

Molecular genetic analysis of congenital afibrinogenemia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 澤村, 暢, 谷口, 照美, 濱田, 悦子, 三浦, 真希子, 坂本, 秀生, 前川, 真人, SAWAMURA, Toru, TANIGUCHI, Terumi, HAMADA, Etsuko, MIURA, Makiko, SAKAMOTO, Hideo, MAEKAWA, Masato メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.20608/00000968

原著

先天性無フィブリノゲン血症患者の分子遺伝学的解析

澤村 暢¹⁾ 谷口 照美²⁾ 濱田 悦子³⁾ 三浦 真希子¹⁾ 坂本 秀生¹⁾ 前川 真人²⁾³⁾

Molecular genetic analysis of congenital afibrinogenemia

Toru SAWAMURA ¹⁾, Terumi TANIGUCHI ²⁾, Etsuko HAMADA ³⁾, Makiko MIURA ¹⁾,
Hideo SAKAMOTO ¹⁾, and Masato MAEKAWA ²⁾³⁾

要旨

浜松医科大学にて先天性無フィブリノゲン血症の患者を経験し、その遺伝子解析からフィブリノゲン (Fbg) を構成する遺伝子 *FGA* に 1238 bp の欠失を見出した。同時にウエスタンブロットにより Fbg が血漿中には存在しないことを確認した。

この患者の変異と同じ *FGA* の欠失を Fbg 非産生の培養細胞株 COS1 を用い再現し、その動態について研究を行った。*FGB*、*FGG* と野生型 *FGA* または、患者と同じ変異を加えた変異型 *FGA* の 3 つの発現ベクターを COS1 細胞に共遺伝子導入し、Fbg の生合成・分泌に関して解析を行った。その結果、野生型を導入した細胞では培養液中にも分泌され本来の Fbg と同様の動態を示したが、変異型 *FGA* を発現させた細胞では細胞内に発現しているものの、培養液中には分泌されてなかった。これらのことから患者の不完全な A α 鎖では Fbg 全体が細胞外に分泌できず発症すると思われる。

キーワード：無フィブリノゲン血症、*FGA*、フィブリノゲン

Summary

At the Hamamatsu University School of Medicine, we encountered a patient with congenital afibrinogenemia for whom genetic analysis revealed the presence of a 1238 bp deletion in the *fibrinogen alpha chain (FGA)* gene, which codes for fibrinogen. Western blotting confirmed that there was no fibrinogen present in the patient's plasma.

We reproduced the same *FGA* deletion as that seen in our patient, using fibrinogen nonproducer cultured COS1 cells, to investigate its dynamics. The three expression vectors of *fibrinogen beta chain*,

1) 保健科学部医療検査学科 2) 浜松医科大学医学部臨床検査医学講座 3) 浜松医科大学医学部附属病院検査部

fibrinogen gamma chain, and either wild type *FGA* or variant *FGA*, possessing the mutation, were co-transfected into COS1 cells and fibrinogen biosynthesis and secretion were analyzed. Our results indicated that in cells transfected with wild type *FGA*, fibrinogen secretion was detected in the culture medium, demonstrating normal fibrinogen dynamics. However, although cells expressing the variant *FGA* exhibited intracellular expression, we detected no secretion into the culture medium. Thus, it appears that fibrinogen cannot be secreted outside of cells possessing the incomplete fibrinogen A α chain in our patient with congenital afibrinogenemia, resulting in the onset of the disease.

Key words : afibrinogenemia, *FGA*, Fibrinogen

はじめに

フィブリノゲン (Fibrinogen:Fbg) は複雑な血液凝固反応の最終産物であるフィブリンの前駆体であり、3つのポリペプチドが結合し、さらに2量体を形成した分子量 340 k の巨大な糖タンパクである。健常人血漿中には 180 ~ 350 mg/dl 存在している。

Fbg は肝細胞において、A α 鎖 (アミノ酸数 610 個, 分子量 67 k)、B β 鎖 (461 個, 56 k)、 γ 鎖 (411 個, 45 k) の 3 種のポリペプチドとして合成された後、S-S 結合により (A α · B β · γ) 複合体を形成する。次いでそれらが N 末端領域の S-S 結合により 2 量体 (A α · B β · γ)₂ に組み立てられ肝細胞から分泌される。これら A α 鎖 · B β 鎖 · γ 鎖をコードする Fbg 遺伝子は第 4 染色体長腕の 4q31 に存在している¹⁾。

