

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO Scienze Geriatriche ed Ematologiche e Fisiopatologia Clinica

CICLO XXVIII

## Aspetti clinici, epidemiologici e genetici delle diverse forme di trombocitopenie ereditarie

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

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

**Dottoranda:** Silvia Ferrari



## INDICE

Riassunto	pag.1
Summary	pag.5
Introduzione	pag.9
Scopo della tesi	pag. 29
Materiali e Metodi	pag. 31
Risultati	pag. 44
Discussione	pag. 56
Bibliografia	pag. 62

## **RIASSUNTO**

### **Introduzione**

Le piastrinopenie congenite sono un eterogeneo gruppo di patologie caratterizzato da ridotto numero di piastrine e si presentano con manifestazioni cliniche variabili da forme gravi a forme più lievi di riscontro casuale. Si suddividono in piastrinopenie da difetto della differenziazione e maturazione megacariocitaria, difetto di migrazione dei MK dalla nicchia ossea del midollo a quella vascolare e della elongazione delle pro-piastrine. Vi sono poi le piastrinopenie ereditarie da ridotta sopravvivenza piastrinica e le piastrinopenie a patogenesi ancora sconosciuta.

Attualmente si conoscono almeno 20 geni i cui difetti genetici determinano un fenotipo caratterizzato da trombocitopenia ereditaria, ma circa il 50% dei pazienti hanno forme che non coincidono con nessun difetto noto. Negli ultimi anni sono emerse alcune forme di piastrinopenia ereditaria associate allo sviluppo di neoplasie di tipo ematologico e non ematologico che hanno destato un estremo interesse nei ricercatori; in particolare le forme associate a mutazioni di *ANKRD26*, *RUNX1* e *ETV6*.

### **Scopo**

Lo scopo di questo lavoro è quello di:

1. Costruire un database completo dei pazienti con piastrinopenia familiare finora pervenuti nel nostro laboratorio, definendo le mutazioni genetiche rinvenute.
2. Condurre uno studio preliminare sulla presenza di mutazioni in 5'UTR di *ANKRD26* in pazienti con piastrinopenia sporadica e familiare, che non rientravano in forme note di piastrinopenia ereditaria e che presentavano volume piastrinico nella norma ( $4\mu\text{m} < \text{MPV} < 8\mu\text{m}$ ), definendone le caratteristiche cliniche e molecolari di questa nuova forma di piastrinopenia ereditaria e studiando le famiglie con mutazioni in questo gene.
3. Ampliare l'indagine ad altri due geni coinvolti in forme di piastrinopenia ereditaria con predisposizione a neoplasie ematologiche: *RUNX1* ed *ETV6*.
4. Raccogliere e analizzare i dati relativi al corso della gravidanza in una ampia coorte di pazienti con forme di IT (inherited thrombocytopenia).

### **Materiali e metodi**

Presso l'Unità di Clinica Medica 1 dell'Azienda Ospedale-Università di Padova è presente una casistica di circa 70 pedigree familiari di soggetti con piastrinopenia familiare da difetto ignoto.

La valutazione comprende storia clinica e lo studio dell'espressione degli antigeni piastrinici di superficie mediante metodica citofluorimetrica utilizzando anticorpi monoclonali. Per valutare la morfologia piastrina è stato adottato il metodo della colorazione con May-Grunwald/Giemsa (MGG) su strisci di sangue periferico (macro, micro e normo trombocitopenia). Il DNA è stato

estratto da sangue intero e amplificato per lo studio dei seguenti geni: GpIb $\alpha$ , GpIb $\beta$ , GpIX, MYH9, ACTN1. I prodotti delle reazioni di amplificazione sono stati visualizzati con elettroforesi su gel di agarosio marcato e quindi sequenziati con metodo di Sanger.

Abbiamo condotto uno studio preliminare sulla presenza di mutazioni in 5'UTR di ANKRD26 in pazienti con piastrinopenia sporadica e familiare, che non rientravano in forme note di piastrinopenia ereditaria e che presentavano volume piastrinico nella norma ( $4\mu\text{m} < \text{MPV} < 8\mu\text{m}$ ) per poterne definire le caratteristiche cliniche e molecolari.

Abbiamo quindi ampliato l'indagine a RUNX1 ed ETV6, due geni coinvolti in forme di piastrinopenia ereditaria con predisposizione a neoplasie ematologiche in pazienti piastrinopenici e non (MDS piastrinopenia +; MDS piastrinopenia -) appartenenti alle diverse classi di sindrome mielodisplastica sec. WHO 2008.

Infine, nell'ambito delle piastrinopenie familiari confermate mediante indagine genetica, abbiamo partecipato al *Pregnancy In Inherited Platelet Abnormalities (PIPA)*, studio multicentrico retrospettivo di valutazione di 339 gravidanze in 181 donne con 13 diverse forme di trombocitopenia.

### **Risultati**

8 famiglie (12%) presentano mutazioni nella MYH9, MYH9-related disease, 12 famiglie (19%) presentano mutazioni del gene GP1B $\alpha$ , 4 famiglie (6%) presentano mutazioni del gene GP1B $\beta$  che causano Bernard-Soulier Syndrome (BSS) mono o biallelico. Le rimanenti famiglie (60%) non presentano mutazioni genetiche sulle glicoproteine studiate, e nessuna mutazione sul gene *ACTN1*.

Alla luce dei recenti studi relativi alle forme di piastrinopenie ereditarie caratterizzate, nel nostro laboratorio abbiamo condotto uno studio preliminare sulla presenza di mutazioni in 5'UTR di ANKRD26 in pazienti con piastrinopenia sporadica e familiare, che non rientravano in forme note di piastrinopenia ereditaria e che presentavano volume piastrinico nella norma ( $4\mu\text{m} < \text{MPV} < 8\mu\text{m}$ ), identificando due diverse mutazioni in eterozigosi, localizzate nella regione del 5'UTR non tradotta del gene. Dato l'interesse nello studio delle piastrinopenie ereditarie associate allo sviluppo di neoplasie di tipo ematologico e non ematologico, in particolare dei geni RUNX1 ed ETV6, responsabili di trombocitopenia non sindromica a trasmissione autosomica dominante, abbiamo preliminarmente raccolto una piccola casistica di soggetti mielodisplastici piastrinopenici (9 soggetti), di soggetti mielodisplastici con conta piastrinica nei limiti di norma (12 soggetti) e di 27 soggetti di controllo con trombocitopenia ereditaria indeterminata; questo per rinforzare le evidenze circa una possibile associazione tra mutazioni dei geni citati, piastrinopenia e rischio di evoluzione mielodisplastica/leucemica. Di questi soggetti abbiamo raccolto i dati relativi all'età, sesso, cariotipo, numero di blasti, emoglobina e piastrine.

I dati preliminari (Tabella 1) dimostrano che le mutazioni dei geni RUNX1 e ETV6 sono presenti solo nel gruppo dei mielodisplastici piastrinopenici.

GENE	POSIZIONE	MUTAZIONE
<i>RUNX-1</i>	ESONE 4	c.76C>G
<i>RUNX-1</i>	ESONE 8	c.934del A
<i>RUNX-1</i>	ESONE 9	c.1214_1215insTG
<i>ETV6</i>	INTRONE 1	c.28+192delC

Tabella 1. Mutazioni rinvenute nei geni RUNX1 ed ETV6

Anche se il coinvolgimento di questi geni nella piastrinopoiesi è noto, l'esatto meccanismo responsabile di trombocitopenia non è ancora chiaro. La rarità di queste patologie rende difficile raccogliere dati utili ad una analisi genotipo-fenotipo.

Nello studio multicentrico (PIPA) abbiamo classificato 23 gravidanze (13 donne): 5 donne presentano bBSS, 3 mBSS, 4 MYH9-RD, 1 ANKRD26. L'età media alla diagnosi di trombocitopenia è di 30 anni, la conta media piastrinica prima del parto è di circa  $60 \times 10^9$  piastrine/L, anche se in alcuni casi è stata osservata una drastica riduzione piastrinica. La tendenza al sanguinamento è bassa prima del parto e solo in due gravidanze è stata necessaria la trasfusione di piastrine. Tutte le nascite sono avvenute tra la 34<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> settimana; 13 sono i nati con parto cesareo e 10 con parto naturale. Solo 9 neonati riportano la stessa patologia della mamma, anche se in 6 casi il dato non è disponibile poiché non sono state fatte indagini a riguardo. Abbiamo riscontrato un unico caso di decesso neonatale a causa di emorragia cerebrale, ma nessun caso di sanguinamento nei nuovi nati.

### **Conclusioni**

Le piastrinopenie rappresentano il più frequente disordine dell'emostasi e costituiscono un gruppo eterogeneo di entità cliniche. La peculiarità delle forme familiari risiede nella difficoltà della loro identificazione clinica poiché spesso le piastrinopenie vengono classificate come immuni ed i pazienti sottoposti a terapie inappropriate. Come riportato nei risultati di studi recenti che coinvolgono un numero di famiglie più elevato, anche nel nostro lavoro le forme più comuni di piastrinopenia familiare risultano essere la BSS, la MYH9-RD seguite dalla ANKRD26.

Grazie ad una attenta analisi clinica ed alle indagini genetiche associate a recenti studi molecolari, ad oggi è possibile individuare e classificare correttamente i pazienti con nuove mutazioni genetiche considerando che ancora più del 50% delle famiglie non ha diagnosi.

Per valutare possibili meccanismi implicati nello sviluppo di piastrinopenia in corso di sindromi mielodisplastiche sarà indispensabile studiare in modo estensivo queste tre categorie di pazienti: piastrinopenie ereditarie con difetto noto di ANKRD26, RUNX-1 e ETV6, mielodisplasie o leucemie con prevalente piastrinopenia. Aumentare la casistica di tali soggetti ci permetterà di approfondire lo studio funzionale delle mutazioni definendone le caratteristiche cliniche e molecolari, al fine di valutare un possibile link tra mielodiplasia e piastrinopenia e comprendere a che livello della megacariopoiesi e dell'ematopoiesi esse agiscano.

## **SUMMARY**

### **Introduction**

The congenital thrombocytopenias are a heterogeneous group of disorders characterized by reduced number of platelets and variable clinical manifestations from severe to milder forms of incidental finding. They are divided into: 1) thrombocytopenia defect of megakaryocytic differentiation and maturation 2) MK migration defect from the bone marrow to the vascular niche 3) elongation of the pro-platelets. Then there are the hereditary thrombocytopenias from reduced platelet survival and thrombocytopenias with a still unknown pathogenesis.

Currently, there are now at least 20 genes whose genetic defects determine a phenotype characterized by hereditary thrombocytopenia, but approximately 50% of patients have forms that do not coincide with any known defect. In recent years, there were several forms of hereditary thrombocytopenia associated with the development of hematologic and non-haematological malignancies that have aroused a great interest in researchers; especially the forms associated with mutations of ANKRD26, RUNX1 and ETV6.

### **Purpose**

The purpose of this work is:

1. Build a comprehensive database of patients with inherited thrombocytopenia studied in our laboratory, defining the genetic mutations found.
2. Conduct a preliminary study on the presence of mutations in the 5'UTR of ANKRD26 in patients with sporadic and inherited thrombocytopenia, who did not fit into known forms of inherited thrombocytopenia and who had normal platelet volume ( $4\mu\text{m} < \text{MPV} < 8\mu\text{m}$ ), establishing the clinical and molecular features of this new form of thrombocytopenia and studying families with inherited mutations in this gene.
3. Enlarge the investigation to two other genes involved in inherited forms of thrombocytopenia with susceptibility to hematological malignancies: RUNX1 and ETV6.
4. Collect and analyze data related to the course of pregnancy in a large cohort of patients with IT forms (inherited thrombocytopenia).

### **Materials and methods**

At the Medical Clinic 1 of the City Hospital-University of Padua complex there exist a series of about 70 family pedigrees of patients with inherited thrombocytopenia from hidden defect.

The assessment includes the clinical history and the study of the expression of surface platelet antigens by flow cytometry method using monoclonal antibodies. To evaluate the platelets morphology, the method of staining with May-Grunwald / Giemsa (MGG) on peripheral blood (macro, micro and normo thrombocytopenia) has been adopted. The DNA was extracted from

whole blood and amplified for the study of the following genes: GpIb $\alpha$ , GpIb $\beta$ , GPIX, MYH9, ACTN1. The products of the amplification reactions were visualized by agarose gel electrophoresis and sequenced with the Sanger method.

We carried out a preliminary study on the presence of mutations in the 5'UTR of ANKRD26 in patients with sporadic and inherited thrombocytopenia, which did not fit into known forms of inherited thrombocytopenia and who had normal platelet volume ( $4\mu\text{m} < \text{MPV} < 8\mu\text{m}$ ) in order to be able to define the clinical and molecular features.

We then expanded the investigation to RUNX1 and ETV6, two genes involved in hereditary forms of thrombocytopenia with predisposition to blood cancer in thrombocytopenic patients and not (MDS + thrombocytopenia; MDS thrombocytopenia -) belonging to different classes of myelodysplastic syndrome sec. WHO 2008.

Finally, as part of thrombocytopenia family confirmed through genetic investigation, we participated in Pregnancy In Inherited Platelet Abnormalities (PIPA), multicenter retrospective evaluation of 339 pregnancies in 181 women with 13 different forms of thrombocytopenia.

### **Results**

8 families (12%) have mutations in the MYH9, MYH9-related disease, 12 families (19%) have mutations GP1B $\alpha$ , 4 families (6%) have gene mutations that cause GP1B $\beta$  Bernard-Soulier Syndrome (BSS) mono or biallelic. The remaining families (60%) do not have the genetic mutations in the studied glycoproteins, and no mutation in the ACTN1 gene.

In light of recent studies on the forms of inherited thrombocytopenia characterized in our laboratory, we conducted a preliminary study on the presence of mutations in the 5'UTR of ANKRD26 in patients with sporadic and inherited thrombocytopenia, which did not fit into known forms of inherited thrombocytopenia and showed normal platelet volume ( $4\mu\text{m} < \text{MPV} < 8\mu\text{m}$ ). We identified two different heterozygous mutations, located in the 5'UTR untranslated region of the gene. Given the interest in the study of hereditary thrombocytopenia associated with the development of hematologic and non-hematological malignancies, in particular of RUNX1 and ETV6 genes, responsible for non-syndromic autosomal dominant thrombocytopenia, we collected preliminarily a small series of myelodysplastic thrombocytopenic subjects (9 subjects), myelodysplastic subjects with platelet counts within the normal range (12 subjects) and 27 control subjects with hereditary undetermined thrombocytopenia; this in order to strengthen the evidence about a possible association between mutations in the mentioned genes, thrombocytopenia and risk myelodysplastic / leukemia evolution. Of these subjects, we collected data on age, sex, karyotype, number of blast cells, hemoglobin and platelets.

Preliminary data (Table 1) show that mutations of RUNX1 ETV6 gene are present only in the group of myelodysplastic thrombocytopenic.

GENE	POSITION	MUTATION
<i>RUNX-1</i>	EXON 4	c.76C>G
<i>RUNX-1</i>	EXON 8	c.934del A
<i>RUNX-1</i>	EXON 9	c.1214_1215insTG
<i>ETV6</i>	INTRON 1	c.28+192delC

Table 1. Mutations found in RUNX1 and ETV6 genes

Although the involvement of these genes in thrombopoiesis is known, the exact mechanism responsible for thrombocytopenia is not yet clear. The rarity of these diseases makes it difficult to collect relevant data for analysis of genotype-phenotype relation.

In the multicenter study (PIPA) we have classified 23 pregnancies (13 women): 5 women have BBSs, mBSS 3, 4 MYH9-RD, 1 ANKRD26. The average age at diagnosis of thrombocytopenia is 30 years, the average platelet count before giving birth is about  $60 \times 10^9$  platelets / L, even if in some cases there was a drastic reduction in platelet aggregation. The bleeding tendency is low before birth and only in two pregnancies platelet transfusion is needed. All births took place between the 34th and 40th week; 13 are born by caesarean section and 10 vaginally. Only 9 infants carry the same disease of the mother, although in 6 cases the data is not available because they were not made inquiries about it. We found only one case of neonatal death due to brain hemorrhage, but no cases of bleeding in newborns.

### **Conclusions**

The thrombocytopenia is the most common disorder of hemostasis and is a heterogeneous group of clinical entities. The peculiarity of family forms is the difficulty of clinical identification since they are often classified as immune thrombocytopenia and patients undergoing inappropriate therapy. As reported in the results of recent studies involving a higher number of families, in our work the most common forms of thrombocytopenias family is the BSS, the MYH9-RD followed by ANKRD26. Thanks to a careful analysis of clinical and genetic investigations associated with recent molecular studies, it is now possible to identify and correctly classify patients with new genetic mutations even though more than 50% of families remain with no diagnosis.

To evaluate the possible mechanisms involved in the development of thrombocytopenia being myelodysplastic syndromes will be essential to study extensively the three categories of patients: thrombocytopenia hereditary with defect of ANKRD26, RUNX-1 and ETV6, myelodysplasia or leukemia with prevailing thrombocytopenia. A larger number of cases of these subjects will allow us to deepen the study of functional mutations defining the clinical and molecular features, in order to evaluate a possible link between myelodysplasia and thrombocytopenia and understand at what level of megakaryopoiesis and hematopoiesis they intervene.

# **1 Introduzione**

---

## 1. LE PIASTRINOPENIE COSTITUZIONALI

Gli studi sulle piastrinopenie ereditarie, un tempo ritenute patologie rare, sono oggetto di un continuo arricchimento per quanto riguarda i loro aspetti fisiopatologici e clinici, e costituiscono oggi un importante campo di ricerca.

Vista la rarità di casi con chiara familiarità o segni aggiuntivi alla piastrinopenia che ne facilitano il riconoscimento (forme sindromiche), diagnosticare di queste forme è spesso cosa complessa.

Identificare precocemente le forme di piastrinopenie ereditarie è fondamentale per evitare diagnosi errate che spesso portano a trattamenti inefficaci e potenzialmente dannosi, quali la somministrazione di farmaci immunosoppressori e/o la splenectomia nel caso venga erroneamente diagnostica come una piastrinopenia immune.

Negli ultimi anni le conoscenze nel campo si sono notevolmente arricchite, tanto da portare a 20 il numero dei disordini codificati (Tabella 1). Tuttavia si stima che circa la metà dei pazienti abbia una forma non ancora descritta e rimanga quindi senza una diagnosi precisa (Noris et al. 2004).

Uno dei punti critici nel riconoscimento di queste patologie, è rappresentato dalla diagnosi differenziale con la piastrinopenia immune (ITP) e con condizioni non patologiche caratterizzate da conta piastrinica compresa tra 100 e 150 x 10<sup>9</sup>/L (Bader-Meunier et al. 2003; Biino et al. 2011 & 2012). Il corretto inquadramento diagnostico è quindi importante perché offre al paziente l'opportunità di ricevere terapie appropriate.

Studi recenti sulla popolazione italiana hanno infatti dimostrato come il range di normalità oggi impiegato nei paesi occidentali, ovvero 150 - 400 o 450 x10<sup>9</sup>/L, sia da considerarsi superato poiché non tiene conto del peso delle variabili quali sesso, età e background genetico (Biino et al. 2011, 2012, 2013) (Figura 1).

Una volta confermata la reale presenza di piastrinopenia, ed escluso che sia un artefatto o causata dalla presenza di anticorpi naturali che agglutinano le piastrine in presenza dell'EDTA utilizzato come anticoagulante per l'esame emocromocitometrico (pseudotrombocitopenia da EDTA), lo step successivo è procedere con la diagnostica differenziale che prevede l'anamnesi, l'esame obiettivo ed esami laboratoristici.

Per quanto riguarda l'anamnesi, la presenza di altri familiari piastrinopenici suggerisce immediatamente la possibilità di una forma ereditaria. La loro assenza non esclude però una piastrinopenia genetica, sia perché alcune forme sono trasmesse con modalità recessiva, sia perché le mutazioni possono essere "de novo" come, ad esempio, nella Malattia MYH9-correlata, in cui l'evento si verifica in più del 30% dei casi (Savoia et al. 2008).

