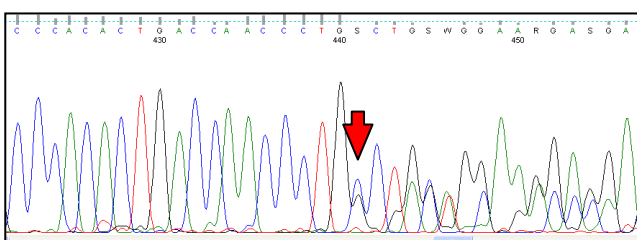
Tabella 8. quadro emostatico dei probandi delle famiglie A, B, C e D

	Fam. A	Fam. B	Fam. C	Fam. D	Range di Norma
FVIII:C	54,0 U/dL	25,9 U/dL	31,0 U/dL	13,6 U/dL	60 - 160 U/dL
FVIII:C / VWF:Ag ratio	1,3	1,6	0,5	1,6	~ 1
VWF:Ag	41,7 U/dL	16,3 U/dL	59,2 U/dL	8,6 U/dL	60 - 160 U/dL
VWF:RCo	37,6 U/dL	15,2 U/dL	79,3 U/dL	<3,125 U/dL	60 - 130 U/dL
VWF:RCo / VWF:Ag ratio	0,9	0,9	1,2	-	~ 1
VWF:FVIII BA	-	13,6 U/dL	65,1 U/dL	7,2 U/dL	60 - 160 U/dL
VWF:FVIII BA / VWF:Ag ratio	-	0,8	1,1	0,8	~ 1
VWF:CB	43,4 U/dL	8,0 U/dL	54,7 U/dL	3,4 U/dL	70 - 150 U/dL
VWF:CB / VWF:Ag ratio	1,0	0,5	0,9	0,4	~ 1
VWF intrapiastrinico	27,6 U/dL	50,5 U/dL	133,6 U/dL	101,0 U/dL	70 - 140 U/dL

### 4.1. Famiglia A: il ruolo dei polimorfismi silenti

La proposita della famiglia A ha una storia di moderato sanguinamento caratterizzato da epistassi, ematomi dopo eventi traumatici lievi, menorragia e sanguinamento gengivale. Il quadro clinico, leggermente più lieve, si ripresentava anche nella madre e nella nonna materna. I test emostatici eseguiti sul proposito hanno evidenziato la riduzione omogenea dei valori VWF:Ag (41,7 U/dL), VWF:CB (43,4 U/dL) e VWF:RCo (37,6 U/dL) ed un ridotto contenuto di VWF intrapiastrinico (27,6 U/dL), indicando una VWD di tipo 1. Il sequenziamento diretto del gene del VWF nel proposito non ha rilevato mutazioni. Tuttavia, come è prassi comune, è stata evidenziata la presenza di diversi polimorfismi già noti in letteratura. L'analisi di *linkage* con marcatori VNTR ha dimostrato che la VWD è in *linkage* con il gene del VWF, si è quindi ritenuto di approfondire l'analisi del gene in questione. È stata effettuata l'estrazione del mRNA da piastrine del proposito, che successivamente è stato retrotrascritto in cDNA. L'intero cDNA, comprensivo dei 52 esoni del gene del VWF, è stato amplificato in 12 blocchi distinti di esoni

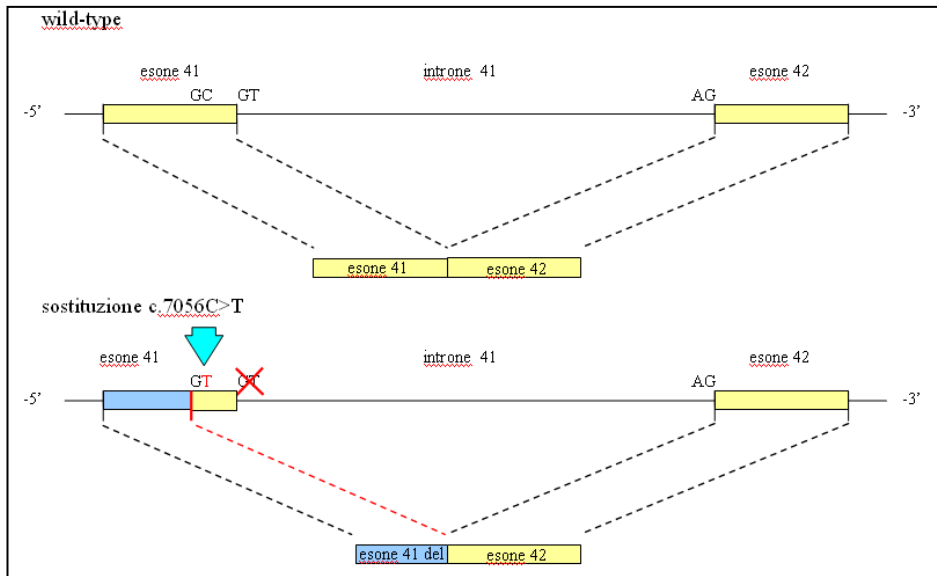
con i *primer* e le condizioni di amplificazione riportate nella Tabella 2 (Pag. - 18 - ). È stata effettuata la corsa elettroforetica degli amplificati ottenuti in un gel di agarosio al 2% e le bande del paziente sono state confrontate con quelle amplificate da individui sani: non è stato possibile rilevare alcuna differenza a livello macroscopico. Quindi, i prodotti di PCR del paziente sono stati sequenziati con metodo di Sanger, per evidenziare eventuali piccole anomalie non rilevabili direttamente con il gel di agarosio. A livello del frammento 11, che contiene gli esoni compresi tra il 38 e il 45, il sequenziamento ha identificato uno sdoppiamento del segnale. Lo sdoppiamento del segnale è il tipico indizio della presenza di un'inserzione o di una delezione in stato di eterozigosi (Fig. 4).



**Figura 4.** Elettroferogramma dell'amplificato 11. La freccia indica l'inizio dello sdoppiamento del segnale

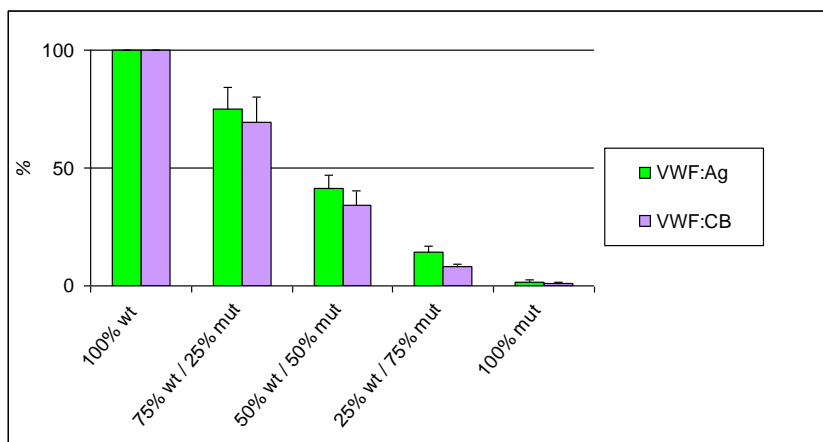
Con la ricostruzione accurata dell'elettroferogramma si è potuto dimostrare che lo sdoppiamento del segnale è dovuto ad una delezione di 27 paia di basi (c.7055\_7081del): il fatto che tale delezione non fosse presente a livello del DNA genomico, ma solo del cDNA, suggeriva la possibilità che la delezione fosse il risultato di uno *splicing* genico difettoso. Per evidenziare la causa dello *splicing* difettoso è stato inizialmente rivalutato il sequenziamento genomico del gene del VWF. In particolare, nell'esone 41, era stato precedentemente evidenziato un nucleotide in stato di eterozigosi (c.7056C>T), posizionato a ridosso del primo nucleotide coinvolto nella delezione. Tale nucleotide era stato già riportato in letteratura e classificato come polimorfismo silente, cioè come variante nucleotidica biallelica non associata a fenomeni patogenetici in quanto non altera l'amminoacido codificato. L'effetto di tale sostituzione è stato analizzato con il *software* di predizione di *splicing* Alamut 1.5.1 (<http://www.interactivebiosoftware.com/alamut/whatsnew/v1.5.html>): effettivamente, Alamut 1.5.1 ha attribuito un ruolo potenzialmente patologico alla sostituzione che introduceva un nuovo sito GT donatore di *splicing* (Fig. 5) nella sequenza. Secondo la predizione del *software*, il nuovo sito donatore di *splicing* risultava essere più potente del sito donatore *wild-type* e causava lo stesso *splicing* anomalo che è stato evidenziato anche nell'analisi del mRNA della paziente. Le evidenze sperimentali e la predizione *in silico* hanno dimostrato che la sostituzione non è un polimorfismo ma una mutazione genetica.





**Figura 5.** Rappresentazione grafica del difetto di splicing identificato

Una volta definito il meccanismo della mutazione, si è proceduto a identificarne la presenza anche nei familiari del probando. Come atteso, la presenza della sostituzione c.7056C>T è stata accertata in tutti i familiari affetti, mentre risulta assente nei sani. A Completamento del lavoro svolto, si è valutato l'effetto della sostituzione mediante transfezione del cDNA del VWF in cellule BHK. Il plasmide pSVvWF, contenente l'intero cDNA *wild-type* del VWF, è stato ingegnerizzato mediante mutagenesi primer-mediata e trasformazione batterica in modo da inserire la delezione di 27 nucleotidi identificata. Successivamente, le cellule BHK sono state transfettate con il plasmide contenente il VWF in versione *wild-type* (*wt*) e con il plasmide contenete il VWF con la mutazione c.7055\_7081del (*mut*), utilizzando i seguenti rapporti tra le quantità di plasmide: 100% *wt* (omozigote *wild-type*); 75% *wt*:25% *mut*; 50% *wt*:50% *mut* (stato di eterozigosi); 25% *wt*:75% *mut*; 100% *mut* (omozigote per la mutazione)



**Figura 6.** espressione della mutazione c.7055\_7081del in cellule FUR4-BHK: effetto della mutazione sulla secrezione di VWF.

I dati ottenuti (Fig. 6) hanno dimostrato che la delezione interferisce con la sintesi del VWF: la mutazione agisce con un puro meccanismo di *loss-of-function* dell'allele mutato che si traduce nel dimezzamento dei livelli di VWF prodotti dalle cellule che mimano lo stato di eterozigosi. La capacità del VWF prodotto di legare il collagene risulta anch'essa ridotta al 50% circa, in linea con quanto rivelato dai test emostatici eseguiti sulla paziente. Non si ha alcuna produzione di VWF quando le cellule vengono transfettate con il solo plasmide pSVvWFA7055\_7081del. Il gene del VWF mutato, che potenzialmente produrrebbe una proteina aberrante priva di 9 amminoacidi, in realtà non garantisce alcun apporto alla produzione di VWF maturo e multimerizzato.

Alla luce dei dati ottenuti nello studio della famiglia A, si è successivamente deciso di rivalutare, con la medesima metodologia, anche altre sostituzioni sinonimo rilevate in famiglie o in individui singoli con VWD non geneticamente caratterizzata. Poiché le sostituzioni sinonimo con effetto patologico devono comunque essere poco frequenti nella popolazione, l'attenzione è stata focalizzata solo su quelle sostituzioni che risultassero rare (frequenza <1%) o assenti nella popolazione. Nella tabella a seguito sono state riportate le sostituzioni sinonimo a carico del gene del VWF che sono state identificate nel corso di altre analisi genetiche effettuate presso questo laboratorio (Tab. 9). Vengono inoltre riportati i dati riguardanti l'effetto delle sostituzioni sulla proteina matura e le loro frequenze nella popolazione, derivate da database quali UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) o Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) quando disponibili.