マウスを使ったノックアウト実験も行われており、Fbg 欠損症のモデル動物として 1995 年に A α 鎖ノックアウトマウスが作製された。A α 鎖ノックアウトマウスでは、マウスは子宮内で死亡することなく出産されるが、生まれてきた新生マウスの約 30% は出産時から明らかな出血が認められ、腹腔内出血で死亡することもある²⁾。このように Fbg は凝固線溶系以外に創傷治癒や妊娠継続に重要な働きを担っている。

日常臨床検査における Fbg 測定は、入院時あるいは手術前の凝固スクリーニング検査の一つとして行われる。血漿 Fbg が低下する疾患・病態として、重症肝障害による産生低下、巨大血栓症や播種性血管内凝固症候群などによる消費亢進、L-asparaginase 製剤投与などがある。Fbg の先天的な欠損症には 2 タイプあり、タンパクそのものが産生されない量的な異常症 (I 型) と、主にアミノ酸置換によるフィブリノゲンタンパクはあるが活性が低下している質的な異常症 (II 型) がある。II 型では易出血や易血栓形成、傷の治りが悪いなどの症状を呈する事があるが無症状の場合もある³⁾⁴⁾。一方、I 型では出血症状がみられる他、妊娠継続が困難などの症状がある。全世界で合わせて 350 家系以上がデータベースに登録され公開されている (<http://www.geht.org/databaseang/fibrinogen/>)。

今回、先天性無フィブリノゲン血症患者および、そのご家族の分子遺伝学的解析を行い、*FGA* のエクソン 4 を含む 1238 bp の欠失を見出した。Fbg を構成する 3 つのポリペプチドのすべてが揃わないと分泌されない事は既に報告されており、A α 鎖が不完全な状態でも分泌されない事は既に報告されている⁵⁾⁷⁾。これらの報告を元に、我々が今回経験した症例もこの変異が原因の不完全な A α 鎖によって分泌されなくなるのかを *in vitro* の実験で確認し

たので報告する。

症例

34歳女性。出生時に先天性無フィブリノゲン血症と診断され経過観察されていた。34歳のときに脳梗塞の疑いで浜松医科大学医学部附属病院に入院となった。入院時のフィブリノゲン量は検出感度以下であった。

遺伝子解析は未実施であったため、浜松医科大学医学部の倫理審査委員会にて承認を受け、患者に遺伝カウンセリングを行い、インフォームドコンセントを得たのちに遺伝子解析を行った。(承認番号: 18-28)

材料と方法

1. 遺伝子解析

患者全血より QIAamp DNA Blood mini Kit

(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、*FGA*、*FGB*、*FGG* 遺伝子の全エクソン及び、エクソンとイントロンの境界領域をPCRで増幅できるようにプライマーを設計した(表1⁸⁾)。PCR条件は、変性94°Cで1分、アニーリング50~59°Cで1分、伸長72°Cで1分を1サイクルとして行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により大きさを確認した。

それぞれのPCR産物はQIAamp PCR Purification Kit (QIAGEN)にて精製後、ABI BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)を用いたダイレクトシークエンスにて遺伝子配列を解析した。解析にはABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を使用した。

