



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

XXVII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA
in
SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE
indirizzo **MEDICINA MATERNO INFANTILE PERINATOLOGIA**

STUDIO CLINICO E MOLECOLARE DELLA SINDROME DI BERNARD-SOULIER

Settore scientifico-disciplinare: **MED/03**

DOTTORANDA
Daniela De Rocco

Daniela De Rocco

COORDINATORE
Prof. Giuliana Decorti

Giuliana Decorti

SUPERVISORE DI TESI
Prof. Anna Savoia

Anna Savoia

ANNO ACCADEMICO 2013 / 2014

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE, DIAGNOSI E TERAPIA	3
1.2 STRUTTURA E FUNZIONE DEL COMPLESSO GLICOPROTEICO Ib-IX-V	4
1.2.1 GPIb α	5
1.2.2 GPIb β	6
1.2.3 GPIX	7
1.2.4 GPV	7
1.3 MUTAZIONI NEL BSS BIALLELICO.....	7
1.4 PLATELET-TYPE VON WILLEBRAND DISEASE (VWDP).....	8
1.5 SINDROME DI BERNARD-SOULIER MONOALLELICA (BSSA2)	8
1.6 ORIGINI DELLA MACROTROMBOCITOPENIA	10
2. SCOPO DELLA TESI	11
3. MATERIALI E METODI.....	12
3.1 BSS CONSORTIUM DATABASE	12
3.2 BSS MONOALLELICO (BSSA2)	13
3.2.1 AMPLIFICAZIONE DEI GENI <i>GP1BA</i> , <i>GP1BB</i> e <i>GP9</i>	13
3.2.2 SEQUENZIAMENTO DEI PRODOTTI DI PCR ED ANALISI DELLE SEQUENZE	15
3.3 UTILIZZO DEI PROGRAMMI PREDITTIVI.....	15
3.3.1 MUTAZIONE SITO SPECIFICA	16
4. BSSA1 DATABASE: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	18
4.1 ANALISI DEI DATI MOLECOLARI.....	18
4.2 MUTAZIONI NEL GENE <i>GP1BA</i>	19
4.3 MUTAZIONI NEL GENE <i>GP1BB</i>	19
4.4 MUTAZIONI NEL GENE <i>GP9</i>	20
4.5 EFFETTO FONDATORE	21
4.6 EFFETTI DELLE MUTAZIONI SUL COMPLESSO.....	22
GPIb-IX-V	22
4.7 STUDIO IN SILICO DEGLI EFFETTI DELLE NUOVE MUTAZIONI MISSENSE	24
4.8 ANALISI DEI DATI CLINICI E DI LABORATORIO	26
4.9 RILEVANZE CLINICHE EMERSE DALLO STUDIO	27
5. BSS MONOALLELICO(BSSA2): RISULTATI E DISCUSSIONE	28

5.1 VARIANTI IDENTIFICATE NEI GENI GP1BA, GP1BB E GP9.....	28
6. CONCLUSIONI	34
7. TABELLE	35
8. BIBLIOGRAFIA	60

RIASSUNTO

La sindrome di Bernard-Soulier (BSS) è una rara piastrinopenia ereditaria causata da alterazioni a livello del complesso glicoproteico GPIb-IX-V, presente sulla membrana piastrinica e responsabile della adesione delle piastrine in seguito a danno vascolare. La BSS si trasmette come malattia autosomica recessiva (BBSA1) e i pazienti affetti presentano piastrine giganti e severi episodi di sanguinamento. Tuttavia in tempi recenti sono state descritte delle famiglie con una forma dominante nota come BSSA2. In questi pazienti la piastrinopenia è moderata e le piastrine presentano un volume leggermente aumentato. Finora sono state individuate solo 5 varianti in eterozigosi nel BSSA2: 4 nel gene *GP1BA* e 1 in *GP1BB*. Fatta eccezione per p.Ala172Val del gene *GP1BA* che è relativamente frequente nella popolazione Italiana, le altre 4 sono state descritte in singole famiglie.

I pochi casi di cui disponiamo, soprattutto per la forma recessiva non ci permettono di avere informazioni sui meccanismi patogenetici e sulla sua evoluzione nel tempo. Per questo motivo è stato istituito un Consorzio Internazionale per lo studio della BSS grazie al quale è stato possibile raccogliere i dati clinici e molecolari di 132 famiglie. Tutte le informazioni sono state inserite in un database (BSS Consortium database) attualmente gestito dal nostro laboratorio e consultabile dai gruppi di studio che hanno aderito al Consorzio. Inoltre per aumentare le informazioni sulle varianti identificate nel BSSA1 abbiamo incrementato i dati molecolari delle famiglie del Consorzio con i dati di altre 79 famiglie descritte in letteratura, raggiungendo un totale di 211 famiglie. Tutte le mutazioni identificate in queste famiglie sono state poi inserite in un database pubblico disponibile in rete (LOVD: Leiden Open Variation Database). La raccolta e l'elaborazione dei dati ci ha permesso di chiarire alcuni aspetti clinici e molecolari della malattia. Tuttavia data l'eterogeneità genetica e l'elevata espressione fenotipica gli studi genotipo-fenotipo si sono rivelati difficili da eseguire. Nonostante le molte informazioni acquisite, il database risulta ancora incompleto e limitato; per questo motivo è necessario raccogliere nuovi casi e inserire assieme alle varianti anche i relativi studi funzionali che si rivelano indispensabili per poter definire l'effetto delle varianti sul complesso GPIb-IX-V.

Nell'ambito invece dello studio e caratterizzazione della forma meno grave di BSS (BSSA2) sono stati selezionati 120 pazienti piastrinopenici senza diagnosi caratterizzati da piastrine grandi. In questi pazienti sono stati analizzati i geni *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9* e sono state identificate 11 diverse varianti: 1 nonsense, 2 mutazioni di framshift, 1 mutazione nel codone

di inizio e 5 varianti missense. Gli studi funzionali eseguiti sulle varianti missense per stabilire il loro ruolo patogenetico sono ancora in corso. Tuttavia se gli studi dovessero confermare la loro patogenicità 11 pazienti su 120 risulterebbero BSSA2 e questa forma dovrebbe essere considerata una tra le piastrinopenie ereditarie più frequenti in Italia.

In conclusione grazie a questo studio è stato possibile raccogliere la più ampia casistica di pazienti affetti da BSSA1 fin'ora descritta e ottenere numerose informazioni sia sulla clinica che sulle mutazioni coinvolte. Il BSS Consortium database permetterà ai clinici che hanno partecipato allo studio di osservare nel tempo l'andamento della malattia nei pazienti e di ottenere informazioni utili per stabilire un corretto protocollo per la presa in carico dei pazienti.

Infine la caratterizzazione di nuove forme di BSSA2 rappresenta il punto di partenza per descrivere al meglio la BSSA2 sia dal punto di vista clinico che molecolare. In futuro sarà quindi indispensabile estendere il BSS Consortium database anche alla forma BSSA2.

1. INTRODUZIONE

La Sindrome di Bernard Soulier (BSS: MIM#231200) è una rara forma di piastrinopenia ereditaria descritta per la prima volta nel 1948 dai medici francesi Jean Bernard e Jean-Preue Soulier [Bernard J, Soulier JP. 1948]. L'ereditarietà è autosomica recessiva, ma recentemente sono stati descritti dei casi di BSS a trasmissione autosomica dominante (BSSA2). La BSS è caratterizzata da severi e prolungati episodi di sanguinamento, da una conta piastrinica bassa e da piastrine grandi. La tendenza al sanguinamento è dovuta alla disfunzione o all'assenza del complesso glicoproteico GIIb-IX-V presente sulla superficie delle piastrine. L'alterata funzionalità del complesso GPIIb-IX-V è causata da mutazioni a carico dei geni *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9* che codificano per tre delle quattro glicoproteine che compongono il complesso.

1.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE, DIAGNOSI E TERAPIA

La sindrome di Bernard-Soulier è una malattia estremamente rara e la sua frequenza è stimata essere di 1 su 1000000, anche se si pensa possa essere più alta in quanto spesso sfugge alla diagnosi [Lopez et al., 1998]. Clinicamente è caratterizzata da trombocitopenia (conta piastrinica inferiore a $150 \times 10^9/L$), piastrine grandi e prolungati episodi di sanguinamento. Frequenti sono gli episodi di epistassi, perdita di sangue cutaneo e gengivale ed emorragie a seguito di traumi, meno frequenti sono invece i sanguinamenti gastrointestinali e l'ematuria [Lanza F., 2006]. La tendenza al sanguinamento si manifesta a partire dalla prima infanzia, tuttavia la severità dei sintomi varia molto tra i pazienti, tanto che può ulteriormente peggiorare oppure ridursi con la pubertà o la vita adulta. La menorragia nelle donne in premenopausa presenta diversi gradi di severità e in alcuni casi può essere controllata attraverso l'uso di contraccettivi orali. Particolare attenzione viene data alle donne BSS in gravidanza per la possibilità di emorragie postpartum (PPH) che potrebbero richiedere trasfusione di piastrine o interventi chirurgici quali l'isterectomia [Lopez et al., 1998; Peitsidis et al., 2009]. Molto rari sono i casi di decesso.

L'algoritmo diagnostico proposto dal Gruppo di Studio delle Piastrine [Noris et al., 2004] costituisce un ottimo strumento per individuare la BSS. L'algoritmo prevede, oltre all'osservazione del tempo di sanguinamento, l'utilizzo di esami di laboratorio per individuare alcune caratteristiche cliniche e molecolari. Oltre a determinare la conta piastrinica e la presenza di piastrine grandi è indispensabile eseguire il test di aggregazione piastrinica in presenza di ristocetina (RIPA: ristocetine-induced platelet aggregation) che nei pazienti BSS

risulta essere assente o fortemente ridotta rispetto ad un individuo sano. Un altro test importante è la valutazione dell'espressione delle glicoproteine (GP) sulla superficie delle piastrine attraverso l'utilizzo della citofluorimetria, infatti la riduzione o l'assenza di espressione del complesso GPIb-IX-V è un forte indizio che fa sospettare la presenza di BSS. Per confermare la diagnosi di BSS è poi indispensabile eseguire lo screening di mutazioni dei geni del complesso (*GP1BA*, *GP1BB* e *GP9*) [Noris et al., 2004].

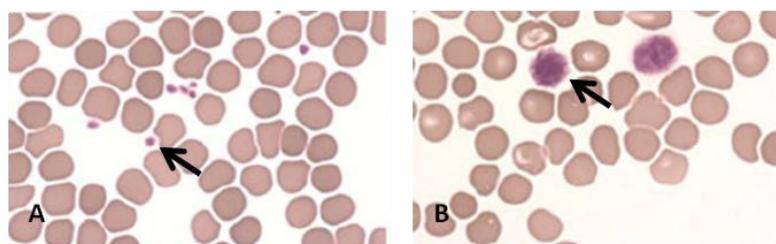


Figura 1. Dimensione delle piastrine. In un individuo sano (A) il diametro medio di una piastrina è di circa 2-3 μ m, mentre nei pazienti BSS biallelici (B) il diametro è > di 4 μ m. [Immagine adattata C.L.Balduini et al., 2013a].

Gli approcci terapeutici per i pazienti BSS dipendono molto dalla gravità della malattia [Lopez et al., 1998]. In generale il paziente dovrebbe prevenire i traumi, non assumere farmaci anticoagulanti come l'aspirina e mantenere una buona igiene orale per evitare cure dentali. La necessità di trasfusioni di sangue o di piastrine è indispensabile nei casi più gravi o durante gli interventi chirurgici. La somministrazione invece di farmaci come la desmopressina e rFVIIa si è rivelata utile solo per alcuni pazienti. Nei rari casi nei quali ci sia la presenza di disturbi potenzialmente letali può essere necessario un trapianto di cellule staminali ematopoietiche da midollo o da cordone ombelicale [Locatelli et al., 2003].

1.2 STRUTTURA E FUNZIONE DEL COMPLESSO GLICOPROTEICO Ib-IX-V

Il complesso GPIb-IX-V è formato da 4 glicoproteine di membrana GPIb α , GPIb β , GPIX e GPV rispettivamente legate tra loro secondo la proporzione stechiometrica 2:4:2:1 (Figura 2) [Luo SZ et al., 2007]. Le proteine prima di essere inviate sulla superficie cellulare, vengono assemblate nel reticolo endoplasmatico e modificate attraverso alterazioni post-traduzionali all'interno dell'apparato del Golgi. Ogni subunità del complesso è composta da una porzione N-terminale extracellulare contenente dei domini formati da sequenze ripetute di leucine (LRR), una elica transmembrana e una porzione citoplasmatica [Lopez et al., 1998]. Queste proteine appartengono alla superfamiglia delle proteine ricche in leucina, i cui membri sono

coinvolti in numerosi processi biologici quali segnali cellulari, adesione cellulare e sviluppo [Lopez et al., 1998]. Il complesso GPIb-IX-V svolge un ruolo essenziale nell'emostasi primaria, in quanto permette l'iniziale adesione delle piastrine al danno vascolare. L'aggregazione avviene grazie al legame della proteina GPIb α con il dominio A1 del fattore di von Willebrand (vWF). Le proteine GPIb α , GPIb β e GpIX sono fortemente legate tra di loro e sono tutte indispensabili per un corretto funzionamento del complesso. GPV invece si lega a GPIb-IX interagendo debolmente con GPIb α e la sua assenza sembra non alterare l'espressione del recettore [Lopez et al., 1999; Li and Emsley, 2013].

Nonostante le quattro proteine presentino una similitudine strutturale dovuta appunto alle sequenze ripetute ricche in leucina, le 4 catene sono codificate da 4 distinti geni (*GP1BA*, *GP1BB*, *GPV* e *GP9*) posti su porzioni genomiche diverse .

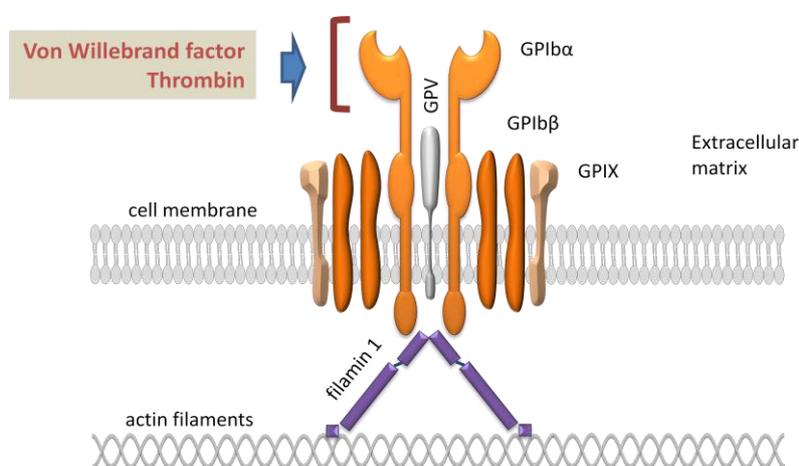


FIGURA 2. Rappresentazione schematica del complesso glicoproteico GPIb-IX-V. [Immagine adattata da Pecci et al. 2014].

1.2.1 GPIb α

Il gene *GP1BA*, che localizza nel cromosoma 17p13.2 è composto da 2 esoni, ma la parte codificante è presente nell'esone 2 (Figura 4). All'interno di questo esone vi è una sequenza di 39 nucleotidi (VNTRs) che si può ripetere 1, 2, 3 o 4 volte determinando polipeptidi con 626 amminoacidi (allele D, 1 VNTR; NM_000173.3), con 639 (allele C, 2 VNTR; NM_000173.4), 652 (allele B, 3 VNTR; NM_000173.5) e infine con 665 amminoacidi (allele A, 4 VNTR; NM non disponibile). La proteina possiede una sequenza peptide N-terminale di 16 amminoacidi che viene rimossa per formare una proteina matura di 632 amminoacidi (NM_000173.5 è il trascritto preso in considerazione). La proteina GPIb α è la subunità più grande del complesso, presenta all'N-terminale 8 sequenze ripetute ricche in leucina (LRRs), fiancheggiate da una regione N-capping (LRRNT) che interagisce con LRR1 e da una regione

C-capping (LRRCT) caratterizzata dalla presenza di legami disolfuro. Il legame con vWF avviene all'interno delle regione LRRs (Figura 3). A seguito delle LRR vi è una piccola regione anionica contenente tirosine solfatate (Tyr292/294/295) che risulta essere il sito di legame della trombina (Figura 3) e un'ampia regione O-glicosilata, nota come macroglicopeptide. Due cisteine (Cys500 e Cys5001) presenti tra i domini extracellulari e di membrana formano legami disolfuro con la proteina GPIIb/IIIa. Il dominio citoplasmatico contiene siti di legame per le filamine A,B,C e le proteine 14-3-3ζ [Li and Emsley, 2013].

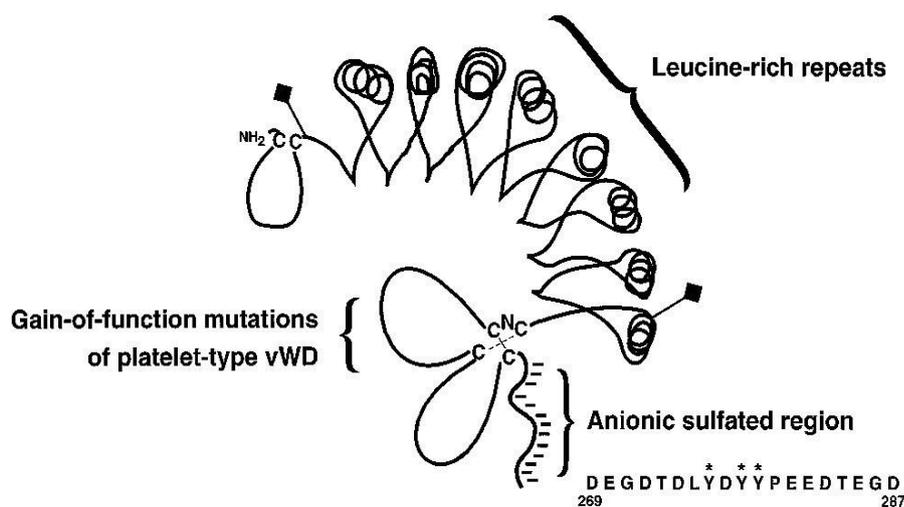


Figura 4. Rappresentazione schematica dell'N-terminale della proteina GPIIb/IIIa. In figura sono rappresentate le tre regioni della proteina ritenute importanti per il legame del fattore Von Willebrand (vWF): le sequenze ripetute di leucina (LRR), la regione fiancheggiante al C-terminale delle LRR (LRRCT) e le tirosine solfatate (indicate in sequenza con l'asterisco). [L'immagine adattata da Lopez et al., 1998].