**Tabella 9.** Sostituzioni sinonimo rilevate nel gene del VWF

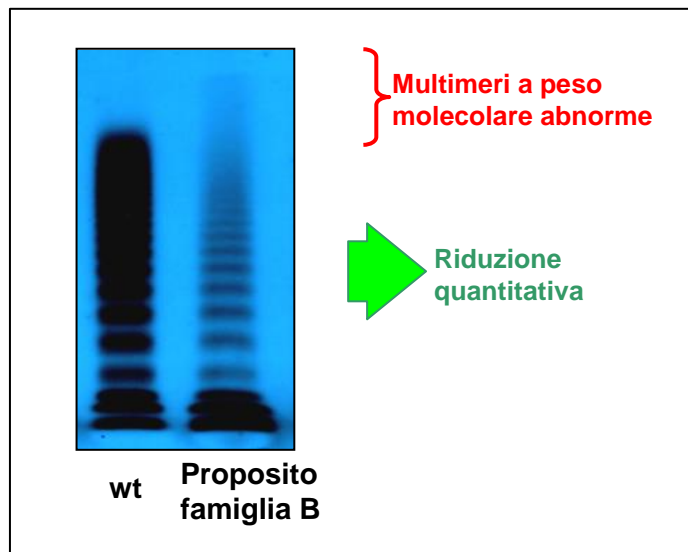
Sostituzione nucleotidica	Frequenza nella popolazione (%)	Sostituzione sinonima	Posizione (num. esone)	Effetto su VWF maturo
c.114C>T	0,1 %	p.Phe38=	3	Nessun Effetto
c.3390C>T	N.D.	p.Cys1130=	26	<i>Skipping</i> Esone 26 (Pagliari M. T. <i>et al.</i> , 2013)
c.3414C>T	N.D.	p.Asn1138=	26	Nessun Effetto (Pagliari M. T. <i>et al.</i> , 2013)
c.7056C>T	0,1 %	p.Gly2352=	41	Delezione 27 bp Esone 41
c.8079C>T	< 0,1 %	p.Cys2693=	49	In fase di Studio

N.D. = Non Disponibile

#### 4.2. Famiglia B: presenza di una larga delezione

Il proposito della famiglia B è giunto alla nostra osservazione dopo un singolo episodio emorragico, piuttosto severo, conseguente ad un intervento di estrazione dentaria. I test emostatici denotavano una marcata riduzione dei livelli di VWF:Ag (16,3 U/dL) e FVIII:C (25,9

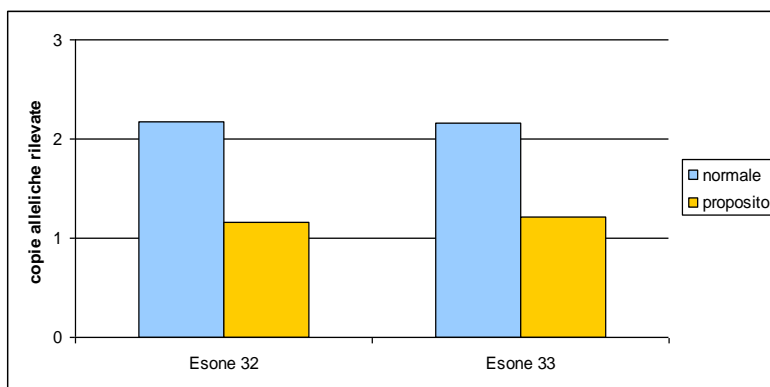
U/dL) associata ad una ancor più pronunciata riduzione del VWF:CB (8 U/dL) e ad un quadro multimerico profondamente alterato (Fig. 7).



**Figura 7.** comparazione del multimerico plasmatico del “pool” di controllo con quello del proposito della famiglia B: evidenze di differenze quantitative e qualitative.

L'analisi multimerica del VWF del paziente metteva in luce non solo un'importante riduzione quantitativa dei multimeri, ma anche la presenza di multimeri anomali a peso molecolare estremamente elevato assenti nel *pattern* del “pool” plasmatico di controllo. Il sequenziamento diretto del gene del VWF non ha evidenziato la presenza di mutazioni. È stata effettuata l'analisi di *linkage* con marcatori VNTR, che ha evidenziato come il proposito e la sorella, il primo affetto da VWD e la seconda con parametri emostatici normali, condividano in realtà identici alleli: questa condizione escludeva la co-segregazione tra VWD e VWF e di fatto negava lo stato di *linkage*. Ciononostante, la profonda alterazione multimerica rilevata ammetteva l'ipotesi di un evento mutazionale *de novo*, cioè della comparsa nel corredo genetico del proposito di un nuovo difetto genetico del VWF. Per valutare tale ipotesi, diversamente da quanto proposto nella *flow-chart*, è stato analizzato il mRNA del proposito. L'elettroforesi dei frammenti amplificati ha messo in luce che l'amplificazione del blocco numero 9, che include gli esoni compresi tra il 30 e il 36, presenta due bande: una ad altezza attesa di 1125 bp e una seconda ad altezza inferiore, circa 800 bp. Il successivo sequenziamento del frammento ha evidenziato un elettroferogramma con sdoppiamento del segnale dovuto ad una corposa delezione degli esoni 32-33-34 in stato di eterozigosi, per un totale di 387 nucleotidi. Risultava necessario capire se la variazione corrispondeva a una delezione nel DNA genomico o, piuttosto, a un difetto di *splicing* dovuto ad una mutazione di qualche sito regolativo situato nella profondità di un introne. Si è deciso di

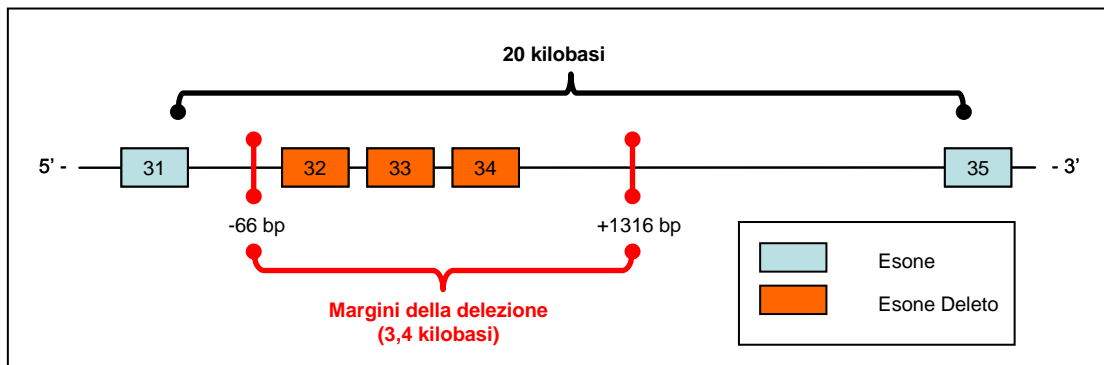
utilizzare una tecnica basata sulla Real-Time PCR (RT-PCR) per quantificare il numero di copie di un dato allele e quindi distinguere alleli presenti in doppia (corredo normale) o in singola copia (emizigosità dovuta a delezione). Sono state elaborate diverse coppie di *primers* per amplificare sequenze discrete (~100-200bp) appartenenti alla regione ipoteticamente deleta. La Real-Time PCR è stata realizzata sul genoma del proposito e su DNA genomico di controllo con 4 diverse coppie di *primers*, utilizzando una coppia per ciascuno degli esoni potenzialmente deleti, più una coppia a livello dell'introne 33. Il dato grezzo ottenuto è stato successivamente normalizzato in funzione dell'amplificazione del gene GPR4, utilizzato come riferimento interno. Come si evince nella figura sottostante (Fig. 8), la Real-Time PCR ha dimostrato la presenza di un singolo allele per gli esoni 32 e 33 del proposito: lo stato di emizigosi identificato conferma in maniera significativa che la delezione è presente non solo a livello di messaggero, ma anche di DNA genomico.



**Figura 8.** numero di copie alleliche degli esoni 32 e 33 derivato dal dato di fluorescenza in RT-PCR

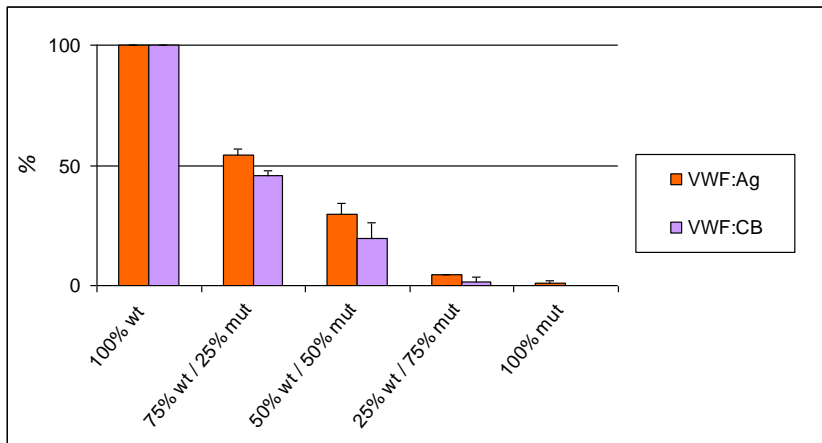
La Real-Time PCR definiva l'esistenza di una delezione degli esoni 32, 33 e 34 e degli introni compresi a livello genomico. La delezione si estendeva potenzialmente per diverse kilobasi di DNA genomico, da un minimo di 2 kb fino a circa 20 kb, qualora anche gli introni 31 e 34 fossero totalmente deleti. Al fine di evidenziare grossolanamente le dimensioni della delezione sono state allestite delle long-PCR, delle reazioni di PCR in grado di sintetizzare frammenti di DNA molto lunghi. Gli amplificati relativi al proposito, confrontati con quelli derivati dai controlli, hanno consentito di stabilire per la delezione una dimensione approssimativa di 3,5 kb. Quindi, è stato eseguito il sequenziamento della regione utilizzando *primer forward* a scalare, costruiti cioè sufficientemente distanti tra loro da coprire l'intera area deleta, ma contemporaneamente abbastanza vicini al *primer reverse* perché la reazione di amplificazione avvenisse facilmente. Con questa tecnica sono stati definiti con precisione i margini della delezione che misura 3411 bp, comincia nell'introne 31 a -66 bp a monte dall'esone 32 e termina

nell'introne 34 a +1316 bp a valle dell'esone 34 (Fig. 9). Secondo nomenclatura *standard*, la delezione ha la dicitura c.5456\_5842del.



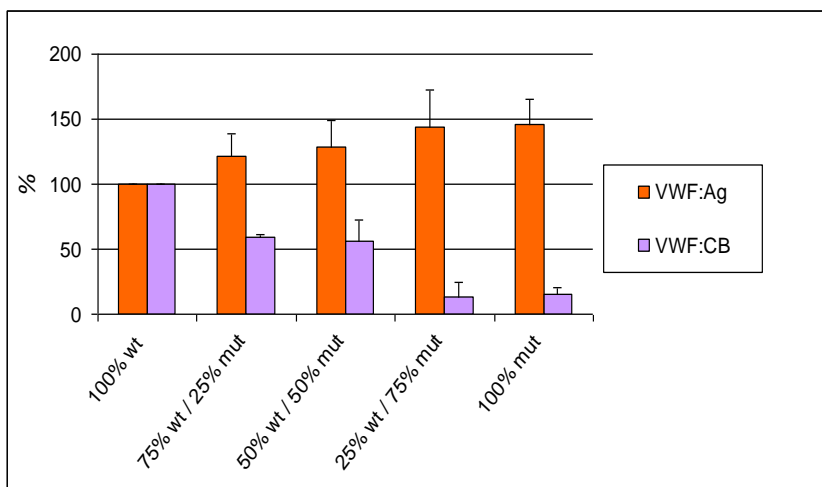
**Figura 9.** rappresentazione grafica della delezione genomica identificata

La mutazione identificata non altera il *frame* di lettura del messaggero e codifica per una proteina matura in cui sono assenti 129 amminoacidi appartenenti al dominio A3 del VWF (p.R1819\_C1948delinsS), che è noto per essere implicato nel legame del VWF con il collagene. La mutazione è stata rilevata in stato di eterozigosi solo nel proposito, mentre è assente in tutti i familiari: è stata pertanto confermata l'ipotesi iniziale di un evento mutazionale *de novo*. Il fatto che il probando, che presentava la grande delezione in eterozigosi ma nessuna altra mutazione, possedesse valori di VWF circolante inferiori al 20%, suggeriva che la mutazione potesse anche avere un carattere dominante, cioè che fosse capace di compromettere anche la funzionalità del VWF sintetizzato dall'allele sano. Questo effetto è stato valutato con l'espressione del mRNA contenente la delezione degli esoni 32-33-34 del gene del VWF inserito nel plasmide pSVvWFA (pSVvWFA 5456\_5842del). Il plasmide in questione è stato preparato con mutagenesi mediata da *primers* specifici e trasformazione batterica in ceppo E. coli Ag1. Lo studio è stato effettuato transfettando cellule appartenenti alla linea stabilizzata HEK293T. Per evidenziare l'eventuale carattere dominante negativo della mutazione, in entrambe le serie di esperimenti si è provveduto a variare il rapporto tra plasmide *wild-type* (*wt*) e plasmide mutato 5456\_5842del (*mut*). Sono stati valutati i seguenti rapporti: 100% *wt* (omozigote *wild-type*); 75% *wt*:25% *mut*; 50% *wt*:50% *mut* (stato di eterozigosi); 25% *wt*:75% *mut*; 100% *mut* (omozigote per la mutazione); con questo espediente è stato possibile considerare l'impatto della mutazione sul VWF *wild-type* in funzione dell'aumento di VWF mutato prodotto. I risultati sono riportati a seguito (Fig. 10).