2. SDS-PAGE、ウエスタンブロット

患者より3.2%クエン酸ナトリウム加血漿を採取し、PBSにて500倍に希釈した。同様に陽性コントロールとして健常者からも血漿を採取しPBS

表1 フィブリノゲン遺伝子のPCR増幅および塩基配列決定に使用したプライマー

Peptide and Exon(s)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	PCR Product (bp)
Aα				
I	GTC TAG GAG CCA GCC CCA CC	GTG TCA GGA CAT AGA GCA GG	59	180
II and III	GCC CTG TGT CTG CTC TCC TTA ATC	ACG AAA ACA AAA GCT CCC TC	56	1,070
IV and V(1)	TTT GCT GGC AAT TAC AGA CA	CCT GGG GCT TTC CGT CTC TG*	56	1,144
V(2)	AGA CCT GGT GGA AAT GAG ATT AC* TGG	GTT AAG AAG GAA ATG CAA GGG CCC AGG	53	1,206
V(3)	CAC TCT GAA TCT GGA AG*†	GTG ATG AGA ACT GG*†		
Bβ				
I	GGA TGG TTT CTT GGA GC	GCT AAG CCA TCC TCA TCT	50	335
II and III	GAT TCA CTA TCA CCA ACC AGC CAG	CAT GCA TTC TCG TGG CAG TC	50	1,088
IV and V	CTG CTT GGT GAT AGC TCA GT	CTG GCC TTG TTT CCT GGC AT	50	1,078
VI and VII	GAA TGG ACA GGG GAT TCA GA	AAG TGC CCA GGA AGT GGT AG	50	808
VIII	GTG CAC ACG AGT GTA GCA GT	GAA CGC TTC TCC TTC CTT AC	50	842
Y				
I and II	GGA GCC TGA GAG GTG ACA GTG C	CCA GTT CAC ACA CAA AGG GAG AAA C	50	321
III and IV	TTT CTC TTT TAG TAT GTT GC	TCA ACA TAA TCA GGC ATA AT	50	779
V and VI	CTT ATT TTT GTC TTC TTA TT	TGT GCC TCA GTT TCC TTT TC	50	784
VII	ATT TTC TCC TTT TGC TCT TG	CCC AAG AAC CAA ACA GAC TC	50	372
VIII	AGA TCC CTG AGG AGG GTC AG	CTA AGA AAG GAA AAC ATA CC	50	347
IX and X	AGA CTT GCA GAG GTA AAA AG	GCT TTG CAA GTC CAT TGT CC	55	880

*Primer in exon.

†Primer only for sequencing.

にて500倍に希釈した。それぞれの血漿にトリス SDS β -ME サンプル処理液 (COSMO BIO) を加え、95°Cで5分加熱したものをサンプルとした。泳動には SDS- トリス - グリシン泳動バッファー (COSMO BIO) を使用し、4-20% ポリアクリルアミドゲル (COSMO BIO) にて30 mA、80分泳動を行った。泳動後、セミドライプロットングにて PVDF 膜 (BIO-Rad) に転写した。転写後の膜は5% スキムミルクで1時間ブロックし、一次抗体として抗ヒトフィブリノゲンポリクローナル抗体 (Dako) を3000倍に希釈し室温で一晩反応させた。膜を洗浄し、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Dako) を5000倍に希釈し反応させた。洗浄後、BCIP/NBT アルカリホスファターゼ染色キット (NACALAI TESQUE) を使用し、発色法にて検出を行った。

3. フィブリノゲン発現ベクターの構築

野生型の *FGA*, *FGB*, *FGG* 遺伝子はヒト肝臓 cDNA ライブラリー Cap Site cDNA dT Human Liver (NIPPON GENE) から各遺伝子のプライマーを用い単離した (表2)。使用したプライマーには制限酵素サイトを付加しており、各々の制限酵素で処理後、哺乳類細胞でのタンパク発現用ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen) のマルチクローニングサイトへ Ligation-Convenience Kit (NIPPON GENE) を用い挿入した。構築したベクターは大腸菌 DH5 α にトランスフォームし、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) プラスミド抽出を行った。得られたそれぞれのプラスミドはインサートの

塩基配列を確認し、野生型の *FGA*, *FGB*, *FGG* 発現ベクターとした。なお、遺伝子組換え実験は神戸常盤大学遺伝子組換え実験安全委員会の規定に則り承認を得て行っている。(承認番号:25-01)

4. 変異型 *FGA* 発現ベクターの構築

患者と同じ変異はエクソン4を含むイントロン3からイントロン4の1238 bpの欠失である。この欠失によって mRNA に転写されるとエクソン3の後にエクソン5が繋がると推測される。その結果フレームシフトが起こり数塩基で終止コドンが入る。変異導入には野生型 *FGA* を鋳型とし、FGAex1-F: 5'-GTCTAGGAGCCAGCCCCACC、FGAex4del-R: 5'-GGGGATCCATCAATGTCCACTATTGGCTG のプライマーを用いエクソン3の後にエクソン5が入るように PCR にて増幅した。その後、前述と同じ方法で制限酵素処理、ライゲーション、トランスフォーメーションを行い塩基配列の確認を行い、変異型 *FGA* (*mFGA*) 発現ベクターとした。