1.2.2 GPIIb/IIIa

Il gene *GPIIb/IIIa* è presente sul cromosoma 22q11.21 ed è formato da 2 esoni entrambi codificanti (Figura 4). La proteina GPIIb/IIIa è formata da 206 amminoacidi e presenta all'N-terminale una sequenza peptide di 25 amminoacidi, che sarà successivamente rimossa. La proteina matura presenta nella porzione extracellulare un solo dominio LRR fiancheggiato da regioni N-capping e C-capping contenenti entrambi dei ponti disolfuro [Li and Emsley, 2013]. All'interno della proteina vi è un solo sito di N-glicosilazione rappresentato dal residuo Asn41, mentre l'amminoacido Cys122 forma un legame disolfuro con GPIIb/IIIa. La porzione citoplasmatica ricca di residui basici, presenta un sito di legame per la calmodulina [Li and Emsley, 2013].

1.2.3 GPIX

Il gene *GP9* è situato sul cromosoma 3q21.3 ed è composto da tre esoni ma solo il terzo è codificante (Figura 4). La proteina GPIX è formata da 177 amminoacidi con all'N-termianle una sequenza di 16 amminoacidi corrispondente ad un peptide segnale. GPIX ha un'elevata omologia di sequenza e quindi una struttura molto simile alla GPIb β : infatti presenta una sola sequenza LRR fiancheggiata da regioni LRRNT e LRRCT, una singola elica trans membrana e una porzione intracellulare costituita da 8 residui che non presentano siti di legame per l'interazione con altre proteine [Li and Emsley, 2013].

1.2.4 GPV

Il gene *GPV* è presente nella porzione cromosomica 3q29 ed è composto da 2 esoni, ma solo il secondo è codificante (Figura 4). La proteina GPV, formata da 544 amminoacidi, contiene 13 sequenze LRR nella porzione extracellulare, fiancheggiate da regioni N-capping e C-capping (LRRNT, LRRCT), un singolo dominio trans membrana e una piccola porzione citoplasmatica che sembra avere siti di legame per la calmodulina e per la proteina 14-3-3 ζ [Li and Emsley, 2013].

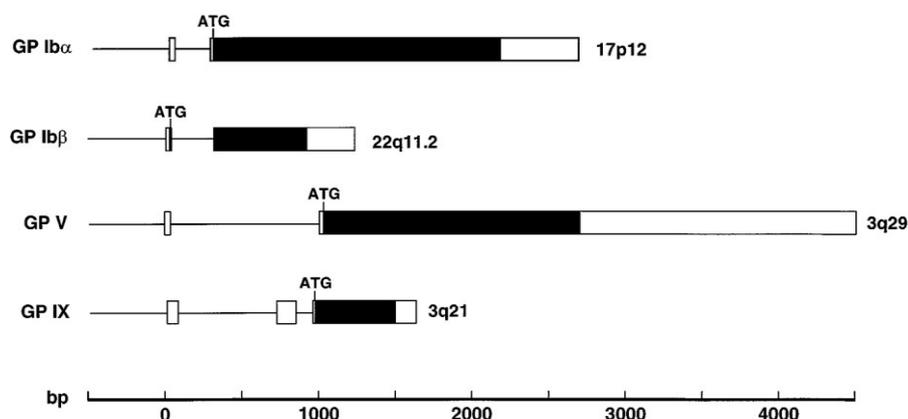


Figura 4. Struttura dei geni che codificano per le 4 glicoproteine del complesso GPIb-IX-V. I rettangoli colorati di nero rappresentano la parte codificante del gene. [Immagine adattata da Lopez et al., 1998]

1.3 MUTAZIONI NEL BSS BIALLELICO

Fino ad oggi sono state riportate in letteratura 50 alterazioni associate alla BSS, mutazioni che colpiscono i geni *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9*. Le mutazioni finora descritte sono principalmente missense, nonsense, piccole delezioni in frame e mutazioni di frameshift che possono provocare effetti sulla sintesi e l'espressione del complesso oppure possono alterare la capacità di legame del recettore. Ad eccezione della variante p.Asn61Ser presente nella proteina GPIX

e identificata in molte famiglie Europee [Liang HP et al., 2005], la maggior parte delle varianti sono mutazioni private esclusive di una famiglia. Interessante è il caso di alcuni pazienti che presentano su un allele una mutazione nel gene *GP1BB*, mentre sull'altro l'assenza del gene *GP1BB* dovuta alla microdelezione 22q11.2 che è caratteristica della Sindrome DiGeorge [Budarf et al., 1995].

1.4 PLATELET-TYPE VON WILLEBRAND DISEASE (VWDP)

Mutazioni a carico del gene *GP1BA* possono essere responsabili anche di un'altra malattia a trasmissione autosomica dominante la VWDP (Platelet-type von Willebrand Disease). E' un disordine estremamente raro e solo 6 mutazioni sono state descritte in letteratura: 1 delezione in frame dei residui 462-470 della regione del macroglicolipide [Othman et al., 2005] e 5 mutazioni missense che colpiscono i residui 249, 255 e 251 [Othman et al., 2011; Hamilton et al., 2011; Dreyfus et al., 2011; Enayat et al., 2012]. Questi ultimi amminoacidi si trovano all'interno di una sequenza che affianca la regione LRRCN, dove ci sono i legami disolfuro tra cisteine. La loro alterazione provoca un cambiamento di conformazione della regione che determina un aumento dell'affinità per il fattore von Willebrand (vWF) [Lopez et al., 1998; Nurden AT, 2005]. Nei pazienti con la VWDP le piastrine si legano spontaneamente al vWF aggregandosi tra di loro, determinando una diminuzione del vWF nel plasma e una riduzione delle piastrine in circolazione.

1.5 SINDROME DI BERNARD-SOULIER MONOALLELICA (BSSA2)

La BSS è una malattia trasmessa solitamente come tratto autosomico recessivo (BSS biallelica). Tuttavia recentemente sono stati descritti dei casi di BSS a trasmissione autosomica dominante che presentavano mutazioni su un unico allele (BSS monoallelico, BSSA2). La mutazione meglio descritta è la p.Ala172Val conosciuta con il nome di mutazione Bolzano presente nel gene *GP1BA* [Savoia et al., 2001]. Questa variante rappresenta la più frequente causa di trombocitopenia ereditaria in Italia. In una estesa ricerca condotta su 216 individui piastrinopenici è stata individuata in 103 pazienti, i quali presentavano tutti lo stesso aplotipo, suggerendo, quindi, la presenza di un antenato in comune [Noris et al., 2012]. In questi pazienti il volume piastrinico era leggermente aumentato (volume piastrinico medio di 3,5µm

contro 2,4µm dei controlli), era presente una moderata trombocitopenia (conta piastrinica media di $81 \times 10^9/L$), mentre gli episodi di sanguinamento erano assenti o molto lievi.

A differenza dei casi BSS biallelici, l'aggregazione piastrinica in presenza di ristocetina era normale o leggermente ridotta, invece il livello di espressione delle subunità del complesso era inferiore di circa il 60% rispetto ad un controllo sano. Le stesse caratteristiche cliniche e di laboratorio sono state descritte in altri pazienti che presentavano altre mutazioni monoalleliche nel gene *GP1BA* (p.Asn57His, p.Tyr70Asp, p.Leu73Phe) [Miller et al., 1992; Kunishima et al., 2006a; Vettore et al., 2008b] e nel gene *GP1BB* (p.Arg42Cys) [Kunishima et al., 2001] (Figura 5). Nella maggior parte dei casi i fenomeni di sanguinamento erano assenti o molto lievi [Balduini et al., 2013a].

Il motivo per cui alcune mutazioni in GPIb-IX-V presenti su un solo allele siano in grado di portare a difetti clinici mentre altre mutazioni debbano essere presenti su entrambi gli alleli, non è ancora chiaro. Un aiuto può venire dai pazienti affetti dalla Sindrome DiGeorge. In questi pazienti privi di una porzione cromosomica su un allele che contiene il gene *GP1BB* presentano una riduzione dell'espressione del complesso GPIb-IX-V pari al 50% e molti di questi non presentano trombocitopenia. Questo può significare che il 50% di espressione del recettore sia sufficiente affinché le piastrine possano svolgere la loro funzione. Sulla base di queste osservazioni si è ipotizzato che alcune mutazioni responsabili delle forme di BSS monoallelico possano avere un effetto dominante, in grado di indurre una lieve macrotrombocitopenia anche in presenza di un allele normale [Balduini et al., 2013a].

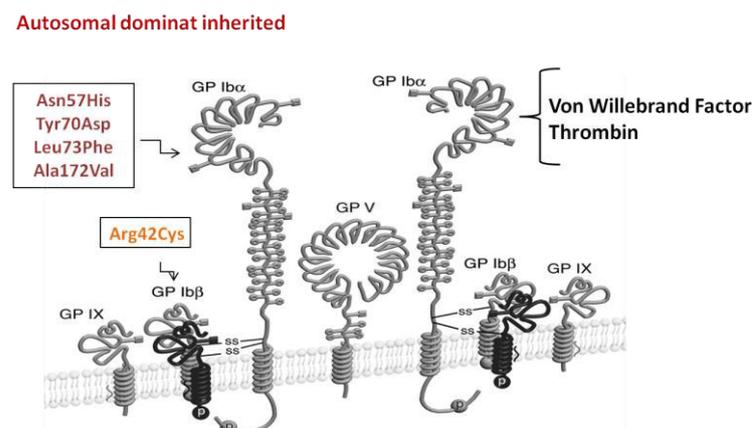


Figura 5. Rappresentazione del complesso GPIb-IX-V. In figura sono riportate le 5 varianti finora identificate nella forma autosomica dominante della BSS (BSSA2). [Immagine tratta dall'articolo Luo SZ et al., 2007].

1.6 ORIGINI DELLA MACROTROMBOCITOPENIA

Molti aspetti all'origine della macropiastrinopenia sono ancora da chiarire. Tuttavia recenti studi condotti *in vitro* suggeriscono l'importanza della proteina GPIb α nella produzione di piastrine. Si è visto infatti che bloccando il recettore presente sulla superficie dei megacariociti umani (MKs), questi non producono pro piastrine [Balduini A et al., 2008]. L'importanza del complesso GPIb-IX-X è stata ulteriormente confermata anche da altri studi condotti su pazienti BSS. Sono stati generati megacariociti a partire da cellule progenitrici prelevate da pazienti BSS monoallelici con la mutazione Bolzano. I megacariociti non presentavano difetti di maturazione ma una riduzione della capacità di formare propiastrine di circa il 50%. Le propiastrine prodotte invece erano più larghe del normale e presentavano un'alterata distribuzione della α -tubulina al loro interno [Balduini A et al., 2009]. Studi analoghi condotti su pazienti BSS biallelici hanno dimostrato un'alterata produzione di propiastrine che si rivela ancora più grave rispetto ai BSS monoallelici [Balduini et al., 2011]. Grazie agli studi condotti sui topi che presentano la BSS si è visto che il complesso GPIb-IX-V è essenziale per la formazione delle propiastrine a causa del suo ruolo nell'organizzazione del citoscheletro che si rivela indispensabile ai megacariociti per produrre le propiastrine [Strassel et al. 2009].

2. SCOPO DELLA TESI

La sindrome di Bernard-Soulier (BSS) è una macropiastrinopenia molto rara, geneticamente eterogenea e con un'ampia variabilità fenotipica. I pochi casi di cui disponiamo non ci permettono di avere chiare informazioni sui meccanismi patogenetici e soprattutto sulla sua evoluzione nel tempo. Per questo motivo abbiamo istituito un Consorzio Internazionale al fine di raccogliere un'ampia coorte di famiglie affette. Grazie al Consorzio sarà possibile creare un database che raccoglierà i dati clinici, molecolari ed epidemiologici dei pazienti. Le informazioni raccolte ci permetteranno di chiarire i meccanismi patogenetici e di effettuare studi di associazione genotipo-fenotipo.

Nella sua forma più grave e più nota la BSS è trasmessa come tratto autosomico recessivo (BSSA1; OMIM 231200), anche se sono stati riportati alcuni casi, più lievi, in cui la piastrinopenia si trasmette come carattere autosomico dominante (BSSA2; OMIM 153670). Per definire quanto la forma BSSA2 incida nella nostra casistica di famiglie con piastrinopenia abbiamo analizzato un ampio gruppo di probandi privi di diagnosi molecolare. L'individuazione di nuove varianti e gli studi funzionali associati ad esse associate permetteranno di caratterizzare e di chiarire alcuni aspetti del BSSA2.

3. MATERIALI E METODI

3.1 BSS CONSORTIUM DATABASE

Il progetto per l'attuazione del Consorzio Internazionale per lo studio del BSS è stato approvato dal Comitato Bioetico dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste. Il Consorzio è attualmente composto da medici e ricercatori provenienti da 15 nazioni e a ciascun centro di ricerca è stato chiesto di compilare per ogni paziente i seguenti campi di informazione:

1) Famiglia:

- a. consanguineità ed eventuale grado
- b. origine geografica

2) Probando e altri membri della famiglia:

- a. grado di parentela
- b. sesso
- c. età
- d. età alla diagnosi ed età dell'ultimo controllo medico
- e. indicare se vivo o deceduto
- f. cause del decesso

3) Progressiva diagnosi di trombocitopenia idiopatica (ITP) terapie somministrate per ITP:

- a. steroidi
- b. immunoglobuline
- c. Splenectomia
- d. altro

4) Valutazione (WHO bleeding score) e tempo di sanguinamento, indicazione degli eventi emorragici e terapia:

- a. Eventi emorragici: alla nascita e dopo la nascita (petecchie, ecchimosi, epistassi, sanguinamento gengivale, altro).
- b. Interventi chirurgici: specificare intervento ed eventuali emorragie
- c. Gravidanze: specificare modalità di parto ed eventuali emorragie
- d. Terapie: trasfusione piastrinica e di globuli rossi, estroprogestinici, fattore VIIa ricombinante, trapianto di midollo, altro.
- e. Eventuali conseguenze della trasfusioni piastriniche: refrattarietà, produzione di anticorpi contro le piastrine

5) Numero piastrine :

- a. conteggi ottenuti mediante lettura ottica al microscopio
- b. conteggi ottenuti mediante contatore automatico, indicando il tipo di strumento.

6) Dimensioni delle piastrine:

- a. MPV (mean platelet volume) in fL
- b. Diametro
- c. Percentuale di piastrine più grandi di un globulo rosso

7) Risultati saggi della ristocetina (RIPA: ristocetina induced platelet agglutination):

8) Citofluorimetria delle proteine del complesso GPIb-IX-V (GPIb α , GPIb β , GPIX, GPV) indicando gli anticorpi utilizzati.

9) Mutazioni nei geni GP1BA, GP1BB e GP9:

- a. gene coinvolto
- b. status: omozigote, eterozigote composto o emizigote
- c. mutazione su cDNA
- d. mutazione a livello proteico
- e. tipo di mutazione
- f. Indicare se riportata in letteratura o nuova
- g. Indicare se riportata l'articolo

10) Carriers nella famiglia:

- a. N° dei portatori e grado di parentela con il probando
- b. N° dei carriers valutati per il difetto piastrinico
- c. N° dei carriers con difetto piastrinico, specificando il tipo di difetto e la mutazione se il probando è eterozigote composto
- d. N° dei portatori senza difetto piastrinico

Tutti i dati raccolti sono stati poi inseriti nel BSS Consortium database.

3.2 BSS MONOALLELICO (BSSA2)

3.2.1 AMPLIFICAZIONE DEI GENI *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9*

Il DNA dei pazienti con sospetta diagnosi di BSS monoallelico sono stati inviati dal Dipartimento di Medicina Interna della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.

I pazienti sono stati sottoposti allo screening dei geni *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9*, utilizzando i primers riportati in tabella 1.

Frammento	Primer Foward 5'-3'	Primer Reverse 5'-3'
<i>GP1BA</i>		
1	TGGATGCTGTTTCTGGAAGC	CGCCAAGACCACGCAGGG
2	ACCAAGCTCCAGGTCGAT	ATAGAGGATCTCACAGTTGC
3	CCCTGCGTGGTCTTGCG	GGTCTGTGTCACCTTCAT
4	GCAACTGTGAGATCCTCTAT	TCGGGCTTGGAGTGGGCTC
5	ACAAGAATCCACTAAGGAGC	GAGACCCAAGACATAGAAGC
6	ATCCCGACCATCGCCACAAG	AGACCCCTCCCCTATCACC
<i>GP1BB</i>		
1	CCTCCCCTGCAGAGTAAGC	GCAACGCAGGTCGCGGTAG
2	CTGCGACTGCCGCCTTGTG	GTGGGGTGGGTCTGAGAGAT
<i>GP9</i>		
1	ACTCCACCTCCCTAGTCAC	ACCAGGCTTGGTGGAGTCTG

Tabella 1. Sequenze dei primers utilizzati nello screening dei geni *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9*.

Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando la KAPA2G FastHotStart (KAPABIOSYSTEMS).

- ❖ Ogni reazione di PCR è stata sottoposta ai seguenti cicli :
 - ❖ attivazione dell'enzima TAq 95°C per 2 minuti
- 30 cicli suddivisi in:
1. denaturazione a 95°C per 10 secondi;
 2. appaiamento a Tm per 15 secondi;
 3. estensione a 72°C 4 secondi per ampliconi < 1kb

estensione finale dell'amplificato a 72°C per 1 minuto.

La presenza e la corretta lunghezza dei prodotti di amplificazione sono stati verificati attraverso l'elettroforesi su gel di agarosio (Seakem).

3.2.2 SEQUENZIAMENTO DEI PRODOTTI DI PCR ED ANALISI DELLE SEQUENZE

I prodotti di PCR sono stati inviati al servizio di sequenziamento IGA Technology Service di Udine. Le sequenze sono state poi analizzate attraverso l'utilizzo del programma SeqMan del pacchetto Lasergene (DNASTAR).