Tab.1 Prospetto delle forme di piastrinopenia ereditaria codificate

Malattia (abbreviazione, OMIM)/ [Riferimento bibliografico]	Frequenza*/ Sanguinamento spontaneo	Tipo di ereditarietà	Gene (localizzazione cromosomica)	Altre caratteristiche	
<b>FORME SINDROMICHE</b>					
Sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS, 301000)/ [Notarangelo, 2008]	++++ / si	XL	WAS (Xp11)	Grave immunodeficienza. Piastrine di dimensioni ridotte.	
Trombocitopenia X-linked (XLT, 313900)/ [Notarangelo, 2008]	++++ / si	XL	WAS (Xp11)	Blanda immunodeficienza. Piastrine di dimensioni ridotte.	
Malattia MYH9-correlata (MYH9-RD, 603622, 153650, 153640, 600208, 155100, 605249)/ [Balduini, 2011]	++++ / no	AD	MYH9 (22q12-13)	Cataratta, nefropatia e/o sordità. Piastrine giganti. Può anche non essere sindromica.	
Trombocitopenia di Paris-Trousseau (TCPT, 188025), Sindrome di Jacobsen (JBS, 147791)/[Mattina, 2009]	++++ / si	AD	Ampia delezione (11q23-ter)	Difetti cardiaci e facciali. Ritardo mentale. Piastrine di dimensioni aumentate.	
Trombocitopenia con assenza del radio (TAR, 274000)/[Aber, 2012]	+++ / si	AR	RBM8A (1q21.1)	La conta piastrinica tende ad aumentare nell'età adulta. Ridotto numero di megacariociti midollari. Piastrine di dimensioni normali. Aplasia radiale bilaterale, possibili altre alterazioni.	
Trombocitopenia amegacariocitica congenita (CAMT, 604498)/[Geddis, 2011]	+++ / si	AR	MPL (1p34)	Evoluzione costante in aplasia midollare nell'infanzia. Piastrine di dimensioni normali.	
Malattia GATA1-correlata (GATA1-RD) (Anemia diseritropoietica con trombocitopenia, 300367 - Trombocitopenia X-linked con talassemia - XLT, 314050)/[Ciovecco, 2008]	++ / si	XL	GATA1 (Xp11)	Anemia emolitica, possibile sintesi sbilanciata di catene globiniche, possibile porfiria eritropoietica congenita. Piastrine di dimensioni aumentate.	
Trombocitopenia congenita con sinostosi radio-ulnare (CTRUS, 605432)/[Castillo-Caro, 2010]	+ / si	AD	HOXA11 (7p15-14)	Sinostosi radio-ulnare. Possibile evoluzione in anemia aplastica. Piastrine di dimensioni normali.	
Trombocitopenia con sitosterolemia (STSL, 210250)/[Rees, 2005]	+ / no	AR	ABCG5, ABCG8 (2p21)	Anemia, xantomi tendinei, aterosclerosi. Piastrine di dimensioni aumentate. Può anche non essere sindromica.	
Trombocitopenia FLNA-correlata (FLNA-RT, 300049)/[Nurden, 2011]	+ / si	XL	FLNA (Xq28)	Eterotopia nodulare periventricolare. Piastrine di dimensioni aumentate. Può anche non essere sindromica.	
<b>FORME NON SINDROMICHE</b>					
Sindrome di Bernard-Soulier (BSS, 231200)/[Noris, 2012]	Bialelica	++++ / si	AR	GP1BA (17p13), GPIBB (22q11), GP9 (3q21)	Piastrine giganti.
	Monoallelica	+++ / no	AD		Piastrine di dimensioni aumentate.
Disordine piastrinico familiare e predisposizione alla leucemia mieloide acuta (FPD/AML, 601399)/[Liew, 2011]	+++ / no	AD	CBFA2 (21q22)	Alto rischio di sviluppare leucemia o sindrome mielodisplastica. Piastrine di dimensioni normali.	
Sindrome delle piastrine grigie (GPS, 139090)/ [Di Paola, 2011]	+++ / si	AR	NBEAL2 (3p21.1)	Alto rischio di sviluppare mielofibrosi evolutiva. Piastrine giganti.	
Trombocitopenia ANKRD26-correlata (THC2, 188000)/[Noris, 2011]	+++ / no	AD	ANKRD26 (10p2)	Aumentato rischio di leucemia. Piastrine di dimensioni normali.	
Trombocitopenia ITGA2B/ITGB3-correlata (ITGA2B/ITGB3-RT, 187800)/[Gresle, 2009]	+ / no	AD	ITGA2B (17q21.31), ITGB3 (17q21.32)	Piastrine di dimensioni aumentate.	
Malattia di von Willebrand tipo piastrinico (VWDp, 177820)/[Hamilton A, 2011]	++/ si	AD	GPIBA (17p13.2)	Piastrine di dimensioni aumentate.	
Trombocitopenia ACTN1-correlata (ACTN1-RT, 615193)/[Kunishima et al, 2013]	+/no	AD	ACTN1 (14q24.1)	Piastrine di dimensioni aumentate.	
Trombocitopenia GFI1B-correlata (GFI1B-RT, nd)/ [Stevenson et al, 2013]	+/si	AD	GFI1B (9q34.13)	Piastrine di dimensioni aumentate e con ridotta funzionalità per riduzione nel contenuto dai granuli alfa.	
Trombocitopenia TUBB1-correlata (TUBB1-RT, 613112)/[Kunishima, 2009]	+ / no	AD	TUBB1 (20q13.32)	Piastrine giganti.	
Trombocitopenia CYCS-correlata (THC4, 612004)/[Morison, 2008]	+ / no	AD	CYCS (7p15.3)	Piastrine di dimensioni normali.	
* +++++: più di 100 famiglie note, +++: più di 50 famiglie note; ++: 10 o più famiglie note; + meno di 10 famiglie note Legenda: AR: autosomico recessivo; AD: autosomico dominante; XL: X-linked; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; nd: non disponibile.					

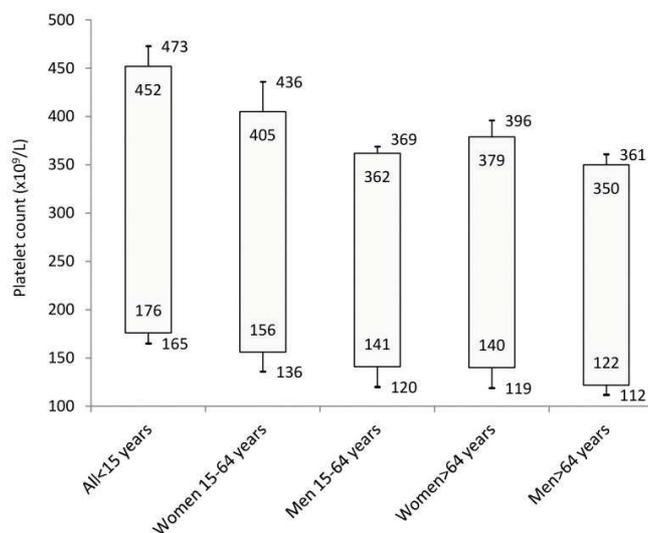


Figura 1. Nuovi intervalli di normalità della conta piastrinica modulati per sesso ed età (Biino et al. 2013). I numeri all'interno dei rettangoli definiscono il range di normalità nell'intera popolazione. I numeri sopra e sotto i rettangoli individuano i limiti massimi e minimi delle variazioni legate al background genetico nella popolazione italiana.

L'ipotesi di un disordine ereditario va perciò sempre considerato quando i dati clinico-anamnestici non depongono chiaramente per una forma acquisita, in particolare quando il deficit piastrinico è moderato e viene riscontrato casualmente in un paziente senza attuale o pregressa diatesi emorragica. Al contrario, la presenza di piastrinopenia severa in un paziente che manifesta una acuta diatesi emorragica, riduce la probabilità di un disordine ereditario, perché in queste forme il numero di piastrine rimane solitamente stabile nel corso della vita e la diatesi emorragica ha i caratteri della cronicità (Geddis et al. 2007). L'insorgenza improvvisa di diatesi emorragica può verificarsi comunque in forme lievi di piastrinopenia ereditaria, in precedenza asintomatiche per l'assunzione di farmaci inibenti la funzionalità piastrinica (in particolare acido acetilsalicilico) o per interventi chirurgici e traumi.

L'esame obiettivo riveste un ruolo diagnostico fondamentale, dato che metà delle forme di piastrinopenia ereditaria sono sindromiche (Balduini et al. 2012). In alcune forme si associano malformazioni scheletriche più o meno evidenti (Trombocitopenia con assenza del radio - TAR, Trombocitopenia amegacariocitica con sinostosi radio-ulnare - ATRUS) (Castillo-Caro et al., 2010); nella Malattia MYH9-correlata (MYH9-RD) possono comparire nel corso della vita sordità neurosensoriale, nefropatia proteinurica con evoluzione in insufficienza renale terminale, cataratta presenile e/o indicatori biumorali di danno epatico (Balduini et al., 2011; Pecci et al., 2012; Pecci et al., 2013); nella Trombocitopenia con sitosterolemia (STSL) si ritrovano xantomi tendinei (Rees et al. 2005); la sindrome di Jacobsen (JBS) è caratterizzata da ritardo mentale (Balduini et al. 2012) (Figura 2).

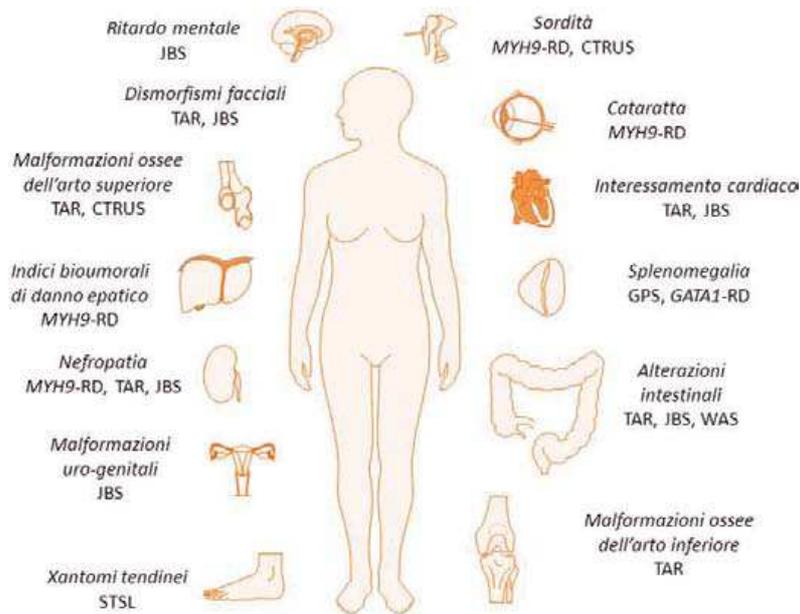


Figura 2. Caratteristiche fisiche rilevabili nelle forme sindromiche di piastrinopenia ereditaria.

Per quanto riguarda gli esami di laboratorio, il primo approccio è costituito dalla valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico. Nella maggior parte delle forme di piastrinopenia ereditaria (12 delle 20 attualmente codificate) si riscontrano infatti anomalie morfologiche a carico delle piastrine e/o degli eritrociti e/o dei granulociti, talune riconducibili a specifiche patologie (inclusioni Döhle-like nei polimorfonucleati per la Malattia *MYH9*-correlata) (Savoia *et al.* 2010), altre comuni a più disordini come il caso della macrocitosi piastrinica, presente in oltre il 50% delle forme conosciute (Noris *et al.* 2009). Quest'ultima caratteristica morfologica comporta frequentemente errori di valutazione, in particolare per quanto riguarda il conteggio piastrinico. I contaglobuli automatici oggi più comunemente utilizzati, non sono infatti in grado di riconoscere e contare le piastrine molto grandi, identificandole erroneamente come eritrociti.

La strategia operativa più semplice al fine di ridurre al minimo le possibilità di errore, è quella dell'analisi morfologica dello striscio di sangue periferico per accertare la presenza di piastrine con diametro molto aumentato, superiore a 4  $\mu\text{m}$ .

La conta manuale in camera di Bürker (Noris *et al.* 2009) o quella citofluorimetrica con specifici anticorpi monoclonali anti-piastrine (Noris *et al.* 2009) viene preferita alla conta piastrinica ottenuta con tecnica automatica, poiché tale approccio è in grado di evitare l'errore diagnostico del quale più frequentemente sono vittima i pazienti con piastrinopenia ereditaria ovvero l'errata classificazione come piastrinopenia immune (ITP).

L'indagine genetica è attualmente lo strumento più efficace per confermare il sospetto di piastrinopenia ereditaria ed è supportata dall'*algoritmo diagnostico per le piastrinopenie ereditarie*, messo a punto nel 2003 dal Gruppo di Studio delle Piastrine, successivamente validato e più volte

aggiornato per comprendere le forme di più recente identificazione (Balduini et al. 2003; Noris et al. 2004; Glembotsky et al. 2012; Balduini et al. 2013).

L'inizio del percorso diagnostico prevede l'anamnesi e l'esame obiettivo, coadiuvati da pochi esami di laboratorio e strumentali, volti ad identificare la presenza di un quadro sindromico. In questo caso, le anomalie associate alla piastrinopenia suggeriscono la diagnosi nella maggior parte dei casi.

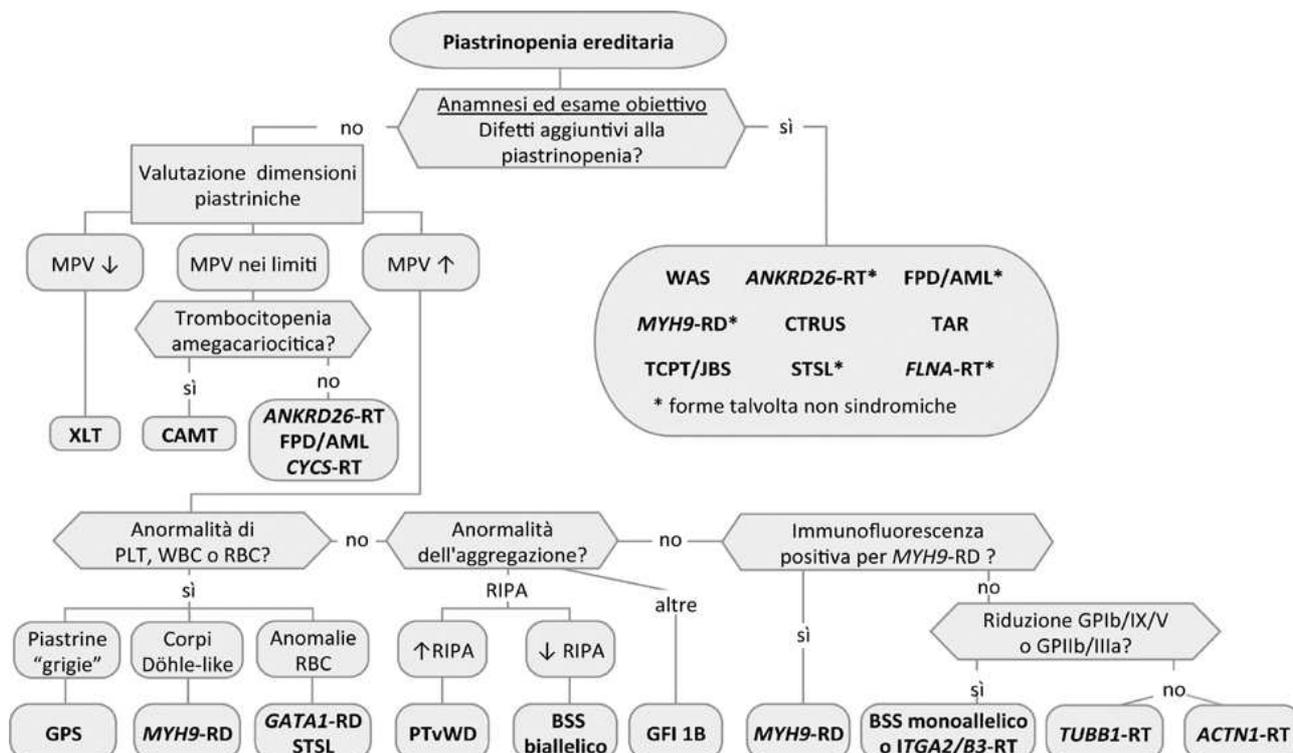


Figura 3. Algoritmo diagnostico per le piastrinopenie ereditarie. MPV: volume piastrinico medio; PLT: piastrine; WBC: globuli bianchi; RBC: globuli rossi; RIPA: agglutinazione piastrinica da ristocetina; GP: glicoproteine

Nel caso di forme non sindromiche, l'algoritmo considera dapprima le dimensioni piastriniche e quindi lo striscio di sangue periferico e del midollo osseo, l'aggregazione piastrinica e le indagini citofluorimetriche per lo studio delle glicoproteine piastriniche di superficie. Lo studio genetico darà quindi la conferma diagnostica definitiva.

Nelle forme per le quali sono state identificate correlazioni genotipo-fenotipo, quali MYH9-RD, CAMT e BSS, l'esatta definizione del difetto genetico consente poi di definire la prognosi. Ciò è particolarmente rilevante per la MYH9-RD, in quanto i pazienti con alcune mutazioni sono a grande rischio di sviluppare in giovane età, oltre a sordità neurosensoriale, una grave nefropatia che evolve in insufficienza renale terminale, mentre soggetti con altre mutazioni hanno un rischio in tal senso modesto o addirittura assente (Pecci et al. 2013).

Malgrado l'applicazione sistematica dell'algoritmo e delle indagini genetiche, circa il 40% dei pazienti rimane senza una diagnosi definitiva (Noris et al. 2011).

Questi soggetti costituiscono il gruppo delle trombocitopenie di incerta classificazione; alcuni autori, catalogano questo gruppo di pazienti come portatori di “true type” di Macrotrombocitopenia Cronica Ereditaria o Chronic Isolated Hereditary Macro-Thrombocytopenia (CHMT – Macrotrombocitopenia Cronica Isolata Ereditaria) (*Fabris et al.1997; Fabris et al.2002*).

Approfonditi studi associati alle più avanzate tecnologie di diagnostica molecolare, hanno messo in luce importanti scoperte che hanno fatto emergere nuovi difetti genetici alla base di alcune forme di piastrinopenie ereditarie, che si sommano alle mutazioni già ampiamente descritte in letteratura, presenti in questo tipo di patologie.

Si è sempre più convinti che “nuovi” loci possano essere coinvolti nelle forme non ancora caratterizzate di trombocitopenia, e tutt’oggi la lista delle mutazioni descritte, si sta arricchendo sempre più di variazioni che giocano un ruolo fondamentale nel processo di maturazione delle piastrine e/o sono coinvolte nella loro normale funzionalità. E’ proprio su questo che si concentrano gli sforzi per individuare nuove anomalie alla base delle patologie non ancora caratterizzate.

A livello fisiologico nella megacariopoiesi e quindi nella piastrinopoiesi la trombopoietina (TPO) si lega al recettore c-Mpl delle cellule staminali e stimola la loro differenziazione in megacariociti. Una serie di fattori di trascrizione regola poi la produzione delle proteine necessarie per loro maturazione (*Fabris F. et al. 2000*). Sia il difetto ereditario del recettore per la TPO che difetti dei fattori di trascrizione HOXA11, CBFA2, GATA1, FLI1 sono responsabili di piastrinopenie ereditarie da difetto di differenziazione-maturazione dei megacariociti. Durante la maturazione, la cellula, guidata da un gradiente di stem cell factor (SDF1), migra dalla nicchia staminale alla nicchia vascolare e prende contatto con l'endotelio dei sinusoidi midollari. Qui il megacariocita emette lunghi filamenti (proplatelets) che si insinuano nel lume dei sinusoidi ed originano dalle loro estremità le piastrine. Anche se non sono disponibili prove certe, evidenze iniziali suggeriscono come alterazioni della piastrinoformazione siano alla base di alcune piastrinopenie genetiche. (Figura 4)

La classificazione delle piastrinopenie ereditarie o costituzionali (FAM) prevede la suddivisione di queste in: piastrinopenie ereditarie da difetto di maturazione dei megacariociti, da difetto di differenziazione dei megacariociti, piastrinopenie da difetto della formazione piastrinica e da ridotta sopravvivenza piastrinica.