5. 細胞培養

本研究にはアフリカミドリザル腎臓由来培養細胞 (COS1) および、ヒト肝臓がん由来培養細胞 (HepG2) を使用した。COS1は無血清培地 VP-SFM (GIBCO) + 2% GlutaMAX (GIBCO)、CO₂濃度5%、37°Cで培養した。HepG2はDMEM Low glucose にウシ胎児血清 (GIBCO) を10%加え、CO₂濃度5%、37°Cで培養した。

表2 フィブリノゲン遺伝子のクローニングプライマー

gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	制限酵素サイト (5'-3')
<i>FGA</i>	GGGATATCCCCTTAGAAAAGATG	GGGGATCCAGTCTAGGGGGACAG	EcoRV-BamHI
<i>FGB</i>	GGGCTCGAGTCTACATGAAAAGGAT	GGGATATCTGGGGACTATTGCTGTG	XhoI-EcoRV
<i>FGG</i>	GGGCTCGAGATGAGTTGGTCCTTG	GGGGATCCCTTATATCTCTCTGTT	XhoI-BamHI

6. *FGA* または *mFGA* と *FGB*, *FGG* 発現ベクターのトランスフェクション

作製した発現ベクター (*FGA*, *FGB*, *FGG*, *mFGA*) 及び陰性コントロールとして pcDNA3.1 をフィブリノゲン非産生培養細胞である COS1 へ遺伝子導入し、72 時間培養後、細胞および培養液を回収しウエスタンブロットによりフィブリノゲンの生合成・分泌について解析を行った。遺伝子導入には Lipofectoamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用い製品のプロトコルに従った。フィブリノゲンは3つのタンパクが揃い、二量体を形成する事で初めて細胞外へ分泌されるため、*FGA*, *FGB*, *FGG* の3つをコトランスフェクションした。また、患者のフィブリノゲン生合成・分泌状態を再現するために *mFGA*, *FGB*, *FGG* のコトランスフェクションを行った。3つのベクターをコトランスフェクションする際は、それぞれのベクターが等モルになるように行った。

結果

1. 遺伝子解析

PCR により3つの遺伝子の各エクソンジャンクション部分の増幅を行い、塩基配列を解析した結果、*FGB*, *FGG* には変異が認められなかった。*FGA* の PCR ではイントロン1からエクソン2とエクソン3を含むイントロン3までのプライマーで増幅が見られなかった。また、イントロン3からエクソン4を含むエクソン5までのプライマーに於いても増幅が見られなかった。そのため、エクソン2からエクソン5までのプライマーで増幅させたところコントロールと比較して1 kbp 以上短いものが増幅された(図1A)。この PCR 産物の塩基配列を解析した結果、エクソン4全体を含む、イントロン3からイントロン5までの1238 bp の大きな欠損を見いだした(図1B)。この欠失変異以外の変異は存在しなかった。