Per l'analisi degli SNP è stata usata come riferimento la banca dati dbSNP, gestita e fornita dall'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

3.3 UTILIZZO DEI PROGRAMMI PREDITTIVI

Le varianti missense identificate nello screening del BSS monoallelico sono state sottoposte all'analisi di patogenicità utilizzando 4 programmi predittivi: Mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>), Mutation Assessor (<http://mutationassessor.org/>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pp2/index.shtml>) e SIFT (<http://sift.jcvi.org/>). Poiché ogni programma utilizza diversi algoritmi di predizione per rendere più uniforme e comparabile tra di loro l'output dei programmi, ogni risultato è stato convertito in un valore compreso tra 0 e 2. In particolare:

1) PolyPhen2:

- Benigna =0
- Possibilmente patogenetica=1
- Probabilmente patogenetica=2

2) Mutation Taster:

- Polimorfismo=0
- Variante causativa=2

3) Mutation Assessor:

- Neutrale =0
- Bassa=1
- Media=2

4) SIFT:

- Tollerata=0
- Non Tollerata=2

Lo score di patogenicità è stato calcolato sommando i valori ottenuti dall'applicazione dei programmi predittivi, considerando patogenetiche le varianti con uno score ≥ 4 .

3.3. MUTAZIONE SITO SPECIFICA

Grazie alla collaborazione con il Professore Lanza dell'istituto INSERM di Strasburgo abbiamo ricevuto i vettori pDX contenenti la sequenza wild-type di *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9*.

Per inserire le varianti missense identificate nello screening del BSS monoallelico è stata utilizzata la tecnica della mutagenesi sito specifica. Questa procedura prevede l'utilizzo di primers di lunghezza compresa tra le 25-45 basi e contenenti al centro della sequenza il nucleotide mutato. In tabella 2 sono elencate le alterazioni missense analizzate e i rispettivi primers utilizzati.

Mutazione	Primer Forward (F) 5'-3'	Primer reverse (R) 5'-3'
GP1BA Ile203Thr	CTCGCTGTATACAA C ACCAAA	AAAAGCCCTTTGGT G TTGTAT
GP1BB Leu60Pro	GACACAACCGAGC C GGTGCTG	GCCGGTCAGCAC C GGCTCGGT
GP1BB Leu75Gln	GCCGGGGCTGC A GGACGCGCTGC	GCAGCGCGT C TCAGCCCCGGC
GP1BB Asn89Thr	ACACCTGGGCGCCA C CCCCTGGC	GCCAGGGG G TGGCGCCCAGGTGT
GP1BB Tyr131Cys	CGCCTGCTGCC T GCTGGCCGAGG	CCTCGGCCAG A CAGGGCAGCAGGCG
GP9 Gly129Ser	GCTGGGCCGGCTGACA A GCTACCAGC	GCTGGTAG C TGTCAGCCGGCCCAGC

Tabella 2. Primers utilizzati nella mutagenesi

Per ogni campione sono state testate quattro diverse concentrazioni di DNA plasmidico: 10-20-50-100 ng/μl ed è stato utilizzato il seguente protocollo di reazione

Reagenti	Volume (μl)
DNA 10-20-50-100 ng/μl	1
Buffer fusion 5X	10
dNTPs 2,5nM	4
Primer Forward 10μM	1
Primer Reverse 10μM	1
Taq Fusion 2U/μl	0,5
H ₂ O	32,5
Volume finale	50

Il programma per ogni reazione di PCR è stato il seguente :

- ❖ attivazione dell'enzima Taq Fusion a 98°C per 1 minuto
- ❖ 18 cicli suddivisi in:
 1. denaturazione a 95°C per 30 secondi;
 2. appaiamento a 62 ° C per 1 minuto;
 3. estensione a 68°C 4 per 8 minuti

estensione finale dell'amplificato a 72°C per 5 minuti

Al termine della reazione di PCR i prodotti sono stati digeriti con 1µl di endonucleasi DpnI (10U/µl) a 37°C per 1h. Questo enzima è in grado di discriminare fra filamenti di DNA metilato e non metilato (target sequence: 5'-GmATC-3') e di digerire quindi il DNA templato: in questo modo sono selezionati solo i neofilamenti di DNA con la mutazione inserita. Dopo aver controllato la digestione su gel di agarosio, sono stati trasformati 5µl di ogni preparazione concentrate 50ng, utilizzando le cellule competenti DH5α (Invitrogen). Il giorno successivo sono state selezionate le colonie e sono state inoculate in 100ml di LB Broth e lasciate a crescere a 37°C o/n. Per la purificazione del DNA plasmidico è stato sfruttato il kit Midiprep Kit (QIAGEN). I plasmidi sono stati poi sequenziati per verificare la presenza della mutazione. I plasmidi positivi per la presenza della variante sono attualmente in uso per gli studi funzionali che sono svolti in collaborazione con il Professor Lanza (INSERM, Strasburgo).

4. BSSA1 DATABASE: RISULTATI E DISCUSSIONE

L'istituzione del Consorzio Internazionale al quale hanno aderito medici e ricercatori provenienti da più nazioni, ha permesso di creare un database per la raccolta di dati clinici e molecolari di pazienti affetti dalla BSSA1. Grazie al Consorzio è stato possibile arruolare 132 famiglie provenienti da più nazioni e ottenere da queste una serie di dati anagrafici (sesso, età, età alla diagnosi, origine geografica, consanguineità), clinici (eventuali diagnosi di trombocitopenia idiopatica, trattamenti terapeutici, manifestazioni emorragiche, gravidanze), ematologici (numero e volume piastrinico, risposta alla ristocetina, presenza del recettore GPIb-IX-V) e genetici (mutazioni identificate in uno dei geni *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*). Tutte le informazioni sono state inserite in un database (BSS Consortium database) attualmente gestito dal nostro laboratorio e consultabile dai gruppi di studio che hanno aderito al Consorzio. Per aumentare le informazioni sulle varianti che causano questa malattia abbiamo incrementato i dati molecolari delle famiglie del Consorzio con i dati di altre 79 famiglie descritte in letteratura, raggiungendo un totale di 211 famiglie. Tutte le mutazioni che caratterizzano le 211 famiglie sono state poi inserite in un database pubblico disponibile in rete (LOVD: Leiden Open Variation Database).

Nei paragrafi successivi si descrivono le informazioni acquisite grazie all'elaborazione dei dati clinici e molecolari ottenuti sia dal Consorzio che dalla letteratura.

4.1 ANALISI DEI DATI MOLECOLARI

Dall'analisi dei dati molecolari delle 211 famiglie è emerso che 60 famiglie (28%) presentano le mutazioni nel gene *GP1BA*, 59 (44%) in *GP1BB* e 92 (44%) in *GP9* (Tabella 1). In accordo con la rarità della malattia, in 179 pazienti (85%) la mutazione è in omozigosi, mentre 28 (13%) sono eterozigoti composti. L'omozigosità è in accordo con una consanguineità nota in più del 50% delle famiglie e con numerosi matrimoni tra cugini di primo grado. Negli altri casi la consanguineità è molto probabilmente remota anche se non è disponibile l'analisi dell'aplotipo per dimostrarla. Nella maggior parte dei casi sono state individuate le mutazioni in entrambi gli alleli, tranne che in 4 probandi (2%) (BSS1, BSS26, BSS61, BSS120) nei quali lo screening ha permesso di caratterizzare una 1 sola variante. Anche se è possibile che il secondo allele mutato sia sfuggito all'analisi, non possiamo escludere che alcuni siano casi di BSSA2.

E' stato osservato, inoltre, che in tre famiglie ci sono più di due varianti: nella famiglia BSS3 gli individui affetti hanno due varianti entrambe in omozigosi nel gene *GP1BA*, nella seconda (BSS103) il probando è eterozigote per tre mutazioni presenti di *GP1BB* mentre nella terza (BSS99) il paziente è omozigote per una mutazione in *GP1BB* ed eterozigote per una variante in *GP1BA*. In ogni caso la presenza di mutazioni su entrambi gli alleli di un singolo gene ci consente di definire in modo certo qual è il gene che causa la malattia.

Nell'ampio gruppo di pazienti sono state identificate 112 diverse varianti, di cui 22 mai riportate in letteratura. Si tratta principalmente di alterazioni missense, nonsense e frameshift distribuite lungo tutto il gene. Non sono descritte mutazioni di splicing perché, come indicato nell'introduzione, la maggior parte della regione codificante dei geni BSS è contenuta in un solo esone.

4.2 MUTAZIONI NEL GENE *GP1BA*

Nel gene *GP1BA* sono state descritte 45 diverse varianti (Tabella 2). Si tratta di 3 alterazioni in frame e 10 mutazioni missense nelle LRR, di 10 mutazioni nonsense e 21 frameshift che sono tutte localizzate nella porzione extracellulare della proteina ad eccezione delle mutazioni p.Tyr534Cysfs*82, p.Tyr534Leufs*83 e p.Trp540* che colpiscono il dominio trans membrana e di p.Gln587* che è presente nella porzione citoplasmatica.

Una nuova mutazione descritta c.1A>C distrugge il codone di inizio ATG il cui effetto sulla proteina non è conosciuto (Figura 1).

4.3 MUTAZIONI NEL GENE *GP1BB*

Nel gene *GP1BB* sono state identificate 38 diverse alterazioni (Tabella 3), 23 sono mutazioni missense, 6 nonsense e 8 frameshift. La maggior parte di queste varianti colpisce la porzione extracellulare e 7 distruggono la porzione transmembrana. Non si conoscono mutazioni nella piccola porzione citoplasmatica ed è interessante ricordare che la variante g.-160C>G, essendo localizzata nel promotore, interferisce con il corretto controllo dell'espressione di *GP1BB* (Ludlow et al., 1996)(Figura 1).

In 7 pazienti un allele mutato è una microdelezione sul cromosoma 22q11.2 che contiene il gene *GP1BB* [Budarf et al., 1995; Kenny et al., 1999; Hillmann et al., 2002; Tange t al., 2004; Bartsch et al., 2011]. Questi pazienti oltre a presentare le caratteristiche cliniche della BSS, mostrano difetti tipici della Sindrome di DiGeorge (MIM#188400).

E' interessante notare che in 2 dei 7 pazienti, la macrotrombocitopenia e la tendenza al sanguinamento sono le uniche espressioni cliniche presenti. In questi casi è molto probabile che si tratti di piccole delezioni anche se i relative regioni di rottura non sono state caratterizzate.

4.4 MUTAZIONI NEL GENE *GP9*

Nei pazienti con difetti nel gene *GP9* sono 28 le diverse mutazioni (Tabella 4). Sono soprattutto mutazioni missense che, ad esclusione di p.Leu169Pro presente nella parte citoplasmatica della subunità, colpiscono solo la porzione extracellulare. Altre sono nonsense (N. 4), di cui 3 nella regione extracellulare e p.Trp150* nella porzione transmembrana. Nel gene *GP9* sono state inoltre descritte piccole delezioni e duplicazioni: 3 causano frameshift mentre 2 sono piccole delezioni in frame, una delle quali (c.-4_7del) rimuove la prima metionina del trascritto. Vi è un'unica alterazione intronica c.-90G>C in omozigosi, il cui significato biologico non è ancora stato studiato (Figura 1)

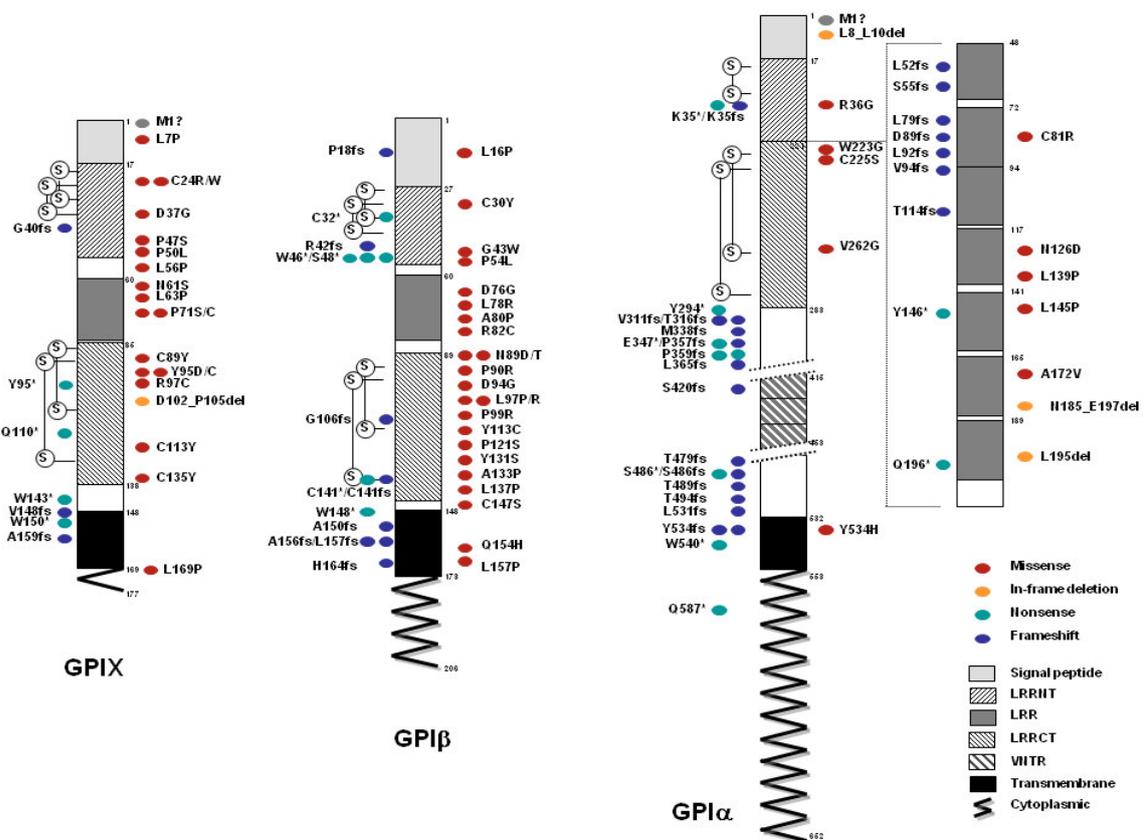


Figura 1. Rappresentazione delle mutazioni all'interno delle proteine GPIIa, GPIIb e GPIIX. La posizione dei domini di GPIIa sono state ottenute dall'articolo Blenner et al., (2004). I ponti disolfuro sono stati disegnati sulla base del lavoro di McEwan et al (2011). [Immagine adattata da Savoia et al., 2014]

4.5 EFFETTO FONDATAZIONE

Dall'analisi dei dati raccolti sull'origine geografica dei pazienti, si nota come molte famiglie provengano dalle stesse aree, in particolare 50 sono le famiglie indiane, 41 sono dal Nord Europa, 37 dal bacino del Mediterraneo e 29 invece siano giapponesi. Tra le famiglie con la stessa origine ci sono mutazioni condivise da più famiglie apparentemente non imparentate ma che suggeriscono la presenza di potenziali effetti fondatori.

Nel gene *GP1BA*, infatti, la mutazione p.Cys225Ser è stata descritta in pazienti della Penisola Iberica e del Sud America, mentre la delezione c.1601_1603del, è stata identificata in quelli provenienti dalla Germania e dalla Finlandia. In modo analogo la variante p.Leu196del è presente in molti casi giapponesi mentre la mutazione di frameshift p.Ser486Ilefs*12 è caratteristica dei pazienti Algerini.

Nel gene *GP1BB* la variante p.Asn89Asp è stata descritta in 8 famiglie, tutte provenienti da Ile de La Réunion, un'isola nell'Oceano Indiano ex colonia francese. Ricostruendo gli alberi genealogici di queste famiglie, un gruppo di ricerca francese ha dimostrato che sette delle otto famiglie hanno un antenato comune nato nel 1671 in India [Lanza et al., 2013]. Nello stesso gene ci sono altri casi di mutazioni presenti in più famiglie con la stessa origine geografica: ad esempio la variante p.Arg42Cysfs*14 è stata descritta in 10 famiglie Indiane, la mutazione nonsense p.Ser48* in 5 alleli di pazienti tunisini, mentre la missense p.Tyr113Cys è stata ritrovata in 4 alleli di pazienti originari del Giappone.

Per quanto riguarda invece il gene *GP9* cinque sono le mutazioni più frequenti che da sole colpiscono 137 (75%) su 194 alleli di questo gene. La variante p.Asn61Ser spiega 64 alleli europei [Liang et al., 2005]; p.Cys24Arg, presente in 32 alleli, è relativamente frequente nelle famiglie dell'India e del Pakistan. Le varianti p.Cys89Tyr e p.Trp143* presenti rispettivamente in 11 e 12 alleli, sono state descritte in pazienti Giapponesi provenienti dalle aree di Kyushu e Okinawa [Kunishima et al., 2006]. Infine la mutazione missense p.Phe71Ser è stata descritta in 18 alleli di pazienti provenienti da più regioni del mondo, quali Iran, India e Giappone suggerendo per questo locus il verificarsi di eventi mutazionali distinti tra loro.

4.6 EFFETTI DELLE MUTAZIONI SUL COMPLESSO GPIb-IX-V

Anche se non indagati in questa tesi, si ritiene opportuno indicare quali potrebbero essere i meccanismi molecolari che impediscono al complesso GPIb-IX-V di operare correttamente.

Nelle piastrine dei pazienti il complesso è assente o espresso a livelli molto bassi

Indipendentemente da quale gene è mutato il complesso non si assembla nel reticolo endoplasmatico [Lie and Emsley, 2013].

Per la corretta espressione sulla membrana sono necessari i legami disolfuro tra le proteine GPIb α e GPIb β a livello extracellulare e le interazioni tra i domini transmembrana delle varie subunità. Conseguentemente, mutazioni nonsense o di frameshift che colpiscono i domini extracellulari sono da considerarsi deleterie in quanto generano subunità instabili che non sono in grado di legarsi tra loro. Un esempio è dato dalle mutazioni nonsense (p.Glu347, p.Trp359*, p.Ser486*) localizzate nella porzione extracellulare di GPIb α . In questi casi le proteine sono sintetizzate ma non sono presenti sulla superficie delle piastrine [Ware et al., 1990; Kunishima et al., 1994; Yamamoto et al., 2013]. L'unica mutazione nonsense che consente l'espressione del complesso a livelli normali è p.Gln587*. Questa mutazione altera il dominio citoplasmatico di GPIb α , impedendo l'interazione con le tubulina. Il complesso non è in grado di legarsi con il VWF, mettendo in evidenza l'importanza del legame della proteina al citoscheletro per la corretta funzionalità del recettore [Yamamoto et al., 2013].