Le piastrinopenie ereditarie da difetto di maturazione dei megacariociti sono legate a mutazioni di GATA1, fattore di trascrizione (codificato da un gene del cromosoma X), che regola la produzione di proteine indispensabili per la corretta maturazione di megacariociti ed eritroblasti. Mutazioni del gene causano forme X-linked di piastrinopenia associata a diseritropoiesi con componente emolitica.

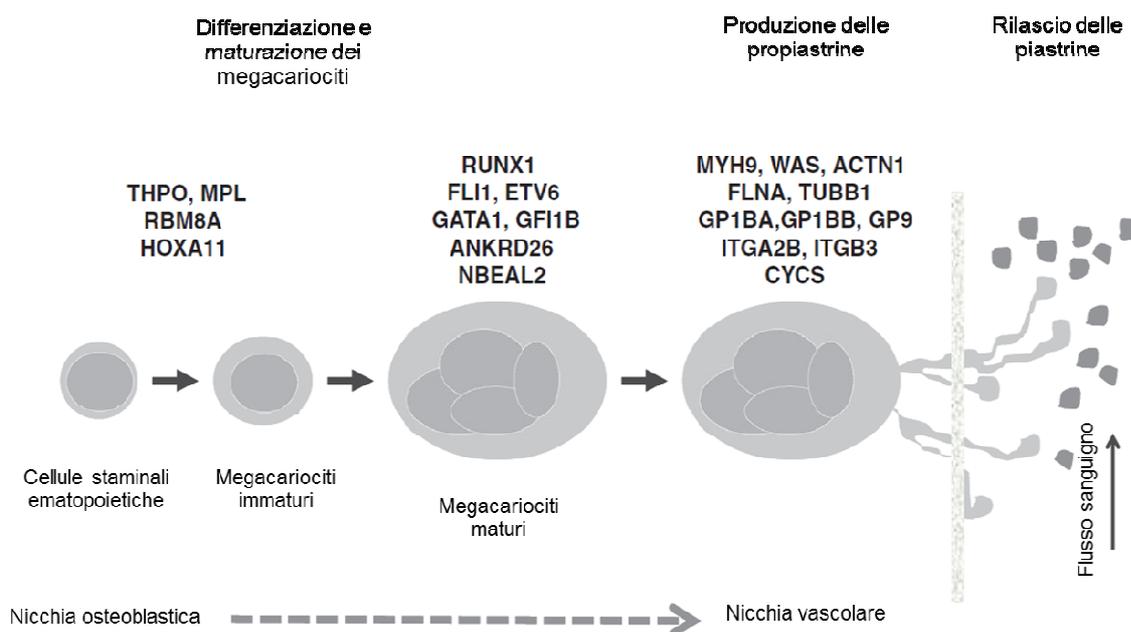


Figura 4. Rappresentazione schematica della megacariopoiesi e della piastrinoformazione. L'immagine mostra le diverse fasi della biogenesi delle piastrine, che includono la differenziazione e maturazione dei megacariociti, la produzione e rilascio delle piastrine nel flusso sanguigno. Nelle IT ciascuna fase può essere soggetta a mutazioni nei geni indicati. (Savoia et al.2015)

La Trombocitopenia tipo Paris-Trousseau e Sindrome di Jacobsen (TCPT, thrombocytopenia Paris-Trousseau e JBS, Jacobsen syndrome) causate anche queste da difetto di maturazione dei megacariociti, sono entrambe varianti fenotipiche autosomiche dominanti derivanti dalla delezione terminale 11q23. La sindrome di Jacobsen è caratterizzata da piastrinopenia, ritardo psico-motorio e tipiche malformazioni cardiache e del volto, mentre la piastrinopenia tipo Paris-Trousseau non si associa a difetti somatici maggiori.

Nelle piastrinopenie da difetto di differenziazione dei megacariociti rientra la *piastrinopenia amegacariocitica congenita (CAMT, Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia)*, patologia di tipo autosomico recessiva che deriva da mutazioni del gene *c-MPL* per il recettore della TPO. Il difetto del recettore impedisce la differenziazione delle cellule staminali emopoietiche in megacariociti, causando grave piastrinopenia e la morte del paziente in età giovanile. In questi soggetti i livelli di TPO sono molto elevati e le piastrine hanno morfologia normale.

Un altro tipo di difetto genetico da differenziazione megacariocitaria viene evidenziato nella *Trombocitopenia amegacariocitica congenita con sinostosi radio-ulnare (CTRUS, Congenital megakaryocytic Thrombocytopenia with Radio-Ulnar Synostosis)*.

È una patologia molto rara, autosomica dominante, caratterizzata da piastrinopenia amegacariocitica congenita. I soggetti affetti sono eterozigoti per la delezione di un paio di basi nel

gene *HOXA11* responsabile di frameshift, con conseguente sintesi di una proteina incompleta. Si presenta come forma sindromica in cui parallelamente alla piastrinopenia si possono avere sinostosi radio-ulnare, clinodattilia, sindattilia, displasia dell'anca e/o sordità neurosensoriale.

*La Trombocitopenia con assenza del radio (TAR, Thrombocytopenia with Absent Radii)* ha ereditarietà di tipo autosomico recessiva. Oltre alla piastrinopenia si ha aplasia bilaterale del radio associata ad altre malformazioni scheletriche e non.

Le piastrinopenie da difetto della formazione piastrinica costituiscono l'importante gruppo delle Macrotrombocitopenie, nel quale troviamo la *Sindrome di Bernard-Soulier (BSS)* (Lopez JA et al. 1998; Savoia A et al. 2001), legata a un difetto quantitativo e/o qualitativo del complesso glicoproteico Ib $\alpha$ -Ib $\beta$ -IX-V causato da mutazioni nel gene per la GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX che determinano alterazioni quantitative del complesso GPIb-IX-V, recettore per il Fattore von Willebrand (vWF).

Questo recettore, composto dalle glicoproteine è intimamente connesso con il citoscheletro attraverso il dominio interno della catena GPIb, la quale ha un importante ruolo nella trasduzione del segnale per l'innescò dell'attivazione piastrinica. In letteratura sono state finora descritte più di 20 mutazioni a carico di GPIb $\alpha$ , 12 su GPIb $\beta$  e 10 su GPIX, nessuna mutazione è stata descritta invece per GPV (Lopez JA et al. 1998). La GPIb $\alpha$  è la maggiore componente del complesso e, come gli altri elementi appartiene alla superfamiglia delle proteine con sequenze ripetute ricche di Leucina (Leucine Rich Repeats o LRR). I sette LRR di GPIb $\alpha$ , sono localizzati all'N-terminale della catena, dove formano dei tratti strand che costituiscono il sito di legame per il vWF.

Generalmente sono lunghi 22- 28 aminoacidi, ed è identificabile una sequenza consenso con diversi residui che risultano conservati in posizioni precise, sia all'interno della superfamiglia delle proteine con LRR, sia tra proteine omologhe delle varie specie animali (Afshar-Kharghan et al. 2000b). Tali aminoacidi sono perciò considerati fondamentali per la stabilità e la corretta funzionalità di questa catena proteica e dell'intero recettore piastrinico per il vWF (Lopez JA. 1994; Lopez JA et al. 1998). Il dominio citoplasmatico della GPIb $\alpha$  oltre a trasdurre il segnale di attivazione in seguito al legame col vWF, si associa anche ad elementi del citoscheletro piastrinico, le Actin Binding Proteins (ABP). Alterazioni di questa glicoproteina, quindi, possono spiegare anche l'anomala morfologia dei macrotrombociti, dovuta ad una non corretta interazione col vWF durante la megacariopoiesi o ad un'alterata interazione col citoscheletro

La *Sindrome di Bernard-Soulier* è una patologia emorragica ereditaria, con una frequenza stimata inferiore a 1: 1.000.000, classicamente definita come autosomica recessiva e caratterizzata da numerose piastrine giganti. La conta piastrinica varia da 20 a  $100 \times 10^9/L$ , con aumento di diametro (>8  $\mu m$ ) e volume (>12.5 fL) dei trombociti e loro ridotta sopravvivenza. Le piastrine di questi

pazienti aggregano normalmente in risposta ad ADP, collagene o epinefrina, ma viene meno la risposta alla ristocetina (RIPA test), cui è sensibile la funzionalità del recettore per il vWF. La diatesi emorragica è grave sin dall'infanzia e può essere causa di morte, anche se col passare degli anni può attenuarsi.

Nel 1990 è stata descritta la prima e la più frequente variante di BSS ad ereditarietà autosomica dominante (denominata Variante Bolzano o BSS-BZ), in cui il recettore del vWF è presente, ma mutato nella sequenza proteica. Tale mutazione è macroscopicamente rivelata in diagnostica da un legame ridotto o assente rispettivamente degli anticorpi monoclonali (mAb) LJ-Ib10, LJ-Ib1 (*De Marco et al. 1990; Ware et al. 1993*) e SZ2 (*Savoia et al. 2001*), diretti contro la subunità GPIb $\alpha$  (CD42b) del complesso GPIb/V/IX, mentre a livello genetico si rileva la comparsa di un sito di taglio per l'enzima HpaI nel locus alterato. La mutazione genica causa della variante autosomica dominante BSS-BZ è infatti una transizione C>T in posizione 515 nel gene GpIb $\alpha$  sul cromosoma 17p2, che crea un nuovo sito di restrizione e porta alla sostituzione aminoacidica Ala156Val nella proteina corrispondente (*De Marco et al. 1990; Ware et al. 1993; Margaglione et al. 1999*).

Oltre alla variante BSS-BZ e ad altre mutazioni di GPIb $\alpha$  che causano forme di BSS a trasmissione autosomica dominante (*Miller et al., 1992*), sulla stessa glicoproteina sono stati rilevati alcuni polimorfismi che non sembrano influenzarne l'espressione e che sono frequenti nella popolazione normale: la sostituzione -5C/T (o polimorfismo Kozak); la presenza di un numero variabile (da 0 a 4) di ripetizioni in tandem di una sequenza di 13 aminoacidi (varianti VNTR D, C, B, A rispettivamente) responsabili dei diversi pesi molecolari attribuibili alla proteina; una sostituzione aminoacidica Thr145Met denominata polimorfismo Hpa2 e una sostituzione silente in terza base nel codone che specifica per Arg358 (*Lopez 1994*).

Tra le macrotrombocitopenie va inserita anche la *Malattia MYH9-correlata (MYH9-RD, MYH9-related disease)* che comprende l'anomalia di May-Hegglin, la sindrome di Sebastian, la sindrome di Fechtner e quella di Epstein. Derivano tutte da mutazioni del gene MYH9 per la catena pesante della miosina non muscolare IIA (NMMHC-IIA) (*Girolami et al. 1980*). Fin dalla nascita si ha la presenza di una piastrinopenia più o meno marcata con numerose piastrine giganti.

I soggetti affetti presentano piastrinopenia associata a cataratta e/o difetto uditivo di tipo neurosensoriale nonché nefropatia che spesso evolve in insufficienza renale terminale.

Questa proteina, dotata di attività ATPasica, è un importante costituente del citoscheletro dei megacariociti, dei trombociti e dei granulociti neutrofili in cui è ugualmente espressa. Se alterata, NMMHC-IIA precipita in granuli citoplasmatici senza assolvere al suo ruolo strutturale, compromettendo la trombopoiesi.

Il gene MYH9 è composto da 40 esoni, ma finora sono state identificate mutazioni solo a carico di pochi esoni (1, 10, 16, 24, 25, 26, 30, 38, 40), che causano anomalie della funzione ATPasica (mutazioni degli esoni 1, 10, 16) o che comunque inficiano il ruolo strutturale della proteina. Si pensa che difetti della NMMCH-IIA, così come viene ipotizzato per le anomalie del complesso GPIIb/IIIa, portino ad un alterato processo di maturazione delle piastrine, dovuto nel primo caso ad una carente riorganizzazione del citoscheletro dei MK, e nel secondo ad una deficitaria interazione col vWF. Difetti in questi processi impediscono una corretta formazione e la maturazione delle proplatelets, causando la conseguente Macrotrombocitopenia (*Chen et al. 2007*).

Le Macrotrombocitopenie ereditarie sono caratterizzate da una grande eterogeneità del quadro clinico, che può presentare diversi gradi di diatesi emorragica, così come la presenza o meno di quadri sindromici associati alla piastrinopenia. Per questa ragione l'identificazione di queste malattie su base puramente clinica diventa difficile. Conoscere i difetti genetici alla base della loro eziopatogenesi può essere senz'altro utile ad una migliore classificazione. Negli ultimi anni l'avvento di nuove tecniche diagnostiche (citofluorimetria, immunofluorescenza, PCR, sequenziamento) ha permesso di elaborare un algoritmo diagnostico più preciso per classificare le trombocitopenie ereditarie e facilitarne la diagnosi (*Balduini et al. 2003; Noris et al. 2004*).

La presenza di corpi inclusi (Corpi di Döhle) dovuti alla precipitazione della NMMCH-IIA nel citoplasma dei granulociti neutrofilici, che può avere un aspetto macrogranulare o microgranulare a seconda delle manifestazioni della MYH9-RD, permette di diagnosticare questa patologia con la colorazione May-Grunwald su strisci di sangue periferico. Non è però sempre possibile evidenziare tali inclusioni con una semplice colorazione: per una diagnosi certa è necessario ricorrere alla marcatura dei neutrofilici con anticorpi fluorescenti anti NMMCH-IIA, che ne rendano visibile la distribuzione al microscopio a fluorescenza.

Nel gruppo delle piastrinopenie da ridotta sopravvivenza piastrinica troviamo la *Sindrome di Wiskott-Aldrich*, la *Trombocitopenia X-linked (WAS, Wiskott-Aldrich syndrome, e XLT, X-linked thrombocytopenia)*, la *Malattia di von Willebrand tipo 2B (vWD2B, von Willebrand disease 2B)* e *Pseudo-von Willebrand (PTvWD, platelettype von Willebrand disease)* caratterizzata da diatesi emorragica conseguente al difetto del vWF con aumentata risposta alla ristocetina.

La WAS è un disordine recessivo legato al cromosoma X la cui incidenza è compresa tra 1 e 10/1.000.000 individui ed il cui fenotipo clinico è caratterizzato da piastrinopenia grave, eczema, infezioni ricorrenti ed aumentata tendenza a sviluppare malattie autoimmuni e neoplasie.

La XLT rappresenta una forma lieve della WAS nella quale la piastrinopenia è severa, mentre gli altri difetti sono assenti o lievi. Entrambi i disordini derivano da mutazioni del gene per la proteina WAS (*Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASp*) localizzato in posizione Xp11.22-p11.23.

La sintomatologia si manifesta nei maschi emizigoti, ma sono state recentemente descritte femmine con WAS sintomatica per inattivazione preferenziale dell'X sano.

Infine, nel gruppo delle piastrinopenie a patogenesi sconosciuta troviamo la *Sindrome delle piastrine grigie (GPS, gray platelet syndrome)* caratterizzata da un grave deficit di alfa- granuli, tale da conferire alle piastrine un aspetto “pallido”.

La diagnosi di GPS riguarda attualmente soggetti con trombocitopenia ereditaria, piastrine giganti ed una grave carenza di alfa-granuli che fa sì che le piastrine appaiano *pallide e vuote* alle colorazioni (*Hematology Meeting Reports 2007*).

L'applicazione dell'algoritmo diagnostico (Figura 3), applicato alle macrotrombocitopenie ereditarie ha permesso in uno studio di catalogare circa il 60% dei pazienti con trasmissione autosomica dominante della malattia (*Noris et al. 2004*) che rientrano nelle quindici forme di trombocitopenie ereditarie descritte in OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Il restante il 40% dei pazienti con una forma ereditaria di trombocitopenia rimane senza una diagnosi definitiva, perché la loro condizione non è mai stata descritta o non è stata riconosciuta come relativa a un disturbo.

## **2. ANKRD26, RUNX-1 ed ETV6**

Negli ultimi anni sono emerse alcune forme di piastrinopenia ereditaria associate allo sviluppo di neoplasie di tipo ematologico e non ematologico che hanno destato un estremo interesse nei ricercatori, in particolare le forme associate a mutazioni dei geni *ANKRD26*, *RUNX1* ed *ETV6*.

La *Trombocitopenia 2*, anche definita come *ANKRD26-Related Disease* rientra fra le nuove forme di piastrinopenie ereditarie recentemente caratterizzate (2011) (*Balduini et al. 2013*).

Si tratta di una trombocitopenia non sindromica a trasmissione autosomica dominante causata da mutazione nel gene *ANKRD26* che mappa sul cromosoma 10p11.1-p12. Fra le diverse caratteristiche della malattia, spicca nei soggetti affetti, un'augmentata tendenza a sviluppare sindromi mielodisplastiche (MDS) e leucemie, con una stretta correlazione tra mutazioni di *ANKRD26* e lo sviluppo della neoplasia.

La Trombocitopenia *ANKRD26* correlata (*ANKRD26-RT*) è causata da sostituzioni puntiformi nel 5'UTR che possono comportare una sovra espressione del gene durante megacariopoiesi (*Pippucci et al. 2011*). La prima serie di pazienti studiati, ha suggerito che *ANKRD26-RT* predispone a neoplasie mieloidi (*Noris et al. 2011*), e la recente pubblicazione di una serie ulteriore di casi ha confermato questo dato (*Noris et al. 2013*). In entrambi i lavori pubblicati, le neoplasie si sono verificate in circa l'8% dei pazienti. Inoltre, alcuni soggetti presentavano leucocitosi e un aumento dei livelli di emoglobina, dati che suggeriscono una deregolazione a livello del progenitore mieloide comune che, in alcuni casi, evolve in tumori maligni. I megacariociti e le piastrine dei pazienti

ANKRD26-RT sono caratterizzati da inclusioni citoplasmatiche *Particulate Cytoplasmic Structure* (PaCS) contenenti componenti del sistema ubiquitina / proteasoma, fenomeno che è stato descritto in altre condizioni displastiche, così come nel cancro (Necchi et al, 2013).

I soggetti affetti presentano una piastrinopenia moderata i cui sintomi più comuni sono le petecchie, ecchimosi, epistassi e menorragia, emerge inoltre una diminuzione degli alfa granuli e un aumento delle trombopoietina sierica, mentre nel midollo è stata osservata un'importante dismegacariocitopoiesi. (Noris et al. 2011).

Il gene ANKRD26 è stato analizzato in una casistica di pazienti piastrinopenici privi di una diagnosi e sono state identificate diverse mutazioni in eterozigosi, tutte localizzate nella regione 5' UTR del gene non tradotta. Per quanto riguarda la ricerca volta a definire i meccanismi patogenetici della malattia, è stato ipotizzato che le mutazioni, vista la loro localizzazione in una regione regolatrice, possano alterare i meccanismi di controllo dell'espressione di ANKRD26 durante la megacariocitopoiesi. (Noris et al.2011).

Il 5'UTR di un gene rappresenta infatti una regione trascritta e non tradotta a monte dell'ATG. Le funzioni di queste regioni sono prevalentemente di regolazione, e possono avere un ruolo rilevante sia come promotore della trascrizione, sia a livello post-trascrizionale, aumentando il reclutamento di ribosomi per la traduzione e favorendo il legame di fattori promotori inibitori della traduzione. Possono inoltre agire nel controllo della produzione proteica formando strutture secondarie che intervengono nella stabilità del messaggero, o a livello dei siti di legame per fattori di regolazione. Studi a riguardo portano a ritenere che le mutazioni identificate nella stringa di oligonucleotidi del 5'UTR del gene, abbiano un ruolo nella differenziazione megacariocitaria, e quindi nella produzione di piastrine. E' probabile infatti che queste mutazioni agiscano su siti specifici riconosciuti da fattori del lineage megacariocitario, causando piastrinopenia e non altri fenotipi a livello sistemico.