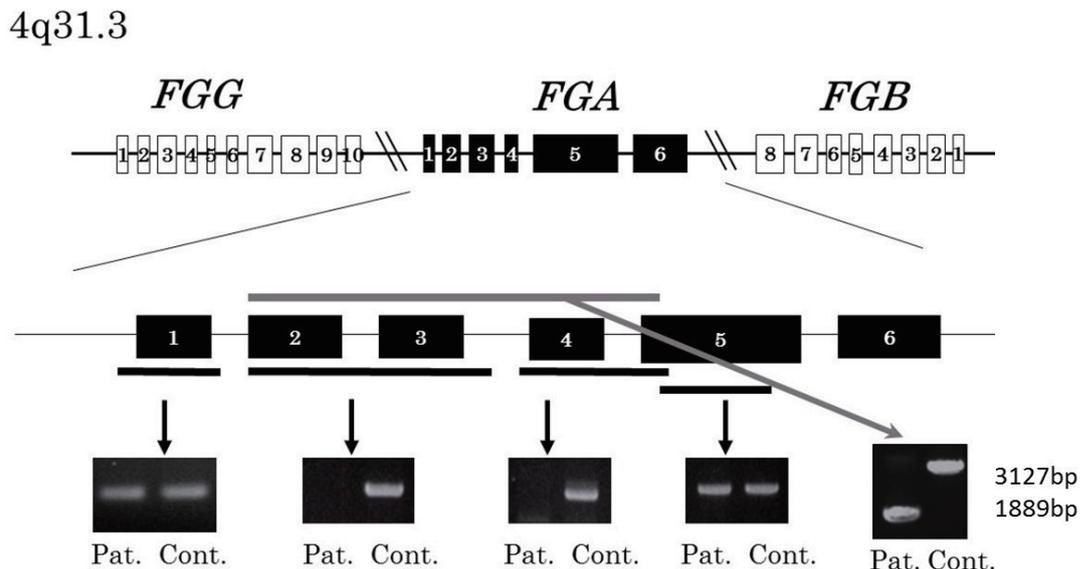


図1A 遺伝子解析の結果

A: それぞれのエクソンジャンクション部分が入るようなプライマーで増幅させた。

エクソン2と3、エクソン4と5のプライマーでは増幅されなかった。

エクソン2からエクソン5までのプライマーではコントロール3127bp、患者1889bp の増幅産物が得られた。

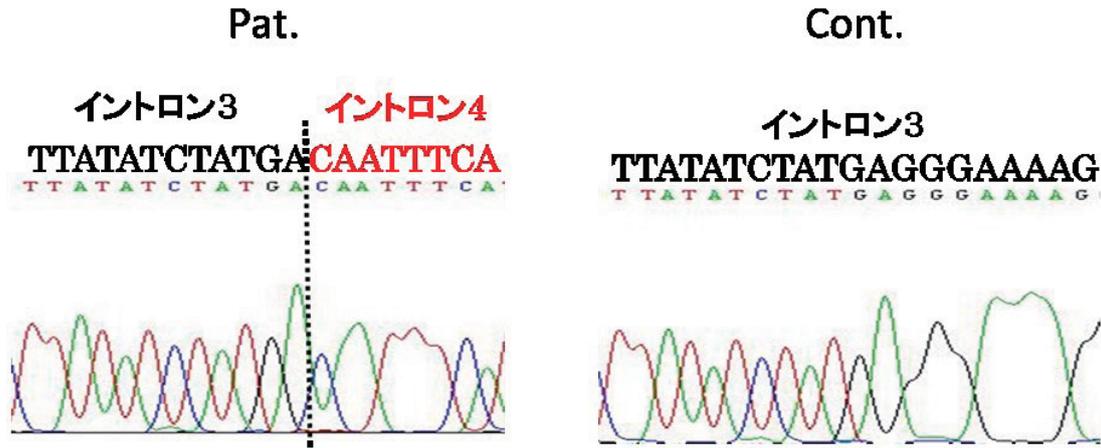


図1B 遺伝子解析の結果
B:1889bpの増幅産物をダイレクトシーケンスで解析した結果、イントロン3からイントロン4までの1238bpの欠失を見出した。

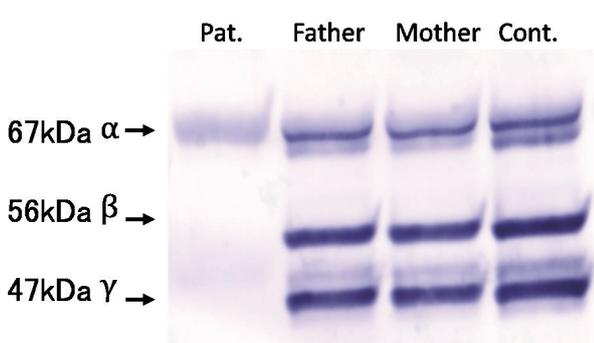


図2 フィブリノゲンA α鎖、B β鎖、γ鎖のウエスタンブロット
抗ヒトフィブリノゲン抗体を1:3000に希釈し使用。両親およびコントロールでは3本のフィブリノゲン鎖が検出されたが、患者ではいずれのフィブリノゲン鎖も検出されなかった。
(Cont. 健常者血漿、Pat. 患者血漿、Father 患者の父親、Mother 患者の母親)



図3 患者とその家族の遺伝子解析
3127bpがコントロールと同じ大きさであり、両親は患者と同じ1889bpの短いものと、コントロールと同じ3127bpの2種類が増幅され、ヘテロ接合体だとわかる。
(Cont. 健常者、Pat. 患者、Father 患者の父親、Mother 患者の母親)