Altre mutazioni possono interferire con i corretti eventi posttraduzionali delle subunità: le varianti p.Leu8_Leu10del, p.Leu16Pro e p.Leu7Pro localizzate nel peptide segnale rispettivamente di GPIb α , GPIb β e GPIIX altereranno la conformazione proteica impedendo la corretta traslocazione delle subunità nel reticolo endoplasmatico o il corretto clivaggio del peptide segnale [Lanza et al., 2002].

Un'alterata espressione del complesso può risultare dalle microdelezioni, come quelle sul cromosoma 22q11.2, o a mutazioni che alterano i processi di trascrizione e traduzione. Un esempio è la variante g.-160C>G nel gene *GP1BB*, che distrugge il legame con il fattore di trascrizione GATA-1 e causa la riduzione dell'attività del promotore di circa 84% [Ludlow et al., 1996]. La mutazione c.376A>G in *GP1BA*, sembra invece interferire con la stabilità dell'mRNA che non è espresso nei megacariociti di un paziente omozigote per tale mutazione. [Vettore et al 2011]. Infine, le varianti c.1A>C (GPIb α) e c.-4_7del (GP9) potrebbero alterare il processo di traduzione in quanto colpiscono il codone di inizio e la sequenza Kozak [Sandrock et al., 2010].

Più difficile invece è la valutazione della patogenicità delle varianti missense che risultano relativamente frequenti nella BSS (56%) e che colpiscono principalmente le proteine GPIIb β e GPIIX, il cui folding è probabilmente più sensibile ad eventuali cambi amminoacidici.

Per stabilire la patogenicità di una variante missense è spesso necessario studiarla a livello funzionale. La manipolazione *in vitro* dei megacariociti dei pazienti è relativamente complessa ed per questo sono state allestite le linee cellulari utili per questi studi.

Le cellule maggiormente utilizzate sono le CHO (Chinese Hamster Ovary) nelle quali, dopo la cotrasfezione dei geni *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9*, uno dei quali mutato, si valuta l'effetto della variante sulla corretta espressione del complesso sulla membrana e sulla sua funzionalità nel legare VWF. Grazie all'applicazione di questi studi è stato possibile valutare l'effetto di molte varianti. In particolare è stato dimostrato che le alterazioni p.Trp233Gly e p.Cy225Ser in GPIIb α , p.Tyr113Cys in GPIIb β e p.Leu7Pro in GPIIX producono subunità instabili [Gonzalez-Manchon et al., 2001; Kurosawa et al., 2001; Lanza et al., 2002; Rosenberg et al., 2007]. La proteina mutata p.Asn89Thr (GPIIb β), anche se stabile, è ritenuta nel reticolo endoplasmatico, impedendo così l'espressione del complesso sulla membrana [Strassel et al., 2003]. In altri casi si osserva la corretta espressione della proteina, la formazione del complesso ma l'incapacità di legarsi con il VWF, come nel caso di p.Cys81Arg in GPIIb β [Kenny et al., 1998].

Nonostante gli studi funzionali nei modelli cellulari si rivelino utili, possono produrre dati discordanti rispetto a quelli ottenuti dalle cellule dei pazienti. E' questo il caso della variante p.Leu147Ser (GPIIb α) che nel modello cellulare impedisce l'espressione del recettore che è invece riscontrabile al 40% rispetto al normale nelle cellule del paziente [Li et al., 1995]. Un altro esempio è dato dalla variante p.Cys147Ser (GPIIb β) che nelle cellule CHO risulta espressa mentre nelle piastrine del paziente risulta significativamente ridotta [Kunishima et al., 2006b]. Risulta quindi importante, soprattutto per lo studio di patogenicità delle varianti missense, avvalersi di studi sia *in vitro* che *in vivo*, in modo da determinare e chiarire il loro effetto sull'espressione e funzionalità del complesso.

4.7 STUDIO IN SILICO DEGLI EFFETTI DELLE NUOVE MUTAZIONI MISSENSE

Dall'analisi delle mutazioni è emerso che tra le nuove varianti, 12 sono nuove alterazioni missense. In assenza di studi funzionali è possibile ricorrere a programmi bioinformatici che valutano la conservazione e la struttura dell'amminoacido oppure utilizzare le strutture tridimensionali delle proteine.

In collaborazione con la Prof.ssa Annalisa Pastore del MRC National Institute for Medical Research di Londra abbiamo sfruttato le strutture cristalline di GPIb α , GPIb β e GPIX disponibili nella banca dati PDB (Protein Data Base) per analizzare l'impatto delle nuove varianti sul corretto folding della proteina.

Nel gene *GP1BA* sono 2 le nuove varianti missense, p.Arg36Gly e p.Leu139Pro. Come si osserva dalla rappresentazione di GPIb α l'amminoacido Leu139 è presente in uno dei domini di ripetizione delle leucine (LRR4) e la sostituzione con una prolina è considerata destabilizzante per la struttura. Meno chiaro è l'effetto di p.Arg36Gly, ma essendo stata identificata in un paziente omozigote per la mutazione la p.Leu8_Leu10del sempre GPIb α in omozigosi, è ipotizzabile che il suo effetto non sia significativo.

Le nuove mutazioni missense di *GP1BB* sono sette: p.Gly43Trp, p.Leu78Arg, p.Asn89Asp, p.Asp94Gly, p.Leu97Arg, p.Tyr131Ser, p.Leu137Pro. Il residuo Gly43 si presenta in un piccolo loop di ripiegamento e la sostituzione con l'amminoacido triptofano dovrebbe avere un effetto destabilizzante sulla struttura; infatti la glicina è l'unico residuo ad avere dei valori di phi e psi positivi (angoli torsionali), che gli permettono di posizionarsi in piccole regioni di ripiegamento.

I residui idrofobici Leu78 e Leu97 e il residuo idrofilico Asn89 sono residui nascosti con le catene laterali rivolte verso una regione idrofobica e per questo motivo la loro sostituzione con residui carichi potrebbe destabilizzare il folding.

Il residuo Asp94 non sembra avere un particolare ruolo strutturale ma essendo un residuo esposto sulla superficie della proteina non possiamo escludere la sua interazione con altre molecole.

Per i residui Tyr131Ser e Leu137Pro presenti nel dominio LRRCT non è stato possibile valutare la loro posizione perché le coordinate di questa regione non sono disponibili.

Se però confrontiamo il dominio LRRCT di GPIb β con quello di GPIb α in quanto zone omologhe, il residui Tyr131 e Leu137 corrisponderebbero rispettivamente agli amino acidi Asn239 e Gln248 in GPIb α .

Osservando la struttura possiamo ipotizzare che essendo il residuo Tyr131 nascosto, una sua sostituzione porterebbe ad una distorsione della struttura, mentre per Leu137 che è esposto sulla superficie un cambio è probabile possa interferire con la funzione della proteina.

In GPIX sono state identificate 3 nuove missense. Essendo Pro47 e Pro50 residui idrofobici e quindi nascosti, ci aspettiamo che un loro cambio possa alterare la struttura del loop dove sono localizzate.

Più complicata è la situazione di p.Arg97Cys, che subendo un cambio con una cisteina potrebbero interferire con la formazione dei ponti disolfuro.

Dallo studio è quindi emerso che la maggior parte delle nuove varianti missense riportate nel BSS database sono potenzialmente causa di destabilizzazione della proteina e possibile motivo della loro degradazione. Come già accennato solo gli studi funzionali ci permetteranno di stabilire con più accuratezza il loro ruolo patogenetico.

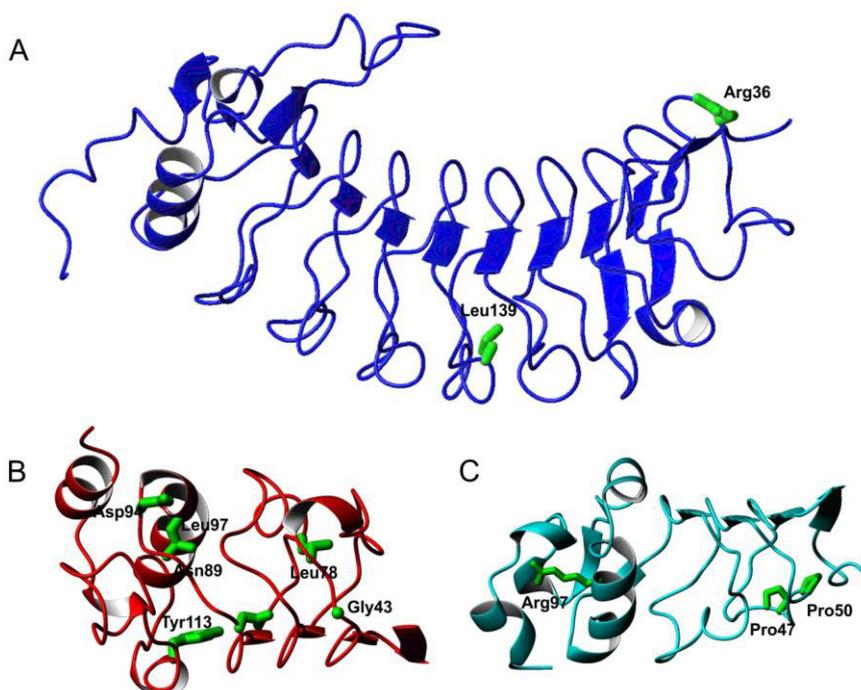


Figura 2. Rappresentazione delle nuove mutazioni missense riportate nel BSS Consortium Database, utilizzando le strutture cristalline delle proteine GPIIb α (A, nome accesso al PDB 1gwb), GPIIb β (B, nome accesso al PDB 3rfe) e GPIIX (C,3rez). [Immagine tratta dall'articolo Savoia et al., 2014].

4.8 ANALISI DEI DATI CLINICI E DI LABORATORIO

Nel BSS database sono stati raccolti i dati clinici di 161 probandi appartenenti alle 132 famiglie del Consorzio. Trattandosi di una raccolta retrospettiva non è sempre stato possibile ottenere le tutte informazioni cliniche ed ematologiche per tutti i pazienti. Pertanto l'elaborazione è stata condotta su gruppi di individui numericamente diversi tra loro. Nonostante questo riteniamo che le informazioni ottenute siano interessanti e utili per comprendere al meglio la malattia visto che i lavori finora prodotti in letteratura riguardano solo uno o pochi casi.

L'età media dei pazienti alla diagnosi è 16 anni (dalla nascita fino ai 75 anni) con una predominanza delle femmine (N=100) rispetto ai maschi (N=60). Circa il 50% dei pazienti (64 su 131) aveva ricevuto una diagnosi di piastrinopenia autoimmune (ITP) con somministrazione di immunoglobuline e/o steroidi e/o splenectomia (N. 14).

Ad ogni probando era stato assegnato uno score di sanguinamento, secondo le regole del World Health Organization (WHO): in assenza di sanguinamento è attribuito il grado 0, in presenza di petecchie il grado 1, con piccole perdite di sangue il grado 2, con perdite di sangue che hanno richiesto ricovero il grado 3, mentre per emorragie spontanee che richiedono trasfusioni è assegnato il grado 4.

Elaborando i dati disponibili su 139 pazienti, è emerso che alla diagnosi più del 50% dei pazienti presentavano gravi fenomeni emorragici: 34 con grado 3 e 43 con grado 4; in 39 pazienti, invece, il grado era 2; 17 presentavano petecchie quindi il grado era 1; solo 6 pazienti avevano avuto episodi emorragici (grado 0). Non è stata osservata alcuna correlazione tra lo score e il gene mutato anche se nei pazienti con mutazioni nel gene *GPIBB* si è notato una maggiore, ma non significativa, tendenza al sanguinamento.

La conta piastrinica media di $51 \times 10^9/L$ (range $5-175 \times 10^9/L$), è stata determinata sulla base dei valori riportati per 128 pazienti; il volume piastrinico medio, disponibile per 84 individui, varia dai 9.3 ai 27 fL mentre il diametro medio di una piastrina calcolato su 42 pazienti, è di $4.8\mu m$ (range $2.9-7.5\mu m$), il doppio rispetto ad un controllo sano. Come per il WHO score, non è stato possibile determinare alcuna correlazione tra numero o dimensione delle piastrine e tipo di gene mutato. Questo dato è in linea con il fatto che l'espressione del complesso GPIb-IX-V è ridotta o assente indipendentemente da quale gene risulti mutato.

Per quanto riguarda la funzionalità delle piastrine, il test RIPA è assente o molto ridotto in 92 casi. In 14 individui affetti, invece, la risposta alla ristocetina oscilla tra il 7% e 22% rispetto ai controlli sani, mentre un solo paziente (BSS61) ha il 60% di risposta all'agglutinazione.

Purtroppo non è stato possibile utilizzare i risultati del test RIPA per studi di correlazione tra risposta aggregazione piastrinica e mutazioni, perché le analisi non sono state eseguite in un unico laboratorio, ma in più centri che utilizzano protocolli diversi e quindi concentrazioni diverse di ristocetina. Inoltre, non abbiamo identificato differenze significative nella conta piastrinica o nei livelli di espressione del complesso GPIb-IX-V tra il gruppo con parziale risposta alla ristocetina e quello con assenza di risposta alla ristocetina.

Infine la subunità GPIb α , quella che preferenzialmente è studiata in citofluorimetria per valutare l'espressione del recettore, è presente sulla superficie delle piastrine in 103 pazienti. In 11 casi l'espressione di tale subunità è di circa 20-40% mentre in 10 è maggiore del 50%. Tra questi ultimi pazienti ci sono i tre probandi (BSS1, BSS61, BSS120) in cui è stato identificato un solo allele e che molto probabilmente sono affetti dalla forma BSSA2.

4.9 RILEVANZE CLINICHE EMERSE DALLO STUDIO

La raccolta dei dati clinici e molecolari ha permesso di ottenere numerose informazioni sulla sindrome e di far luce su alcuni aspetti poco chiari. Nonostante sia una piastrinopenia congenita e relativamente grave l'età media alla diagnosi è di 16 anni. La malattia spesso non è riconosciuta e molti pazienti ricevono una diagnosi di ITP sottoponendoli a terapie mediche inutili e spesso invasive come la rimozione della milza.

Il fatto che non sia diagnosticata in modo corretto può dipendere dal fatto che non sempre gli episodi emorragici sono gravi come atteso per una patologia con il difetto nel recettore del VWF. Infatti, dallo studio è emerso che circa la metà degli individui affetti ha uno WHO score tra 0 e 2, corrispondente ad assenti o leggeri episodi di sanguinamento che non richiedono particolari interventi. I pazienti probabilmente sfuggono alla diagnosi anche per la mancata individuazione delle piastrine grandi, caratteristica peculiare della malattia. Infatti è stato osservato in un recente lavoro [Noris et al., 2013] che i contatori elettronici non solo non sono in grado di rilevare le piastrine di volume aumentato ma sottostimano anche la conta piastrinica. Per questo motivo è importante visionare uno striscio di sangue al microscopio.

Dall'analisi dei dati di laboratorio emerge che il test RIPA e/o lo studio dell'espressione delle subunità del complesso, sono test diagnostici semplici e molto utili per supportare il sospetto diagnostico di BSS ed indirizzare il caso agli studi molecolari.

5 .BSS MONOALLELICO (BSSA2): RISULTATI E DISCUSSIONE

La BSS è nota come autosomica recessiva (BSSA1), anche se in tempi recenti sono state descritte delle famiglie con una forma dominante nota come BSSA2. In questi pazienti la piastrinopenia è moderata e le piastrine presentano un volume leggermente aumentato. Solo 5 varianti in eterozigosi sono state finora identificate, 4 nel gene *GP1BA* e 1 in *GP1BB*. Fatta eccezione per p.Ala172Val del gene *GP1BA* che è relativamente frequente nella la popolazione Italiana, [Savoia et al., 2001; Noris et al., 2011], le altre 4 varianti sono state descritte in singole famiglie [Miller et al.,1992; Kunishima et al., 2006a; Vettore e al., 2008a]. Con l'obbiettivo di approfondire le nostre conoscenze sulla forma monoallelica e di stabilire la sua frequenza nella nostra coorte di pazienti piastrinopenici privi di diagnosi, sono stati selezionati 120 pazienti sulla base di alcune caratteristiche, tra cui una moderata piastrinopenia, piastrine con volume normale o leggermente aumentato,e/o lieve riduzione della capacità di aggregazione piastrinica in presenza di ristocetina. In molti di questi pazienti erano già stati esclusi i possibili geni candidati delle forme più frequenti: in 26 casi era stato analizzato il gene *MYH9*, responsabile di un'altra forma di macropiastrinopenia ereditaria (MYH9-RD, MIM#160775); in 62 pazienti invece era stata analizzata la regione 5'UTR di *ANKRD26*, un gene implicato nella piastrinopenia THC2 (MIM#188000) una forma autosomica dominante associata ad elevato rischio di leucemia.

5.1 VARIANTI IDENTIFICATE NEI GENI GP1BA, GP1BB E GP9

Nei 120 pazienti sono stati analizzati i geni *GP1BA*, *GP1BB* e *GP9* mediate PCR e sequenziamento Sanger. L'analisi ha permesso di individuare 13 varianti in eterozigosi: 5 nel gene *GP1BA*, 6 in *GP1BB* e 2 in *GP9* (Tabella 5).

Delle 13 varianti identificate, quattro sono potenzialmente patogenetiche (1 nonsense, 2 frameshift e una a livello del codone di inizio), mentre le altre sono sostituzioni amminoacidiche.

La sola mutazione nonsense identificata è p.Lys483* che produce una subunità GP1 α tronca a livello della porzione extracellulare. Basandoci sui dati della letteratura [Ware et al., 1990; Kunishima et al., 1994; Yamamoto et al. 2013] è ipotizzabile che la proteina priva della

porzione transmembrana sia incapace di assemblarsi nel complesso o di ancorarsi alla membrana con conseguente degradazione.

Potrebbe pertanto trattarsi di aploinsufficienza anche se sarà importante capire perché la proteina prodotta dall'allele wild type non sia sufficiente a garantire un fenotipo sano come atteso nelle condizioni autosomiche recessive. Per questo motivo non è da escludere un effetto dominante negativo con interferenza della subunità mutata nella formazione del complesso, aspetto che solo gli studi funzionali potranno accertare.

Nel corso delle analisi sono state identificate 2 mutazioni di frameshift: la delezione di una base c.104del nel gene *GP1BA* (BSSA2_3) che colpisce il dominio proteico LRRNT e la duplicazione di una base c.491dup nel gene *GP1BB* (BSSA2_13), variante presente nella porzione transmembrana. Si tratta di mutazioni note, descritte in pazienti con BSSA1: in particolare la variante c.104del è stata riportata in tre affetti [Li et al., 1996; Savoia et al., 2014] mentre la c.491dup è stata ritrovata in omozigosi in un solo paziente [Savoia et al., 2011].