Le varianti trovate, sono tutte localizzate nella regione trascritta e non tradotta al 5' del gene, nelle posizioni -116C>T, -118C>T, -125T>G, -127A>T, -128G>A, e -134G>A dall'inizio di traduzione. E' possibile che sostituzioni nucleotidiche, dal punto di vista del folding dell'mRNA, causino delle modificazioni nella struttura secondaria del messaggero, che potrebbero portare dal punto di vista della produzione proteica, alla formazione o distruzione di loop e forcine funzionali.

Nella situazione wild-type il 5'UTR è posizionato in una struttura complessa separata dal resto del messaggero e vicino al 3'UTR. Inoltre la stringa di basi nella quale sono collocate le mutazioni, forma una struttura a stem-loop particolarmente esposta. (Figura 5).

Il gene ANKRD26 è espresso nella maggior parte dei tessuti umani, compresi cervello, fegato, reni, cuore e tessuti embrionali, ma non è stata identificata la funzione del prodotto genico. E' composto

da 34 esoni ed il suo messaggero misura 7.5 Kb; la proteina è costituita da 1709 aminoacidi e sono note tre isoforme della stessa. Studi condotti sulla presenza di mutazioni in 5'UTR di ANKRD26 in 80 pazienti, sia sporadici che familiari, affetti da forme ereditarie di trombocitopenia senza una diagnosi definitiva, hanno messo in luce che 16 di essi presentano mutazioni in tale regione. Tutte le mutazioni rinvenute nel 5'UTR del gene si localizzano nella regione da -113 a -134 nucleotidi a monte dell'ATG. Questo dato conferma fortemente l'ipotesi di coinvolgimento del gene ANKRD26 nella patologia e lo colloca tra i principali responsabili di trombocitopenia autosomica dominante.

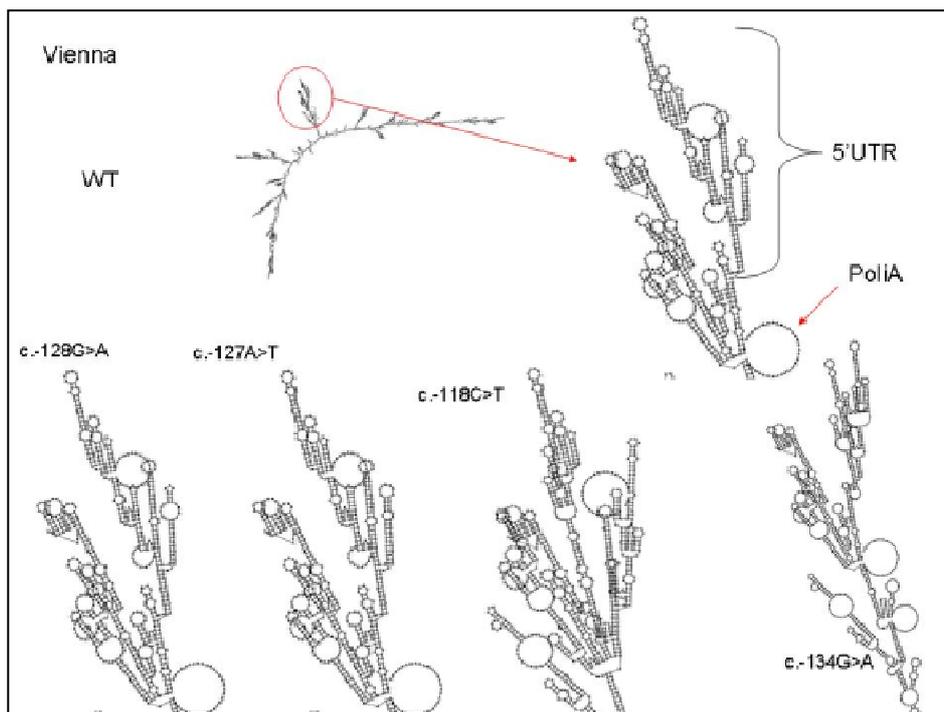


Figura 5. Struttura secondaria del messaggero del gene ANKRD26 secondo la predizione del software Vienna (Vienna RNA package v. 1.7, <http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>); in alto è mostrato il wildtype, in basso le modificazioni causate dalle singole mutazioni. Il rettangolo tratteggiato mette in evidenza la struttura a stem-loop nella quale sono situate le mutazioni. Questa struttura è modificata ma mantenuta nelle mutazioni -128 e -127, mentre scompare completamente nelle mutazioni -118 e -134.

Un altro disordine piastrinico familiare con predisposizione alla leucemia mieloide acuta (FPD/AML), è causato da mutazioni del gene RUNX1 (CBFA2). Il difetto si presenta con ereditarietà di tipo autosomico dominante ed è stato recentemente descritto come gene mutato in soggetti con piastrinopenia familiare. RUNX1 è un fattore di trascrizione con un ruolo cruciale nell'ematopoiesi e nella megacariopoiesi. Esso infatti è fondamentale per la formazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs) durante l'embriogenesi, per la maturazione megacariocitaria e per la produzione delle piastrine. Pazienti affetti da mutazioni presentano una tendenza al sanguinamento, modesta piastrinopenia e difetti della funzionalità piastrinica. Le piastrine circolanti presentano dimensioni e morfologia normali, mentre i megacariociti midollari

sono ridotti. Mutazioni nonsense, missense, ampie delezioni intrageniche o microdelezioni di RUNX1 sono alla base della malattia.

Il gene è costituito da una subunità alfa CBFA2, core binding factor (CBF), che interagisce con il DNA. Il legame con la subunità beta, CFBF, incapace di per sé di legare il DNA, aumenta notevolmente l'affinità per il DNA di CBFA2 che risulta quindi protetto dalla degradazione proteolitica; inoltre la maggior parte delle mutazioni descritte sono localizzate nel runt-homologous (RHD) domain, regione che media l'interazione di CBF-beta e il DNA (Cohen *et al.* 2009) (Figura 6). Al complesso CBFA2/CBFB viene attribuito un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione di numerosi geni codificanti sia per citochine che per i recettori delle stesse coinvolti nel processo emopoietico, come confermato dai topi CBFA2<sup>-/-</sup> che muoiono durante la vita fetale a causa della totale assenza di emopoiesi epatica. Particolare importanza funzionale potrebbe avere la carenza di recettore per la trombopoietina identificata nelle piastrine dei pazienti. (Sun *et al.* 2006). Sebbene non sia chiaro come le mutazioni in questione predispongano alla comparsa di leucemia, è noto come CBFA2 sia spesso implicato nella genesi della leucemia mieloide acuta de novo, essendo o coinvolto in traslocazioni cromosomiche acquisite, la più frequente delle quali è la t(8;21), o colpito da mutazioni puntiformi. La recente segnalazione di assenza di mutazioni a carico di CBFA2 in una famiglia in cui tre pazienti piastrinopenici hanno sviluppato sindrome mielodisplastica, in un caso evoluta in leucosi acuta mieloide, suggerisce l'eterogeneità genetica di questo disordine (Minelli *et al.* 2004). E' dimostrato che una singola mutazione di un fattore di trascrizione può alterare l'espressione di numerosi geni e influenzare differenti meccanismi cellulari, provocando simultaneamente un difetto nel numero e nella funzionalità delle piastrine, localizzate in differenti compartimenti delle membrane intracellulari.

Studi recenti hanno inoltre portato a ritenere che mutazioni germinali del gene ETV6 siano strettamente correlate a forme di trombocitopenia autosomica dominante. Costituito da 8 esoni e appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione ETS, ETV6 è caratterizzato da due importanti domini: un dominio ETS C-terminale, responsabile delle specifiche attività che legano il DNA e un dominio N-terminale, coinvolto nelle interazioni proteina-proteina (PNT) (Figura 7).

Molte varianti germinali missenso che interessano il dominio centrale e l'ETS, sono state recentemente identificate nelle famiglie con trombocitopenia e neoplasie ematologiche.

Coerentemente con un difetto di maturazione, in individui con ETV6-RT, i megacariociti si presentano piccoli e ipolobati. Le mutazioni infatti, impediscono la migrazione di ETV6 nel nucleo, reprimendo la trascrizione dei geni bersaglio. La presenza di trombocitopenia e l'aumento del numero dei megacariociti immaturi, dimostrano l'importanza di ETV6 nella biogenesi delle piastrine.

Una caratteristica che accomuna soggetti con piastrinopenia e mutazioni dei geni ETV6, RUNX1 e ANKRD26 è rappresentata dalla maggiore predisposizione allo sviluppo di leucemia acuta negli individui affetti (Noris *et al.* 2011; Noetzli *et al.* 2015). Questo aspetto non sorprende dato che ETV6, RUNX1 e ANKRD26 sono geni altamente espressi nelle cellule staminali ematopoietiche e nei progenitori della linea megacariociti-eritroide. Interessanti sono le recenti evidenze, le quali suggeriscono che ANKRD26 sia trascrizionalmente regolato da RUNX1 e dalla famiglia dei fattori di trascrizione ETS a cui appartiene ETV6. (Zhang *et al.* 2015).

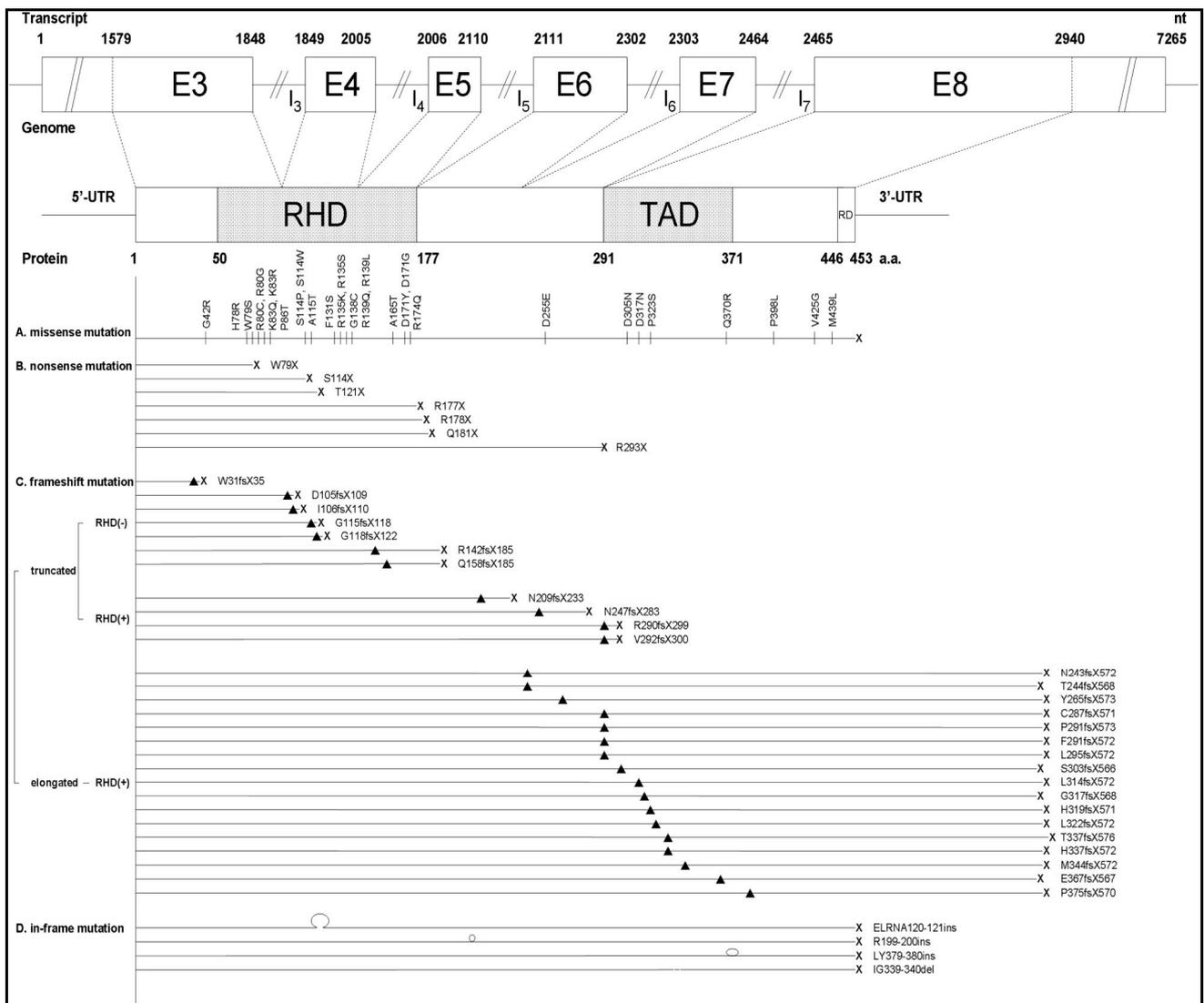


Figura 6: Pattern e mappatura di 68 mutazioni di RUNX-1 (Tang *et al.* 2009)

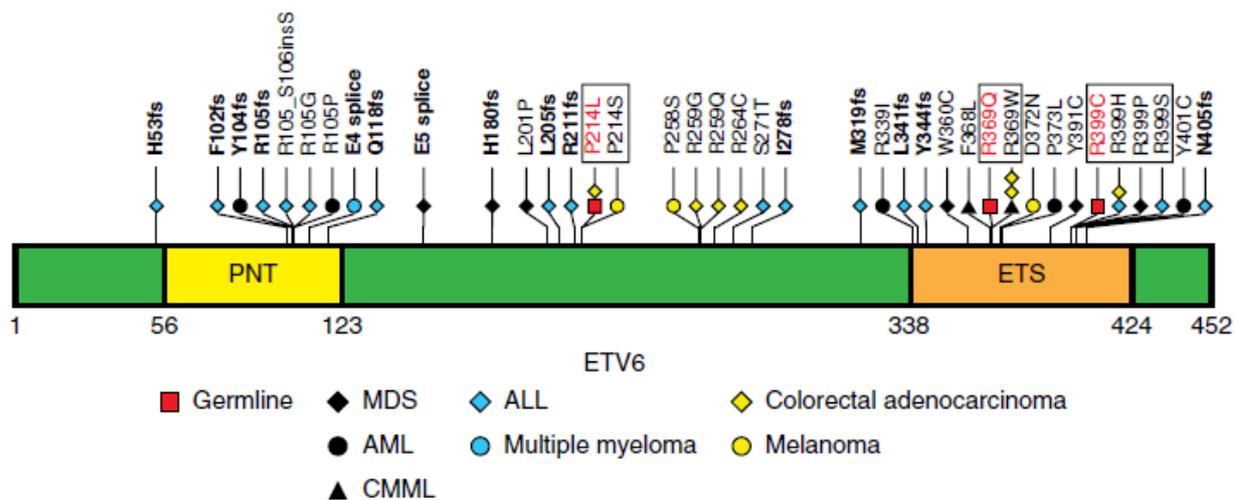


Figura 7. Mappatura delle mutazioni descritte in ETV6 (Zhang *et al.* 2015).

### 3. LE SINDROMI MIELODISPLASTICHE (MDS)

Le Sindromi Mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo eterogeneo di malattie clonali del sistema emopoietico caratterizzate da una progressiva incapacità di maturazione delle cellule staminali emopoietiche. A seconda del livello di differenziamento coinvolto, tali malattie si presentano quindi sottoforma di anemia, neutropenia, con problemi di sanguinamento ed infezioni. Tuttavia, i soggetti affetti non presentano una grave sintomatologia, pur essendo a rischio di progressione in leucemia mieloide acuta (AML). Dal punto di vista istologico, le MDS sono suddivise secondo la classificazione F.A.B. (French-American-British), basata sul numero e la morfologia dei blasti presente nel sangue midollare al momento della diagnosi (Bennett *et al.* 1982), che definisce cinque sottotipi principali di MDS: anemia refrattaria (RA), anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS), anemia refrattaria con eccesso di blasti (RAEB), anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione (RAEB-t), e leucemia mielomonocitica cronica (CMML), come mostrato in Tabella 2. A tale classificazione è stata aggiunta la classificazione WHO (World Health Organization), che raggruppa le MDS in otto categorie, come mostrato in Tabella 3 (Germing *et al.* 2000) (Vardiman *et al.* 2002). Inoltre, mediante l'uso del fattore IPSS (International Prognostic Scoring System) si può effettuare una valutazione prognostica, che si basa sulla combinazione delle aberrazioni cromosomiche, la presenza di citopenia e l'età del paziente (Greenberg *et al.* 1997); secondo questo sistema, i pazienti sono suddivisi in quattro categorie, dal basso rischio all'alto rischio di evoluzione in AML, come mostrato nella Tabella 4. È possibile che alterazioni citogenetiche, sia numeriche che strutturali, caratterizzino le MDS; l'incidenza di aberrazioni cromosomiche è di circa il 30-50% nelle MDS primarie e dell'80% nelle MDS secondarie, provocate da lunghe esposizioni ad agenti mutageni. Normalmente, circa il 70% di tutti i pazienti affetti da MDS presenta una buona prognosi,

ma nel 30% dei casi si ha una crisi blastica ed una rapida evoluzione in AML. Tra i pazienti che evolvono in AML, circa il 25-30% possiede un cariotipo normale, che attualmente rimane un fattore prognostico positivo, mentre il restante 70% presenta un cariotipo alterato, fattore prognostico negativo. Infatti, circa il 50% dei pazienti ad alto rischio di evoluzione in AML possiede delezioni parziali o totali del cromosoma 7, oppure trisomia del cromosoma 8. Inoltre, sono state riscontrate frequenti perdite alleliche a livello dei cromosomi 6q, 7p, 10p, 11q, 14q e 20q (*Alvarez and Cigudosa, 2005; Mori et al. 2000*). Per quanto riguarda il gruppo di pazienti affetti da MDS a cariotipo normale, attualmente il loro trattamento rappresenta un problema, poiché recentemente è stato visto che il *follow-up* clinico non è sufficiente a prevenire l'insorgenza di forme di AML molto aggressive (*Trost et al. 2004*). Sarebbe quindi molto importante avere a disposizione strumenti efficaci per identificare con maggior sicurezza i pazienti ad alto rischio di evoluzione in AML. Complessivamente, i meccanismi molecolari che inducono l'evoluzione in AML nei pazienti affetti da MDS non sono ancora stati chiariti.

Tabella 2. Classificazione F.A.B. delle MDS

<b>Sottotipo</b>	<b>Sangue periferico</b>	<b>Sangue midollare</b>	<b>Diagnosi MDS in %</b>
Anemia refrattaria	≤1% blasti	< 5% blasti <15% sideroblasti ad anello	10-40
Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello	≤1% blasti	< 5% blasti ≥15% sideroblasti ad anello	10-35
Anemia refrattaria con eccesso di blasti	< 5% blasti	5-19% blasti	25-30
Anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione	≥ 5% blasti o cellule di Auer	20-29% blasti o cellule di Auer	10-30
Leucemia mielomonocitica Cronica	< 5% blasti >1x10 <sup>9</sup> /L monociti	≤ 20% blasti	10-20

Tabella 3. Classificazione WHO delle MDS

RA	Anemia Blasti < 1% Monociti < 1000/mm <sup>3</sup>	Blasti < 5% Sideroblasti ad anello < 15%
RARS	Anemia Blasti < 1% Monociti < 1000/mm <sup>3</sup>	Blasti < 5% Sideroblasti ad anello ≥ 15%
RCMD	Citopenia (bi- o pancitopenia) Blasti < 1% Monociti < 1000/mm <sup>3</sup>	Displasia ≥ 10% delle cellule Blasti < 5% Sideroblasti ad anello < 15%
RCMD-RS	Citopenia (bi- o pancitopenia) Blasti < 1% Monociti < 1000/mm <sup>3</sup>	Displasia ≥ 10% delle cellule Blasti < 5% Sideroblasti ad anello ≥ 15%
RAEB-I	Citopenia Blasti < 5% Monociti < 1000/mm <sup>3</sup>	Displasia multilineage Blasti 5% - 9%
RAEB-II	Citopenia Blasti 5% - 19% Monociti < 1000/mm <sup>3</sup> Cellule di Auer ±	Displasia multilineage Blasti 10% - 19% Cellule di Auer ±
MDS-U	Citopenia Blasti < 1%	Displasia unilineage Blasti < 5%
MDS, con del(5q) isolata	Anemia Blasti < 5% Piastrine normali o aumentate	Blasti < 5% del (5q) isolata Megacariociti normali o aumentati

\* Abbreviazioni: RA, anemia refrattaria; RARS, RA con sideroblasti ad anello;  
RCMD, citopenia refrattaria con displasia multilineage;  
RCMD-RS, RCMD con sideroblasti ad anello;  
RAEB-I e RAEB-II, RA con eccesso di blasti (I e II);  
MDS-U, MDS non classificabile

Tabella 4. Classificazione IPSS delle MDS

Categorie di rischio IPSS	Punteggio prognostico*	Blasti midollari	Cariotipo
Low	0 (5.7 anni)	< 5%	Normale† oppure del 5q, del 20q
Intermediate-I	0.5-1.0 (3.5 anni)	5-10%	Intermedio <sup>□</sup>
Intermediate-II	1.5-2.0 (1.2 anni)	11-30%	Complesso* e/o anomalie del Chr 7
High	≥ 2.5 (6 mesi)	> 30%	Complesso*

\* Il punteggio prognostico è calcolato come somma dei singoli punteggi valutativi dei blasti midollari, della citopenia e del cariotipo. La sopravvivenza media per ogni gruppo è mostrata tra parentesi.