2. ウエスタンブロット

患者及びその両親の血漿をSDS-PAGE及びウエスタンブロットを行った。その結果、患者血漿中には、A α鎖、B β鎖、γ鎖のいずれも検出されず、FGAの欠失変異によってフィブリノゲンが血中に分泌されていない事が推測された。両親の血漿ではA α鎖、B β鎖、γ鎖が検出され、フィブリノゲンは正常に血中へと分泌されていた(図2)。

両親は血中に分泌されていたため、両親の同意

を得て欠失部位をはさんだPCRで確認したところ、いずれも欠失変異のヘテロ接合体であった(図3)。

3. フィブリノゲン発現実験

3つの発現ベクターをCOS1に遺伝子導入し、フィブリノゲンの生合成・分泌について解析を行った。3つの遺伝子が同時に細胞内に入れば分泌され、1つもしくは2つであれば細胞外へは分泌されず、それぞれ単独で遺伝子導入した場合、細胞内では発

現するが細胞外へは分泌されない⁹⁾。野生型の3つを遺伝子導入した場合、細胞内、細胞外にもフィブリノゲンのシグナルが確認された。mFGA, FGB, FGGを遺伝子導入した場合、細胞内での発現は確認できたが、培養液中には確認されず分泌されていなかった(図4 A, B)。

考察

本例で見出された FGA 遺伝子の 1238 bp の欠失は、2003年に九州大学、2005年に中国、2012年に信州大学から報告された症例と同じ変異であった^{10)~12)}。九州大学の症例では、プロテインC遺伝子のエクソン7に3塩基の欠失変異のヘテロを伴っていたため、その変異の有無を解析したところ本例には

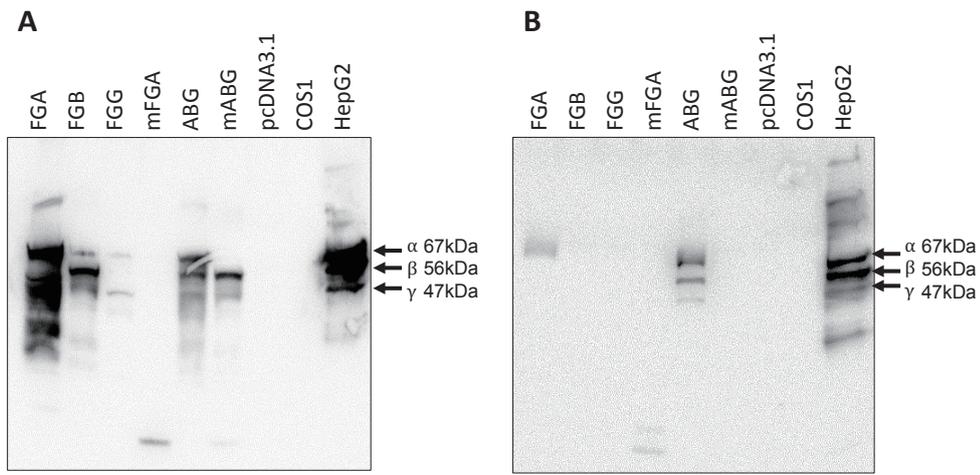


図4 トランスフェクション後の細胞分画(A)と培養液分画(B)のウエスタンブロット

単独でトランスフェクションしたものは細胞分画には発現しているが、培養液中には分泌されていない。野生型の3つをトランスフェクションした場合は、培養液中に分泌され3つのシグナルが確認できる。変異型 FGA と野生型 FGB, FGGをトランスフェクションした場合、細胞分画には発現しているが、培養液中には分泌されていない。尚、使用しているポリクローナル抗体は A α鎖に対して感度が高くなっており、トランスフェクション後、培養している間に死んだ細胞から培養液中に漏出した FGA, mFGA が反応したものと考えられる。図 A でも FGA のレーンにはスメア状にシグナルが見られるが、FGA の分解産物であると思われる。また、これまでに報告された文献でも FGA のみのトランスフェクションでは分泌されないとされている。

FGA:野生型 FGA ベクター、FGB:野生型 FGB ベクター、FGG:野生型 FGG ベクター、mFGA:変異型 FGA ベクター、ABG:野生型 FGA, FGB, FGG ベクター、mABG:変異型 FGA、野生型 FGB, FGG ベクター、pCDNA3.1 ベクターのみ、COS1:未処理 COS1、HepG2:陽性コントロールとして HepG2 を使用した。