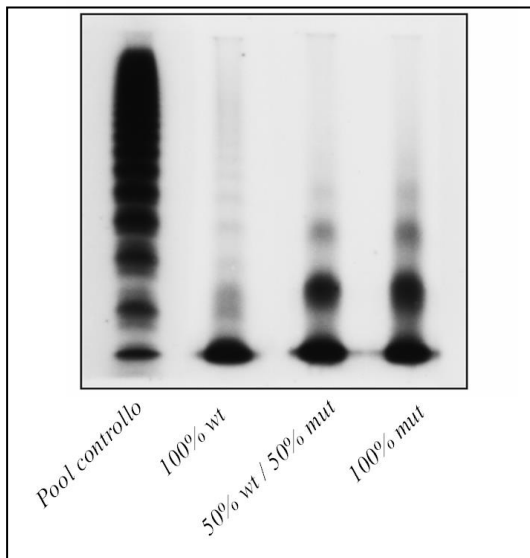
**Figura 10.** espressione della mutazione *c.5456\_5842del* in cellule HEK293T: dimostrazione dell'effetto dominante negativo della mutazione sulla secrezione di VWF.

Il risultato ottenuto ha evidenziato che, se il rapporto tra plasmide *wild-type* e plasmide *5456\_5842del* si spostava a favore del secondo termine, la secrezione di VWF da parte delle cellule diminuiva. La riduzione non era progressiva: nella situazione che mima lo stato di eterozigosi, in cui entrambi gli alleli forniscono eguale apporto alla produzione di VWF, la secrezione residua della proteina risultava attorno al 20-30%, in analogia a quanto già era stato evidenziato nel paziente *in vivo*. Ad un aumento ulteriore della frazione di plasmide mutagenizzato, la secrezione risultava pressoché annullata. Un simile *trend*, ma ulteriormente accentuato, era evidente anche nella capacità del VWF di legare il collagene, dato che suggeriva la presenza di un difetto funzionale, oltre che quantitativo. È stata valutata anche la presenza di VWF intracellulare (Fig. 11).



**Figura 11.** espressione della mutazione *c.5456\_5842del* in cellule HEK293T: dimostrazione dell'accumulo intracellulare di VWF.

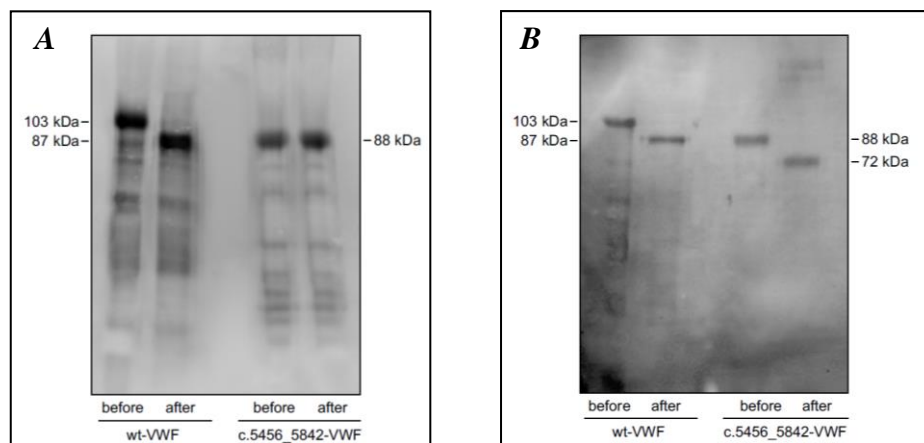
Il dosaggio eseguito ha segnalato la presenza di una quantità crescente di VWF all'interno delle cellule, in risposta all'aumento della frazione di plasmide 5456\_5842del. A questo accumulo però non corrispondeva un aumento della capacità della molecola di legare il collagene, ma anzi i valori di VWF:CB venivano abbattuti rapidamente ed erano quasi assenti quando la frazione di plasmide 5456\_5842del diveniva preponderante. Successivamente è stata compiuta l'analisi dei multimeri del VWF intracellulare (Fig. 12)



**Figura 12.** Analisi multimerica del contenuto intracellulare di VWF in cellule HEK293T transfettate.

L'analisi multimerica confermava visivamente l'accumulo di VWF mutato all'interno delle cellule; inoltre, accertava la presenza degli oligomeri anche nelle cellule transfettate col solo plasmide 5456\_5842del (100% *mut*), dimostrando che il VWF mutato conserva sia la capacità di dimerizzare che di multimerizzare. In definitiva, si dimostrava un effetto dominante negativo della mutazione sulla secrezione del VWF dovuto al fatto che il VWF mutato, mantenendo la capacità di interagire con la proteina *wild-type* prodotta dall'allele normale, ne impedisce la normale secrezione. Inoltre, è stato dimostrato che la mutazione interagiva negativamente sulla capacità del VWF di legare il collagene. Chiariti gli aspetti relativi alla riduzione della produzione proteica e alla funzionalità, l'indagine è stata focalizzata sulla presenza dei multimeri ad altissimo peso molecolare nel plasma del probando. È stata formulata l'ipotesi che la mutazione conferisca al VWF una sorta di "resistenza" alla metalloproteasi ADAMTS13, la cui funzione *in vivo* è quella di tagliare il VWF in posizione Tyr1605-Met1606. A sostegno di questa ipotesi, recentemente è stata identificata una mutazione (p.C2362F) che rende il VWF resistente all'azione di ADAMTS13: anche in questo caso l'analisi multimerica mostrava la presenza di multimeri a peso molecolare troppo elevato (Casonato A. *et al.*, 2013). Per studiare questo fenomeno, si è prodotto in un sistema batterico un frammento proteico contenente i domini

funzionali della molecola di VWF coinvolti nell'interazione con ADAMTS13. Il frammento si estendeva dall'aminoacido 1480 al 2399 e corrispondeva ai domini A2 - A3 - D4 - B1 - B2 - B3 (A2-B3 *wild-type*) della molecola di VWF (Sadler, J. E. *et al.*, 2006). Parallelamente al frammento A2-B3 *wild-type*, è stato sintetizzato anche il frammento esprime la mutazione identificata nella famiglia B (A2-B3 5456\_5842del). I frammenti ricombinanti *wild-type* e mutato sono stati sottoposti a proteolisi in vitro mediata da ADAMTS13 ricombinante. L'effetto della proteolisi sui frammenti è stato evidenziato con SDS-PAGE in poliacrilammide e successivo *western-blot* (Fig. 13 A e B).



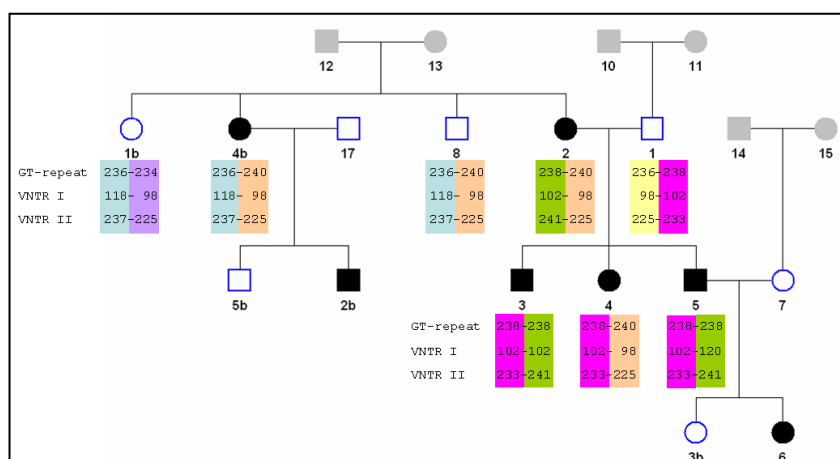
**Figura 13.** A) frammenti A2-B3 wt e mutato proteolizzati ad con ADAMTS13 in western-blot; B) frammenti A2-B3 wt e mutato proteolizzati con ADAMTS13 in western-blot post-trattamento 8M urea

Il *western-blot* evidenziava come il frammento A2-B3 5456\_5842del di 88 kDa non fosse proteolizzato ADAMTS13, rimanendo assolutamente invariato prima e dopo il trattamento di proteolisi (Fig. 13 A). Invece, come era atteso, il frammento A2-B3 *wild-type* di 103 kDa risultava tagliato in due frammenti più leggeri, dei quali era visibile solamente il maggiore, di circa 87 kDa. Il frammento inferiore, a causa delle dimensioni esigue, veniva perso durante la migrazione. Questo risultato dimostrava chiaramente che la mutazione conferiva al VWF la resistenza all'azione proteolitica di ADAMTS13. Sono stati successivamente compiuti ulteriori esperimenti di proteolisi, utilizzando come substrato i frammenti A2-B3 precedentemente denaturati con Urea 8 M (Fig. 13 B). In questo caso ADAMTS13 operava efficacemente anche la proteolisi del frammento A2-B3 5456\_5842del, che veniva tagliato in due frammenti più leggeri, di cui era ben visibile quello a peso molecolare più elevato, di circa 72 kDa. Tale prova suggeriva che la resistenza alla proteolisi del frammento A2-B3 5456\_5842del era una conseguenza diretta del *fold*ing anomalo assunto dal frammento ricombinante.



### 4.3. Famiglia C: fenotipo 2N-like

Diversi membri appartenenti alla Famiglia C presentavano un deficit emostatico caratterizzato da sanguinamento mucoso-cutaneo di moderata gravità. Gli individui affetti erano presenti in tutte le generazioni indipendentemente dal sesso, suggerendo un difetto genetico a trasmissione autosomica dominante. Tutti gli individui affetti presentavano un valore del rapporto FVIII/VWF:Ag ridotto ( $\sim 0,5$ , valore normale  $0,8 - 1,2$ ), che identifica la variante 2N di VWD (10). Diversamente dalla tipica VWD di tipo 2N, il valore di *binding* del VWF al FVIII risultava nella norma (Tab. 8). Dopo il sequenziamento del gene del VWF è stato compiuto anche il sequenziamento del gene F8, che codifica per il FVIII, ma in entrambi i casi non era stata rilevata alcuna mutazione. Al fine di valutare l'eventuale interessamento del gene del VWF in questa forma di VWD è stata eseguita un'analisi di *linkage* mediante marcatori VNTR interni al gene del VWF. Questa analisi, ha definito che il gene VWF non segregava con la malattia (Fig. 14), escludendo di fatto l'implicazione del gene del VWF.