Nella famiglia BSSA2_3 (Figura 1) abbiamo analizzato 5 componenti della famiglia. In accordo con la segregazione, dall'analisi è emerso che la variante c.104del è presente solo negli individui affetti. Tra questi l'individuo II-1, che presenta un fenotipo più grave rispetto ai familiari ma non così grave come nelle forme BSSA1, abbiamo identificato una seconda variante c.13_15delCTC (p.Leu10del) che rimuove un amino acido nel peptide segnale. Poiché tale variante è stata trasmessa dalla madre I-2 anche all'individuo II-3, entrambi asintomatici, è probabile che la mutazione p.Leu10del sia una variante ipomorfica. Rimane comunque da chiarire se la delezione p.Leu10del in associazione con la mutazione frameshift possa aggravare il fenotipo della paziente II-1. Per rispondere a tale domanda è necessario prima di tutto approfondire gli esami clinici in tutta la famiglia e successivamente mettere a punto degli studi funzionali per capire l'effetto della variante p.Leu10del.

Nella famiglia del probando BSSA2_13 la variante c.491dup, presente nel gene *GP1BB*, è presente solo negli individui affetti. Visto che l'alterazione avviene a livello del dominio transmembrana, è plausibile ipotizzare un effetto dominante negativo, che anche in questo caso solo gli studi funzionali sveleranno.

Per la variante c.2T>G nel gene *GP1BB* sarà interessante determinare se la proteina è assente oppure se durante la traduzione sarà riconosciuto codone di inizio a valle per la sintesi di una subunità GPIb β priva della porzione N-terminale, il cui significato biologico andrà successivamente indagato.

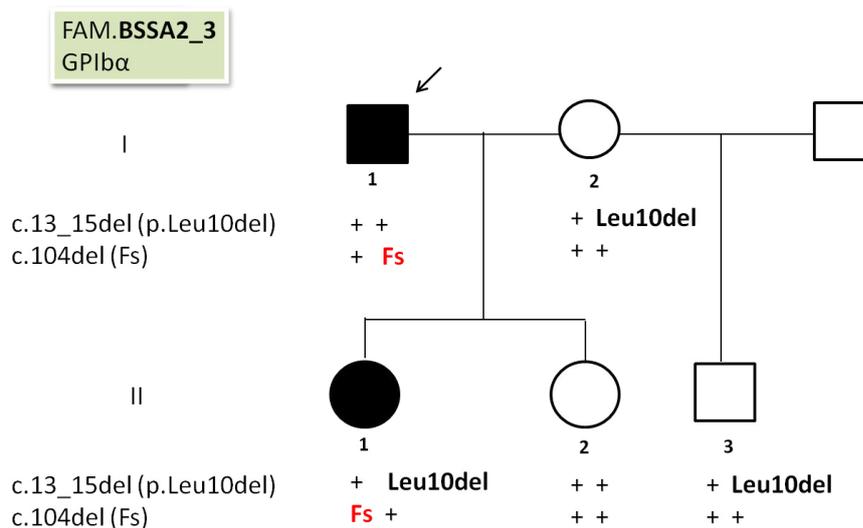


FIGURA 1. Albero genealogico della famiglia BSSA2_3. Le mutazioni sono presenti nel gene *GP1BA*. L'allele wild type è segnato con il simbolo +, la mutazione c.104del è indicata con Fs mentre la variante c.13_15del è indicata con Leu10del nell'albero. L'individuo II-1 presenta entrambe le varianti, una ereditata dal padre piastrinopenico l'altra dalla madre asintomatica.

In 11 pazienti sono state identificate 9 varianti missense: 3 nel gene *GP1BA*, 4 nel gene *GP1BB* e 2 nel gene *GP9*. Tranne che per p.Asn89Thr (*GP1BB*) [Strassel et al.,2003], identificata in omozigosi in un paziente BSSA1, tutte le alterazioni non sono mai state descritte.

Per stabilire quali sono le varianti potenzialmente patogenetiche abbiamo condotto degli studi in silico e di segregazione. Per prima cosa abbiamo verificato che le varianti non fossero riportate come SNP. Le uniche varianti presenti nel dbSNP sono la p.Val31Ala nel gene *GP1BA* (rs201827537) e la p.Pro123Leu nel gene *GP9* (rs202229101) entrambe però rare e prive del valore di MAF (Minor Allele Frequency). Abbiamo inoltre utilizzato dei programmi predittivi, quali Mutation Assessor, Mutation Taster, PolyPhen2, SIFT. I programmi utilizzano diversi algoritmi di predizione e per tale motivo è stato convertito ogni risultato in un valore compreso tra 0 e 2 (Vedi Materiali e Metodi). Lo score di patogenicità è stato poi calcolato sommando i valori ottenuti dall'applicazione dei programmi predittivi, considerando patogenetiche le varianti con score ≥ 4 . Dall'analisi bioinformatica è emerso che 8 delle 9 varianti missense presentano uno score maggiore di 4 e quindi risultano potenzialmente patogenetiche, la variante p.Pro123Leu è invece considerata benigna (Tabella 5).

Stabilita la patogenicità delle varianti con i tools bioinformatici, abbiamo eseguito lo studio di segregazione. Per i probandi BSSA2_2, BSSA2_9, BSSA2_10, BSSA2_11, BSSA2_14 e BSSA2_15 non è stato possibile reperire il DNA dei famigliari. La segregazione è confermata nelle famiglie dei probandi, BSSA2_5, BSSA2_7, BSSA2_8, BSSA2_12 ma non in BSSA2_1

e BSSA2_4 . Infatti se osserviamo l'albero genealogico della famiglia BSSA2_1, (figura 2) il probando BSSA2_1 (II-2) ha ereditato la variante p.Val31Ala dalla madre I-2 che però risulta sana (conta piastrinica $177 \times 10^9/L$) considerando la soglia di $150 \times 10^9/L$ 150. La stessa variante è trasmessa alla sorella II-3, anche lei sana (conta piastrinica $200 \times 10^9/L$). E' noto però che il numero delle piastrine è più elevato nelle femmine rispetto ai maschi e nei giovani rispetto agli adulti e agli anziani (Balduini et al., 2014), aspetto che dovrebbe essere valutato nella definizione della condizione piastrinopenica.

Nella famiglia BSSA2_4 invece, la p.Pro46Leu è presente nel probando (I-1) e in tutti i figli affetti (II-2, II-4) tranne nella figlia II-3 che ha un numero di piastrine inferiore alla soglia (Figura 2). E' quindi possibile che il gene che causa la piastrinopenia in questa famiglia non sia *GP1BA*.

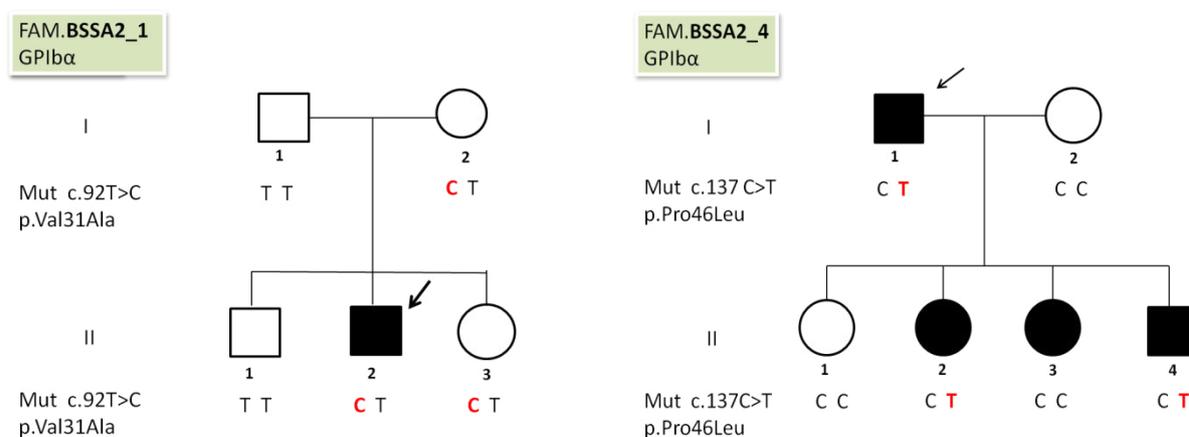


Figura 2. Alberi genealogici delle famiglie BSSA2_1 e BSSA2_4. In entrambe le famiglie le varianti sono presenti nel gene *GP1BA*. Il probando è indicato con la freccia, mentre il nucleotide mutato è in grassetto rosso. Osservando gli alberi di entrambe le famiglie si osserva come le varianti non segregano negli individui affetti.

L'utilizzo dei programmi predittivi e contemporaneamente lo studio di segregazione si rivelano degli utili strumenti per la valutazione della patogenicità di una variante missense. Tra quelle identificate in questo studio, 8 sono state indicate come patogenetiche dai programmi. In 5 famiglie sono stati condotti gli studi di segregazione che hanno confermato la patogenicità solo in tre casi. Osservando i dati raccolti nella tabella 4, p.Ile203Thr (*GPIbα*), come pure p.Leu60Pro e p.Tyr131Cys (*GPIbβ*), possono essere considerate varianti patogenetiche in quanto sia il dato bioinformatico sia quello genetico concordano.

Per p.Leu75Gln e p.Asn89Thr, anche se i dati di segregazione non sono disponibili, lo score predittivo di patogenicità è elevato. Inoltre la variante p.Asn89Thr era stata identificata in un paziente BSSA1, nel quale la proteina risultava stabile nel reticolo endoplasmatico ma non espressa sulla superficie della cellula [Strassel et al.,2003].

L'alterazione p.Gly129Ser invece, ha uno score di 5 ma è priva del dato di segregazione e quindi di più difficile interpretazione. Delle altre tre varianti, due p.Val31Ala e p.Pro46Leu, nonostante uno score di patogenicità di 5 non segregano perfettamente nelle rispettive famiglie. Infine, con uno score molto basso e in assenza del dato di segregazione, consideriamo p.Pro123Leu non patogena. In conclusione, sei delle 9 varianti missense sono probabilmente responsabili della piastrinopenia.

Solo gli studi funzionali ci consentono di stabilire con accuratezza il ruolo delle varianti nella malattia e per questo è necessario procedere in questo senso. Sono stati generati i costrutti mutati ai singoli loci per le transfezioni in cellule CHO che esprimono stabilmente i geni del complesso. Gli esperimenti sono in corso e quindi non sono disponibili dei dati. Tuttavia se gli studi funzionali, in combinazione con i dati clinici, dovessero confermare la patogenicità almeno delle sei varianti designate come patologiche sulla base dei dati bioinformatici e/o di segregazione, 11 su 120 probandi (9%) sarebbero da considerarsi affetti da BSSA2. Questo rappresenta l'unico lavoro che sta cercando di stabilire la frequenza di BSSA2 tra le forme di piastrinopenia ereditaria. Se i dati fossero confermati, considerando anche l'elevata frequenza della mutazione p.Ala172Val, la BSSA2 risulterebbe una tra le forme di piastrinopenia ereditaria più frequente in Italia.

Family ID	<i>GPIBA</i> NM_000173.5 cDNA mutation	Protein in <i>GPIba</i>	Mutation type	Pathogenicity score using bioinformatic tools	Pathogenicity on genetic basis	Reference
BSSA2-1	c.92T>C (rs201827537)	p.Val31Ala	missense	5	NP	Novel
BSSA2_2	c.92T>C (rs201827537)	p.Val31Ala	missense	5	ND	Novel
BSSA2_3	c.104delA	p.Lys35Argfs*4	frameshift		P	Li et al., 1996
BSSA2_4	c.137C>T	p.Pro46Leu	missense	5	NP	Novel
BSSA2_5	c.608T>C,	p.Ile203Thr	missense	7	P	Novel
BSSA2_6	c.1447A>T	p.Lys483*	nonsense		ND	Novel
Family ID	<i>GPIBB</i> NM_000407.4 cDNA mutation	Protein in <i>GPIbβ</i>	Mutation type			Reference
BSSA2_7	c.2T>G	p.Met1?	start codon		P	Novel
BSSA2_8	c.179T>C	p.Leu60Pro	missense	8	P	Novel
BSSA2_9	c.179T>C	p.Leu60Pro	missense	8	ND	Novel
BSSA2_10	c.224T>A	p.Leu75Gln	missense	7	ND	Novel
BSSA2_11	c.266A>C	p.Asn89Thr	missense	7	ND	Strassel et al., 2003
BSSA2_12	c.394A>G	p.Tyr131Cys	missense	6	P	Novel
BSSA2_13	c.491dup	p.His164Glnfs*145	frameshift		P	Savoia et al, 2011
Family ID	<i>GP9</i> NM_000174.3 cDNA mutation	Protein in <i>GPIX</i>	Mutation type			Reference
BSSA2_14	c.368C>T (rs202229101)	p.Pro123Leu	missense	2	ND	Novel
BSSA2_15	c.385G>A	p.Gly129Ser	missense	5	ND	Novel

Tabella 5. Varianti identificate nei pazienti con sospetta diagnosi di BSSA2. Le varianti p.Val 31Ala nel gene *GPIBA* e p.Pro123Leu nel gene *GP9* presentano un rs in quanto sono presenti nel dbSNPs. La colonna Pathogenicity score riporta gli score solo per le 9 varianti missense. I dati di segregazione sono disponibili per 8 famiglie, in particolare in due famiglie (BSSA2_1, BSSA2_4) la variante non segrega negli affetti. La maggior parte sono mutazioni nuove mai descritte tranne per la mutazione c.104del nel gene *GPIBA* descritta in Li et al., 1996, e le mutazioni la p.Asn89Thr e c.491dup del gene *GPIBB* presenti rispettivamente in Strassel et al., 2003 e Savoia et al. ,2011. [P=patogenetica, NP=non patogenetic, ND=non determinata].

6. CONCLUSIONI

L'istituzione di un Consorzio Internazionale per lo studio della Sindrome di Bernard-Soulier ha permesso la realizzazione un database (BSS Consortium database) che attualmente raccoglie i dati clinici, molecolari ed epidemiologici di 132 famiglie affette. La casistica è stata ulteriormente ampliata a 211 famiglie raccogliendo i dati molecolari di altre 79 famiglie descritte in letteratura. L'elaborazione dei dati ci ha permesso di descrivere l'ampio spettro di varianti che caratterizzano i pazienti BSS e di chiarire alcuni aspetti della malattia. Purtroppo data l'eterogeneità genetica e l'ampia variabilità fenotipica gli studi di tipo genotipo-fenotipo si sono rivelati difficili da eseguire. Nonostante le varie informazioni acquisite il database rimane comunque ancora limitato e incompleto, sarà necessario ampliare il numero di pazienti e associare alle varianti identificate i relativi studi funzionali che si rivelano sempre più indispensabili per stabilire l'effetto di una variante sulla struttura del complesso GPIb-IX-V e sulla sua funzionalità. Il BSS Consortium database permetterà ai clinici che hanno partecipato allo studio di osservare nel tempo l'andamento della malattia nei pazienti e di ottenere informazioni utili per stabilire un corretto protocollo per la presa in carico dei pazienti.

La caratterizzazione di nuove forme di Bernard-Soulier monoallelico (BSSA2) all'interno della nostra coorte di pazienti piastrinopenici rappresenta un punto di partenza per riuscire a caratterizzare la malattia sia dal punto di vista clinico che molecolare. Se gli studi funzionali dovessero confermare la patogenicità delle varianti missense identificate nello screening potremmo dimostrare che le forme di BSS monoallelico sono presenti in circa il 9% dei pazienti piastrinopenici e che quindi dovrebbero essere prese in considerazione in caso di diagnosi di trombocitopenia ereditaria. Diventa quindi indispensabile anche per la forma BSSA2 la realizzazione di un database per raccogliere i dati clinici e molecolari dei pazienti. L'elaborazione dei dati permetterà di caratterizzare meglio la malattia e di far luce su alcuni aspetti poco chiari come ad esempio capire perché alcuni individui eterozigoti sono asintomatici mentre altri presentano la malattia.