† Normale: normale oppure con -Y, del(5q) e del(20q)

\* Complesso: ≥ 3 anomalie cromosomiche <sup>□</sup> Intermedio: altre anomalie

Durante lo svolgimento di questa tesi è emerso un ulteriore aspetto nello studio delle trombocitopenie non ancora approfondito, ovvero il corso della gravidanza nelle donne con piastrinopenia ereditaria.

La gravidanza in donne con trombocitopenia ereditata è oggetto di preoccupazione sia per le madri che per i neonati, entrambi potenzialmente a rischio di sanguinamento e la gestione medica di questa condizione non può essere basata su dati, a causa della mancanza di informazioni coerenti in letteratura. Per questo motivo è data la necessità di far progredire le conoscenze su questa materia, è stato eseguito uno studio multicentrico retrospettivo di valutazione di 339 gravidanze in 181 donne con 13 diverse forme di trombocitopenia ereditaria, promosso da *Scientific Working Group on Thrombocytopenias and Platelet Function Disorders of the European Hematology Association (EHA)*, annunciato al Congresso EHA di Stoccolma nel 2013, che ha visto coinvolte moltissime università sul territorio nazionale e internazionale.

I pochi dati presenti in letteratura, mostrano come il rischio di sanguinamento in donne con trombocitopenia familiare risulti essere elevato, e causato da una bassa conta piastrinica associata, in alcuni casi, a difetti della funzione piastrinica.

Una sistematica revisione della letteratura pubblicata nel 2010, identifica nella Sindrome di Bernard-Soulier biallelica (bBSS) la forma di trombocitopenia ereditaria (IT) più frequentemente diagnosticata durante la gravidanza e associata ad un elevato rischio di sanguinamento sia per la madre che per il neonato.

Pochi sono anche i dati disponibili per la MYH9-RD, una delle forme più frequenti di (IT); con tale patologia il rischio di sanguinamento non sembra aumentare né nella madre, né nel neonato.

I dati limitati sull'esito della gravidanza, e sullo stato di salute del neonato, suggeriscono che, le donne con mBSS hanno un parto con risvolti pressoché simili a quello di donne sane.

Un moderato rischio di sanguinamento durante la nascita è stato riportato in una serie di soggetti con trombocitopenia causata da mutazioni del gene ANKRD26.

La scarsità dei dati presenti in letteratura, indicano che il rischio di sanguinamento per la gestante e per il bambino può presentarsi sia in forma lieve, ma anche in forma più severa nelle varie forme di IT.

## **2 Scopo**

---

Attualmente si conoscono almeno 20 geni i cui difetti genetici determinano un fenotipo caratterizzato da trombocitopenia ereditaria, ma circa il 50% dei pazienti hanno forme che non coincidono con nessun difetto noto.

Il fenotipo delle piastrinopenie ereditarie è caratterizzato dalle diverse dimensioni delle piastrine, da un diverso grado di piastrinopenia, dalla presenza o meno di difetto funzionale delle piastrine e dalla associazione con complessi sindromici che coinvolgono altre linee cellulari od altre funzioni d'organo.

Negli ultimi anni sono emerse alcune forme di piastrinopenia ereditaria associate allo sviluppo di neoplasie di tipo ematologico e non ematologico che hanno destato un estremo interesse nei ricercatori; in particolare le forme associate a mutazioni di *ANKRD26*, *RUNX-1* e *ETV6*.

Proprio all'interno di questo filone di ricerca si colloca il lavoro di questa tesi che si pone i seguenti obiettivi:

1. Costruire un database completo dei pazienti con piastrinopenia familiare finora pervenuti nel nostro laboratorio, definendo le mutazioni genetiche rinvenute.
2. Condurre uno studio preliminare sulla presenza di mutazioni in 5'UTR di *ANKRD26* in pazienti con piastrinopenia sporadica e familiare, che non rientravano in forme note di piastrinopenia ereditaria e che presentavano volume piastrinico nella norma ( $4\mu\text{m} < \text{MPV} < 8\mu\text{m}$ ), definendone le caratteristiche cliniche e molecolari di questa nuova forma di piastrinopenia ereditaria e studiando le famiglie con mutazioni in questo gene.
3. Ampliare l'indagine ad altri due geni coinvolti in forme di piastrinopenia ereditaria con predisposizione a neoplasie ematologiche, *RUNX1* ed *ETV6*, in un gruppo di pazienti con sindromi mielodisplastiche dal quale sono stati selezionati pazienti piastrinopenici e non (MDS piastrinopenia+, MDS piastrinopenia -) appartenenti alle diverse classi di sindrome mielodisplastica WHO 2008, in cura presso Presso l'Unità di Ematologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova (previo adeguato consenso informato).
4. Raccogliere e analizzare i dati relativi al corso della gravidanza in una ampia coorte di pazienti con forme di IT.

# **3      Materiali e Metodi**

---

### **Soggetti esaminati**

Presso l'Unità di Clinica Medica 1 dell'Azienda Ospedale-Università di Padova è presente una casistica di circa 60 pedigree familiari di soggetti con piastrinopenia familiare da difetto ignoto. Sono stati selezionati, previo adeguato consenso informato, i soggetti piastrinopenici per lo studio genetico, in base al fenotipo, alle dimensioni delle piastrine ed alla storia clinica di neoplasia, per valutare la presenza di mutazioni sui geni ANKRD26, RUNX-1 ed ETV6.

Presso l'Unità di Ematologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova è presente una casistica di pazienti con sindromi mielodisplastiche assommante a più di 150 pazienti. Sono stati selezionati, previo adeguato consenso informato, pazienti piastrinopenici e non (MDS piastrinopenia +; MDS piastrinopenia -) appartenenti alle diverse classi di sindrome mielodisplastica sec. WHO 2008. L'obiettivo dello studio preliminare è quello di sottoporre ad indagine molecolare alcuni pazienti per ciascun gruppo (anemia refrattaria, citopenia con displasia multilineare, anemia refrattaria con eccesso di blasti 1 e 2).

### **Conta piastrinica**

Il numero delle piastrine è stato valutato per mezzo del contaglobuli automatizzato Sysmex XP-300™ (Dasitgroup, Milano). Questo strumento, grazie alla facilità di utilizzo, alla velocità di esecuzione del test, affidabilità e alla precisione dei risultati, consente all'operatore di ottenere una conta piastrinica pressoché immediata.

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

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

### **Citofluorimetria: immunofenotipo piastrinico**

Con i test in citofluorimetria è stato valutato il binding dei seguenti anticorpi monoclonali (mAbs) diretti contro le principali glicoproteine della superficie piastrinica: antiCD41a-FITC (Serotec, Oxford,UK PM6/248) diretto contro la GPIIb/IIIa; antiCD42a-FITC (clone GR-P Serotec,

Oxford,UK) diretto contro la GPIX, componente del recettore per il vWF GPIb/V/IX; antiCD42b-FITC clone SZ2 (Immunotech) che riconosce un piccolo epitopo (Tyr276-Glu282) localizzato nella regione ricca di solfati anionici, a ridosso dell'estremità C-Terminale della regione LRR di GPIb $\alpha$  (Ward CM et al., 1996). SZ2 è usato come anticorpo conformazionale nella diagnosi della variante BSS-BZ, poiché in questi pazienti il binding risulta diminuito (Savoia A. et al. 2001). Per meglio caratterizzare la regione N-terminale della GPIb $\alpha$ , è stato usato anche il clone LJ-Ib1 che riconosce un epitopo localizzato tra i residui 1 e 293 della GPIb $\alpha$  tipicamente assente nella BSS-BZ (De Marco L et al. 1990) ed inibisce il binding del vWF alle piastrine stimulate con ristocetina.

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

Sono stati condotti test di citometria a flusso su tutti i soggetti per i quali era stata esclusa una malattia correlata a deficit di MYH9.

In un volume finale di 25  $\mu$ l sono stati incubati 22,5  $\mu$ l di PRP nativo o diluito 1:10 con Tyrode's buffer (nel caso in cui la conta piastrinica fosse inferiore a  $50 \times 10^9$  plts/L) con 2,5 $\mu$ l dell'appropriato mAbs. L'incubazione è avvenuta a temperatura ambiente (TA) per 15'. Nel caso degli anticorpi non direttamente coniugati con FITC, si è resa necessaria una seconda incubazione a TA per 15' con 2,5  $\mu$ l di secondario anti mouse IgG-FITC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluito 1:50. Appropriati 24 controlli (bianco ed aspecifico) sono stati realizzati ad ogni seduta per tutti i soggetti in esame ed i controlli sani.

Le piastrine marcate sono state risospese in 500  $\mu$ l di Tyrode's buffer a pH 7,4 e analizzate con un citofluorimetro BD FACScan (BD Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) ed il relativo software Kaluza. Per ogni campione sono stati acquisiti 10000 eventi. L'eccitazione dei fluorocromi è affidata ad un Argon laser con filtro a banda passante di 530 nm. La popolazione piastrinica è stata individuata in base alle dimensioni (forward scatter), alla granularità (side scatter) delle particelle, e in base al legame dell'anticorpo anti-CD41a (marcatore piastrinico). Per la quantificazione della fluorescenza risultante dal binding dei diversi anticorpi sono stati usati i rispettivi istogrammi di fluorescenza ed i valori del Canale Medio di Fluorescenza (Mean fluorescence Channel o MCH) elaborati dal software. In ogni istogramma, le regioni soglia sono state impostate in modo che includessero almeno il 98% degli eventi positivi registrati.

### **Estrazione del DNA genomico**

Il DNA genomico è stato estratto da sangue congelato, utilizzando l'estrattore automatizzato Maxwell (Promega Corp. Madison, WI, USA) seguendo il protocollo e le indicazioni del

produttore. Il DNA finale viene eluito dall'estrattore in 400 microlitri finali di elution buffer in una concentrazione di 50 ng/ml.

Per dosare gli acidi nucleici estratti è stato utilizzato il metodo spettrofotometrico che sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV con un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm. Per determinare la concentrazione ed il grado di purezza del campione estratto viene misurata la densità ottica (O.D.), considerando l'assorbanza (A) alle lunghezze d'onda di 260 e di 280 nm. Il rapporto A260/A280 è usato per stimare la purezza della preparazione degli acidi nucleici, in quanto le proteine, che sono la principale fonte di contaminazione, assorbono a 280 nm. Lo spettrofotometro viene azzerato a 260 e 280 nm utilizzando come "bianco" la soluzione TE. Il valore letto viene quindi moltiplicato per la diluizione (in genere 1:100).

Preparazioni ottimali di DNA hanno valori di A260/A280 uguali a 1.8: un rapporto inferiore a 1.8 è indice di contaminazione proteica, mentre un rapporto superiore a 2 è indice di frammentazione del DNA o contaminazione di RNA.

### **Amplificazione PCR dei geni GpIb $\alpha$ , GpIb $\beta$ , GpIX, Myh9**

#### **GpIb $\alpha$**

Il gene (Sequenza di riferimento NM\_000173) è costituito da due esoni ed è lungo 2501 paia di basi (bp) (<http://www.ensembl.org>). L'intera regione codificante, il promotore e parte delle regioni fiancheggianti i 2 esoni del gene sono stati amplificati usando 3 coppie di primers: 1F/2R, 3F/3R, 4F/5R (*Savoia A et al. 2001*).

#### Sequenza Oligonucleotidica 5'-3'

	Senso	Antisenso	Temperatura di Annealing
1	TGGAGAGGTTTTTAAAAGATG	CACACCTTGCTTCCATACGTAGAC	60°
2	CCCCTGGTTATGCAACTGTG	TGGATGCAAGGAGGAGGGCAT	60°
3	GATTACTACCCAGAAGAGGACA	CACAGGCTCTTCTCTCAAGG	60°

Le tre reazioni PCR sono state preparate in 25  $\mu$ l di volume finale con 50 ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X PCR Master Mix Promega (Corp. Madison, WI, USA).

Ogni reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 95°C per 2'
- 32 cicli di amplificazione suddivisi in:
  - ✓ Denaturazione a 94°C per 30''
  - ✓ Annealing 60° per 45''

- ✓ Estensione a 72°C per 1'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 5'

### **GpIbβ**

Il gene (Sequenza di riferimento NM\_000407) è costituito da un esone ed è lungo 1553 paia di basi (bp) (<http://www.ensembl.org>). L'intera regione codificante, il promotore e parte delle regioni fiancheggiante l'esone del gene è stata amplificata utilizzando la coppia di primers: 1F/1R. (Savoia A et al. 2001).

#### Sequenza Oligonucleotidica 5'-3'

	Senso	Antisenso	Temperatura di Annealing
1	CGCTCGGGCTCTCCCGCCTACGCCTCC	CAGGCCCGTGTGCCCAGCGCCG	58°

La reazione PCR è stata preparata in 25 µl di volume finale con 50 ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X GoTaq Green PCR Master Mix Promega (Corp. Madison, WI, USA).

Ogni reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 94°C per 5'
- 35 cicli di amplificazione suddivisi in:
  - ✓ Denaturazione a 96°C per 30''
  - ✓ Annealing 58° per 40''
  - ✓ Estensione a 72°C per 1:40'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'

### **GpIX**

Il gene (Sequenza di riferimento NM\_000174) è costituito da un esone lungo 889 paia di basi (bp) (<http://www.ensembl.org>). L'intera regione codificante, il promotore e parte delle regioni fiancheggianti l'esone sono stati amplificati usando tre coppie di primers: 1F/1R, 2F/2R, 3F/3R (Savoia A et al. 2001).

#### Sequenza Oligonucleotidica 5'-3'

	Senso	Antisenso	Temperatura di Annealing
1	CTGGGCACACTCCACCTT	ACGGACTGAAGGCTGTTGTT	55°
2	TGGA AACCATGGGGCTGT	GCCACGTCCCACAAGACC	55°
3	TGTGACTGCAGCCTCCACCTA	TATTCTGGGCTTCTGGTGGT	55°

La reazione PCR è stata preparata in 25 µl di volume finale con 200ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X PCR Master Mix Promega (Corp. Madison, WI, USA).

Ogni reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 95°C per 5'
- 30 cicli di amplificazione suddivisi in:
  - ✓ Denaturazione a 94°C per 1'
  - ✓ Annealing 55° per 30''
  - ✓ Estensione a 72°C per 45''
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'

### **MYH9**

Il gene (Sequenza di riferimento NM\_002473) è costituito da 41 esoni ed è lungo 7501 paia di basi (bp) (<http://www.ensembl.org>). Le mutazioni finora identificate sono a carico degli esoni (1, 10, 16, 24, 25, 26, 30, 38, 40). Sono stati amplificati le regioni codificanti, il promotore e parte delle regioni fiancheggianti dei 9 esoni del gene (*Heath KE et al. 2001*).

#### Sequenza Oligonucleotidica 5'-3'

	Senso	Antisenso	Temperatura di Annealing
1	TCCTTCTCCTCCCCGCTTAG	TCCTTCAAGCCCCCTTCTCA	55°
10	TTGCTCATTACCCCCGTGG	CCTCAACTGTGCTGCTGCA	55°
16	GTTCCCTGACTATTCTCCGACTG	CACCTCTGGGACTCACTGCA	55°
24	GAGACAGAACCCATGGCACT	AGTGCCGAGAAGCTAGGGCCAG	55°
25	TGTCCTGCAAACCTCTGCTCC	TCCATGTCTCCAAGCCAAGG	55°
26	GAAAAGCTGCCTGGAGTGCC	CAGGACTGGTTTGGATTCTG	55°
30	TGAGCAGGTGCCATCTCGG	TCAACAAGCCAGAGCCTGAG	59°
38	CCGGACCCTCTGAAGGAGG	CCCTGCCTGTCACCCCATCT	55°
40	GAGTGGTCTGTCTAGCTCAG	GGAGGCTGTGGTGTCTGTCT	55°

La reazione PCR è stata preparata in 25 µl di volume finale con 50 ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X PCR Master Mix Promega (Corp. Madison, WI, USA).

- Per gli esoni 10, 16, 24, 25, 26 la reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:
  - Attivazione della polimerasi 95°C per 5'

- 39 cicli di amplificazione suddivisi in:
  - ✓ Denaturazione a 95°C per 1'
  - ✓ Annealing 55° per 45''
  - ✓ Estensione a 72°C per 1'
    - Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'
- Per gli esoni 1, 38,40 la reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:
  - Attivazione della polimerasi 95°C per 5'
  - 39 cicli di amplificazione suddivisi in:
    - ✓ Denaturazione a 95°C per 1'
    - ✓ Annealing 55° per 30''
    - ✓ Estensione a 72°C per 1'
      - Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'
- Per l'esone 30 la reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:
  - Attivazione della polimerasi 95°C per 5'
  - 40 cicli di amplificazione suddivisi in:
    - ✓ Denaturazione a 95°C per 1'
    - ✓ Annealing 59° per 1'
    - ✓ Estensione a 72°C per 1'
      - Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'

La strumentazione usata è un termociclatore Mastercycler Pro (Eppendorf, Amburgo). Tutti gli ampliconi ottenuti sono stati controllati con una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% colorato con Etidio Bromuro.

### **5'UTR del gene ANKRD26**

#### **3.1.1 Reazione di PCR**

Il gene (Sequenza di riferimento NM\_014915) è costituito da 34 esoni ed è lungo 6591 paia di basi (bp) (<http://www.ensembl.org>). Lo studio del gene è limitato al 5'UTR del gene, regione in cui sono localizzate le mutazioni patogenetiche oggetto di questo studio.

### Sequenza Oligonucleotidica 5'-3'

	Senso	Antisenso	Temperatura di Annealing
1	CATGGAGCACACTTGACCAC	TACTCCAGTGGCACTCAGTC	58°

La reazione di PCR è stata preparata in 25 µl di volume finale con 50 ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X PCR Master Mix Promega (Corp. Madison, WI, USA).

La reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 95°C per 2'
- 30 cicli di amplificazione suddivisi in:
  - ✓ Denaturazione a 95°C per 10''
  - ✓ Annealing 58° per 1'
  - ✓ Estensione a 72°C per 2'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 1'

I prodotti sono stati sottoposti a elettroforesi su gel d'agarosio al 1% in tampone di TBE 1X per verificare la corretta altezza dei prodotti amplificati mediante il confronto con un marcatore.

### **RUNX1**

Il gene (Sequenza di riferimento NM\_001001890) è costituito da 8 esoni ed è lungo 7274 paia di basi (bp) (<http://www.ensembl.org>). Sono stati amplificati l'intera regione codificante, il promotore e parte delle regioni fiancheggianti degli 8 esoni del gene.