**Figura 14.** Analisi di linkage mediante marcatori VNTR del VWF: l'analisi dimostra assenza di co-segregazione tra VWD e VWF, infatti non esiste alcun aplotipo che sia comune a tutti gli affetti e assente nei sani

In maniera analoga, utilizzando specifici marcatori VNTR situati in posizione telomerica del braccio lungo del cromosoma X, è stato studiato lo stato di *linkage* tra gene F8 e malattia. In questo caso l'analisi effettuata non ha permesso di escludere il *linkage* con il F8. Al fine di verificare il coinvolgimento del gene F8, è stato quindi analizzato il relativo mRNA estratto da piastrine. Una volta retrotrascritto in cDNA, l'intero messaggero del FVIII, suddiviso in 13 ampliconi, è stato amplificato mediante PCR e sequenziato. Non sono state individuate variazioni o alterazioni dello *splicing* genico. Quindi, in questa prima fase di studio, non sono state evidenziate mutazioni a carico di VWF, di cui si è anche escluso lo stato di *linkage*, o di F8. Inoltre, il modello di ereditarietà dominante autosomica evidenziato suggeriva l'estraneità del gene F8 che, se mutato, è responsabile di emofilia A, patologia con ereditarietà *X-linked*

recessiva. Seguendo la *flow-chart* diagnostica proposta, lo studio è stato quindi esteso a tutto il genoma per identificare un nuovo *locus* coinvolto nella malattia. Questo studio utilizzava due strategie in parallelo: il sequenziamento dell'intero genoma del proposito mediante sistema SOLiD™ e l'analisi di *linkage* familiare *genome-wide* con *array* di SNPs. Il sequenziamento genomico viene utilizzato al fine di identificare tutte le variazioni presenti nel genoma dell'individuo analizzato, che di norma sono dell'ordine di alcune decine di migliaia, ed è dunque evidente la necessità di uno strumento che consenta la gestione di tale dato. Nel tentativo di circoscrivere il campo d'azione ad un numero limitato di mutazioni, è possibile utilizzare in parallelo l'analisi di *linkage genome-wide*: tale metodica evidenzia le regioni cromosomiche che co-segregano con la patologia all'interno di un nucleo familiare, nelle quali è quindi contenuto il gene causativo. Le due strategie sono state applicate alla Famiglia C: l'analisi di *linkage genome-wide*, effettuata con *array* di SNPs sull'intero nucleo familiare, ha definito 4 regioni distinte in *linkage* con la malattia situate sui cromosomi 5, 7, 15 e X, escludendo circa il 95% del genoma da successive analisi; il sequenziamento del probando, invece, se da un lato ha identificato circa 30.000 variazioni interdisperse nel genoma rilevate con il *software Human Genome Variation*, dall'altro ha mostrato un *coverage* inadeguato, talvolta nullo, in diverse regioni cromosomiche, nonostante un *coverage* medio ~20X. Conseguentemente, le variazioni identificate erano in realtà una sottostima delle variazioni realmente presenti sul DNA genomico del proposito. Nonostante l'incompletezza del sequenziamento, si è deciso di proseguire l'indagine nei geni che hanno ottenuto una copertura esaustiva. I geni contenuti nelle regioni di *linkage* sono in tutto 396: per il 23,5% di questi (93/396) il *coverage* è stato ritenuto non affidabile e tali geni sono stati momentaneamente esclusi da successive analisi. L'interpolazione del dato del *linkage genome-wide* con il dato del sequenziamento ha definito un insieme di circa 900 variazioni distribuite in 303 geni delle regioni di *linkage* con *coverage* adeguato. Le variazioni identificate sono state caratterizzate nel database di polimorfismi dbSNP: ~88% delle variazioni erano già state descritte come polimorfismi frequenti nella popolazione, mentre per il rimanente 12% (109 variazioni) non erano presenti informazioni oppure la frequenza della popolazione era troppo bassa (<2%) per escludere un potenziale effetto patologico. Il numero di variazioni, per quanto limitato, rimaneva comunque elevato. Quindi si è deciso di valutare il ruolo dei geni con l'approccio classico del "gene candidato": i 303 geni appartenenti alle regioni di *linkage* sono stati caratterizzati sulla base delle informazioni disponibili in letteratura e nei database di riferimento al fine di definire un sottogruppo di geni potenzialmente associati alla malattia in questione. Le caratteristiche salienti che sono state valutate sono le seguenti:

- interazione, diretta o indiretta, del prodotto genico con FVIII o VWF

- proteina sintetizzata a livello epatico o in cellule endoteliali
- presenza nel circolo ematico
- proteine che intervengono durante sintesi (es. fattori di trascrizione) o processi di maturazione (es. *folding*, solfatazione, glicosilazione) di FVIII o VWF
- presenza di domini funzionali in comune con FVIII o VWF

Sono stati selezionati 10 geni candidati:

- SCAMP1: Secretory Carrier Membrane Protein 1 (chr5:77,656,339-77,776,562) *carrier* implicato nel trasporto di proteine dall'apparato di Golgi verso le membrana plasmatica; sintetizzata nel fegato
- THBS4: Thrombospondin 4 (chr5:79,331,170-79,379,107) proteina plasmatica, membro della famiglia delle trombospondine, già associate a meccanismi emostatici; interagisce con cellule endoteliali
- DLL4: Delta-Like 4 (chr15:41,221,531-41,231,258) ligando di Notch, recettore che regola diversi processi cellulari; l'espressione di DLL4 è ristretta alle sole cellule endoteliali
- VPS39: Vacuolar Protein Sorting 39 Homolog (chr15:42,450,899-42,500,502) proteina coinvolta nel *trafficking* vescicolare e nel *sorting* di proteine; espressione in fegato
- SNAP23: Synaptosomal-Associated Protein, 23kDa (chr15:42,787,504-42,825,259) proteina implicata nel processo di *trafficking* e nell'interazione vescicola membrana, in particolare in fase di ancoraggio/fusione; espressione elevata in fegato e cellule del sangue
- PRRG3: Proline Rich Gla (G-Carboxyglutamic Acid) 3 (chrX:150,863,730-150,870,063) proteina vitamina K-dipendente, contiene dominio GLA presente in altri fattori della coagulazione; espresso anche da fegato
- ATP2B3: (chrX:152,801,580-152,848,387) scambiatore per ioni  $Ca^{++}$  di membrana, possibile ruolo in aggregazione e attivazione piastrinica;
- AVPR2: Arginine Vasopressin Receptor 2 (chrX:153,170,529-153,172,620) recettore di tipo 2 per la vasopressina; quando interagisce con vasopressina stimola il rilascio di diversi fattori della coagulazione; alcune varianti sono associate a valori di VWF e FVIII alterati
- *F8: Coagulation Factor VIII (chrX:154,064,064-154,250,998) fattore delle coagulazione. Difetti di questo gene causano Emofilia A, malattia recessiva a trasmissione X-linked*
- VAMP7: Vesicle-Associated Membrane Protein 7 (chrX:155,110,943-155,173,433) proteina transmembrana coinvolta nel trasporto e nel processo di fusione vescicolare; espressa in fegato e componenti cellulari del sangue

Se presenti, sono state valutate le variazioni a carico di questi geni. Eliminati i polimorfismi noti e frequenti nella popolazione, sono state identificate 15 diverse variazioni, tutte introniche, così distribuite:

- SCAMP1  
Chr5:77,696,631 rs62362623 c.135+11893T>C in eterozigosi  
Chr5:77,701,845 c.136-9499G>A in eterozigosi  
Chr5:77,710,495 rs115245256 c.136-849A>T in eterozigosi  
Chr5:77,743,614 rs62364295 c.633-2143T>C in eterozigosi
- THBS4:  
Chr5:79,331,625 c.88+177C>A in eterozigosi  
Chr5:79,344,694 c.293-6914C>T in eterozigosi
- VPS39:  
Chr15:42,470,336 rs142302634 c.960+80T>C in eterozigosi
- SNAP23:  
Chr15:42,791,649 c.1-12396G>T in eterozigosi
- ATP2B3:  
ChrX:152,803,700 c.208+1787G>A in emizigosi  
ChrX:152,823,342 rs78190480 c.2434-228C>G in emizigosi
- VAMP7 (*porzione pseudo-autosomica*):  
ChrX:155,116,163 rs149870137 c.-9-2958T>C in eterozigosi  
ChrX:155,116,567 rs370690721 c.-9-2553delA in eterozigosi  
ChrX:155,116,574 rs2376579 c.-9-2547C>T in eterozigosi  
ChrX:155,116,579 rs5904414 c.-9-2542\_-9-2541insT in eterozigosi  
ChrX:155,151,082 rs141204141 c.501+1538T>C in eterozigosi

Non sono state individuate variazioni a carico della porzione codificante dei geni candidati. In particolare, il sequenziamento SOLiD<sup>TM</sup> confermava ulteriormente l'assenza di mutazioni nel gene F8, già escluso precedentemente con sequenziamento del DNA genomico e del mRNA. Le variazioni introniche contraddistinte con l'identificativo "rs" sono già state descritte ma evidenziavano una frequenza nella popolazione generale inferiore al 2%. Le variazioni sono state valutate con il *software* Alamut 1.5.1 per predire eventuali *splicing* aberranti, ma non sono state evidenziate alterazioni potenzialmente significative dello *splicing* genico. In questa prima parte dello studio, il sequenziamento SOLiD<sup>TM</sup> ha identificato solo polimorfismi privi di significato patologico a carico dei geni candidati con *coverage* adeguato. L'indagine dovrà essere estesa ad

altri geni presenti nelle regioni di *linkage*. Anche nel caso dei geni con *coverage* insufficiente è stato effettuata una ricerca per geni candidati, utilizzando gli stessi criteri già descritti in questo paragrafo. Tra i 93 geni considerati ne sono stati individuati 4 particolarmente interessanti:

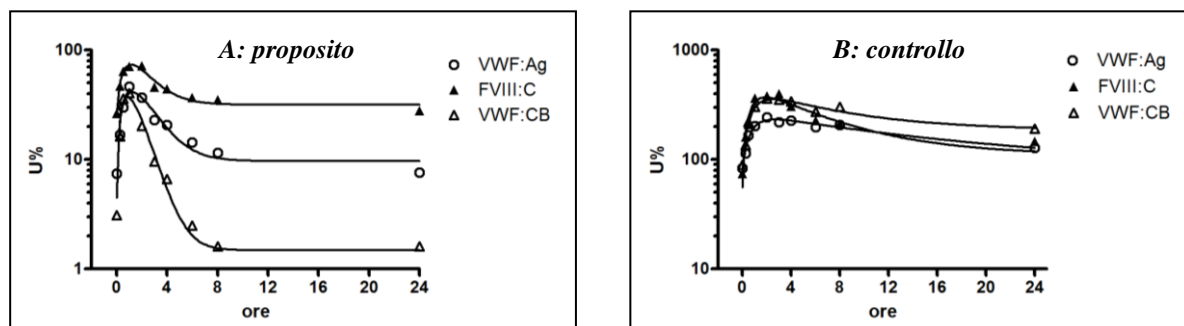
- VPS18: Vacuolar Protein Sorting 18 Homolog (chr15:41,186,628-41,196,173) proteina implicata nel trasporto vescicolare e nel *sorting* di proteine;
- PDIA3: Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 3 (chr15:44,038,590-44,064,804) proteina del reticolo endoplasmatico con funzione di disulfide isomerasi; interagisce con calreticulina e calnexina, già coinvolte nel processo di maturazione del FVIII
- NAA10: N(Alpha)-Acetyltransferase 10 (chrX:153,195,280-153,200,607) subunità di un complesso proteico che opera modifiche post-traduzionali ed è implicato nel processo di maturazione delle proteine
- HCFC1: Host Cell Factor C1 (chrX:153,213,008-153,236,819) fattore attivatore della trascrizione; presente a livello epatico

Il gene PDIA3 (Protein Disulfide-Isomerase A3) rappresentava il miglior candidato, non solo tra i tre geni appena descritti, ma in generale tra tutti i 396 geni inclusi nelle regioni di *linkage*. PDIA3 codifica per una proteina potenzialmente implicata nel processo di maturazione e *folding* del FVIII stesso. Il *coverage* relativo a questo gene era lacunoso e, dato il forte interesse per il gene, si è deciso di effettuare il sequenziamento Sanger del cDNA del proposito, così da valutare eventuali sostituzioni o difetti di *splicing*. Il sequenziamento di PDIA3 non ha rivelato mutazioni, solo la presenza di alcuni polimorfismi noti e frequenti (rs2411284 T in omozigosi, rs1053492 T in omozigosi, rs3087657 A in omozigosi, rs118162479 A/G in eterozigosi), quindi il coinvolgimento del gene PDIA3 nella malattia è stato escluso. Gli altri geni candidati, VPS18, NAA10 e HFC1, dovranno essere nuovamente sequenziati con metodo di Sanger. In alternativa, potrebbero essere utilizzate strategie di sequenziamento massivo, al fine di completare l'analisi delle regioni di *linkage*.

#### **4.4. Famiglia D: fenotipo *Vicenza-like***

Il probando della famiglia D ha sofferto di numerosi eventi emorragici. Reiterati test emostatici hanno evidenziato un'importante riduzione del VWF (VWF:Ag 8,6 U/dL), accompagnata da riduzione di tutti i parametri funzionali della molecola (VWF:CBA 3,4 U/dL, VWF:RCo <3,125 U/dL, VWF:FVIII BA 7,2 U/dL, Tab. 1). Tuttavia i livelli di VWF intrapiastrinico risultavano essere normali. Il probando era stato sottoposto a test di stimolo con desmopressina (DDAVP),

un analogo sintetico della vasopressina che induce il rilascio di VWF nelle cellule endoteliali, il quale aveva dimostrato un'importante riduzione dell'emivita di VWF ( $T_{1/2el} = 0,87$  h) dovuto ad una *clearance* notevolmente aumentata ( $CL = 31,78$  mL/kg/h) (Fig. 15; Tab. 10).