7. TABELLE

Tabella 1. Pazienti BSS inclusi nello studio

Family ID	Number of affected individuals	Geographical origin	Status	NM_000173.5 (GP1BA) ^a	Protein ^b	Reference
BSS1	1	Italy	Heterozygote ^c	c.555_590del	p.Asn185_Glu197delinsLys	BSS Consortium Savoia et al., 2014
BSS2	1	nd	Homozygote	c.1A>C	p.?	
BSS3	2	Algeria	Homozygote	c.23_31del	p.Leu8_Leu10del	
				c.106A>G	p.Arg36Gly (p.Arg20Gly)	
BSS4	2	Italy	Homozygote	c.104del	p.Lys35Argfs*4	
BSS5	1	Switzerland	Homozygote	c.104del	p.Lys35Argfs*4	
BSS6	1	Maghreb	Homozygote	c.416T>C	p.Leu139Pro (p.Leu123Pro)	
BSS7	1	Adoption	Homozygote	c.438C>G	p.Tyr146*	
BSS8	2	Algeria	Homozygote	c.583_585del	p.Leu195del (p.Leu179del)	
BSS9	2	Algeria	Homozygote	c.583_585del	p.Leu195del (p.Leu179del)	
BSS10	1	Japan	Compound heterozygote	c.103A>T	p.Lys35*	
		Brazil		c.673T>A	p.Cys225Ser (p.Cys209Ser)	
BSS11	2	Germany	Compound heterozygote	c.586C>T	p.Gln196*	
				c.1601_1602delinsTGG	p.Tyr534Leufs*83	

BSS12	2	South Iran	Homozygote	c.154dup	p.Leu52Profs*5	BSS Consortium	Afrasiabi et al., 2007
BSS13	1	Italy	Homozygote	c.165_168del	p.Ser55Argfs*12		Vettore et al., 2008b
BSS14	1	nd	Homozygote	c.339_340insGA	p.Thr114Glufs*16		Sumitha et al., 2011
BSS15	1	Italy	Homozygote	c.376A>G	p.Asn126Asp (p.Asn110Asp)		Savoia et al., 2011
BSS16	1	Italy	Homozygote	c.376A>G	p.Asn126Asp (p.Asn110Asp)		Vettore et al., 2011
BSS17	3	Algeria	Homozygote	c.583_585del	p.Leu195del (p.Leu179del)		de la Salle et al., 1995; Ulsemer et al., 2000
BSS18	2	Uzbekistan	Homozygote	c.667T>G	p.Trp223Gly (p.Trp207Gly)		Rosenberg et al., 2007
BSS19	1	South America	Homozygote	c.673T>A	p.Cys225Ser (p.Cys209Ser)		Savoia et al., 2011
BSS20	1	Spain	Homozygote	c.673T>A	p.Cys225Ser (p.Cys209Ser)		Simsek et al., 1994b
BSS21	1	Portugal	Homozygote	c.673T>A	p.Cys225Ser (p.Cys209Ser)		Rand et al., 2010
BSS22	1	Bolivia (ethinia indigenous)	Homozygote	c.882C>G	p.Tyr294*		Glembotsky et al., 2012
BSS23	1	Japan	Homozygote	c.1094_1101del	p.Leu365Argfs*14		Imai et al., 2009
BSS24	1	nd	Homozygote	c.1257dup	p.Ser420Glnfs*78		Sumitha et al., 2011
BSS25	1	Japan	Homozygote	c.1457C>A	p.Ser486*		Kunishima et al., 1994
BSS26	1	nd	Heterozygote ^c	c.1077G>A	p.Trp359*		Ware et al., 1990
BSS27	1	Japan	Homozygote	c.103A>T	p.Lys35*		Gohda et al., 2007
BSS28	1	nd	Homozygote	c.104del	p.Lys35Argfs*4	Li et al., 1996	

BSS29	1	India	Homozygote	c.236dup	p.Asp79Glufs*2	Ali et al., 2014
BSS30	1	India	Homozygote	c.266dup	p.Asp89Glufs*63	Ali et al., 2014
BSS31	1	nd	Homozygote	c.275del	p.Leu92Argfs*20	Simsek et al., 1994a
BSS32	1	India	Homozygote	c.278dup	p.Val94Serfs*58	Ali et al., 2014
BSS33	2	Afrikan-American	Homozygote	c.434T>C	p.Leu145Pro (p.Leu129Pro)	Li et al., 1995
BSS34	1	Afrikan-American	Homozygote	c.434T>C	p.Leu145Pro (p.Leu129Pro)	Antonucci et al., 2000
BSS35	1	Italy	Homozygote	c.515C>T	p.Ala172Val (p.Ala156Val)	De Marco et al., 1990; Ware et al., 1993
BSS36	2	India	Homozygote	c.785T>G	p.Val262Gly (p.Val246Gly)	Ali 2014
BSS37	1	nd	Homozygote	c.932_933del	p.Val311Glyfs*39	Kanaji et al., 1997
BSS38	1	India	Homozygote	c.941dup	p.Thr316Hisfs*35	Ali et al., 2014
BSS39	1	West India	Homozygote	c.1012dup	p.Met338Asnfs*13	Ali et al., 2013
BSS40	1	India	Homozygote	c.1064dup	p.Pro357Thrfs*2	Ali et al., 2014
BSS41	1	nd	Homozygote	c.1077del	p.Trp359*	Bowers et al., 2006
BSS42	1	India	Homozygote	c.1436dup	p.Leu479Phefs*19	Ali et al., 2014
BSS43	1	West India	Homozygote	c.1454dup	p.Ser486Ilefs*12	Ali et al., 2013
BSS44	1	Japan	Homozygote	c.1454dup	p.Ser486Ilefs*12	Gohda et al., 2007
BSS45	1	India	Homozygote	c.1465del	p.Glu489Asnfs*64	Ali et al., 2014
BSS46	1	nd	Homozygote	c.1480del	p.Thr494Prof*59	Noda et al., 1995

BSS47	1	nd	Homozygote	c.1480del	p.Thr494Profs*59	Mitsui et al., 1998
BSS48	2	India	Homozygote	c.1592del	p.Leu531Argfs*22	Ali et al., 2014
BSS49	1	Germany	Homozygote	c.1601_1602del	p.Tyr534Cysfs*82	Kenny et al., 1997
BSS50	1	Germany	Homozygote	c.1601_1602del	p.Tyr534Cysfs*82	Afshar-Kharghan et al., 1997
BSS51	1	Finland	Homozygote	c.1601_1602del	p.Tyr534Cysfs*82	Koskela et al., 1999a
BSS52	1	nd	Homozygote	c.1620G>A	p.Trp540*	Holmberg et al., 1997
BSS53	1	Japan	Homozygote	c.1759C>T	p.Gln587*	Yamamoto et al., 2013
BSS54	1	Germany	Compound heterozygote	c.165_168del	p.Ser55Argfs*12	Afshar-Kharghan et al., 2000
				c.1601_1602del	p.Tyr534Cysfs*82	
BSS55	2	Iceland	Compound heterozygote	c.241T>C	p.Cys81Arg (p.Cys65Arg)	Kenny et al., 1998
				c.1620G>A	p.Trp540*	
BSS56	1	Finland	Compound heterozygote	c.434T>C	p.Leu145Pro (p.Leu129Pro)	Koskela et al., 1999
				c.1601_1602del	p.Tyr534Cysfs*82	
BSS57	1	Italy	Compound heterozygote	c.515C>T	p.Ala172Val (p.Ala156Val)	Margaglione et al., 1999
				c.555_590del	p.Asn185_Glu197delinsLys	
BSS58	2	Spain	Compound heterozygote	c.673T>A	p.Cys225Ser (p.Cys209Ser)	Gonzalez-Manchon et al., 2001
				c.1454dup	p.Ser486Ilefs*12	
BSS59	1	Japan	Compound	c.1039G>T	p.Glu347*	Yamamoto et al., 2013

			heterozygote	c.1480del	p.Thr494Profs*59	
BSS60	1	nd	Compound heterozygote	c.1454dup	p.Ser486Ilefs*12	Kanaji et al., 1997
				c.1480del	p.Thr494Profs*59	
Family ID	Number of affected individuals	Geographical origin	Status	NM_000407.4 (GP1BB) ^a	Protein ^b	Reference
BSS61	2	Tunisia	Heterozygote ^c	c.53_65del	p.Pro18Argfs*23	BSS Consortium Savoia et al.2014
BSS62	1	Canada	Homozygote	c.47T>C	p.Leu16Pro	
BSS63	1	India	Homozygote	c.124_145del	p.Arg42Cysfs*14	
BSS64	1	nd	Homozygote	c.127G>T	p.Gly43Trp (p.Gly18Trp)	
BSS65-66	2	Turkey	Homozygote	c.233T>G	p.Leu78Arg (p.Leu53Arg)	
BSS67-74	9	La Réunion	Homozygote	c.265A>G	p.Asn89Asp (p.Asn64Asp)	
BSS75	2	Lebanon	Homozygote	c.281A>G	p.Asp94Gly (p.Asp69Gly)	
BSS76	1	France	Homozygote	c.290T>G	p.Leu97Arg (p.Leu72Arg)	
BSS77	1	Spain	Homozygote	c.392A>C	p.Tyr131Ser (p.Tyr106Ser)	
BSS78	1	Mauritania	Homozygote	c.418_419dup	p.Cys141Leufs*53	
BSS79	3	Algeria	Homozygote	c.423C>A	p.Cys141*	
BSS80	2	nd	Homozygote	c.[470T>A;472_473del]	p.Leu157Glnfs*151	
BSS81	1	France	Compound	c.410T>C	p.Leu137Pro (p.Leu112Pro)	

			heterozygote	c.470T>C	p.Leu157Pro (p.Leu132Pro)		
BSS82	1	Gypsy tribe	Homozygote	22q11.2 deletion		BSS Consortium Savoia et al., 2014	Bartsch et al., 2011
BSS83	1	Saudi Arabia	Homozygote	c.53_65del	p.Pro18Argfs*23		Strassel et al., 2004
BSS84-92	10	India	Homozygote	c.124_145del	p.Arg42Cysfs*14		Sumitha et al., 2011
BSS93	1	Tunisia	Homozygote	c.143C>A	p.Ser48*		Hadjkacem et al., 2010
BSS94	1	Tunisia	Homozygote	c.143C>A	p.Ser48*		Hadjkacem et al., 2009; Hadjkacem et al., 2010
BSS95	1	Algeria	Homozygote	c.266A>C	p.Asn89Thr (p.Asn64Thr)		Strassel et al., 2003
BSS96	1	India	Homozygote	c.269C>G	p.Pro90Arg (p.Pro65Arg)		Sumitha et al., 2011
BSS97	1	Japan	Homozygote	c.296C>G	p.Pro99Arg (p.Pro74Arg)		Kunishima et al., 2000
BSS98	1	Japan	Homozygote	c.443G>A	p.Trp148*		Kunishima et al., 2002
BSS99	1	India	Homozygote	c.462G>C	p.Gln154His (p.Gln129His)		Sumitha et al., 2011
				c.470T>C	p.Leu157Pro (p.Leu132Pro)		
			Heterozygote in GP1BA	c.1600T>C	p.Tyr534His (p.Tyr518His)		
BSS100	1	Morocco	Homozygote	c.466dup	p.Ala156Glyfs*153		Strassel et al., 2006
BSS101	1	Italy	Homozygote	c.491dup	p.His164Glnfs*145		Savoia et al., 2011
BSS102	1	Japan	Compound heterozygote	c.443G>A	p.Trp148*	Kunishima et al., 2013a	
				22q11.2 deletion			

BSS103	1	Tunisia	Compound heterozygote	c.143C>A	p.Ser48*	Hadjkacem et al., 2010
				c.227A>G	p.Asp76Gly (p.Asp51Gly)	
				c.238G>C	p.Ala80Pro (p.Ala55Pro)	
BSS104	1	Japan	Compound heterozygote	c.244C>T	p.Arg82Cys (p.Arg57Cys)	Sato et al., 2014
				c.338A>G	p.Tyr113Cys (p.Tyr88Cys)	
BSS105	1	Japan	Compound heterozygote	c.289C>T	p.Leu97Phe (p.Leu72Phe)	Kunishima et al., 2013a
				22q11.2 deletion		
BSS106	1	Japan	Compound heterozygote	c.338A>G	p.Tyr113Cys (p.Tyr88Cys)	Kunishima et al., 1997
				c.397G>C	p.Ala133Pro (p.Ala108Pro)	
BSS107	1	Japan	Compound heterozygote	c.439T>A	p.Cys147Ser (p.Cys122Ser)	Kunishima et al., 2006b
				c.448del	p.Ala150Argfs*43	
BSS108	2	Japan	Homozygote	c.53_65del	p.Pro18Argfs*23	Watanabe et al., 2003
BSS109	2	nd	Homozygote	c.89G>A	p.Cys30Tyr (p.Cys5Tyr)	Gonzalez-Manchon et al., 2003
BSS110-111	2	West India	Homozygote	c.96C>A	p.Cys32*	Ali et al., 2013
BSS112	1	Ireland	Homozygote	c.137G>A	p.Trp46*	Moran et al., 2000
BSS113	1	India	Homozygote	c.138G>A	p.Trp46*	Ali et al., 2014
BSS114	1	nd	Homozygote	c.338A>G	p.Tyr113Cys (p.Tyr88Cys)	Kurokawa et al., 2001
BSS115	1	Syria	Homozygote	c.423C>A	p.Cys141*	Mahfouz et al., 2012

BSS116	1	nd	Compound heterozygote	g.-160C>G	Reduced protein level	Ludlow et al., 1996
				22q11.2 deletion		Budarf et al., 1995
BSS117	1	nd	Compound heterozygote	c.161C>T	p.Pro54Leu (p.Pro29Leu)	Hillmann et al., 2002; Nurden et al., 2003
				22q11.2 deletion		
BSS118	1	nd	Compound heterozygote	c.315del	p.Gly106Alafs*87	Kenny et al., 1999
				22q11.2 deletion	{Kenny, 1999 #34}	
BSS119	1	nd	Compound heterozygote	c.361C>T	p.Pro121Ser (p.Pro96Ser)	Tang et al., 2004
				22q11.2 deletion		
Family ID	Number of affected individuals	Geographical origin	Status	NM_000174.3 (GP9) ^a	Protein ^b	Reference
BSS120	1	Spain	Heterozygote ^c	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	BSS Consortium
BSS121	1	nd	Homozygote	c.-90G>T	nd	
BSS122	1	India	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)	
BSS123	2	Pakistan	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)	
BSS124	1	Pakistan	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)	
BSS125	1	Australia	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	
BSS126	1	France	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	
BSS127	1	France	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	

BSS128	1	France	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
BSS129	1	France	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
BSS130	1	France	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
BSS131	1	France	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
BSS132	1	Switzerland	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
BSS133	1	India	Homozygote	c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)
BSS134	1	Japan	Homozygote	c.266G>A	p.Cys89Tyr (p.Cys73Tyr)
BSS135	1	Japan	Homozygote	c.266G>A	p.Cys89Tyr (p.Cys73Tyr)
BSS136	1	Spain	Homozygote	c.289C>T	p.Arg97Cys (p.Arg81Cys)
BSS137	1	Albania	Homozygote	c.442dup	p.Val148Glyfs*67
BSS138	1	France	Compound heterozygote	c.139C>T	p.Pro47Ser (p.Pro31Ser)
				c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
BSS139	1	France	Compound heterozygote	c.149C>T	p.Pro50Leu (p.Pro34Leu)
				c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
BSS140	1	Australia	Compound heterozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
				c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)
BSS141	1	Australia	Compound heterozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)
				c.506T>C	p.Leu169Pro (p.Leu153Pro)

BSS142	2	France	Compound heterozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	BSS Consortium	
				c.139C>T	p.Pro47Ser (p.Pro31Ser)		
BSS143	1	Japan	Compound heterozygote	c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)		
				c.266G>A	p.Cys89Tyr (p.Cys73Tyr)		
BSS144	1	Germany	Homozygote	c.-4_7del	p.?		
BSS145	1	France	Homozygote	c.20T>C	p.Leu7Pro		
BSS146	2	India	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)		
BSS147-152	6	India	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)		
BSS153	2	Pakistan	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)		
BSS154	2	Italy	Homozygote	c.72T>G	p.Cys24Trp (p.Cys8Trp)		
BSS155	1	India	Homozygote	c.119del	p.Gly40Alafs*43		
BSS156	2	Italy	Homozygote	c.167T>C	p.Leu56Pro (p.Leu40Pro)		
BSS157	1	Turkey	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)		
BSS158	1	Australia	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)		
BSS159	4	Switzerland	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)		
BSS160	1	Australia	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)		
BSS161	1	Canada	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)		
BSS162	2	Italy	Homozygote	c.188T>C	p.Leu63Pro (p.Leu47Pro)		

BSS163-164	2	India	Homozygote	c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)	Savoia et al., 2014	Sumitha et al., 2011
BSS165-166	5	South Iran	Homozygote	c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)		Afrasiabi et al., 2007
BSS167	1	The Netherlands	Homozygote	c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)		Noris et al., 1997
BSS168	1	India	Homozygote	c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)		Savoia et al., 2011
BSS169-170	2	India	Homozygote	c.212T>G	p.Phe71Cys (p.Phe55Cys)		Sumitha et al., 2011
BSS171	1	Italy	Homozygote	c.284A>G	p.Tyr95Cys (p.Tyr79Cys)		Savoia et al., 2011
BSS172	1	India	Homozygote	c.328C>T	p.Gln110*		Sumitha et al., 2011
BSS173	1	Japan	Homozygote	c.338G>A	p.Cys113Tyr (p.Cys97Tyr)		Kunishima et al., 1999
BSS174-175	2	Southwest Japan	Homozygote	c.429G>A	p.Trp143*		Iwanaga et al., 1998
BSS176	1	Southwest Japan	Homozygote	c.429G>A	p.Trp143*		Kunishima et al., 2006c
BSS177	1	Italy	Homozygote	c.442dup	p.Val148Glyfs*67		Savoia et al., 2011
BSS178	1	India	Homozygote	c.437_474dup	p.Ala159Argfs*77		Sumitha et al., 2011
BSS179	1	Canada	Compound heterozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)		Drouin et al., 2005
		Ojibway tribe		c.305_313del	p.Asp102_Pro105delinsAla		
BSS180	1	Pakistan	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)	Rivera et al., 2001	
BSS181-182	2	India	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)	Ali et al., 2014	

BSS183-184	2	West India	Homozygote	c.70T>C	p.Cys24Arg (p.Cys8Arg)	Ali et al., 2013
BSS185	1	Austria	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	Clemetson et al., 1994
BSS186	1	Sweden	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	Donner et al., 1996
BSS187-191	11	Finland	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	Koskela et al., 1999b
BSS192	1	Belgium	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	Vanhoorelbeke et al., 2001
BSS193-196	4	Germany	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	Sachs et al., 2003
BSS197-199	5	2 Switzerland, 1 Germany	Homozygote	c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	Liang et al., 2005
BSS200	1	Japan	Homozygote	c.212T>C	p.Phe71Ser (p.Phe55Ser)	Suzuki et al., 1997; Suzuki et al., 1999
BSS201-202	4	Japan	Homozygote	c.266G>A	p.Cys89Tyr (p.Cys73Tyr)	Noda et al., 1996
BSS203	1	Japan	Homozygote	c.266G>A	p.Cys89Tyr (p.Cys73Tyr)	Gohda et al., 2007
BSS204	1	West India	Homozygote	c.283T>G	p.Tyr95Asp (p.Tyr79Asp)	Ali et al., 2013
BSS205	1	India	Homozygote	c.285T>G	p.Tyr95*	Ali et al., 2014
BSS206	1	West India	Homozygote	c.404G>A	p.Cys135Tyr (p.Cys119Tyr)	Ali et al., 2013
BSS207	1	Southwest Japan	Homozygote	c.429G>A	p.Trp143*	Toyohama et al., 2003
BSS208	1	Southwest Japan	Homozygote	c.429G>A	p.Trp143*	Takata et al., 2012
BSS209	1	Southwest Japan	Homozygote	c.429G>A	p.Trp143*	Noda et al., 1995

BSS210	1	nd	Homozygote	c.450G>A	p.Trp150*	Xu et al., 2010
BSS211	3	British Isles	Compound heterozygote	c.110A>G	p.Asp37Gly (P.Asp21Gly)	Wright et al., 1993
				c.182A>G	p.Asn61Ser (p.Asn45Ser)	

^aLa numerazione nucleotidica su cDNA dei geni GP1BA, GP1BB e GP9 inizia considerando il nucleotide A dell'ATG come +1. (Sequenze di riferimento NM_000173.5, NM_000407.4, NM_000174.3, rispettivamente).