### Sequenza Oligonucleotidica 5'-3'

	Senso	Antisenso	Temperatura di Annealing
1-2	TCTTGCAAAGTCTACTCGGCT	TCTGCACCGAGGTGAAACAA	58°
3	CTCCAGTGCTAAAAAGTGTAAG	TGGAATCAGCAGAAACAGCC	58°
4	GTAATAAAGGCCCTGAACG	CCCACATCCCAAGCTAGGAA	58°
5	GTTATCATTGCTATTCCCTCTGC	GTTTCTAGGGATTCCATCACAG	58°
6	CTGGTAACTTGTGCTGAAGG	TCTGAGACATGGTCCCTGAG	58°
7	CCCCAGTTTTAGGAAATCCAC	CTCTGAGCATCAAGGGGAAA	58°
8	ACCCTGGTACATAGGCCACA	GTTCTGCCAACTCCTTCATGC	58°
9	TGGGTGGCTTCCCATCCTCC	GGGCTTGTGCGAACAGGA	55°

La reazione di PCR è stata preparata in 25 µl di volume finale con 50 ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X PCR Master Mix Promega (Corp. Madison, WI, USA).

Per tutti gli esoni la reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 95°C per 5'
- 35 cicli di amplificazione suddivisi in:
  - ✓ Denaturazione a 95°C per 1'
  - ✓ Annealing 58° per 1'
  - ✓ Estensione a 72°C per 2'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'

### **ETV6**

Il gene (Sequenza di riferimento NM\_001987) è costituito da 8 esoni ed è lungo 5989 paia di basi (bp) (<http://www.ensembl.org>). Sono stati amplificati l'intera regione codificante, il promotore e parte delle regioni fiancheggianti degli 8 esoni del gene.

La reazione di PCR è stata preparata in 25 µl di volume finale con 50 ng di DNA genomico, 15 pmol di ogni primer e l'appropriato volume di 2X PCR Master Mix Promega (Corp. Madison, WI, USA).

#### Sequenza Oligonucleotidica 5'-3'

	Senso	Antisenso	Temperatura di Annealing
1	GGGAGAGGAAAGGAAAGTGG	CCCCCTTGCTTTTTGACAAT	57°
2	GTCTCATACTCCATTCCAAG	AGGGACAGAGGATTGATGG	57°
3	AGACCTTCTCCCTTTATTCC	AGGGAAGAAGAGGAAGTGTT	57°
4	GCTTGGTGAGGGTAGGAG	CTCACGATCAAAGCGAAG	57°
5	ATACCTACACGCTCCTCCATT	TTCTGCTTGGATGAGGCTAA	57°
6	TTGCCTCCCGTCTTTCA	GCAAAGGGAAGGAAATAAT	57°
7	AAGCGAGGCTGCTATGG	TAACGCAGTGACCAAATAATA	57°
8	TGGACCAAGGCTTCTCGT	AAACTACCCAGCACAGGCG	57°

Per tutti gli esoni la reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico

- Attivazione della polimerasi 95°C per 5'
- 35 cicli di amplificazione suddivisi in:

- ✓ Denaturazione a 95°C per 1'
- ✓ Annealing 57° per 1'
- ✓ Estensione a 72°C per 2'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'

### **3.2 Analisi di sequenza dei prodotti di PCR**

Tutti i prodotti di PCR sono stati preparati per il sequenziamento attraverso una procedura a quattro fasi.

#### **FASE 1. Digestione**

Il primo passaggio di questa procedura a quattro step prevede il trattamento dei prodotti di PCR con Esonucleasi I e Fosfatasi Alcalina (GE Healthcare,UK). Questi due enzimi digeriscono, rispettivamente, i frammenti genici a singola elica e i dNTPs residui dalla reazione di PCR.

Composizione della soluzione per la reazione di digestione enzimatica:

Reagente	Volume (µl)
Prodotto PCR	5
Exosap	2
Volume totale	7

- ✓ Attivazione enzimatica a 37°C per 15';
- ✓ Inattivazione enzimatica a 85°C per 15'.

#### **FASE 2. Marcatura**

La seconda fase prevede una reazione di marcatura dei prodotti di PCR. La reazione è una soluzione già pronta contenente l'enzima, i nucleotidi per la polimerizzazione e i dideossinucleotidi marcati tramite fluorescenza (BigDye V.1.1, Applied Biosystems).

E' una reazione molto simile alla PCR da cui si ottengono frammenti marcati di lunghezza diversa. Si utilizza una miscela contenente Ampli Taq DNA polimerasi, dNTPs normali e dNTPs marcati: questi ultimi sono sprovvisti dell'ossidrile al 5', pertanto quando vengono incorporati nella catena di DNA nascente ne impediscono l'allungamento.

Il ciclo termico della reazione è così strutturato:

- Attivazione della polimerasi presente nella mix a 96°C per 1'

- 26 cicli suddivisi in:

- ✓ Denaturazione a 96°C per 10''
- ✓ Appaiamento a 50°C/55°C per 6''
- ✓ Estensione a 60°C per 1'30''

La temperatura di appaiamento sarà di 50°C se la temperatura di annealing dei primers utilizzati nella PCR è inferiore o uguale a 60°C, a 55°C se la temperatura di annealing dei primers è superiore o uguale a 60°C.

Composizione della soluzione per la reazione di marcatura:

Reagente	Quantità (µl)	Concentrazione finale
Prodotto di PCR 100 ng/µl	10	50ng/µl
BigDye Terminator3.1	1,5	
Buffer BigDye 5X	2,5	0,6X
Primer 10µM	2,5	1,25µM
H <sub>2</sub> O	4	
Volume totale	20	

### FASE 3. Purificazione

I prodotti della marcatura sono stati purificati utilizzando le colonnine GE Healthcare Illustra Autoseq G-50 Dye Terminator Removal Kit.

Per permettere alla resina in soluzione di entrare in contatto con i prodotti marcati, la soluzione di purificazione è stata messa in agitazione per 30'. Successivamente il tutto viene centrifugato a 4800 rpm per 1' ed il prodotto di PCR è così pronto per essere caricato nel sequenziatore automatico.

### FASE 4. Sequenziamento

Il sequenziatore automatico presenta un sistema a 16 capillari riempiti con un particolare polimero che funziona da matrice di separazione nella corsa elettroforetica dei campioni (AB3130cl Applied Biosystem). Il sistema capillare è formato da tre parti: la cella di rilevazione, la barra di caricamento e gli elettrodi dei capillari. La cella di rilevazione colloca i 16 capillari nella posizione corretta per l'eccitazione da parte del laser; la barra di caricamento, invece, sostiene i capillari e funziona da catodo durante l'elettroforesi.

I campioni vengono caricati simultaneamente all'interno dei capillari e separati elettroforeticamente migrando attraverso il polimero del capillare. Quando il DNA passa attraverso la cella di rilevazione, un raggio laser illumina entrambi i lati dei 16 capillari ed eccita i cromofori legati ai frammenti genici. La fluorescenza emessa è catturata dalla camera CCD che la converte in segnale elettrico, poi processato dal computer. I dati così ottenuti vengono visualizzati mediante elettroferogrammi in cui ad ogni picco di un certo colore corrisponde una specifica base. In questo modo dalla sequenza dei picchi si risale alla sequenza delle basi azotate del frammento analizzato.

Per visualizzare su computer gli elettroferogrammi forniti dal sequenziatore, abbiamo utilizzato il programma "Chromas Lite 2.0". Utilizzando questo programma abbiamo analizzato ed allineato le sequenze relative agli individui affetti e ai loro familiari ed abbiamo confrontato queste con le sequenze corrispondenti presenti nella banca dati NCBI Entrez Nucleotide.

Lo studio sulle gravidanze è stato promosso *Scientific Working Group on thrombocytopenias and Platelet Function Disorders of the European Hematology Association (EHA)*. Il Policlinico San Matteo di Pavia ha approvato il protocollo di studio, il quale è stato eseguito in accordo con la dichiarazione di Helsinki.

45 centri clinici sono stati coinvolti nello studio ed invitati a fornire dati sul decorso delle gravidanze in donne con IT, estrapolati da pubblicazioni scientifiche e da database personali.

I dati relativi all'arruolamento riguardavano le caratteristiche basali della madre, il corso della gravidanza, il parto e le condizioni del neonato, con particolare attenzione agli eventi di sanguinamento nella mamma e nel bambino.

Erano valutabili solo le donne con una diagnosi confermata dall'indagine molecolare, con l'unica eccezione per la MYH9-RD, per la quale era sufficiente la positività all'immunofluorescenza, considerata come diagnosi in pazienti dove lo screening genetico non era disponibile.

Data la natura retrospettiva dello studio, non è stato possibile usare la più recente classificazione del tipo di sanguinamento, che è la più usata nei pazienti con difetto dell'emostasi primaria.

Il sanguinamento spontaneo nella madre prima della gravidanza, quando riportato, è stato misurato con la *WHO World Health Organization bleeding scale* in cui:

- Grado 0 assenza di sanguinamento
- Grado 1 petecchie
- Grado 2 sanguinamento lieve
- Grado 3 sanguinamento grave
- Grado 4 sanguinamento debilitante

Sono state utilizzate due definizioni per l'eccessivo sanguinamento:

- *excessive bleeding requiring blood transfusion (EBBT)*, basato su trasfusioni di piastrine e/o di sangue durante o dopo il parto per trattare il sanguinamento
- *all excessive bleedings (AEB)*, che include sia pazienti che ricevono trasfusioni di piastrine e/o sangue, ma anche soggetti che non ricevono prodotti del sangue e che sono trattati per sanguinamenti più severi del normale.

La nascita pre-termine è stata considerata tale, prima delle 37 settimane di gestazione.

Infine, la conta piastrinica è stata misurata con contaglobuli disponibili in ciascun centro.

## **4 Risultati e Discussione**

---

## Risultati

Il lavoro da me svolto finora è stato quello di raccogliere e classificare in un database tutti i pazienti con probabile piastrinopenia pervenuti nel nostro laboratorio. Per i soggetti che presentavano macrotrombocitopenia è stata condotta l'indagine genetica riguardante le mutazioni presenti nelle glicoproteine Gp1B $\alpha$ , Gp1B $\beta$ , GpIX e Myh9, mediante PCR (reazione a catena della polimerasi) sequenziamento genico, e analisi delle sequenze allineate con quelle depositate in database pubblici (NCBI *National Center for Biotechnology Information*).

Il database creato, oltre all'identificazione del paziente con i dati anagrafici, comprende, dove possibile, i dati relativi al numero del campione di Dna, manifestazioni emorragiche, score emorragico, conta piastrinica, morfologia, aggregazione piastrinica, Von Willebrand Factor, immunofenotipo, pattern immunofenotipo Myh9, e dati clinici; tali informazioni sono state reperite dalle cartelle cliniche e dai referti fatti.

Il numero dei soggetti raccolti è di 170, appartenenti a 70 famiglie; di questi, 8 famiglie presentano mutazioni nella MYH9, *MYH9-related disease*, in particolare: 5797 C>T in eterozigosi sull'esone 40, un codone di stop in posizione 1933 (R1933X), e una eterozigosi sull'esone 38, 5521 G>A che genera una sostituzione aminoacidica in posizione 1841 (E1841K).

Mutazioni sporadiche in eterozigosi sono state trovate sull'esone 16 C2104T (R702C), sull'esone 1 C287T (S96L) e sull'esone 25 G3485C (R1162T mutazione non descritta).

12 famiglie presentano mutazioni del gene GP1B $\alpha$ , che causano *Bernard-Soulier Syndrome*: Ala156Val variante Bolzano e A169C sostituzione aminoacidica N41H; mutazioni meno frequenti sono state trovate in eterozigosi sull'esone 3 G814T, che comporta una sostituzione aminoacidica V272F, due eterozigosi sull'esone 2, C171A N41K, C216T L57F, una delezione di un dinucleotide AT (A1523; T1524) e una mutazione allo stato di omozigote A386G N110D.

Infine sono state classificate quattro famiglie che presentano mutazioni del gene GP1B $\beta$  con una eterozigosi C486G, che causa una sostituzione aminoacidica C122W.

Inoltre, in due diverse famiglie è stata trovata una mutazione T179C L60P nella glicoproteina GP1B $\beta$  non ancora descritta in letteratura.

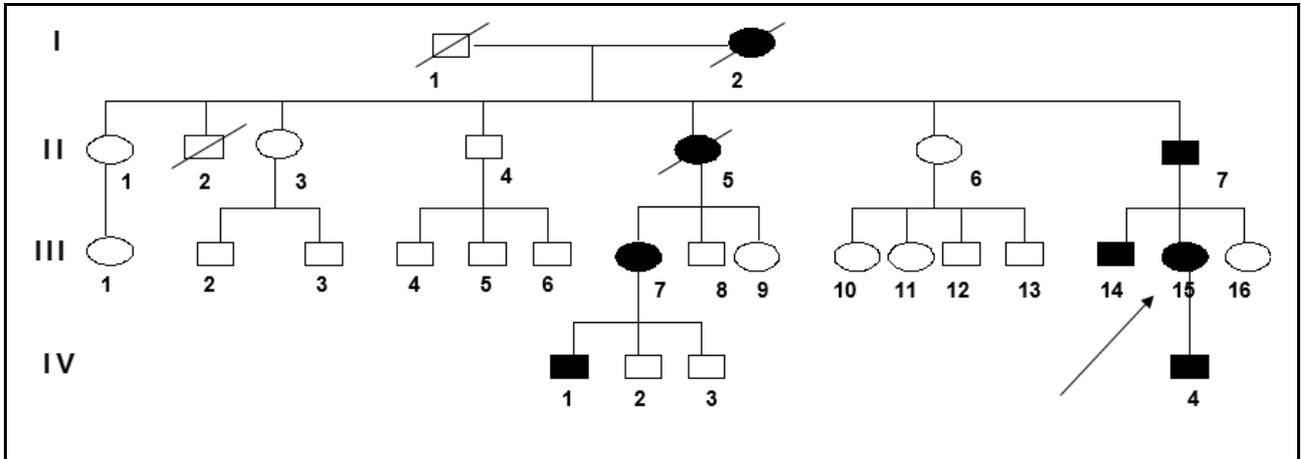
21 famiglie non presentano mutazioni a livello delle glicoproteine.

Alla luce di nuovi studi relativi alle nuove forme di piastrinopenie ereditarie recentemente caratterizzate, è stata indagata regione 5'UTR del gene ANKRD26, di tutti quei pazienti piastrinopenici (27 famiglie) con morfologia piastrinica normale cioè che presentano un valore inferiore a 4% e conta piastrinica inferiore a  $150 \times 10^9/L$ .

Dallo studio è emerso che due famiglie presentano diverse mutazioni in eterozigosi a carico del gene ANKRD26; *la famiglia  $\alpha$*  (Figura 9) presenta le mutazioni c.-134 G>A e c.-140 C>G e *la*

*famiglia β* (Figura 11) la mutazione c.-128 G>A, presenti nella regione del 5'UTR e descritte in letteratura.

Figura 9. Albero genealogico *famiglia α*. III-15 la freccia indica la proposita.



Dati clinici rilevanti in alcuni componenti della famiglia

I-2: d.n. 1915-1995 piastrinopenica, deceduta per ictus, trsfusa per episodi emorragici.

II-5: d.n. 1950-1970 piastrinopenica, deceduta per neoplasia all'utero.

II-7: d.n. 1949, spondilite anchilosante da circa 30 anni,  $40 \times 10^9$  plts/L, no manifestazioni emorragiche.

III-7: piastrinopenica, a 10 anni neoplasia cerebrale.

III-14: d.n. 1985,  $48 \times 10^9$  plts/L, nessuna manifestazione emorragica.

III-15: d.n. 1989,  $36 \times 10^9$  plts/L, trasfusioni di piastrine per estrazione dentale, e pre-parto.

IV-4: d.n. 2012,  $80 \times 10^9$  plts/L, nessuna manifestazione emorragica.

Due soggetti II-5 e III-7 inoltre presentano due forme diverse di neoplasia, probabilmente correlabili al disordine genetico riscontrato. Nella figura 10 è riportato l'elettroferogramma con la mutazione nel 5'UTR del gene ANKRD26 c.-134 G>A in eterozigosi in due soggetti della famiglia e la mutazione c.-140 C>G in eterozigosi solo nel soggetto IV-4.



IV-1 d.n. 2008; 52 x 10<sup>9</sup> plts/L

Nella figura 12 è riportato l'elettroferogramma con la mutazione nel 5'UTR del gene ANKRD26 c.-128G>A in due soggetti della famiglia.

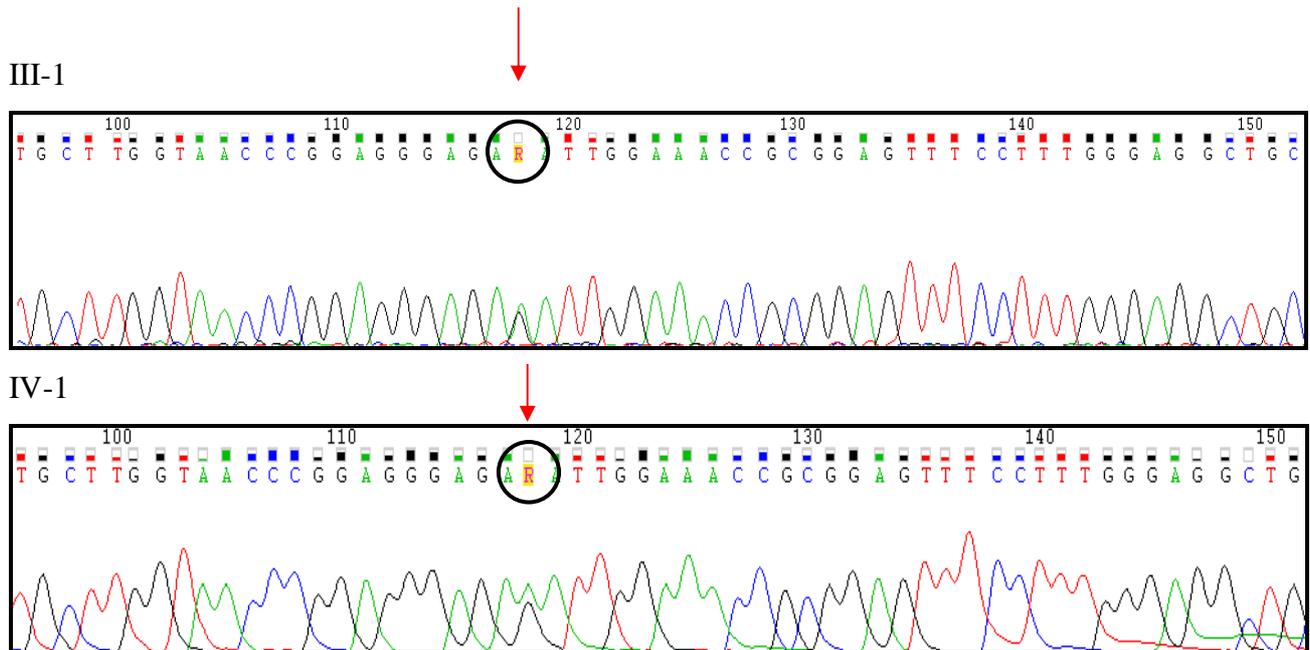


Figura 12. Elettroferogramma soggetti III-1 e IV-1 con mutazione c.-128G>A in eterozigosi.

In una terza famiglia  $\gamma$  (Figura 13) due soggetti, III-3e II-8, presentano polimorfismi sul gene ANKRD26 (Figura 14 e 15), che in letteratura non vengono associati ad alcuna patologia, ma tali soggetti presentano anche una delezione nell'introne 1 del gene ETV6 (Figura 16).

L'aspetto più interessante è che i due soggetti hanno sviluppato una forma di leucemia.

Ad oggi non è possibile stabilire una associazione tra i due polimorfismi in ANKRD26 e la microdelezione dell'introne 1 in ETV6, dato che la delezione è localizzata in una regione non codificante e non esistono dati in letteratura che spieghino il legame tra i due tipi di mutazioni.





In particolare abbiamo rilevato tre mutazioni del gene RUNX1 (una mutazione missenso con cambiamento della polarità dell'aminoacido nell'esone 4, una delezione e una inserzione, rispettivamente nell' esone 8 e 9) e una delezione nell' introne 1 di ETV6. Tutte le mutazioni rilevate non sono presenti nei database pubblici.

Abbiamo inoltre raccolto i dati relativi al sesso, età, cariotipo, numero di globuli bianchi, emoglobina, piastrine e blasti per ciascun gruppo di pazienti. (Tabella 10, 11, 12).