**Figura 15.** Curve di sopravvivenza dopo test di stimolo con DDAVP: A) proposito famiglia D; B) individuo normale di controllo

**Tabella 10.** Risultato del test di stimolo con DDAVP del proposito della Famiglia D

	VWF:Ag (U/dL)		VWF:CB (U/dL)		FVIII (U/dL)	
	Proposito	Range di norma	Proposito	Range di norma	Proposito	Range di norma
$T_{1/2el}$ (h)	0,87	$25,5 \pm 5,3$	0,63	$20,9 \pm 4,5$	0,89	$10,5 \pm 3,0$
Q (U/kg)	31,80	$53,0 \pm 4,2$	36,00	$68,5 \pm 6,3$	39,70	$97,5 \pm 7,1$
CL (mL/kg/h)	31,78	$1,6 \pm 0,2$	44,24	$2,0 \pm 0,2$	31,30	$4,6 \pm 0,6$
Vre (U/kg/h)	2,35	$129,6 \pm 27,9$	1,37	$157,5 \pm 37,0$	8,29	$311,0 \pm 3,0$

L'insieme di questi dati deponeva a favore di una forma VWD definita "tipo Vicenza" (Schneppenheim, R. *et al.*, 2000). Tuttavia, l'analisi multimerica del VWF circolante evidenziava una riduzione di tutti i multimeri ma assenza di multimeri a peso molecolare superiore alla norma, caratteristici del "tipo Vicenza". Il sequenziamento del gene del VWF non aveva evidenziato la mutazione associata a questa forma di VWD, né altre mutazioni, quindi il difetto veniva identificato come "tipo Vicenza-like". Ulteriori informazioni sono state fornite dall'infusione di VWF esogeno emoderivato. Sono stati utilizzati due prodotti diversi: Wilfactin® (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, Courtabœuf Cedex, Francia) ed Haemate P® (CSL Behring GmbH, Marburg, Germania). Per entrambi i dosaggi effettuati denotavano un'emivita ridotta e una *clearance* accelerata, in maniera simile e sovrapponibile a quanto già osservato per il VWF endogeno nel test con desmopressina. I dati sono riportati nella tabella a seguito (Tab. 11)

**Tabella 11 . emivita e clearance di Haemate P<sup>®</sup> e Wilfactin<sup>®</sup> infusi nel paziente**

		<b>VWF:Ag (U/dL)</b>	<b>VWF:CB (U/dL)</b>	<b>FVIII (U/dL)</b>
Haemate P <sup>®</sup>	T <sub>1/2</sub> el (h)	1,06	0,47	0,89
	CL (mL/kg/h)	26,12	58,92	31,21
Wilfactin <sup>®</sup>	T <sub>1/2</sub> el (h)	0,44	N.D.	N.D.
	CL (mL/kg/h)	62,36	N.D.	N.D.

In base ai dati ottenuti è stato escluso il coinvolgimento del VWF nella rapida scomparsa del VWF. Sono state vagliate due differenti ipotesi: un'azione anomala della proteasi ADAMTS13, responsabile fisiologica della degradazione dei multimeri ad alto peso molecolare; oppure, un quadro di malattia autoimmune con presenza di autoanticorpi diretti contro il VWF nel plasma del paziente. Per studiare la prima ipotesi, il gene ADAMTS13 è stato completamente sequenziato: non sono state identificate mutazioni, quindi è stato escluso il coinvolgimento del gene ADAMTS13 nella patologia. Passando alla seconda ipotesi, è stata ricercata nel plasma del paziente la presenza di anticorpi anti-VWF che determinino la rapida rimozione del VWF dal circolo ematico. Il saggio immunoenzimatico effettuato ha evidenziato valori di assorbanza non differenti da quelli ottenuti dai controlli negativi, non sono quindi presenti anticorpi anti-VWF nel plasma del paziente.

## 5. Discussione

Questo progetto si prefigge di caratterizzare dal punto di vista molecolare forme di VWD apparentemente non associate a mutazioni nel gene VWF. La VWD è in assoluto il difetto della emostasi più frequentemente nella popolazione generale, con una prevalenza di 1 affetto ogni 100 individui. Lo spettro fenotipico della VWD è estremamente ampio: comprende sia forme di VWD di grado lieve, tipiche della VWD di tipo 1, in cui l'individuo affetto manifesta disturbi emorragici trascurabili, sia forme di VWD estremamente severe, come la VWD di tipo 3, caratterizzata da eventi emorragici interni ed esterni gravi e potenzialmente letali. Nella maggior parte dei casi, e soprattutto per le forme di VWD di tipo 2 e 3, è possibile evidenziare la causa della malattia in un difetto genetico a carico del gene VWF. Tuttavia, è noto che le tecniche di sequenziamento comunemente utilizzate non sono in grado di evidenziare mutazioni nel gene VWF in almeno il 25-30 % dei casi di VWD, in particolare nei casi di VWD di tipo 1. Per spiegare questo fenomeno si possono formulare due ipotesi: a) la mutazione causativa è comunque a carico del gene VWF ma la tecnica di sequenziamento standard, che prevede l'analisi di esoni, *splicing sites* e UTR, ha limiti intrinseci che non ne consentono l'identificazione; b) la mutazione non è situata nel gene VWF, ma è a carico di un gene differente e sconosciuto. Con il fine di investigare entrambe le ipotesi, in questo progetto è stata elaborata una *flow-chart* diagnostica in cui lo snodo principale è costituito dall'analisi di *linkage* effettuata con marcatori VNTR situati all'interno del gene VWF. La valutazione dello stato del *linkage* tra gene VWF e VWD permette di escludere o meno il coinvolgimento del gene VWF e quindi funge da "ago della bilancia" che distingue i casi in cui l'analisi del gene VWF deve essere ulteriormente approfondita da quelli in cui lo studio del VWF deve essere tralasciato per focalizzare l'attenzione su una causa diversa. Una volta operata questa prima scelta, la *flow-chart* suggerisce quali possano essere le strategie da adottare per identificare la mutazione causativa: nel caso di positività del *linkage*, il gene VWF può essere ulteriormente indagato mediante l'utilizzo di diverse metodiche, come l'analisi del mRNA e o la Real-Time PCR; invece, quando il risultato del *linkage* sia negativo, potrebbe essere necessario utilizzare strategie più complesse di sequenziamento massivo o di *linkage genome-wide*, che consentano di individuare nuove mutazioni o geni candidati. All'inizio di questo lavoro sono state reclutate 20 famiglie non correlate tra loro, affette da varie forme di VWD e nelle quali il sequenziamento *standard* del gene VWF non aveva permesso di identificare mutazioni causative. Per 15 di queste famiglie il fenotipo era stato descritto, almeno inizialmente, come un difetto quantitativo puro, dunque erano ascrivibili alla VWD di tipo 1; le rimanenti 5 famiglie manifestavano, invece, difetti funzionali della molecola, quindi rientravano nella VWD di tipo 2. Da questo insieme di



partenza si è compiuta una prima cernita, eliminando le famiglie con fenotipi poco chiari, quelle con dati emostatici lacunosi o insufficienti, quelle composte da un numero insufficiente di individui e quelle i cui membri erano difficilmente reperibili per diverse ragioni. In questo lavoro sono riportati i dati relativi a 4 famiglie, 2 caratterizzate da VWD tipo 1 e 2 famiglie con VWD tipo 2. Su 3 di queste è stata condotta l'analisi di *linkage* utilizzando marcatori VNTR intragenici al VWF. L'esito dell'analisi è stato positivo in una famiglia (famiglia A) e negativo nelle altre due (Famiglia B, C). La quarta famiglia, essendo composta da due soli individui, non è stata sottoposta ad analisi di *linkage* (Famiglia D).

Nella prima famiglia studiata, denominata "Famiglia A", la VWD e gene del VWF co-segregano. Il difetto identificato negli individui affetti della famiglia è una moderata riduzione del VWF circolante che causa una VWD di tipo 1 di grado lieve. La trasmissione della malattia nella famiglia è evidentemente di tipo dominante, con 3 individui affetti di sesso femminile (probando, madre e nonna materna) appartenenti a 3 generazioni differenti. L'utilizzo di marcatori VNTR ha evidenziato che VWD e gene VWF sono in *linkage* perfetto. La positività del *linkage* indica che il difetto genetico è molto probabilmente a carico del gene VWF, ma che non è possibile identificarlo per limiti intrinseci delle tecniche di sequenziamento *standard*. Si è quindi deciso di ricorrere all'esame del RNA messaggero del VWF, tecnica che permette di evidenziare eventuali *splicing* anomali. È noto che il gene VWF è trascritto con alta efficienza solamente in 2 tipi cellulari, le cellule endoteliali e i megacariociti, ma isolarne un numero tale da compiere un'estrazione di RNA messaggero totale sarebbe estremamente complesso. Tuttavia, è possibile recuperare il mRNA totale a partire dalle piastrine, che derivano dalla "frammentazione" dei megacariociti. A partire da un consistente prelievo di sangue periferico (~20-30 mL), è stato possibile isolare una quantità sufficiente di mRNA del probando, circa 2-3 µg, che poi è stato retrotrascritto in cDNA e l'intero cDNA del gene VWF è stato amplificato e sequenziato. Con il sequenziamento è stato possibile identificare una delezione di 27 nucleotidi in eterozigosi, risultato di un difetto di *splicing* a livello dell'esone 41. Utilizzando il *software* di predizione di *splicing*, Alamut 1.5.1, è stato possibile evidenziare che la delezione era causata dalla presenza di una sostituzione sinonimo, c.7056C>T, situata nell'esone 41: questa sostituzione, precedentemente descritta come polimorfismo privo di significato patologico perché non altera l'amminoacido codificato, è in realtà una mutazione che interferisce con il normale *splicing* del mRNA di VWF. In particolare, la mutazione genera un nuovo sito GT donatore di *splicing*, che risulta essere riconosciuto più efficacemente del sito di *splicing wild-type*. Una volta definita la mutazione, ne è stato studiato l'effetto patologico mediante

espressione della proteina mutata in cellule BHK. La mutazione manifesta un tipico meccanismo di *loss-of-function*, in cui l'allele mutato non fornisce alcun apporto alla sintesi di VWF. Tuttavia, la compresenza dell'allele *wild-type* garantisce comunque una sintesi vicina al 50% di VWF maturo perfettamente funzionante e correttamente multimerizzato. I risultati degli esperimenti in linea cellulare riflettono quanto osservato *in vivo* nel probando della famiglia A, che ha valori di VWF circolante dimezzati (VWF:Ag 41,7 U/dL) ma parametri funzionali della molecola perfettamente normali (VWF:RCo ratio 0,9; VWF:CB ratio 1,0). Il lavoro effettuato su questa famiglia sottolinea un problema rilevante nella diagnosi genetica della VWD e delle malattie congenite in generale: l'interpretazione delle sostituzioni sinonimo. Durante l'analisi genetica di un qualsiasi gene spesso si identificano sostituzioni che non alterano l'amminoacido codificato e alle quali è difficile attribuire una rilevanza clinica. Di solito, tali sostituzioni sinonimo sono piuttosto frequenti nella popolazione generale, quindi vengono facilmente rilevate e catalogate come semplici polimorfismi. Tuttavia, durante l'analisi di un gene si possono anche evidenziare sostituzioni sinonimo estremamente rare o addirittura mai identificate. In questo caso, l'unica strategia possibile per caratterizzarne l'effetto patologico attualmente disponibile è lo studio del mRNA. È doveroso sottolineare che questa strategia ha un limite rilevante: può essere applicata solo se si dispone del tessuto in cui il gene di interesse è trascritto, dal quale poi si estrae il mRNA totale. Nel caso della VWD, fortunatamente, il mRNA può essere ottenuto dalle piastrine circolanti del sangue periferico. Una strategia alternativa per l'interpretazione dell'effetto delle sostituzioni sinonimo è l'utilizzo di appositi *software* di predizione di *splicing* ed elementi regolativi. In questo lavoro è stato utilizzato il programma Alamut 1.5.1, e *on-line* sono disponibili numerosi programmi con funzioni simili. Tali programmi possono essere utili ma spesso risultano insufficienti, dal momento che i meccanismi di *splicing* e di regolazione genica sono stati caratterizzati solo parzialmente. Al fine di ottenere un'analisi più completa e verosimile è consigliabile utilizzare contemporaneamente diversi programmi, ma il risultato, se non corredato da ulteriori dimostrazioni di altro tipo, non è sufficientemente affidabile. A conclusione della prima parte del lavoro svolto, si è deciso di studiare il ruolo di altre sostituzioni sinonimo con l'analisi del mRNA del gene VWF. Le sostituzioni erano state precedentemente rilevate durante la diagnosi genetica di VWD di altri individui e risultavano essere molto rare o assenti nella popolazione. Due di queste sostituzioni (c.114C>T; c.3414C>T) non causano VWD, nonostante in un caso (c.3414C>T) il *software* utilizzato avesse previsto uno *splicing* anomalo; invece, la sostituzione c.3390C>T causa lo *skipping* dell'intero esone 26 del gene VWF, perturbando profondamente la maturazione del messaggero. Queste evidenze sottolineano ulteriormente la necessità di elaborare un valido strumento che consenta di qualificare la

sostituzione sinonimo come polimorfismo o mutazione. Probabilmente il rapido sviluppo del sequenziamento massivo e l'enorme mole di dati genomici ed esomici pubblicati permetteranno in futuro di catalogare la quasi totalità delle sostituzioni nucleotidiche della popolazione e di attribuire con certezza assoluta l'eventuale effetto patologico.