^bTra parentesi sono state indicate le posizioni amminoacidiche nella proteina matura, quindi priva del peptide segnale. I peptidi segnale sono costituiti da 16, 25 e 16 amminoacidi all'N-terminale rispettivamente in GPIb α , GPIb β , e GPIX

^cUna sola mutazione è stata identificata

a

Tabella 2. Lista delle varianti identificate nel gene *GP1BA*

<i>Order</i>	GP1BA cDNA mutation (NM_000173.5)^a	Number of alleles	Predicted amino acid change in GPIb□ (NP_000164.5)	Variant names in mature protein^b	Mutation type	References
1	c.1A>C	2	p.?		Start codon	BSS Consortium
2	c.23_31del	2	p.Leu8_Leu10del		Small in frame deletion	BSS Consortium
3	c.103A>T	3	p.Lys35*	Lys19*	Nonsense	Gohda et al., 2007; BSS Consortium
4	c.104del	6	p.Lys35Argfs*4	Lys19Argfs*4	Frameshift	Li et al., 1996; BSS Consortium
5	c.106A>G	2	p.Arg36Gly	Arg20Gly	Missense	BSS Consortium
6	c.154dup	2	p.Leu52Profs*5	Leu36Profs*5	Frameshift	Afrasiabi et al., 2007
7	c.165_168del	3	p.Ser55Argfs*12	Ser39Argfs*12	Frameshift	Afshar-Kharghan et al., 2000; Vettore et al., 2008b
8	c.236dup	2	p.Asp79Glufs*2	Asp63Glufs*2	Frameshift	Ali et al.,2014
9	c.241T>C	1	p.Cys81Arg	Cys65Arg	Missense	Kenny et al., 1998
10	c.266dup	2	p.Asp89Glufs*63	Asp73Glufs*63	Frameshift	Ali et al., 2014

11	c.275del	2	p.Leu92Argfs*20	Leu76Argfs*20	Frameshift	Simsek et al., 1994a
12	c.278dup	2	p.Val94Serfs*58	Val78Serfs*58	Frameshift	Ali et al., 2014
13	c.339_340insGA	2	p.Thr114Glufs*16	Thr98Glufs*16	Frameshift	Sumitha et al., 2011
14	c.376A>G	4	p.Asn126Asp	Asn110Asp	Missense	Savoia et al., 2011; Vettore et al., 2011
15	c.416T>C	2	p.Leu139Pro	Leu123Pro	Missense	BSS Consortium
16	c.434T>C	5	p.Leu145Pro	Leu129Pro	Missense	Li et al., 1995; Koskela et al., 1999b; Antonucci et al., 2000
17	c.438C>G	2	p.Tyr146*	Tyr130*	Nonsense	BSS Consortium
18	c.515C>T	3	p.Ala172Val	Ala156Val	Missense	De Marco et al., 1990; Ware et al., 1993; Margaglione et al., 1999
19	c.555_590del	2	p.Asn185_Glu197delinsLys	Asn169_Glu181delinsLys	Small inframe deletion	Margaglione et al., 1999; BSS Consortium
20	c.583_585del	6	p.Leu195del	Leu179del	Small inframe deletion	de la Salle et al., 1995; Ulsemer et al., 2000; BSS Consortium
21	c.586C>T	1	p.Gln196*	Gln180*	Nonsense	BSS Consortium
22	c.667T>G	2	p.Trp223Gly	Trp207Gly	Missense	Rosenberg et al., 2007

23	c.673T>A	8	p.Cys225Ser	Cys209Ser	Missense	Gonzalez-Manchon et al., 2001; Simsek et al., 1994b; Savoia et al., 2011; BSS Consortium
24	c.785T>G	2	p.Val262Gly	Val246Gly	Missense	Ali et al., 2014
25	c.882C>G	2	p.Tyr294*	Tyr278*	Nonsense	Glembotsky et al., 2012
26	c.932_933del	2	p.Val311Glyfs*39	Val295Glyfs*39	Frameshift	Kanaji et al., 1997
27	c.941dup	2	p.Thr316Hisfs*35	Thr300Hisfs*35	Frameshift	Ali et al., 2014
28	c.1012dup	2	p.Met338Asnfs*13	Met322Asnfs*13	Frameshift	Ali et al., 2013
29	c.1039G>T	1	p.Glu347*	Glu331*	Nonsense	Yamamoto et al., 2013
30	c.1064dup	2	p.Pro357Thrfs*2	Pro341Thrfs*2	Frameshift	Ali et al., 2014
31	c.1077del	2	p.Trp359*	Trp343*	Nonsense	Bowers et al., 2006
32	c.1077G>A	1	p.Trp359*	Trp343*	Nonsense	Ware et al., 1990
33	c.1094_1101del	2	p.Leu365Argfs*14	Leu349Argfs*14	Frameshift	Imai et al., 2009
34	c.1257dup	2	p.Ser420Glnfs*78	Ser404Glnfs*78	Frameshift	Sumitha et al., 2011
35	c.1436dup	2	p.Leu479Phefs*19	Leu463Phefs*19	Frameshift	Ali et al., 2014

36	c.1454dup	6	p.Ser486Ilefs*12	Ser470Ilefs*12	Frameshift	Kanaji et al., 1997; Gonzalez-Manchon et al., 2001; Gohda et al., 2007; Ali et al., 2013
37	c.1457C>A	2	p.Ser486*	Ser470*	Nonsense	Kunishima et al., 1994
38	c.1465del	2	p.Glu489Asnfs*64	Glu473Asnfs*64	Frameshift	Ali et al., 2014
39	c.1480del	6	p.Thr494Profs*59	Thr478Profs*59	Frameshift	Noda et al., 1995; Kanaji et al., 1997; Mitsui et al., 1998; Yamamoto et al., 2013
40	c.1592del	2	p.Leu531Argfs*22	Leu515Argfs*22	Frameshift	Ali et al., 2014
41	c.1600T>C	1	p.Tyr534His	Tyr518His	Missense	Sumitha et al., 2011
42	c.1601_1602del	8	p.Tyr534Cysfs*82	Tyr518Cysfs*82	Frameshift	Kenny et al., 1997; Afshar-Kharghan et al., 1997; Koskela et al., 1999b; Afshar-Kharghan et al., 2000
43	c.1601_1602delinsTGG	1	p.Tyr534Leufs*83	Tyr518Leufs*83	Frameshift	BSS Consortium
44	c.1620G>A	3	p.Trp540*	Trp524*	Nonsense	Holmberg et al., 1997; Kenny et al., 1998

45	c.1759C>T	2	p.Gln587*	Gln571*	Nonsense	Yamamoto et al., 2013
----	-----------	---	-----------	---------	----------	-----------------------

^aNumerazione dei nucleotidi su cDNA: +1 corrisponde alla A del codone di inizio ATG, che corrisponde quindi all'amminoacido 1. Refseq NM_000173.5. Le nuove varianti sono riportate in grassetto.

^bIn questa colonna sono state riportate le mutazioni nominate sulla proteina matura GPIIb α (NP_000164.5).

Tabella 3. Lista delle varianti identificate nel gene *GP1BB*.

Order	GP1BB cDNA Mutation (NM_000407.4) ^a	Number of alleles	Predicted amino acid change in GPIb α (NP_000398.1)	Variant names in mature protein ^b	Mutation type	References
1	g.-160C>G	1	Reduced protein level		Regulatory (GATA1 binding site disruption)	Ludlow et al., 1996
2	c.47T>C	2	p.Leu16Pro		Missense	BSS Consortium
3	c.53_65del	5	p.Pro18Argfs*23		Frameshift	Watanabe et al., 2003; Strassel et al., 2004; BSS Consortium
4	c.89G>A	2	p.Cys30Tyr	Cys5Tyr	Missense	Gonzalez-Manchon et al., 2003
5	c.96C>A	4	p.Cys32*	Cys7*	Nonsense	Ali et al., 2013
6	c.124_145del	20	p.Arg42Cysfs*14	Arg17Cysfs*14	Frameshift	Sumitha et al., 2011; BSS Consortium
7	c.127G>T	2	p.Gly43Trp	Gly18Trp	Missense	BSS Consortium
8	c.137G>A	2	p.Trp46*	Trp21*	Nonsense	Moran et al., 2000
9	c.138G>A	2	p.Trp46*	Trp21*	Nonsense	Ali et al., 2014
10	c.143C>A	5	p.Ser48*	Ser23*	Nonsense	Hadjkacem et al., 2009; Hadjkacem et al., 2010

11	c.161C>T	1	p.Pro54Leu	Pro29Leu	Missense	Hillmann et al., 2002; Nurden et al., 2003
12	c.227A>G	1	p.Asp76Gly	Asp51Gly	Missense	Hadjkacem et al., 2010
13	c.233T>G	4	p.Leu78Arg	Leu53Arg	Missense	BSS Consortium
14	c.238G>C	1	p.Ala80Pro	Ala55Pro	Missense	Hadjkacem et al., 2010
15	c.244C>T	1	p.Arg82Cys	Arg57Cys	Missense	Sato et al., 2014
16	c.265A>G	16	p.Asn89Asp	Asn64Asp	Missense	BSS Consortium
17	c.266A>C	2	p.Asn89Thr	Asn64Thr	Missense	Strassel et al., 2003
18	c.269C>G	2	p.Pro90Arg	Pro65Arg	Missense	Sumitha et al., 2011
19	c.281A>G	2	p.Asp94Gly	Asp69Gly	Missense	BSS Consortium
20	c.289C>T	1	p.Leu97Phe	Leu72Phe	Missense	Kunishima et al., 2013a
21	c.290T>G	2	p.Leu97Arg	Leu72Arg	Missense	BSS Consortium
22	c.296C>G	2	p.Pro99Arg	Pro74Arg	Missense	Kunishima et al., 2000
23	c.315del	1	p.Gly106Alafs*87	Gly81Alafs*87	Frameshift	Kenny et al., 1999

24	c.338A>G	4	p.Tyr113Cys	Tyr88Cys	Missense	Kunishima et al., 1997; Kurokawa et al., 2001; Sato et al., 2014; BSS Consortium
25	c.361C>T	1	p.Pro121Ser	Pro96Ser	Missense	Tang et al., 2004
26	c.392A>C	2	p.Tyr131Ser	Tyr106Ser	Missense	BSS Consortium
27	c.397G>C	1	p.Ala133Pro	Ala108Pro	Missense	Kunishima et al., 1997
28	c.410T>C	1	p.Leu137Pro	Leu112Pro	Missense	BSS Consortium
29	c.418_419dup	2	p.Cys141Leufs*53	Cys116Leufs*53	Frameshift	BSS Consortium
30	c.423C>A	4	p.Cys141*	Cys116*	Nonsense	Mahfouz et al, 2012; BSS Consortium
31	c.439T>A	1	p.Cys147Ser	Cys122Ser	Missense	Kunishima et al., 2006b
32	c.443G>A	3	p.Trp148*	Trp123*	Nonsense	Kunishima et al., 2002; Kunishima et al., 2013a
33	c.448del	1	p.Ala150Argfs*43	Ala125Argfs*43	Frameshift	Kunishima et al., 2006b
34	c.462G>C	2	p.Gln154His	Gln129His	Missense	Sumitha et al., 2011
35	c.466dup	2	p.Ala156Glyfs*153	Ala131Glyfs*153	Frameshift	Strassel et al., 2006

36	c.470T>C	3	p.Leu157Pro	Leu132Pro	Missense	Sumitha et al., 2011; BSS Consortium
37	c.[470T>A;472_473del]	2	p.Leu157Glnfs*151	Leu132Glnfs*151	Frameshift	BSS Consortium
38	c.491dup	2	p.His164Glnfs*145	His139Glnfs*145	Frameshift	Savoia et al., 2011
39	22q11.2 deletion	8			Large genomic deletion	Budarf et al.,1995; Kenny et al., 1999; Hillmann et al., 2002; Nurden et al., 2003; Tang et al., 2004; Bartsch et al., 2011; Kunishima et al., 2013a

^aNumerazione dei nucleotidi su cDNA: +1 corrisponde alla A del codone di inizio ATG, che corrisponde quindi all'amminoacido 1. Refseq NM_000407.4.

Le nuove varianti sono riportate in grassetto.

^bIn questa colonna sono state riportate le mutazioni nominate sulla proteina matura GPIIb β (NP_000398.1).

Tabella 4. Lista delle varianti identificate nel gene GP9.

Order	GP9 cDNA mutation (NM_000174.3) ^a	Number of alleles	Predicted amino acid change in GPIX (NP_000165.1)	Variant names in mature protein ^b	Mutation type	References
1	c.-90G>T	2			Uncertain significance	BSS Consortium
2	c.-4_7del	2	p.?		Start codon	Sandrock et al., 2010
3	c.20T>C	2	p.Leu7Pro		Missense	Lanza et al., 2002
4	c.70T>C	32	p.Cys24Arg	Cys8Arg	Missense	Rivera et al., 2001; Savoia et al., 2011; Sumitha et al., 2011; Ali et al., 2013; Ali et al., 2014; BSS Consortium
5	c.72T>G	2	p.Cys24Trp	Cys8Trp	Missense	Savoia et al., 2011
6	c.110A>G	1	p.Asp37Gly	Asp21Gly	Missense	Wright et al., 1993
7	c.119del	2	p.Gly40Alafs*43	Gly24Alafs*43	Frameshift	Sumitha et al., 2011
8	c.139C>T	2	p.Pro47Ser	Pro31Ser	Missense	BSS Consortium
9	c.149C>T	1	p.Pro50Leu	Pro34Leu	Missense	BSS Consortium
10	c.167T>C	2	p.Leu56Pro	Leu40Pro	Missense	Noris et al., 1998

11	c.182A>G	64	p.Asn61Ser	Asn45Ser	Missense	Wright et al., 1993; Clemetson et al., 1994; Donner et al., 1996; Koskela et al., 1999a; Vanhoorelbeke et al., 2001; Sach et al., 2003; Liang et al., 2005; Drouin et al., 2005; Dagistan et al., 2007; Zieger et al., 2009; Rand et al., 2010; BSS Consortium
12	c.188T>C	2	p.Leu63Pro	Leu47Pro	Missense	Savoia et al., 2011
13	c.212T>C	18	p.Phe71Ser	Phe55Ser	Missense	Noris et al., 1997; Suzuki et al., 1997; Suzuki et al., 1999; Afrasiabi et al., 2007; Savoia et al., 2011; Sumitha et al., 2011; BSS Consortium
14	c.212T>G	4	p.Phe71Cys	Phe55Cys	Missense	Sumitha et al., 2011
15	c.266G>A	11	p.Cys89Tyr	Cys73Tyr	Missense	Noda et al., 1996; Gohda et al., 2007; BSS Consortium
16	c.283T>G	2	p.Tyr95Asp	Tyr79Asp	Missense	Ali et al., 2013
17	c.284A>G	2	p.Tyr95Cys	Tyr79Cys	Missense	Savoia et al., 2011
18	c.285T>G	2	p.Tyr95*	Tyr79*	Nonsense	Ali et al., 2014

19	c.289C>T	2	p.Arg97Cys	Arg81Cys	Missense	BSS Consortium
20	c.305_313del	1	p.Asp102_Pro105delinsAla	Asp86_Pro89delinsAla	Small inframe deletion	Drouin et al., 2005
21	c.328C>T	2	p.Gln110*	Gln94*	Nonsense	Sumitha et al., 2011
22	c.338G>A	2	p.Cys113Tyr	Cys97Tyr	Missense	Kunishima et al., 1999
23	c.404G>A	2	p.Cys135Tyr	Cys119Tyr	Missense	Ali et al., 2013
24	c.429G>A	12	p.Trp143*	Trp127*	Nonsense	Noda et al., 1995; Iwanaga et al., 1998; Toyohama et al., 2003; Kunishima et al., 2006c Takata et al., 2012
25	c.437_474dup	2	p.Ala159Argfs*77	Ala143Argfs*77	Frameshift	Sumitha et al., 2011
26	c.442dup	4	p.Val148Glyfs*67	Val132Glyfs*67	Frameshift	Savoia et al., 2011; BSS Consortium
27	c.450G>A	2	p.Trp150*	Trp134*	Nonsense	Xu et al., 2010
28	c.506T>C	1	p.Leu169Pro	Leu169Pro	Missense	BSS Consortium

^aNumerazione dei nucleotidi su cDNA: +1 corrisponde alla A del codone di inizio ATG, che corrisponde quindi all'amminoacido 1.

Refseq NM_000174.3. Le nuove varianti sono riportate in grassetto.

In questa colonna sono state riportate le mutazioni nominate sulla proteina matura GPIX (NP_000165.1)

8. BIBLIOGRAFIA

Afshar-Kharghan V, Lopez JA. 1997. Bernard-Soulier syndrome caused by a dinucleotide deletion and reading frameshift in the region encoding the glycoprotein Ib alpha transmembrane domain. *Blood* 90:2634-2643.

Afshar-Kharghan V, Craig FE, Lopez JA. 2000. Bernard-Soulier syndrome in a patient doubly heterozygous for two frameshift mutations in the glycoprotein Ib alpha gene. *Br J Haematol* 110:919-924.

Ali S, Ghosh K, Shetty S. 2013. Molecular pathology of Bernard-Soulier syndrome in Indian patients. *Platelets* 24:571-573.

Ali S, Ghosh K, Shetty S. 2014. Novel genetic abnormalities in Bernard-Soulier syndrome in India. *Ann Hematol* 93:381-384.

Antonucci JV, Martin ES, Hulick PJ, Joseph A, Martin SE. 2000. Bernard-Soulier syndrome: common ancestry in two African American families with the GP Ib alpha Leu129Pro mutation. *Am J Hematol* 65:141-148.

Balduini A, Pallotta I, Malara A, Lova P, Pecci A, Viarengo G, Balduini CL. 2008. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocyte. *J Thromb Haemost* 6:1900-7.

Balduini A, Malara A, Pecci A, Badalucco S, Bozzi V, Pallotta I, Noris P, Torti M, Balduini CL. 2009. Proplatelet formation in heterozygous Bernard-Soulier syndrome type Bolzano. *J Thromb Haemost* 7:478-484.

Balduini A, Malara A, Balduini CL, Noris P. 2011. Megakaryocytes derived from patients with the classical form of Bernard-Soulier syndrome show no ability to extend proplatelets in vitro. 2011. *Platelets* 22:308-11.

Balduini CL, Savoia A, Seri M. 2013a. Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults. *J Thromb Haemost* 11:1006-1019.

Balduini CL, Noris P. 2014. Platelet count and aging. *Haematologica* 99(6).