Tabella 10. 4 pazienti con MDS, trombocitopenia e mutazioni sui geni RUNX1 ed ETV6

SESSO	ETA'	DIAGNOSI	CARIOTIPO	GLOBULI BIANCHI	NEUTROFILI*	Hb§	PLTS°	BLASTI
M	78	RCMD 2011	Normale	6,4	3,3	76	28	0,60%
M	71	RCUD 2013	Normale	12	5,6	101	18	0,40%
M	82	AREB I 2012	Normale	8	0,12	87	10	5,00%
F	78	AREB I 2014	del5	7,9	4,6	102	55	6,00%
*G/L	Lgr/L							
<b>MEDIA</b>	<b>77,2</b>			<b>8,5</b>	<b>3,4</b>	<b>91,5</b>	<b>27,7</b>	<b>3,00%</b>
<b>DS</b>	<b>4,5</b>			<b>2,4</b>	<b>2,4</b>	<b>12,4</b>	<b>19,6</b>	<b>2,92%</b>

Tabella 11. 5 pazienti con MDS, trombocitopenia.

SESSO	ETA'	DIAGNOSI	CARIOTIPO	GLOBULI BIANCHI	NEUTROFILI*	Hb§	PLTS°	BLASTI
M	80	RCMD 2014	+8 20q-	5,6	3,9	136	96	2,00%
M	76	RCMD 2014	del20q	1,1	0,4	90	65	2,50%
F	66	AREB II 2014	Normale	1,5	0,2	102	83	12,00%
M	77	RCMD 2014	Normale	4,1	2,2	86	99	2,00%
M	74	AREB I 2014	Normale	1,7	0,5	132	116	8,00%
*G/L	Lgr/L							
<b>MEDIA</b>	<b>74,6</b>			<b>2,8</b>	<b>1,4</b>	<b>109,2</b>	<b>91,8</b>	<b>5,30%</b>
<b>DS</b>	<b>5,2</b>			<b>1,9</b>	<b>1,6</b>	<b>23,4</b>	<b>19</b>	<b>4,52%</b>

Tabella 12. 12 pazienti con MDS senza trombocitopenia.

SESSO	ETA'	DIAGNOSI	CARIOTIPO	GLOBULI BIANCHI	NEUTROFILI*	Hb§	PLTS°	BLASTI
F	66	AREB II 2014	Complesso	1,7	0,6	80	250	14,00%
F	75	RCMD 2014	Normale	2,7	1,36	88	202	1,50%
F	85	AREB 2012	Normale	4,6	2,3	85	450	1,00%
F	79	RCMD 2015	Del5 +	1,4	0,6	96	119	4,00%
M	78	AREB 2013	Normale	5	3	128	130	2,00%
F	65	RCMD 2012	Normale	2,4	1,8	110	185	4,00%
M	69	AREB II 2011	Del20q	1,7	0,9	90	170	6,50%
M	75	AREBII 2010	8+20q-	4,3	2,7	100	200	8,00%
F	77	RCMD 2015	Normale	1,8	1,1	98	140	5,00%
M	76	RCMD 2011	Normale	2,1	1,3	82	220	4,00%
F	78	AREB I 2012	Complesso	3,6	2,1	105	197	7,00%
F	79	AREB II 2014	Normale	2,9	1,51	98	153	6,00%
*G/L	Egr/L							
<b>MEDIA</b>	<b>74,8</b>			<b>2,8</b>	<b>1,6</b>	<b>96,6</b>	<b>201,3</b>	<b>5,25%</b>
<b>DS</b>	<b>5,9</b>			<b>1,2</b>	<b>0,7</b>	<b>13,4</b>	<b>87,2</b>	<b>0,03%</b>

Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)

Refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD)

Refractory anemia with excess blasts-1 (RAEB-1)

Abbiamo condotto un'analisi statistica per i valori di età, globuli bianchi, neutrofili, emoglobina, piastrine e blasti tra i tre gruppi di pazienti con MDS e trombocitopenia, pazienti con MDS senza trombocitopenia e pazienti con MDS senza trombocitopenia.

Si è evidenziata una chiara significatività per quanto riguarda il confronto dei valori medi di piastrine e globuli bianchi nel gruppo di pazienti con MDS trombocitopenia, confrontati con il gruppo di pazienti con MDS senza trombocitopenia (Tabella 13). Inoltre una evidente significatività è presente, confrontando le medie dei valori piastrinici e dei globuli bianchi, nel gruppo di pazienti con MDS, trombocitopenie e mutazioni, confrontato con il gruppo di soggetti con MDS, trombocitopenia, ma senza mutazioni (Tabella 14).

- Media valori in pazienti con MDS e trombocitopenia.
- Media valori in pazienti con MDS senza trombocitopenia

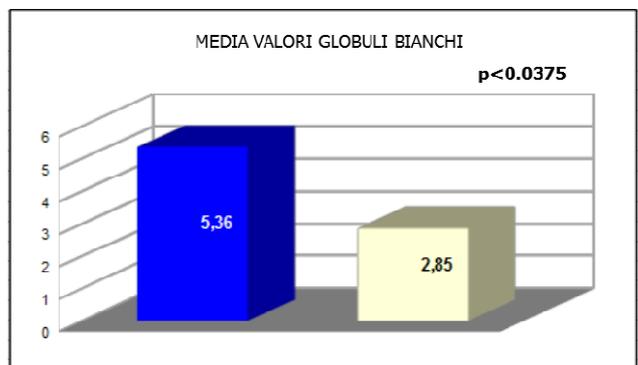
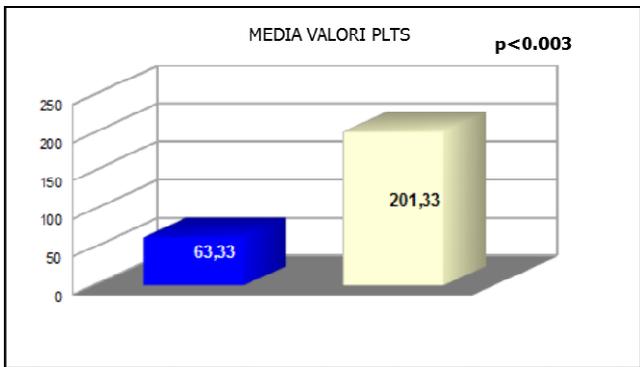


Tabella 13. Confronto dei valori delle medie di piastrine, globuli bianchi e grado di significatività.

- Media valori in pazienti con MDS, trombocitopenia e mutazioni
- Media valori in pazienti con MDS, trombocitopenia senza mutazioni

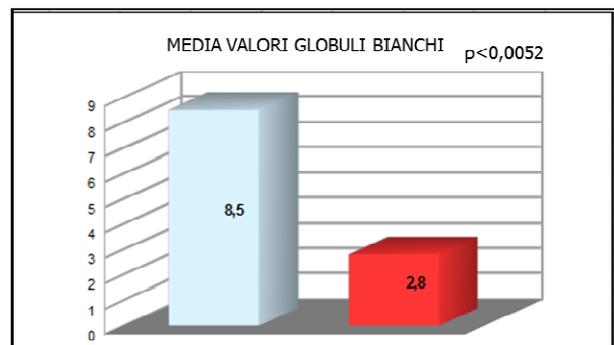
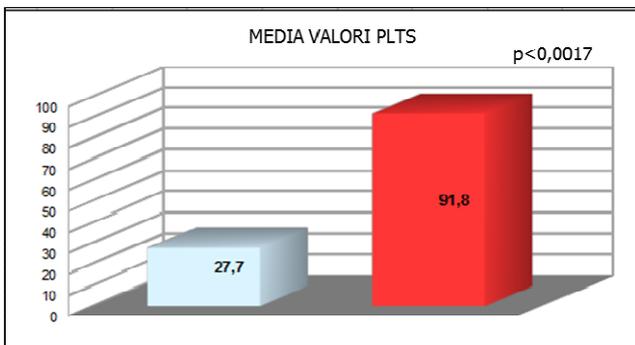


Tabella 14. Confronto dei valori delle medie di piastrine, globuli bianchi e grado di significatività.

Infine, nell'ambito delle piastrinopenie familiari, abbiamo collaborato al progetto *Pregnancy in Inherited Platelet Abnormalities* (PIPA) diretto dal Prof. C. Balduini dell'Università di Pavia.

Questo studio è parte di un più ampio progetto promosso da EHA SWG e presentato al 18° congresso di Stoccolma nel giugno 2013. I risultati delle analisi delle gravidanze in donne con piastrinopenie ereditarie sono stati pubblicati in aprile 2014.

In questo lavoro sono state raccolte informazioni su un totale di 339 gravidanze in 181 donne, sono state studiate le caratteristiche basali della madre, il corso della gravidanza, la gestione e l'esito del parto.

Questo studio ha visto coinvolti centri d'eccellenza che si occupano di piastrinopenie ereditarie: l'Università di Pavia-IRCCS, il policlinico San Matteo di Pavia, l'Ospedale San Paolo di Milano, il policlinico Sant'Orsola- Malpighi di Bologna, il policlinico Gemelli di Roma, l'Università cattolica

sacro cuore di Roma, l'Università di Padova, l'Università di Trieste, l'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste. Inoltre a livello internazionale hanno partecipato: *Denis Diderot University* di Parigi, *Armand Trousseau Children's Hospital* di Parigi, *Centre Hospitalo-Universitaire* di Nancy, *Hopital Xavier Arnoz* di Pessac (Francia), *Institute d'Hématologie-Transfusion* di Lille (Francia), *Hopitaux Universitaires* di Ginevra (Svizzera), *University of Buenos Aires* in Argentina, *Universitat Autònoma de Barcelona* (Spagna), *Immunohematology Department de Barcelona* (Spagna), *Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin* di Greifswald, (Germania), *University of Pennsylvania*, Philadelphia, ( USA).

Vista la criticità della gravidanza e del parto per soggetti con disordini piastrinici ereditari, è nata la necessità di raccogliere a posteriori dati di pazienti con diagnosi definitiva, per avere un quadro più generale degli effetti di tale patologia nella donna in stato interessante e nel nascituro.

Abbiamo quindi contattato, dove possibile, tutte le pazienti di sesso femminile presenti nel nostro database e raccolto i dati inerenti la piastrinopenia in gravidanza, al momento del parto e nel bambino. Sono state raccolte anche informazioni riguardo gli aspetti di base della malattia della madre, come età alla diagnosi, mutazione genetica, sanguinamenti e trattamenti, conta piastrinica, descrizione della gravidanza e informazioni riguardanti il parto come età al momento del parto, tipologia, emorragie, trasfusioni, conta piastrinica, settimane di gestazione e infine dati del neonato come la conta piastrinica alla nascita, se affetto della stessa patologia della mamma, sanguinamento e trattamento.

Il sanguinamento spontaneo è stato valutato utilizzando la scala WHO (World Health Organization).

Dai dati è emerso che il 66% delle donne ha grado 0 (nessun sanguinamento), il 36% ha grado 1 (petecchie), il 50% grado 2 (blando sanguinamento), il 20% grado 3 (sanguinamento severo), il 9% ha grado 4 (sanguinamento debilitante) (Figura 17).

I dati relativi al parto mostrano che su totale dei 303 parti, il 47% è stato di tipo vaginale, il 53% cesareo. Su un totale di 126 anestesie, il 28% è stato di tipo generale, il 16% spinale, mentre il 56% non è ricorso ad alcun tipo di anestesia.

Sul totale di 339 gravidanze, 30 sono i nati pretermine (prima della 37<sup>a</sup> settimana), 272 nati a termine. 34 pazienti hanno ricevuto trasfusioni di piastrine prima del parto come profilassi.

Di 55 donne con precedente diagnosi, 44 hanno ricevuto trattamenti non necessari, inclusa la splenectomia in 15 casi. Il corso della gestazione è stato regolare in 304 casi, gli aborti spontanei sono stati 34. Un'interruzione terapeutica, per malformazioni fetali. La nascita pre-termine è stata registrata in 30 gravidanze (36<sup>a</sup> o 37<sup>a</sup> settimana).

Per quanto riguarda i neonati 122 sono sani, 156 colpiti dalla stessa malattia della madre; 61 bambini non sono stati valutati. In 5 neonati affetti sono stati osservati segni di sanguinamento costituiti da petecchie. 2 aborti spontanei alla 9<sup>a</sup> settimana per emorragia cerebrale.

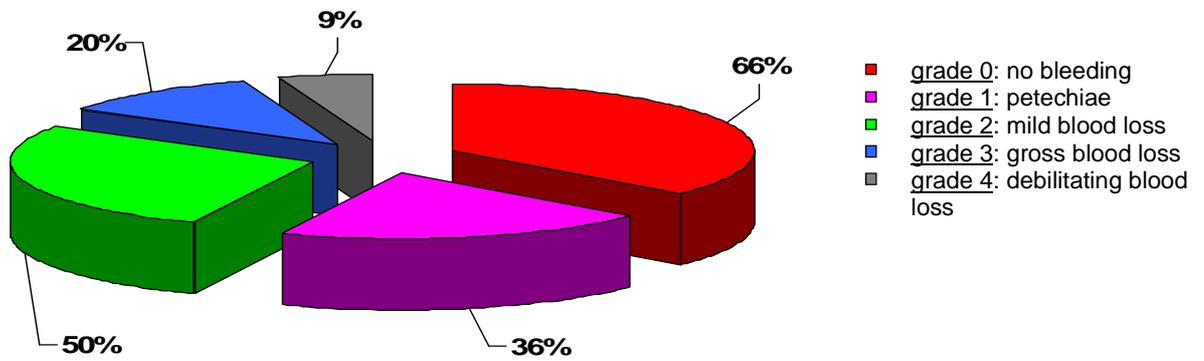


Figura 17. Sanguinamento spontaneo (who bleeding scale)

## Discussione

Le piastrinopenie rappresentano il più frequente disordine dell'emostasi e costituiscono un gruppo eterogeneo di entità cliniche. La peculiarità delle forme familiari risiede nella difficoltà della loro identificazione clinica poiché spesso vengono classificate come immuni ed i pazienti sottoposti a terapie inappropriate. Le forme più comuni di piastrinopenia familiare che abbiamo identificato sono BSS, MYH9-RD seguite da ANKRD26-RD (Figura 18).

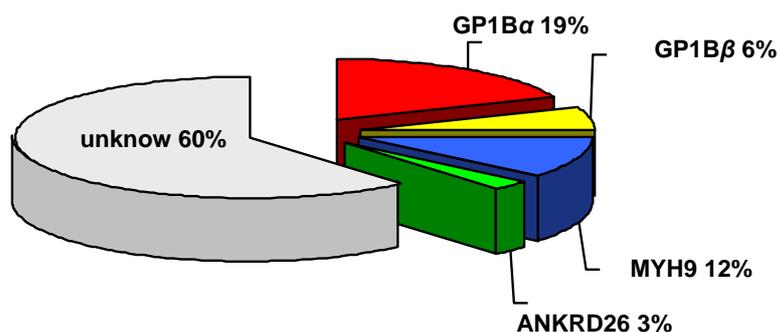


Figura 18. Distribuzione mutazioni

Gli studi relativi a forme di piastrinopenia familiare e l'individuazione di nuovi geni causativi di tale patologia ci permettono di caratterizzare una parte di quel 50% di soggetti con piastrinopenia che ancora rimangono senza una chiara diagnosi e comprendere meglio le forme familiari per poterne identificare in futuro anche l'origine.

La trombocitopenia famigliare THC2 è stata a lungo considerata una rara forma di piastrinopenia ereditaria, in quanto erano note solamente due famiglie con tale diagnosi.

Piuttosto recente è l'individuazione di mutazioni nel gene ANKRD26, nella breve stringa di 22 paia di basi del 5'UTR. Insieme alla sindrome di Bernard-Soulier mono e bi-allelica, alla MYH9-RD, la THC2 rappresenta la più frequente forma di trombocitopenia ereditaria.

Un dato allarmante evidenziato in lavori presenti in letteratura e anche nei nostri studi, è l'alta percentuale di pazienti che hanno sviluppato forme maligne. In tutti i pedigree da noi studiati in cui abbiamo evidenziato la presenza di ANKRD26 mutato, vi è almeno un componente con una patologia neoplastica.

Osservazioni presenti in letteratura sembrano suggerire un possibile collegamento tra ANKRD26 e leucemia o più in generale, con il cancro. Tuttavia, siamo ancora lontani da concludere che mutazioni di ANKRD26 predispongono a leucemia acuta o a qualsiasi altra forma maligna perché il numero di pazienti investigati è troppo bassa. Possiamo solo riportare quanto presente in letteratura, ovvero che la prevalenza di sviluppo di leucemia acuta in pazienti con mutazioni di ANKRD26 è di

167 su 100.000, molto superiore rispetto alla popolazione generale, valore stimato tra 3.4 e 6.6 su 100.000. (Noris et al. 2011).

E' indispensabile approfondire questi studi e includere un'accurata storia familiare inerente il cancro in quei soggetti con mutazioni.

Chiarire questo punto può quindi essere importante alla luce del potenziale beneficio di trattamenti con farmaci TPO mimetici, che dovrebbero essere usati con cautela se è dimostrato il fatto che le mutazioni di ANKRD26 facilitano l'insorgenza della leucemia.

Il disordine piastrinico di tipo familiare con propensione ad evoluzioni neoplastiche e leucemiche è stato per la prima volta evidenziato nel 1978 e da allora sono stati riportati in letteratura circa 30 pedigree con mutazioni germinali di RUNX1.

La regione N-terminale del gene codifica per il runt homology domain (RHD), il quale media sia legame al DNA che l'eterodimerizzazione con il suo partner il core binding factor (CBF) beta. La regione C-terminale regola invece la trascrizione del gene e codifica per il dominio di attivazione della trascrizione sugli esoni 7 e 8.

All'interno di questo dominio vi è una regione specifica, nota come dominio inibitorio di legame al DNA, che è importante nella down-regolazione dell'espressione genica e gioca un ruolo chiave nelle mutazioni.

La proteina RUNX1 agisce legandosi a CBF-beta per formare un complesso fattore di trascrizione che si esprime in cellule ematopoietiche staminali e regola l'espressione di diversi importanti geni coinvolti nell'ematopoiesi. RUNX1 svolge anche un ruolo nella trascrizione di molti geni coinvolti nella normale funzione piastrinica, cosa che spiega la presenza di trombocitopenia e di disfunzione piastrinica descritta nelle forme neoplastiche e mielodisplastiche.

Le mutazioni di RUNX1 sono molto eterogenee e il dominio RHD risulta essere la regione dove sono localizzate il maggior numero di variazioni, sito prossimo all' N-terminale del gene e costituito dagli esoni 3, 4 e 5 (Figura 19). Proprio nell'esone 4 si localizza la mutazione missenso da noi rinvenuta: c.76C>G p.227Pro>Arg.

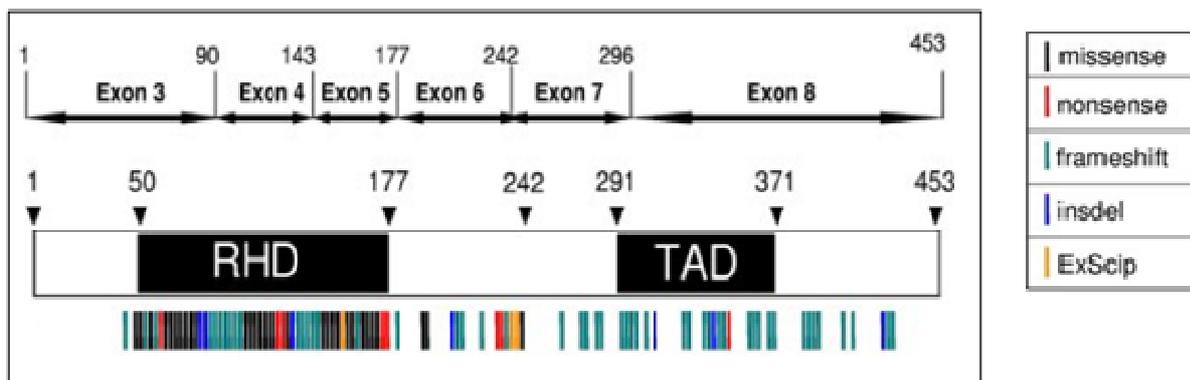


Figura 19. Localizzazione mutazioni nel gene RUNX1. (Schmittger et al. 2011)

Il dominio RHD è particolarmente incline a mutazioni, in quanto contiene sequenze primarie facilmente mutabili; alcune mutazioni conferiscono un maggior rischio di trasformazione in forme maligne. Inoltre le mutazioni che causano aploinsufficienza risultano essere le più comuni; tuttavia, quelle che agiscono in senso "dominante negativo" sono ad alto rischio e competono per i siti di legame al DNA o per il legame preferenziale al CBF-beta, riducendo in tal modo la forma wildtype di RUNX1 di circa il 50%. Queste inoltre hanno una maggiore incidenza di progressione in sindromi mielodisplastiche e leucemie mieloidi acute.