L'analisi del mRNA si è rivelata utile anche nel caso della forma di VWD della "Famiglia B". In questo caso, il proposito era giunto alla nostra attenzione in seguito ad un singolo ma importante evento emorragico causato da un'estrazione dentaria. I test emostatici evidenziavano una considerevole riduzione del VWF circolante, associata ad un difetto funzionale di legame al collagene e ad un quadro multimerico peculiare, con una generale riduzione quantitativa dei multimeri e presenza di forme anomale ad altissimo peso molecolare. Il sequenziamento *standard* non ha evidenziato mutazioni e l'analisi di *linkage* con marcatori VNTR, effettuata in accordo con la *flow-chart* diagnostica proposta, ha dato esito negativo: il probando e la sorella, che ha parametri emostatici nella norma, condividevano infatti gli stessi alleli. Questa condizione esclude il *linkage* e sarebbe in accordo con un difetto genetico indipendente dal gene VWF. Tuttavia, la profonda alterazione evidenziata dall'analisi multimerica mette chiaramente in luce un difetto intrinseco della molecola del VWF. È stato dunque ipotizzato un evento mutazionale *de novo*, cioè la comparsa di un nuovo difetto genetico del VWF peculiare del corredo genetico del proposito. La successiva analisi del mRNA del VWF del paziente ha individuato una estesa delezione in stato di eterozigosi. La delezione coinvolge per intero gli esoni 32, 33 e 34 per un totale di 387 nucleotidi e non altera il *frame* di lettura del mRNA, che quindi codifica per una proteina priva di 129 amminoacidi in posizione centrale. Di questi 129 amminoacidi, 57 appartengono al dominio A3, responsabile dell'interazione tra VWF e collagene. La sola analisi del mRNA, tuttavia, non ci permette di identificare la causa primitiva della delezione: è il risultato di uno *splicing* genico anomalo oppure di una larga delezione genomica? Per determinare quale dei due meccanismi fosse il responsabile dell'alterazione del mRNA, ci siamo serviti di una tecnica basata su Real-Time PCR che ci permettesse di distinguere la presenza di un allele normale in duplice copia dallo stato di emizigosità dovuta ad una delezione. Per quanto concerne la metodica, occorre sottolineare che la selezione delle coppie di primer per la Real-Time PCR è risultata piuttosto complessa per due ragioni: in primo luogo, l'efficienza della procedura è strettamente correlata alla qualità dei *primers* utilizzati, che devono essere selezionati con programmi appositi e condizioni molto stringenti, in modo da garantire il successo dell'analisi; in secondo luogo, nel braccio lungo del cromosoma 22 del genoma umano è presente uno pseudogene del VWF che si estende dall'esone 23 all'esone 34, comprensivo di

introni. La sequenza nucleotidica del gene VWF attivo è identica per il ~97% alla sequenza dello pseudogene, ne consegue che i *primers* necessari per eseguire la Real-Time devono inevitabilmente essere disegnati a cavallo dei rari nucleotidi divergenti, così da poter selezionare e amplificare solo il gene VWF attivo. Le limitazioni affrontate durante la fase di costruzione dei primer hanno dunque obbligato la selezione di 4 coppie di primers a partire da una rosa molto più ampia. La procedura utilizzata ha accertato lo stato di emizigosità della regione cromosomica indagata, quindi è stato possibile definire che una larga delezione genomica è responsabile della presenza di un mRNA del VWF aberrante. I confini della delezione sono stati caratterizzati mediante Long Range PCR: essa si estende per 3411 bp, ha inizio nell'introne 31 a -66 bp a monte dall'esone 32 e termina nell'introne 34 a +1316 bp a valle dell'esone 34. La delezione genomica identificata nel proposito della famiglia B non è presente nei familiari, dato che conferma l'ipotesi di un evento mutazionale *de novo*. Da quanto si apprende in letteratura, questa non è la prima delezione *de novo* che coinvolge l'esone 34: in passato era già stato caratterizzato un altro caso di delezione *de novo* che si estendeva dall'esone 26 fino al 34 (Bernardi F. *et al.*, 1990). In quel caso non sono stati definiti i termini della delezione, tuttavia il fatto che due eventi mutazionali indipendenti coinvolgano entrambi l'esone 34 potrebbe non essere casuale. È possibile che, all'interno dell'introne 34, sia presente una sorta di "sito di fragilità" che rende la doppia elica di DNA più sensibile a eventi di rottura e ricombinazione. Attualmente sono noti alcuni *hotspot* mutazionali che coinvolgono elementi retrotrasponibili come LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*), SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*) o LTR (*Long Terminal Repeat*). Per quanto riguarda la mutazione identificata in questo lavoro, a livello del sito terminale della delezione è effettivamente presente un elemento LINE denominato L1MC4a: che tale elemento possa essere un *hotspot* mutazionale è, al momento, solo un'ipotesi non suffragata da prove evidenti, se non dalla posizione dell'elemento stesso. Definita la delezione, l'effetto della mutazione c.5456\_5842del è stato caratterizzato mediante transfezione in linea cellulare HEK293T. Il dosaggio dei mezzi di crescita cellulari evidenzia chiaramente l'effetto dominante-negativo della mutazione c.5456\_5842del sulla secrezione di VWF maturo. Il VWF mutato è normalmente sintetizzato dalle cellule ma non è efficacemente secreto e, conseguentemente, viene in gran parte accumulato all'interno della cellula. L'analisi multimerica del VWF intracellulare dimostra che, nonostante siano visibili solo i primi oligomeri, il VWF mutato è in grado non solo di dimerizzare, ma anche di multimerizzare come il VWF *wild-type*. Questo spiega come il VWF mutato interferisce con la secrezione della molecola *wild-type*, determinando la ritenzione di una porzione significativa di quest'ultima. Gli esperimenti di espressione hanno dimostrato, inoltre, come la presenza della delezione comporti la riduzione

della capacità del VWF mutato di legare il collagene. La situazione delineata dagli esperimenti *in vitro* è sostanzialmente sovrapponibile a quanto evidenziato nei test emostatici eseguiti sul paziente, cioè una consistente diminuzione dei livelli di VWF circolante e un difetto di legame al collagene. Ciononostante, non spiega la presenza di multimeri anomali ad elevato peso molecolare nel plasma del probando. È noto che il VWF maturo viene secreto nel sangue dalle cellule endoteliali in forme multimeriche ad altissimo peso molecolare. Questi multimeri possiedono un potenziale emostatico superiore alla norma e sarebbero potenzialmente in grado di innescare fenomeni di aggregazione piastrinica intravascolare se le loro dimensioni non fossero immediatamente regolate dall'azione proteolitica di ADAMTS13, una metalloproteasi plasmatica che catalizza il taglio enzimatico del VWF in posizione Tyr1605-Met1606. È quindi lecito ipotizzare che i multimeri anomali ad alto peso molecolare evidenziati nel plasma del probando siano resistenti all'azione di ADAMTS13. In effetti, l'interazione molecolare tra VWF e ADAMTS13 è piuttosto complessa e coinvolge diversi domini funzionali di entrambe le molecole (Crawley J. T. *et al.*, 2001), quindi la delezione identificata, che elimina ben 129 amminoacidi, potrebbe condizionare negativamente la suscettibilità del VWF al taglio proteolitico. Per studiare l'ipotesi di resistenza, la strategia adottata è stata quella di produrre in *E. coli* frammenti proteici che contengano i domini funzionali della molecola di VWF coinvolti nell'interazione con ADAMTS13. Sono stati sintetizzati e purificati sia il frammento *wild-type*, di 920 amminoacidi, che include i domini A2-A3-D4-B1-B2-B3 (A2-B3 *wild-type*), sia il frammento che porta la delezione individuata nella famiglia B (A2-B3 c.5456\_5842del) di 791 amminoacidi. Per entrambi i frammenti, è stata allestita una procedura di proteolisi *in vitro*, utilizzando ADAMTS13 ricombinante che opera il taglio enzimatico tra i due amminoacidi Tyr1605-Met1606 del dominio A2. I frammenti non digeriti e i prodotti della proteolisi sono stati quindi separati in SDS-PAGE, visualizzati in *western-blot* sviluppato con anticorpo anti VWF policlonale e confrontati. Le bande ottenute mettono chiaramente in luce il differente comportamento dei 2 frammenti: A2-B3 *wild-type* come atteso, viene efficacemente proteolizzato, mentre il frammento A2-B3 5456\_5842del rimane inalterato, dimostrando che il VWF che porta la delezione è effettivamente resistente all'azione di ADAMTS13. La procedura di proteolisi è stata successivamente ripetuta trattando i frammenti con urea 8 M, condizione che causa la perdita di conformazione e il dispiegamento dei frammenti. In questo secondo caso i due frammenti risultano ugualmente sensibili all'azione di ADAMTS13, che opera il taglio enzimatico di entrambe le proteine. Questo ulteriore risultato dimostra che la funzionalità del dominio A2 del VWF non viene intaccata dalla mutazione c.5456\_5842del, ma il sito di proteolisi è pronò all'azione di ADAMTS13 solo quando il VWF si trova nello stato non

ripiegato. Ne consegue che il VWF 5456\_5842del, in virtù della mutazione, assume una struttura tridimensionale peculiare che è differente da quella del VWF *wild-type* e che impedisce ad ADAMTS13 di interagire efficacemente con il VWF mutato. È noto che il legame tra VWF e ADAMTS13 e la conseguente proteolisi sono processi caratterizzati da una serie ordinata di interazioni sinergiche che avvengono tra diversi domini delle due molecole (Crawley J. T. *et al.*, 2001). Tali interazioni, in presenza di forze di *shear* adeguate, accompagnano il sito catalitico di ADAMTS13 nella posizione corretta per proteolizzare il sito Tyr1605-Met1606 del dominio A2 di VWF. Invece, fintanto che il VWF 5456\_5842del conserva la propria struttura tridimensionale, i domini della molecola di VWF non sono disponibili ad interagire con le controparti di ADAMTS13 e non possono guidare il *core* catalitico della metalloproteasi al sito di taglio. In definitiva, la mutazione c.5456\_5842del rende inaccessibile il dominio A2 di VWF ad ADAMTS13, spiegando la resistenza acquisita dal VWF mutato alla proteolisi e la presenza dei multimeri a peso molecolare superiore alla norma. Nella mutazione c.5456\_5842del del VWF identificata coesistono sia caratteristiche pro-emorragiche (riduzione del VWF circolante e difetto di *binding* al collagene), sia caratteristiche pro-trombotiche (presenza di multimeri a peso molecolare superiore alla norma). Non è possibile definire quale sia l'effettivo contributo delle due componenti nel definire il fenotipo. Il paziente, attualmente ventottenne, ha sofferto di un solo evento emorragico nonostante valori di VWF circolante e di *binding* al collagene pesantemente ridotti, sicché si può supporre che i multimeri a peso molecolare superiore alla norma circolanti possiedano un'attività anti-emorragica. Questa interessante capacità suggerisce l'esistenza di una nuova categoria di mutazioni in grado di conferire al VWF la resistenza ad ADAMTS13, una proprietà che potrebbe risultare apprezzabile soprattutto se sfruttata a livello commerciale e che potrebbe abbattere la spesa dei prodotti di VWF emoderivati.