Bartsch I, Sandrock K, Lanza F, Nurden P, Hainmann I, Pavlova A, Greinacher A, Tacke U, Barth M, Busse A, Oldenburg J, Bommer M, et al. 2011. Deletion of human GP1BB and SEPT5 is associated with Bernard-Soulier syndrome, platelet secretion defect, polymicrogyria, and developmental delay. *Thromb Haemost* 106:475-483.

Bernard J, Soulier JP. 1948. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire-hémorragique congénitale. *Sem Hop Paris* 24:3217-3222.

Blenner AM, Dong X, Springer TA. 2014. Structural basis of regulation of von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib. *J Bio Chem* 289:5565-5579.

Budarf ML, Konkle BA, Ludlow LB, Michaud D, Li M, Yamashiro DJ, McDonald-McGinn D, Zackai EH, Driscoll DA. 1995. Identification of a patient with Bernard-Soulier syndrome and a deletion in the DiGeorge/velo-cardio-facial chromosomal region in 22q11.2. *Hum Mol Genet* 4:763-766.

Clemetson JM, Kyrle PA, Brenner B, Clemetson KJ. 1994. Variant Bernard-Soulier syndrome associated with a homozygous mutation in the leucine-rich domain of glycoprotein IX. *Blood* 84:1124-1131.

De Marco L, Mazzucato M, Fabris F, De Roia D, Coser P, Girolami A, Vicente V, Ruggeri ZM. Variant Bernard-Soulier syndrome type bolzano. 1990. A congenital bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib-IX complex. *J Clin Invest* 86:25-31.

Donner M, Karpman D, Kristoffersson AC, Winqvist I, Holmberg L. 1996. Recurrent mutation Asn45>Ser of glycoprotein IX in Bernard-Soulier syndrome. *Eur J Haematol* 57:178-179.

Dreyfus M, Desconclois C, Guitton C, Baas M-J, Mandard H, Boisseau P, Goudemand J, Caron C, Itzhar N, Veyradier A, Lanza F, Fressinaud E. First case of platelet-type Von Willebrand disease (PT-VWD) Associated with type 2B Von Willebrand disease (2B VWD). 2011. American Society of Hematology, Annual Meeting 2011. Abstract 5313.

Enayat S, Ravanbod S, et al. 2012. A novel D235Y mutation in GP1BA gene enhances platelet onteraction with vov Willebrand factor in a Iranian family with platelet-type von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 108:946-954.

Gohda F, Uchiumi H, Handa H, Matsushima T, Tsukamoto N, Morita K, Amagai H, Murakami M, Murakami H, Nojima Y, Karasawa M. 2007. Identification of inherited macrothrombocytopenias based on mean platelet volume among patients diagnosed with idiopathic thrombocytopenia. *Thromb REs* 119:741-746.

Gonzalez-Manchon C, Larrucea S, Pastor AL, Butta N, Arias-Salgado EG, Ayuso MS, Parrilla R. 2001. Compound heterozygosity of the GPIIb/IIIa gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost* 86:1385-1391.

Gonzalez-Manchon C, Butta N, Iruin G, Alonso S, Ayuso MS, Parrilla R. 2003. Disruption of the Cys5-Cys7 disulfide bridge in the platelet glycoprotein Ibbeta prevents the normal maturation and surface exposure of GPIb-IX complexes. *Thromb Haemost* 90:456-464.

Hamilton A, Ozelo M, Leggo J, Notley C, Brown H, Frontroth JP, Angelillo-Scherrer A, Baghaei F, Enayat SM, Favalaro E, Lillicrap D, Othman M. 2011. Frequency of platelet type versus type 2B von Willebrand disease. An international registry-based study. *Thromb Haemost* 105:501-508.

Hillmann A, Nurden A, Nurden P, Combrie R, Claeysens S, Moran N, Kenny D. 2002. A novel hemizygous Bernard-Soulier Syndrome (BSS) mutation in the amino terminal domain of glycoprotein (GP)Ibbeta--platelet characterization and transfection studies. *Thromb Haemost* 88:1026-1032.

Holmberg L, Karpman D, Nilsson I, Olofsson T. 1997. Bernard-Soulier syndrome Karlstad: Trp 498>Stop mutation resulting in a truncated glycoprotein Ib alpha that contains part of the transmembranous domain. *Br J Haematol* 98:57-63.

Kanaji T, Okamura T, Kurolwa M, Noda M, Fujimura K, Kuramoto A, Sano M, Nakano S, Niho Y. 1997. Molecular and genetic analysis of two patients with Bernard-Soulier syndrome-identification of new mutations in glycoprotein Ib alpha gene. *Thromb Haemost* 77:1055-1061.

Kenny D, Newman PJ, Morateck PA, Montgomery RR. 1997. A dinucleotide deletion results in defective membrane anchoring and circulating soluble glycoprotein Ib alpha in a novel form of Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 90:2626-2633.

Kenny D, Jonsson OG, Morateck PA, Montgomery RR. 1998. Naturally occurring mutations in glycoprotein Ibalpha that result in defective ligand binding and synthesis of a truncated protein. *Blood* 92:175-183.

Kenny D, Morateck PA, Gill JC, Montgomery RR. 1999. The critical interaction of glycoprotein (GP) IBbeta with GPIX-a genetic cause of Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 93:2968-2975.

Koskela S, Partanen J, Salmi TT, Kekomaki R. 1999a. Molecular characterization of two mutations in platelet glycoprotein (GP) Ib alpha in two Finnish Bernard-Soulier syndrome families. *Eur J Haematol* 62:160-168.

Koskela S, Javela K, Jouppila J, Juvonen E, Nyblom O, Partanen J, Kekomaki R. 1999b. Variant Bernard-Soulier syndrome due to homozygous Asn45Ser mutation in the platelet glycoprotein (GP) IX in seven patients of five unrelated Finnish families. *Eur J Haematol* 62:256-264.

Kunishima S, Miura H, Fukutani H, Yoshida H, Osumi K, Kobayashi S, Ohno R, Naoe T. 1994. Bernard-Soulier syndrome Kagoshima: Ser 444>stop mutation of glycoprotein (GP) Ib alpha resulting in circulating truncated GPIb alpha and surface expression of GPIb beta and GPIX. *Blood* 84:3356-3362.

Kunishima S, Naoe T, Kamiya T, Saito H. 2001. Novel heterozygous missense mutation in the platelet glycoprotein Ib beta gene associated with isolated giant platelet disorder. *Am J Hematol* 68:249-255.

Kunishima S, Imai T, Hamaguchi M, Saito H. 2006a. Novel heterozygous missense mutation in the second leucine rich repeat of GPIbalpha affects GPIb/IX/V expression and results in macrothrombocytopenia in a patient initially misdiagnosed with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 76:348-355.

Kunishima S, Yamada T, Hamaguchi M, Saito H. 2006. Bernard-Soulier syndrome due to GPIX W127X mutation in Japan is frequently misdiagnosed as idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 83:366-367.

- Kurokawa Y, Ishida F, Kamijo T, Kunishima S, Kenny D, Kitano K, Koike K. 2001. A missense mutation (Tyr88 to Cys) in the platelet membrane glycoprotein Ibbeta gene affects GPIb/IX complex expression--Bernard-Soulier syndrome in the homozygous form and giant platelets in the heterozygous form. *Thromb Haemost* 86:1249-1256.
- Lanza F, De La Salle C, Baas MJ, Schwartz A, Boval B, Cazenave JP, Caen JP. 2002. A Leu7Pro mutation in the signal peptide of platelet glycoprotein (GP)IX in a case of Bernard-Soulier syndrome abolishes surface expression of the GPIb-V-IX complex. *Br J Haematol* 118:260-266.
- Lanza Francois 2006. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1:46
- Lanza F, Baas M-J, Dupuis A, Randrianaivo-Ranjatoelina H, Jacquemont M-L, Dreyfus M, Lavenu-Bombled C, Gachet C. 2013. Founder effect for a novel GPIBB mutation in Bernard-Soulier patients from La Réunion island. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 11:1-1322.
- Li C, Martin SE, Roth GJ. 1995. The genetic defect in two well-studied cases of Bernard-Soulier syndrome: a point mutation in the fifth leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha. *Blood* 86:3805-3814.
- Li C, Pasquale DN, Roth GJ. 1996. Bernard-Soulier syndrome with severe bleeding: absent platelet glycoprotein Ib alpha due to a homozygous one-base deletion. *Thromb Haemost* 76:670-674.
- Li R, Emsley J. 2011. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost* 11:605-614.
- Liang HP, Morel-Kopp MC, Clemetson JM, Clemetson KJ, Kekomaki R, Kroll H, Michaelides K, Tuddenham EG, Vanhoorelbeke K, Ward CM. 2005. A common ancestral glycoprotein (GP) 9 1828A>G (Asn45Ser) gene mutation occurring in European families from Australia and Northern Europe with Bernard-Soulier Syndrome (BSS). *Thromb Haemost* 94:599-605.
- Locatelli F, Rossi G, Balduini C. 2003.. Hematopoietic stem-cell transplantation for the Bernard-Soulier syndrome. *Ann Intern Med.* 7;138(1):79.
- Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. 1998. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 91:4397-4418.
- Ludlow LB, Schick BP, Budarf ML, Driscoll DA, Zackai EH, Cohen A, Konkle BA. 1996. Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem* 271:22076-22080.
- Luo SZ, Mo X, Afshar-Kharghan V, Srinivasan S, López JA, Li R. 2007. Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet. *Blood* 109:603-609.

Mahfouz RA, Bolz HJ, Otrrock ZK, Bergmann C, Muwakkit S. 2012. Novel mutation in the glycoprotein Ib β in a patient with Bernard-Soulier syndrome: possibility of distant parental consanguinity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 23:335-337.

Margaglione M, D'Andrea G, Grandone E, Brancaccio V, Amoriello A, Di Minno G. 1999. Compound heterozygosity (554-589 del, C515-T transition) in the platelet glycoprotein Ib alpha gene in a patient with a severe bleeding tendency. *Thromb Haemost* 81:486-492.

Miller JL, Lyle VA, Cunningham D. 1992. Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib alpha leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood* 79:439-446.

Mitsui T, Yokoyama S, Yazaki N, Hayashi T, Suzuki K, Shimizu Y, Kawakami T, Kanazawa C, Katsuura M, Ikegami T, Hayasaka K. 1998. Severe bleeding tendency in a patient with Bernard-Soulier syndrome associated with a homozygous single base pair deletion in the gene coding for the human platelet glycoprotein Ibalpha. *J Pediatr Hematol Oncol* 20:246-251.

Moran N, Morateck PA, Deering A, Ryan M, Montgomery RR, Fitzgerald DJ, Kenny D. 2000. Surface expression of glycoprotein Ib alpha is dependent on glycoprotein Ib beta: evidence from a novel mutation causing Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 96:532-539.

Noda M, Fujimura K, Takafuta T, Shimomura T, Fujimoto T, Yamamoto N, Tanoue K, Arai M, Suehiro A, Kakishita E, Shimasaki A, Kuramoto A. 1995. Heterogeneous expression of glycoprotein Ib, IX and V in platelets from two patients with Bernard-Soulier syndrome caused by different genetic abnormalities. *Thromb Haemost* 74:1411-1415.

Noda M, Fujimura K, Takafuta T, Shimomura T, Fujii T, Katsutani S, Fujimoto T, Kuramoto A, Yamazaki T, Mochizuki T, Matsuzaki M, Sano M. 1996. A point mutation in glycoprotein IX coding sequence (Cys73 (TGT) to Tyr(TAT)) causes impaired surface expression of GPIb/IX/V complex in two families with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost* 76:874-878.

Noris P, Pecci A, Di Bari F, Di Stazio MT, Di Pumpo M, Ceresa IF, Arezzi N, Ambaglio C, Savoia A, Balduini CL. 2004. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica*. 89:1219-1225.

Noris P, Perrotta S, Bottega R, Pecci A, Melazzini F, Civaschi E, Russo S, Magrin S, Loffredo G, Di Salvo V, Russo G, Casale M, et al. 2012. Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIb{alpha} (Bolzano mutation). *Haematologica* 97:82-88.

Nurden AT 2005. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 1773–1782

Othman M, Notley C, Lavender FL, White H, Byrne CD, Lillicrap D, O'Shaughnessy DF. 2005. Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 105:4330-4336.

- Othman M. 2011. Platelet-type Von Willebrand disease: Three decades in the life of a rare bleeding disorder. *Blood Rev* 25:147-153.
- Pecci A, Balduini CL. 2014.. Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol*. 2014 Apr;165(2):179-92.
- Peitsidis P, Datta T, et al. 2010. Bernard-Soulier syndrome in pregnancy: a systematic review. *Haemophilia* 16,584-591.
- Rivera CE, Villagra J, Riordan M, Williams S, Lindstrom KJ, Rick ME. 2001. Identification of a new mutation in platelet glycoprotein IX (GPIX) in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol* 112:105-108.
- Rosenberg N, Lalezari S, Landau M, Shenkman B, Seligsohn U, Izraeli S. 2007. Trp207Gly in platelet glycoprotein Ibalpha is a novel mutation that disrupts the connection between the leucine-rich repeat domain and the disulfide loop structure and causes Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost* 5:378-386.
- Sachs UJ, Kroll H, Matzdorff AC, Berghofer H, Lopez JA. 2003. Santoso S: Bernard-Soulier syndrome due to the homozygous Asn-45Ser mutation in GPIX: an unexpected, frequent finding in Germany. *Br J Haematol* 123:127-131.
- Sandrock K, Knöfler R, Greinacher A, Füll B, Gerisch S, Schuler U, Gehrisch S, Busse A, Zieger B. 2010. Novel Mutation in Bernard-Soulier Syndrome. *Transfus Med Hemother* 37:278-284.
- Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, Del Vecchio M, Perrotta S, Belletti S, Poggi, Iolascon A. 2001. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 97:1330-1335.
- Savoia A, Pastore A, De Rocco D, Civaschi E, Di Stazio M, Bottega R, Melazzini F, Bozzi V, Pecci A, Magrin S, Balduini CL, Noris P. 2011. Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica* 96:417-423.
- Savoia A, Kunishima S, De Rocco D et al. 2014. Spectrum of mutations in Bernard-Soulier Syndrome . *Human Mutation*. Vol.35, N°9, 1033-1045.
- Simsek S, Admiraal LG, Modderman PW, van der Schoot CE, von dem Borne AE. 1994a. Identification of a homozygous single base pair deletion in the gene coding for the human platelet glycoprotein Ib alpha causing Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost* 72:444-449.
- Strassel C, Pasquet JM, Alessi MC, Juhan-Vague I, Chambost H, Combrie R, Nurden P, Bas MJ, De La Salle C, Cazenave JP, Lanza F, Nurden AT. 2003. A novel missense mutation shows that GPIIb/IIIa has a dual role in controlling the processing and stability of the platelet GPIIb-IIIa adhesion receptor. *Biochemistry* 42:4452-4462.

- Strassel C, Eckly A, Léon C et al. 2009. Intrinsic impaired Prpplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 94:800-10
- Suzuki K, Hayashi T, Yahagi A, Akiba J, Tajima K, Satoh S, Sasaki H. 1997. Novel point mutation in the leucine-rich motif of the platelet glycoprotein IX associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol* 99:794-800.
- Takata Y, Kanaji T, Moroi M, Seki R, Sano M, Nakazato S, Sueoka E, Imamura Y, Okamura T. 2012. Platelets with a W127X mutation in GPIX express sufficient residual amounts of GPIb α to support adhesion to von Willebrand factor and collagen. *Int J Hematol* 96:733-742.
- Tang J, Stern-Nezer S, Liu PC, Matyakhina L, Riordan M, Luban NL, Steinbach PJ, Kaler SG. 2004. Mutation in the leucine-rich repeat C-flanking region of platelet glycoprotein Ib beta impairs assembly of von Willebrand factor receptor. *Thromb Haemost* 92:75-88.
- Toyohama T, Nagasaki A, Gushi K, Tamaki K, Masuda M, Takasu N. 2003. Recurrent mutation Trp126> stop of glycoprotein IX in Japanese Bernard-Soulier syndrome. *Platelets* 14:197-198.
- Vanhoorelbeke K, Schlamadinger A, Delville JP, Handsaeme J, Vandecasteele G, Vauterin S, Pradier O, Wijns W, Deckmyn H. 2001. Occurrence of the Asn45Ser mutation in the GPIX gene in a Belgian patient with Bernard Soulier syndrome. *Platelets* 12:114-120.
- Vettore S, Scandellari R, Moro S, Lombardi AM, Scapin M, Randi ML, Fabris F. 2008a. Novel point mutation in a leucine-rich repeat of the GPIb α chain of the platelet von Willebrand factor receptor, GPIb/IX/V, resulting in an inherited dominant form of Bernard-Soulier syndrome affecting two unrelated families: the N41H variant. *Haematologica* 93:1743-1747.
- Vettore S, Tezza F, Malara A, Vianello F, Pecci A, Scandellari R, Floris M, Balduini A, Fabris F. 2011. A A386G biallelic GPIb α gene mutation with anomalous behavior: a new mechanism suggested for Bernard-Soulier syndrome pathogenesis. *Haematologica* 96:1878-1882.
- Ware J, Russell SR, Vicente V, Scharf RE, Tomer A, McMillan R, Ruggeri ZM. 1990. Nonsense mutation in the glycoprotein Ib alpha coding sequence associated with Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2026-2030.
- Watanabe R, Ishibashi T, Saitoh Y, Shichishima T, Maruyama Y, Enomoto Y, Handa M, Oda A, Ambo H, Murata M, Ikeda Y. 2003. Bernard-soulier syndrome with a homozygous 13 base pair deletion in the signal peptide-coding region of the platelet glycoprotein Ib(beta) gene. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14:387-394.
- Wright SD, Michaelides K, Johnson DJ, West NC, Tuddenham EG. 1993. Double heterozygosity for mutations in the platelet glycoprotein IX gene in three siblings with Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 81:2339-2347.

Xu LM, Sun GB, Wang P, Sun N, Hu QP, Cao FF, Peng B, Zhang DH. 2010. Single novel mutation in transmembrane region of glycoprotein (GP) IX affects GP Ib- IX complex expression and causes Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol* 150:627-629.

Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Matsuno K, Hosoya R, Nogami H, Kasahara K, Mitsuyama S, Arai M. 2013. Novel Bernard-Soulier syndrome variants caused by compound heterozygous mutations (case I) or a cytoplasmic tail truncation (case II) of GPIb α . *Thromb Res* 131:e160-167.