Allo stesso modo, mutazioni di RUNX1 nella porzione C-terminale, dove si collocano le quelle da noi rinvenute, hanno maggiore capacità di legare il DNA assieme alla perdita del dominio inibitorio di legame al DNA, con la conseguente espressione preferenziale dell'allele mutato, anche se pochi sono i dati disponibili in letteratura inerenti lo studio degli esoni 6,7 e 8.

Se mutato, RUNX1 migliora quindi la proliferazione delle cellule mieloidi, blocca la differenziazione cellulare, e porta a instabilità genomica che può evolvere in forme leucemiche. Anche se le mutazioni di RUNX1 sono molto rilevanti nella trasformazione in forme leucemiche, da sole sono insufficienti per avviare la malattia; mutazioni secondarie sono obbligatorie per lo sviluppo di neoplasie maligne. Questo ha portato a considerare RUNX1 come "gatekeeper gene" nella patogenesi delle leucemie acute RUNX1-associate.

La trasmissione di tipo autosomico dominante della trombocitopenia e la predisposizione a sindromi mielodisplastiche e leucemia acuta causata da mutazioni germinali di ETV6, ricorda il fenotipo associato a mutazioni di RUNX1 e ANKRD26 rispettivamente. ETV6, RUNX1 e ANKRD26 sono tutti altamente espressi nelle cellule ematopoietiche e nei progenitori della linea megacariociti-eritroide. Recenti evidenze suggeriscono che ANKRD26 è trascrizionalmente regolato da RUNX1 e dal dominio ETS di ETV6 e che la THC2 associata a mutazioni nel 5'UTR di ANKRD26, altera RUNX1 e FL1.

L'intersezione dei percorsi regolati da ANKRD26, RUNX1 e fattori di trascrizione della famiglia ETS nella megacariocitopoiesi e nella trasformazione ematopoietica merita comunque ulteriori studi.

Fino a pochi decenni fa la diagnosi definitiva di piastrinopenia ereditaria era possibile solo per alcuni pazienti che avevano condizioni riconoscibili di anomalie tipiche relative alla morfologia piastrinica (come le piastrine giganti e GPS), a difetti caratteristici della funzione piastrinica in vitro (quali il grave difetto della risposta piastrinica alla ristocetina nella BSS biallelica), o specifici difetti fisici (quali le anomalie scheletriche). Tutti gli altri soggetti venivano diagnosticati come affetti da un persistente basso numero di piastrine e l'unico trattamento disponibile era la trasfusione piastrinica.

Oggi la situazione è profondamente cambiata e nella maggior parte dei casi è possibile avere una diagnosi definitiva.

Tuttavia la diagnosi di trombocitopenia ereditaria è difficile per molte ragioni. In primo luogo, in quanto si tratta di una patologia rara poco conosciuta dai medici, i quali pertanto tendono a sospettare le forme più comuni. In secondo luogo, per una diagnosi definitiva sono richieste tecniche di laboratorio complesse, disponibili solo in pochi centri e infine la metà dei pazienti ha forme che non sono ancora state descritte.

Come conseguenza, in molti pazienti la piastrinopenia ereditaria è mal diagnosticata come forma di trombocitopenia immune, e i soggetti affetti sono a rischio di ricevere trattamenti futili. La diagnosi errata, inoltre, è particolarmente frequente in pazienti la cui conta piastrinica bassa è scoperta in età adulta, perché in questi casi, anche l'origine ereditaria della trombocitopenia può essere persa.

Non sempre la natura genetica di una piastrinopenia è facilmente riconoscibile, soprattutto quando il riscontro avviene casualmente in pazienti asintomatici. Ciò è confermato da studi recenti che dimostrano come il 6.5% dei casi diagnosticati come porpora trombocitopenica idiopatica sia in realtà affetto da forme ereditarie e come il 15% dei pazienti con piastrinopenia genetica venga splenectomizzato nell'ipotesi di piastrinopenia autoimmune. Per evitare questi errori è importante non escludere una forma genetica per l'assenza di altri familiari affetti, in quanto nelle malattie recessive ed in quelle X-linked, così come nei pazienti con mutazioni de novo, l'anamnesi familiare è negativa.

Lo studio degli strisci di sangue periferico è l'esame più utile per confermare il sospetto della natura genetica di una trombocitopenia, in quanto molte di queste forme presentano evidenti anomalie morfologiche delle piastrine, a volte con alterazioni caratteristiche anche di leucociti e/o emazie. A tal proposito è utile ricordare che per l'identificazione di macrocitosi piastrinica l'osservazione microscopica non può essere sostituita dall'uso dei contaglobuli automatici, in quanto questi non riconoscono gli elementi più grandi e sottostimano, sia il volume che il numero delle piastrine.

Una volta identificata o sospettata la natura genetica di una piastrinopenia è necessario formulare una diagnosi precisa sia per definire la prognosi che per identificare il miglior approccio terapeutico. La definizione diagnostica è inoltre necessaria per la consultazione genetica e per un'eventuale diagnosi prenatale, dato che la gravidanza nelle donne con trombocitopenia ereditaria si presenta come evento potenzialmente a rischio di sanguinamento sia nella madre che nel bambino. Questo è dimostrato nello studio *Pregnancy in Inherited Platelet Abnormalities* in cui il rischio di emorragia durante il parto sembra essere aumentato sia nella madre che nel bambino. Le emorragie tali da richiedere trasfusioni di sangue, sono più frequenti nelle donne con una storia di sanguinamento grave prima della gravidanza e con conta piastrinica al momento del parto sotto 50

$\times 10^9 / L$ . Il grado di trombocitopenia nei neonati è risultato essere simile a quello della madre. La diagnosi precoce e la conoscenza della storia clinica della paziente può quindi essere utilizzata come importante parametro predittivo di rischio correlato al sanguinamento durante il parto.

Per la definizione diagnostica è disponibile un algoritmo che, partendo dal quadro clinico e dalle dimensioni delle piastrine, identifica gli esami necessari per arrivare alla diagnosi.

Va tuttavia sottolineato come spesso (e cioè nel 40% dei casi) non sia possibile classificare il paziente in quanto la sua malattia non è inquadrabile in alcuna delle forme note.

Sul piano terapeutico, le trasfusioni con concentrati piastrinici rappresentano il provvedimento più efficace per l'arresto delle emorragie maggiori e la preparazione ad interventi chirurgici dei pazienti con rischio emorragico grave. Dal momento che espongono al rischio di alloimmunizzazione e refrattarietà alle trasfusioni successive, laddove possibile vanno utilizzati donatori HLA-compatibili.

Una nuova speranza terapeutica per i pazienti con piastrinopenia ereditaria è derivata dalla recente osservazione che il TPO-mimetico eltrombopag è efficace nell'aumentare il conteggio piastrinico e ridurre la diatesi emorragica nei pazienti con MYH9-RD (*Pecci et al. 2010*). Il farmaco è stato utilizzato con successo al posto delle trasfusioni piastriniche per consentire ad un paziente con una forma grave di questa malattia di essere sottoposto ad intervento di chirurgia maggiore (*Pecci et al. 2012*). Il rapporto rischio-beneficio della somministrazione cronica di questi farmaci a soggetti con MYH9-RD rimane ancora da valutare ed il loro utilizzo in questo senso non può che avvenire nell'ambito di studi clinici.

Gli effetti dei TPO-mimetici in altre forme di piastrinopenia ereditaria non sono attualmente conosciuti. La descrizione di un aumento della conta piastrinica in pazienti affetti da ANKRD26-RT in risposta al naturale aumento dei livelli sierici di TPO in corso di flogosi sistemica (*Noris et al. 2011*) suggerisce tuttavia la possibilità che i TPO-mimetici possano risultare utili in questa ed altre forme di piastrinopenia ereditaria con livelli sierici di TPO non costitutivamente elevati.

Per correggere stabilmente la piastrinopenia, la splenectomia trova indicazione solamente nella WAS e nella XLT, dove risolve la piastrinopenia nella quasi totalità dei casi. Nonostante nella WAS aumenti il rischio di infezioni, l'asportazione della milza porta la sopravvivenza media dei malati da 5 a 25 anni.

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche è in grado di guarire le piastrinopenie ereditarie e rappresenta oggi il trattamento elettivo per quelle forme che portano inesorabilmente al decesso del paziente prima dell'età adulta o per lo sviluppo di aplasia midollare grave (CAMT) o per emorragie ed infezioni (WAS), è tuttavia gravato dal rischio di morte trapianto-correlata e va quindi riservato ai casi più gravi con prognosi infausta.

Molto recentemente, il difetto genico di cellule staminali e progenitori emopoietici di tre pazienti con Sindrome di Wiskott-Aldrich è stato corretto in vitro e la reinfusione di queste cellule ha indotto un importante miglioramento sia della piastrinopenia che dell'immunodeficienza (*Aiuti et al. 2013*). L'importante successo lascia sperare che la terapia genica possa rappresentare un'alternativa al trapianto di midollo anche in altre forme gravi di piastrinopenia ereditaria, soprattutto nei pazienti per i quali non sia stato possibile identificare un donatore compatibile.

Ad oggi il panorama delle piastrinopenie ereditarie si è notevolmente ampliato e arricchito di conoscenze sui meccanismi cellulari e molecolari preposti alla produzione di piastrine, alle culture di megacariociti in vitro e allo studio di animali transgenici con difetti genetici specifici che interferiscono con biogenesi delle piastrine. Tuttavia, i modelli in vitro non riproducono la complessità del microambiente midollare dove ha luogo megacariopoiesi, ma sicuramente lo studio di modelli sperimentali porterà a chiarire quali siano i meccanismi alla base della patologia, e a verificare se questi siano presenti anche negli esseri umani affetti.

E' chiaro pertanto come l'indagine genetica sia diventata indispensabile per formulare una diagnosi precisa, sia per confermare un sospetto di piastrinopenia ereditaria sia per valutare e approfondire la presenza di mutazioni de novo.

E proprio a questo scopo ci viene incontro l'applicazione delle nuove tecnologie in ambito molecolare ovvero della "next generation sequencing" con la quale è stato possibile identificare nuove mutazioni genetiche che hanno migliorato la nostra conoscenza sul quadro clinico e sui meccanismi molecolari alla base della biogenesi piastrinica. Allo stato attuale, le mutazioni trovate si collocano in più di 20 diversi geni, tuttavia questi geni rappresentano circa il 50% dei pazienti con IT, suggerendo che nuove forme devono essere ancora caratterizzate. Alle nuove tecniche di sequenziamento genico massivo è affidata la speranza di superare in tempi brevi questa limitazione e di fare piena luce su queste complesse patologie.

Il riconoscimento di una specifica forma di piastrinopenia ereditaria consente di definire la prognosi nel singolo malato e di identificare precocemente le molte alterazioni che spesso si associano alla piastrinopenia nelle forme sindromiche.

Inoltre, è ormai noto che mutazioni in alcuni geni che causano trombocitopenia possono esporre i pazienti al rischio di sviluppare altre patologie gravi come la leucemia. E' alla luce di queste nuove scoperte che il quadro delle piastrinopenie ereditarie si arricchisce di nuovi spunti e filoni di ricerca utili a chiarire il link molecolare alla base della loro evoluzione in forme maligne e a individuare nuove opportunità terapeutiche.

## **5 Bibliografia**

---

- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 2013; 341(6148):1233151.
- Afshar-Kharghan V, Craig FE, López JA. Bernard-Soulier syndrome in a patient doubly heterozygous for two frameshift mutations in the glycoprotein Ib alpha gene. *Br J Haematol.* 2000; 110(4):919-24.
- Alvarez, S and Cigudosa, J C. Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 2005; 23, 18-25.
- Bader-Meunier B, Proulle V, Trichet C, et al. Misdiagnosis of chronic thrombocytopenia in childhood. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25:548-52.
- Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, et al. Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica* 2003; 88:582-92.
- Balduini C. L, Noris P. Piastrinopenie costituzionali. *Hematology Meeting Reports* 2007; 1: Clinica Medica III, IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo-Università degli Studi, Pavia
- Balduini CL, Savoia A. Genetics of familial forms of thrombocytopenia. *Hum Genet* 2012; 131:1821-32.
- Balduini C., Savoia A. et al, Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults. *J Thromb Haemost* 2013; 11:1006-19).
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982; 51(2):189-99.
- Biino G, Balduini CL, Casula L, et al. Analysis of 12,517 inhabitants of a Sardinian geographic isolate reveals that predispositions to thrombocytopenia and thrombocytosis are inherited traits. *Haematologica* 2011; 96:96-101.
- Biino G, Gasparini P, D'Adamo P, et al. Influence of age, sex and ethnicity on platelet count in five Italian geographic isolates: mild thrombocytopenia may be physiological. *Br J Haematol* 2012; 157:384-7.
- Biino G, Santimone I, Minelli C, et al. Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data. *PLoS One.* 2013; 8:e54289.
- Castillo-Caro P, Dhanraj S, Haut P, et al. Proximal radio-ulnar synostosis with bone marrow failure syndrome in an infant without a HOXA11 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010; 32:479-85.

- Cohen MM Jr. Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet A*. 2009; 2629–2646.
- Daama S A Al, Y. H Housawi, et al., A missense mutation in ANKRD26 segregates with thrombocytopenia. *Blood* 07/2013; 122(3):461-2.
- De Marco L, Mazzucato M, Fabris F, De Roia D, Coser P, Girolami A, Vicente V, Ruggeri ZM. Variant Bernard-Soulier syndrome type bolzano. A congenital bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib-IX complex. *J Clin Invest*. 1990; 86(1):25-31.
- Fabris F, Cordiano I, Salvan F, Ramon R, Valente M, Luzzatto G, Girolami A. Chronic isolated macrothrombocytopenia with autosomal dominant transmission: a morphological and qualitative platelet disorder. *Eur J Haematol* 1997; 58:40-45.
- Fabris F, Cordiano I, Steffan A, Ramon R, Scandellari R, Nichol JL, Girolami A. A direct study of thrombopoiesis (TPO, reticulated platelets, glycocalicin) in patients with hereditary macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2000; 64:151-156.
- Fabris F, Fagioli F, Basso G, Girolami A. Autosomal dominant macrothrombocytopenia with ineffective thrombopoiesis. *Haematologica* 2002; 87.
- Geddis AE, Balduini CL. Diagnosis of immune thrombocytopenic purpura in children *Curr Opin Hematol* 2007; 14:520-5.
- Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M and Aul C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res* 2000; 24, 983-92.
- Giovanni Castegnaro. Tesi di dottorato: Lo studio di famiglie con patologia genetica per l'identificazione del gene malattia: sindrome di mungan e trombocitopenia autosomica dominante (thc2). Università di Bologna anno 2010.
- Girolami A, Randi ML, Casonato A, Pasini L, Boccato C, Fabris F. A study of platelet function and morphology in a new family with May Hegglin anomaly. *Folia Haemat* 1980;2:256-268.
- Glembotsky AC, Marta RF, Pecci A, et al. International collaboration as a tool for diagnosis of patients with inherited thrombocytopenia in the setting of a developing country. *J Thromb Haemost* 2012;10:1653-61.
- Greenberg P, Cox, C, LeBeau, M M, Fenaux, P, Morel, P, Sanz, G, Sanz, M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 2079-88.

- Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozennfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Baker DF, Greinacher A, Epstein CJ, Gluksman MJ and Martignetti J. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias; May-Hegglin anomaly and Fetchner, Sebastian, Epstein, and Alport Syndromes. *Am J Hum Genet.* 2001;69:1033-1045.
- López JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994; 5(1):97-119.
- Lopez JA, Andrews RK. Bernard- Soulier syndrome. *Blood* 1998; 91: 4397-4418.
- Margaglione M, D'Andrea G, Grandone E, Brancaccio V, Amoriello A, Di Minno G. Compound heterozygosity (554-589 del, C515-T transition) in the platelet glycoprotein Ib alpha gene in a patient with a severe bleeding tendency. *Thromb Haemost.* 1999;81(4):486-92.
- Miller J. L., Lyle, V A, Cunningham D. 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* 1992; 79: 439-446.
- Minelli A, Maserati E, Rossi G et al. Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosomal anomalies. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40:165–171.
- Mori N, Morosetti R., Hoflehner E, Lubbert M, Mizoguchi H and Koeffler H P. Allelic loss in the progression of myelodysplastic syndrome. *Cancer Res* 2000; 60, 3039-42.
- Leila Noetzli, Richard W Lo et al., Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia *Nature Genetics* 2015; 47; 535–538.
- Necchi V, Balduini A, Noris P, et al. Ubiquitin/proteasome -rich particulate cytoplasmic structures (PaCSs) in the platelets and megakaryocytes of ANKRD26-related thrombocytopenia V. *Thrombosis and Haemostasis* 2013; Vol:109:263-271
- Noris P, Pecci A, Di Bari F, et al. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica* 2004;89:1219-25.
- Noris P, Klersy C, Zecca M, et al. Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenias and immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; 7:2131-6.
- Noris P, Perrotta S, Seri M, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood.* 2011; 117(24):6673-80.

- Noris P, Favier R, Alessi MC et al., ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood*. 2013; 122(11):1987-9.
- Pecci A, Biino G, Fierro T, et al. Alteration of liver enzymes is a feature of the MYH9-related disease syndrome. *PloS. One* 2012; 7:359-86.
- Pecci A, Klersy C, Gresele P, et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 2014; 35:236-47.
- Pippucci T, Savoia A. et al., Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. *Am J Hum Genet*. 2011; 88(1):115-20.
- Rees DC, Iolascon A, Carella M, et al. Stomatocytic haemolysis and macrothrombocytopenia (Mediterranean stomatocytosis/macrothrombocytopenia) is the haematological presentation of phytosterolaemia. *Br J Haematol* 2005; 130:297-309.
- Savoia A. Molecular basis of inherited thrombocytopenias. *Clin Genet* 2015.
- Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, Del Vecchio M, Perrotta S, Belletti S, Poggi V, Iolascon A. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2001; 97:1330-1335.
- Savoia A e Balduini CL. MYH9-Related Disorders. *Gene Reviews™* [Internet]. Initial Posting: November 20, 2008; Last Update: April 5, 2011.
- Savoia A, De Rocco D, Panza E, et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9-RD): neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost* 2010; 1030:826-32.
- Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood* 2011.
- Sun L, Gorospe JR, Hoffman EP et al. Decreased platelet expression of myosin regulatory light chain polypeptide (MYL9) and other genes with platelet dysfunction and CBFA2/RUNX1 mutation: insight from platelet expression profiling. *J Thromb Haemost* 2006; 5:146–154.
- Trost, D., Hildebrandt, B., Muller, N., Germing, U. and Royer-Pokora, B. Hidden chromosomal aberrations are rare in primary myelodysplastic syndromes with evolution to acute myeloid leukaemia and normal cytogenetics. *Leuk Res* 2004; 171-7.

- Unkelbach K, Kalb R, Santoso S, Kroll H, Mueller-Eckhardt and V. Kiefel. Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw(PIA), Ko, Bak and Br (HPA-1,2,3,5). *Br J of Haemat*, 1995;89:169-176.
- Vardiman, J W, Harris N L and Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100, 2292-302.
- Ware J, Russell SR, Marchese P, Murata M, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest*. 1993 ;92(3):1213-20.
- Zhang, MY et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy *Nat. Genet* . 2015; 47, 180–185.