La Famiglia C presenta 7 individui affetti da VWD che si manifesta con sanguinamento mucoso-cutaneo di moderata gravità. Il difetto è distribuito in tutte e tre le generazioni ed è indipendente dal sesso del paziente, suggerendo una trasmissione autosomica dominante. Tutti gli individui affetti presentavano un valore del rapporto FVIII/VWF:Ag ridotto che solitamente depone per la variante 2N di VWD, caratterizzata dall'incapacità intrinseca del VWF di legare efficacemente il FVIII, che viene così rimosso dal circolo ematico ad opera delle proteasi plasmatiche. La capacità di legare il FVIII viene misurata con il saggio specifico VWF:FVIII BA e risulta ridotta nella VWD di tipo 2N. Invece, negli individui affetti della Famiglia C, il valore di *binding* è nella norma. Nel tentativo di caratterizzare un nuovo difetto genetico, il gene VWF e il gene F8 sono stati sequenziati a partire da DNA genomico, ma in entrambi i casi non sono state rilevate

mutazioni. È stata dunque effettuata l'analisi di *linkage* su VWF e F8 con marcatori VNTR intragenici: lo stato di *linkage* con il gene è stato escluso per il VWF ma non per il gene F8, quindi quest'ultimo rimaneva potenzialmente coinvolto nella patologia. Nonostante il tipo di ereditarietà evidenziata nella Famiglia C (dominante, con fenotipo indipendente dal sesso) sia in contrasto con un ipotetico coinvolgimento del gene F8 che, se mutato, causa la ben nota Emofilia A a trasmissione recessiva legata al cromosoma X, si è tuttavia preferito procedere al sequenziamento del gene F8 per escluderlo definitivamente. Anche in questo caso è stato effettuato uno studio del mRNA del FVIII. Nonostante si ritenga che trascrizione e traduzione del gene F8 siano processi riconducibili alle cellule del fegato (epatociti, cellule sinusoidali) (Hollestelle M. J. *et al.*, 2001), è stato possibile rilevare la presenza del mRNA del FVIII anche nel RNA totale estratto da piastrine. Questa condizione, inattesa e suggestiva, ci ha permesso di portare a termine l'analisi del messaggero nel quale, comunque, non sono state evidenziate mutazioni o alterazioni di *splicing*. I risultati ottenuti ci hanno consentito di escludere la responsabilità dei geni VWF e F8, quindi la causa della patologia sembra essere riconducibile ad un gene differente. Come descritto nella *flow-chart* diagnostica, per ricercare un nuovo gene causativo si è deciso di ricorrere a strategie complesse che permettano di studiare l'intero genoma e, in particolare, sono state usate due metodologie diverse, il sequenziamento genomico SOLiD™ e l'analisi di *linkage genome-wide* con *array* di SNPs. Mentre il dato relativo all'analisi di *linkage* estesa all'intero genoma è risultato piuttosto significativo, permettendoci di focalizzare l'attenzione su 4 regioni cromosomiche distinte che rappresentavano il 5% del genoma, il dato del sequenziamento genomico non è risultato altrettanto soddisfacente. In particolare, sebbene sia stato identificato un numero plausibile di variazioni situate all'interno delle 4 regioni di *linkage*, il *coverage* di un quarto dei geni appariva inadeguato, indicando che il dato ottenuto è sostanzialmente incompleto e che il numero di variazioni identificate è, in realtà, una sottostima del numero di variazioni effettivamente presenti sul DNA del probando. Abbiamo deciso di procedere comunque all'analisi delle variazioni rilevate nei geni con *coverage* adeguato, escludendo per il momento i geni incompleti. In prima battuta, le variazioni rilevate sono state filtrate al fine di eliminare i polimorfismi comuni nella popolazione. Successivamente, dato che le variazioni rimanevano comunque un numero rilevante, è stato utilizzato l'approccio del "gene candidato" per evidenziare se ci fossero variazioni a carico dei geni che evidenziavano un'affinità funzionale o caratteristiche in comune con il gene VWF o il F8. Sono stati selezionati 10 geni candidati, ma in questi non sono state evidenziate mutazioni potenzialmente causative per VWD. L'approccio del gene candidato è stato utilizzato anche nel caso dei geni con *coverage* insufficiente: sono stati evidenziati 4 diversi geni, tra i quali spiccava il gene PDIA3

(Protein Disulfide-Isomerase A3), che è risultato fin da subito molto interessante in quanto potenzialmente implicato nel processo di maturazione del FVIII. PDIA3 è localizzato nel braccio lungo del cromosoma 15 in posizione telomerica e codifica per una proteina del reticolo endoplasmatico (RE) che interagisce con le chaperonine calreticulina (CALR) e calnexina (CNX) durante il processo di *folding* di proteine neo-sintetizzate. È noto che il sistema CALR-CNX è coinvolto nel processo di maturazione del FVIII, in particolare provvede alla ritenzione del FVIII nel RE fino a quando questo non abbia raggiunto il *folding* corretto. L'ipotesi formulata è che un'alterazione a carico del gene PDIA3 possa compromettere il funzionamento del sistema CALR-CNX, alterando il *folding* del FVIII e quindi impedendone l'uscita dal RE. In alternativa si può supporre che il FVIII, non correttamente ripiegato, venga comunque secreto dalla cellula ma risulti essere non funzionale, incapace di interagire con il VWF o che venga inattivato ed eliminato velocemente dal circolo ematico. Il cDNA di PDIA3 è stato amplificato e sequenziato con metodo di sequenziamento Sanger. Nonostante il gene fosse un ottimo candidato, anche in questo caso non sono state identificate possibili mutazioni causative. A questo punto, rimangono da sequenziare anche gli altri 3 geni candidati. Tuttavia, alla luce del fatto che, oltre a questi geni, ve ne sono altri 89 all'interno delle regioni di *linkage* che non sono coperti dal sequenziamento genomico, stiamo valutando la possibilità di effettuare il sequenziamento dell'esoma del probando, piuttosto che analizzare i singoli geni. È possibile che questa tecnica, con costi e tempi contenuti, ci consentirà di colmare nel modo migliore le lacune del sequenziamento SOLiD™ e di ottenere un dato più completo di quanto evidenziato con il sequenziamento Sanger. Purtroppo, lo studio di questa famiglia non è stato conclusivo e non è stata identificata un'alterazione genetica responsabile per questa forma di VWD congenita. Tuttavia, il lavoro compiuto ha escluso il coinvolgimento dei due indiscussi "protagonisti", il gene VWF e il gene F8, sottolineando l'esistenza di un nuovo gene "comprimario", in gergo specifico un "gene modulatore", in grado di alterare il rapporto tra VWF e FVIII. Il gene è ancora sconosciuto: PDIA3 pareva, su base funzionale, un ottimo candidato ma non ha evidenziato mutazioni. In generale, la descrizione di molti geni è carente e frammentaria: è possibile che, con le informazioni disponibili, il gene causativo non sembri attualmente un buon gene candidato, ma lo potrebbe diventare in un futuro prossimo, man mano che la comprensione dei meccanismi molecolari progredisce. Lo studio Famiglia C proseguirà poiché potrebbe fornire una risposta ad un numero cospicuo di casi di VWD ancora irrisolti.

Il probando della Famiglia D ha sofferto di numerosi eventi emorragici, soprattutto in concomitanza di interventi chirurgici dentari. I test emostatici, effettuati più volte e in momenti



diversi, hanno evidenziato una severa riduzione del VWF circolante e di tutti i parametri funzionali associati alla molecola, unita ad un forte abbattimento dell'attività del FVIII. I livelli di VWF intrapiastrinico risultano, invece, normali, escludendo difetti di sintesi della molecola. Il *pattern* multimerico del probando mostra un'importante riduzione dei multimeri. Il probando è stato sottoposto a test di stimolo con desmopressina (DDAVP), che induce il repentino rilascio del VWF accumulato nei corpi di Weibel-Palade dalle cellule endoteliali. Il test ha dimostrato che la sopravvivenza di VWF è drasticamente ridotta. Il quadro evidenziato, nel complesso, sembra essere tipico di VWD “*tipo Vicenza*” (Casonato *et al.*, 2002), una forma di VWD piuttosto comune nel nordest italiano. L'unica differenza tra la forma di VWD del probando e la VWD “*tipo Vicenza*” è l'assenza di multimeri a peso molecolare superiori alla norma, che sono invece evidenti nel *pattern* multimerico del “*Vicenza*”. Il sequenziamento selettivo degli esoni 17 e 27 ha escluso la presenza delle mutazioni note come causa di “*tipo Vicenza*” (M740I, R1205H), quindi il sequenziamento dell'intero gene è stato completato senza identificare altri difetti. La forma di VWD del probando è stata momentaneamente definita come “*tipo Vicenza-like*” per la sua somiglianza al “*tipo Vicenza*”. La ridotta dimensione della famiglia, costituita solo dal probando e dal figlio che, peraltro, non manifestava alcun fenotipo di VWD né parametri emostatici anomali, non ha permesso di effettuare alcuna analisi di *linkage*. Dunque, non è stato possibile capire se il disturbo del probando della Famiglia D sia dovuto ad un difetto a carico del gene del VWF o a una causa diversa. Tuttavia, sono state ottenute nuove importanti evidenze a seguito alla somministrazione di VWF emoderivato esogeno al paziente per via endovenosa: inaspettatamente il VWF esogeno infuso evidenzia una riduzione della sopravvivenza che riflette quella del VWF endogeno. Dal momento che VWF endogeno ed esogeno si comportano nella stessa maniera, risulta chiaro che la causa della malattia del paziente non può essere ricercata nel gene VWF, bensì in un “fattore” che interagisce con il VWF circolante e ne causa la rapida scomparsa. Sono state formulate due diverse ipotesi: un'azione anomala della proteasi ADAMTS13 a seguito di una mutazione con *gain-of-function* del gene ADAMTS13; un quadro di malattia autoimmune con presenza di autoanticorpi anti-VWF che riconoscono il VWF circolante e ne promuovono la rimozione dal sangue per endocitosi e degradazione. L'implicazione di ADAMTS13 è stata esclusa con il sequenziamento completo dei 29 esoni del gene ADAMTS13, che non ha evidenziato mutazioni ma solamente alcuni polimorfismi comuni nella popolazione europea. Quindi, sono stati ricercati gli anticorpi diretti contro il VWF nel plasma del paziente mediante saggio immunoenzimatico che ha escluso a sua volta la presenza di immunoglobuline anti-VWF. Non è stato possibile identificare la causa primitiva del disturbo emorragico nel paziente, che quindi ricade nel 30% di casi in cui,

nonostante la VWD conclamata, non si evidenzia mutazione nel gene VWF. Tuttavia possiamo affermare con assoluta certezza che il gene VWF non è coinvolto nella patologia, dal momento che VWF endogeno ed esogeno si comportano allo stesso modo. Questo lavoro evidenzia l'esistenza di un "fattore" sconosciuto in grado di influenzare i valori di VWF circolante ma, dal momento che la patologia descritta non evidenzia familiarità, non è possibile affermare se tale "fattore" sia una causa genetica o acquisita. Definire un nuovo meccanismo patologico, indipendente dal gene del VWF, potrebbe portare all'inquadramento di una porzione dei casi irrisolti di VWD.

In conclusione, nel presente lavoro sono state studiate quattro famiglie con VWD in cui non sono state evidenziate mutazioni a carico del gene VWF con le tecniche di sequenziamento standard. Per queste famiglie, a seconda delle necessità, sono stati disegnati percorsi diagnostici differenti e sono stati avanzati quattro possibili meccanismi molecolari responsabili per la VWD. L'applicazione della *flow-chart* proposta negli obiettivi si è dimostrata fondamentale per identificare il difetto genetico in due delle suddette famiglie (A e B) e ci ha consentito di escludere definitivamente il coinvolgimento del gene VWF negli altri due casi, confermando che un porzione rilevante di casi di VWD ancora irrisolti è probabilmente dovuta a geni e meccanismi ancora sconosciuti che esulano dal *locus* VWF. In definitiva, i differenti casi trattati in questo lavoro dimostrano che effettuare la diagnosi genetica della VWD può essere complicato e, allo stesso tempo, confermano la necessità di elaborare un "modus operandi" che permetta di andare oltre la ricerca di mutazioni nella regione codificante del gene del VWF. Innanzitutto, sarà necessario compiere ulteriori sforzi per caratterizzare quei meccanismi patogenetici che interessano il gene VWF e che ancora non sono stati chiariti; inoltre occorre definire quali altri fattori, genetici o acquisiti, sono in grado di causare l'alterazione dei livelli di VWF circolante. Una maggiore comprensione del funzionamento del VWF e dei meccanismi della malattia ad esso associata permetterà di migliorare l'aspetto diagnostico e di fornire una spiegazione a casi di VWD ancora irrisolti.



## 6. Bibliografia

- ❖ Bernardi F., Marchetti G., Guerra S., Casonato A., Gemmati D., Patracchini P., Ballerini G., Conconi F. **A de novo and heterozygous gene deletion causing a variant of von Willebrand disease.** Blood. 1990 Feb 1;75(3):677-83.
- ❖ Bernardi F., Marchetti G., Casonato A., Gemmati D., Patracchini P., Legnani C., DeRosa V., Girolami A., Conconi F. **Characterization of polymorphic markers in the von Willebrand factor gene and pseudogene.** Br J Haematol. 1990 Mar;74(3):282-9.
- ❖ Casonato A., Pontara E., Bertomoro A.P., Zucchetto, A., Girolami, A. **Type 2N von Willebrand disease due to Arg91 Gln substitution and a cytosine deletion in exon 18 of the von Willebrand factor gene.** Brit. J. Haematolog. 103, 39-41, 1998.
- ❖ Casonato A., Pontara E., Sartorello F., Cattini M. G., Sartori M. T., Padrini R., Girolami A. **Reduced von Willebrand factor survival in type Vicenza von Willebrand disease.** Blood. 2002 Jan 1;99(1):180-4.
- ❖ Casonato A., Sartorello F., Pontara E., Gallinaro L., Bertomoro A., Grazia Cattini M., Daidone V., Szukowska M., Pagnan A. **A novel von Willebrand factor mutation (I1372S) associated with type 2B-like von Willebrand disease: an elusive phenotype and a difficult diagnosis.** Thromb Haemost. 2007 Dec;98(6):1182-7.
- ❖ Casonato A., Pontara E., Battiston M., Morpurgo M., Cattini M. G., Casarin E., Saga G., Daidone V., De Marco L. **C2362F mutation gives rise to an ADAMTS13-resistant von Willebrand factor.** Thromb Haemost. 2013 Jun;109(6):999-1006.
- ❖ Crawley J. T., de Groot R., Xiang Y., Luken B. M., Lane D. A. **Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor.** Blood. 2011 Sep 22;118(12):3212-21.
- ❖ Dejana E., Lampugnani M. G., Giorgi M., Gaboli M., Federici A. B. et al. **von Willebrand factor promotes endothelial cell adhesion via an Arg-Gly-Asp dependent mechanism.** J. Cell. Biol. 109, 367-375, 1989.
- ❖ Favaloro E. J. and Koutts J. **Laboratory assays for von Willebrand factor: relative contribution to the diagnosis of von Willebrand's disease.** Pathology 29, 385-391, 1997.
- ❖ Haberichter S. L., Fahs S. A. Montgomery R. R. **Von Willebrand factor storage and multimerization: 2 independent intracellular processes.** Blood, 96, 1808-1815, 2000.
- ❖ Hilbert L., Gaucher C., de Romeuf C., Horellou M. H., Vink T., Mazurier C. **Leu 697-->Val mutation in mature von Willebrand factor is responsible for type IIB von Willebrand disease.** Blood. 1994 Mar 15;83(6):1542-50.

- ❖ Hoffmann K., Lindner T. H. **easyLINKAGE-Plus--automated linkage analyses using large-scale SNP data.** *Bioinformatics.* 2005 Sep 1;21(17):3565-7.
- ❖ Hollestelle M. J., Thinnis T., Crain K., Stiko A., Kruijt J. K., van Berkel T. J., Loskutoff D. J., van Mourik J.A. **Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look.** *Thromb Haemost.* 2001 Sep;86(3):855-61.
- ❖ Kokame K., Matsumoto M., Soejima K., Yagi H., Ishizashi H., Funato M., Tamai H., Konno M., Kamide K., Kawano Y., Miyata T., Fujimura Y. **Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11902-7.
- ❖ Levy G. G., Nichols W. C., Lian E. C., Foroud T., McClintick J. N., McGee B. M., Yang A. Y., Siemieniak D. R., Stark K. R., Gruppo R., Sarode R., Shurin S. B., Chandrasekaran V., Stabler S. P., Sabio H., Bouhassira E. E., Upshaw J. D. Jr, Ginsburg D., Tsai H. M. **Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura.** *Nature.* 2001 Oct 4;413(6855):488-94.
- ❖ Lynch D. C., Zimmerman T. S., Kirby E. P., Livingston D. M. **Subunit composition of oligomeric human von Willebrand factor.** *J. Biol. Chem* 1983; 258:12757-60.
- ❖ Machado F. B., Duarte L. P., Medina-Acosta E. **A novel informative dinucleotide microsatellite marker located on human factor VIII intron 25.** *Haemophilia.* 2009 Mar;15(2):613-4.
- ❖ Machado F. B., Alves Da Silva A. F., Rossetti L. C., De Brasi C. D., Medina-Acosta E. **Informativeness of a novel multiallelic marker-set comprising an F8 intron 21 and three tightly linked loci for haemophilia A carriership analysis.** *Haemophilia.* 2011 Mar;17(2):257-66.
- ❖ Majerus E. M., Zheng X., Tuley E. A., Sadler J. E. **Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity.** *J Biol Chem.* 2003 Nov 21;278(47):46643-8.
- ❖ Mancuso D. J., Tuley E. A., Westfield L. A., Lester Mancuso T. L ,Le Beau M. M., Sorace J. M., Sadler J. E. **Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction.** *Biochemistry* 30, 253-269, 1991.
- ❖ Marchetti G., Patracchini P., Volinia S., Aiello V., Schiavoni M., Ciavarella N., Calzolari E., Schwienbacher C., Bernardi F. **Characterization of the pseudogenic and genic homologous regions of von Willebrand factor.** *Br J Haematol.* 1991 May;78(1):71-9.

- ❖ Mazurier C., Jorieux S., Dieval J., Delobel J., Goudemand M. **A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric pattern of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction.** Blood 75. 20, 1990.
- ❖ Mazurier C., Ribba A. S., Gaucher C., Meyer D. **Molecular genetics of von Willebrand disease.** Ann. Genet. 41, 34-43, 1998.
- ❖ Misumi Y., Oda K., Fujiwara T., Takami N., Tashiro H., Ikehara J. **Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement pro-C3.** J. Biol. Chem. 266, 16594-16601, 1991.
- ❖ Moake J. L. **Thrombotic microangiopathies.** N Engl J Med. 2002;347:589-600.
- ❖ Moll S., Lazarowski A. R., White II G. C. **Giant Platelet Disorder in a Patient With Type 2B von Willebrand's Disease.** American Journal of Hematology 57, 62-67, 1998.
- ❖ Nishino M., Girma JR, Rothschild C., Fressinaud E., Meyer D. **New Variant of von Willebrand Disease with the Defective Binding to Factor VIII.** Blood 74, 1S91-1S99, 1989.
- ❖ Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. **Quantification of mRNA using real-time RT-PCR.** Nat Protoc. 2006;1(3):1559-82.
- ❖ Pagliari M. T., Baronciani L., Garcia Oya I., Solimando M., La Marca S., Cozzi G., Stufano F., Canciani M. T., Peyvandi F. **A synonymous (c.3390C>T) or a splice-site (c.3380-2A>G) mutation causes exon 26 skipping in four patients with von Willebrand disease (2A/IIIe).** J Thromb Haemost. 2013 Jul;11(7):1251-9.
- ❖ Plow E. F., Srouji A. H., Meyer D., Marguerie G., Ginsberg M. H. **Evidence that three adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets.** J. Biol. Chem. 256, 5388-91, 1984.
- ❖ Ruggeri Z. M., Zimmerman T.S. **von Willebrand factor and von Willebrand disease.** Blood 70, 895-904, 1987.
- ❖ Ruggeri Z. M. **Pathogenesis and Classification of von Willebrand Disease.** Haemostasis 24, 26S-27S, 1994.
- ❖ Sadler J. E. **Biochemistry and genetics of von Willebrand Factor.** Ann. U. Rev. Biochem. 67, 395-424, 1998.
- ❖ Sadler J. E. **New concepts in von Willebrand disease.** Annu Rev Med 2005; 56: 173-91.
- ❖ Sadler, J. E., Budde, U., Eikenboom, J. C. J., Favaloro, E. J., Hill, F. G. H., Holmberg, L., Ingerslev, J., Lee, C. A., Lillicrap, D., Mannucci, P. M., Mazurier, C., Meyer, D., Nichols

- W. L., Nishino M., Peake I. R., Rodeghiero F., Schneppenheim R., Ruggeri Z. M., Srivastava A., Montgomery R. R., Federici A. B. **Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor.** J. Thromb. Haemost. 4: 2103-2114, 2006.
- ❖ Schneppenheim, R., Federici, A. B., Budde, U., Castaman, G., Drewke, E., Krey, S., Mannucci, P. M., Riesen, G., Rodeghiero, F., Zieger, B., Zimmermann, R. **Von Willebrand disease type 2M “Vicenza” in Italian and German patients: identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families.** Thromb. Haemost. 82: 136-140, 2000.
  - ❖ Spom L. A., Marder V. J., Wagner D. V. **Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers.** Cell 46, 186, 1986.
  - ❖ Tsai H. M. **Type 2A (group II) von Willebrand disease mutations increase the susceptibility of VWF to ADAMTS-13.** J Thromb Haemost. 2004 Nov;2(11):2057.
  - ❖ Vischer U. M. and Wagner D. D. **von Willebrand Factor Proteolytic Processing and Multimerization Precede the Formation of Weibel-Palade Bodies.** Blood 83, 3536-44, 1994.
  - ❖ Wagner D. D., Marder V. J. **Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: Identifications of a large precursor polypeptide chain.** J. Biol. Chem. 258, 2065-67, 1983.
  - ❖ Wise R. J., Pittman D. D., Handin R. L, Kaufman R. J., Orkin S. H. **The Propeptide of von Willebrand Factor Independently Mediates the Assembly of von Willebrand Multimers.** Cell 52, 229-236, 1988.
  - ❖ Zanardelli S., Crawley J. T., Chion C. K., Lam J. K., Preston R. J., Lane D. A. **Adamts13 substrate recognition of von Willebrand factor A2 domain.** J Biol Chem. 2005 Oct 12.
  - ❖ Zaverio M., Ruggeri, Waxe J. **The Structure and Function of von Willebrand Factor.** Thromb. Haemost. 67, 594-599, 1992.
  - ❖ Zhang X., Halvorsen K., Zhang C. Z., Wong W. P., Springer T. A. **Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor.** Science. 2009 Jun 5;324(5932):1330-4.
  - ❖ Zheng X., Chung D., Takayama T. K., Majerus E. M., Sadler J. E., Fujikawa K. **Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura.** J Biol Chem. 2001: 276.41059-41063.

Questo dottorato è stato ammesso al finanziamento della Fondazione “Cassa di Risparmio di Padova e Rovigo” (progetto “dottorati di ricerca” 2010, AREA 2 – Scienze della Vita)

### ***Congressi:***

Nuovi Strumenti e Strategie di Analisi Genetica – Padova, Italia, 20 – 21 giugno, 2012.

ISTH 2013 Congress – Amsterdam, the Netherlands, June 29 – July 4, 2013.

Daidone V., Gallinaro L., Pontara E., Cattini M. G., Zampese E., Pizzo P., **Barbon G.**, Bertomoro A., Casonato A. **Cysteine 584 is required for correct von Willebrand factor multimerization**

Casonato A., Pontara E., Morpurgo M., Cattini M. G., Battiston M., **Barbon G.**, Saga G., Daidone V., De Marco L. **Resistance of C2362F von Willebrand factor to ADAMTS13-induced proteolysis**

Meeting AICE 2013 – Padova, Italia, Ottobre 07 – Ottobre 09, 2013.

### ***Attività Didattiche e Corsi di aggiornamento:***

Partecipazione a Summer School organizzata per le Scuole di Dottorato di Ricerca dell’Area Medica dell’Università di Padova, Settembre 26-30, 2011.

Diagnostica in Biologia Molecolare – Presidio Ospedaliero san Giacomo Castelfranco Veneto, Dicembre 04, 2013.

### ***Pubblicazioni:***

Casonato A., Daidone V., **Barbon G.**, Pontara E., Di Pasquale I., Gallinaro L., Marullo L., Bertorelle G. **A common ancestor more than 10,000 years old for patients with R854Q-related type 2N von Willebrand disease in Italy.** Haematologica. 2012 Aug 8.

Pontara E., Gresele P., Cattini M. G., Daidone V., **Barbon G.**, Girolami A., Zanon E., Casonato A. **Spontaneous hemarthrosis in combined Glanzmann thrombasthenia and type 2N von Willebrand disease.** Blood Coagul Fibrinolysis. 2014 Jan 10.