表3 患者及び両親の血栓止血関連検査結果及び遺伝子型

	PT (sec)	APTT (sec)	Fibrinogen (mg/dl)		mutation	genotype
			Activity	Antigen		
Patient	>60.0	>200.0	<1	<1	FGA 1238bp deletion	mut / mut
Father	10.8	21.7	245	335	FGA 1238bp deletion	wild / mut
Mother	11.5	29	141	260	FGA 1238bp deletion	wild / mut
Reference range	10.0-13.0	24.0-36.0	178-360	200-400		

PT: prothrombin time

APTT: activated partial thromboplastin time

mut: FGA に 1238 bp の欠失あり wild: 野生型

mut / mut: 両アレルとも変異型のホモ接合体

wild / mut: 片方のアレルは野生型、もう片方は変異型のヘテロ接合体

検出されなかった。患者の解析だけでは、PCRでは検出できない大きな欠失変異とのヘテロ接合や uniparental disomy などの可能性は否定できないため両親の遺伝子解析も行った。その結果、野生型と同じ大きさのバンドと、患者と同じ変異型の短いバンドが確認でき、ヘテロ接合体であると考えられた。父親と母親の野生型バンドの上流に見えるバンドは、野生型と変異型の heteroduplex であると推定され、立体構造の関係から野生型よりも遅れて泳動されていると考えられる。従って、患者は 1238 bp の欠失変異のホモ接合体であると結論づけた。この家族に聞き取り調査を行いこれまでの血栓止血関連検査の結果と遺伝型を含めまとめた (表 3)。

I 型無フィブリノゲン血症の原因遺伝子は、これまでの報告例からいずれも *FGA* に生じている¹³⁾。本例で検出された 1238 bp の欠失以外には、スイス、フランス、米国で報告された 11 kb の欠失¹⁴⁾、タイで報告された 15 kb の欠失の 2 種類にすぎない¹⁵⁾。大きな欠失は *FGA* のみに生じている。

フィブリノゲンは 3 つのポリペプチドがほぼ正常に合成されないと分泌されない⁹⁾。これまでに報告されている Fbg の品質管理に関連した文献では、Dung Vu らが B β 鎖の C 末端 7 ~ 25 アミノ酸残基が 6 量体形成に重要な配列であると報告している¹⁶⁾。また、培養細胞を使った発現実験では不完全な Fbg はゴルジ装置へは運ばれず、その前区画に留まり細胞外へ分泌されないことを明らかにしている¹⁶⁾。γ 鎖では Okumura らが γ 鎖の 387 番目のアミノ酸残基が Fbg の組立てに重要であると報告している¹⁷⁾。

A α 品質管理に重要な配列についての明確な文献は未だ報告がない。これまでに報告があるのは、開始コドンから 149 アミノ酸残基までの短い配列では分泌されないというものである⁷⁾。本症例は欠失によりエクソン 3 とエクソン 5 が繋がっており、報告されている配列とは異なる。しかし、全長 124 アミノ酸残基とより短いものであるため、Fbg の組立てが上手くいかず分泌されないと考えられる。

謝辞

本研究を始めるにあたり、貴重な症例をご紹介いただいた主治医である浜松医科大学医学部脳神経外科学講座の横田尚樹医師に深謝いたします。

本研究は平成 25 年度神戸常盤大学ジョイント研究「変異型フィブリノゲン A α 鎖を用いたフィブリノゲン生合成に関する研究」として助成を受け行った研究である。

文献

- 1) Redman, Colvin M, and Hui Xia. Fibrinogen Biosynthesis: Assembly, Intracellular Degradation, and Association with Lipid Synthesis and Secretion. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2001, 936, 480–95.
- 2) Suh, T. T., K. Holmback, N. J. Jensen, C. C. Daugherty, K. Small, D. I. Simon, and others, Resolution of Spontaneous Bleeding Events but Failure of Pregnancy in Fibrinogen-Deficient Mice. *Genes and Development*, 1995, 9(16), 2020–33.
- 3) Drew AF, Liu H, Davidson JM, Daugherty CC, Degen JL. Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood*, 2001, 97(12), 3691-8.
- 4) Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Paiva M, Kobayashi T, Ploplis VA, Castellino FJ. Fibrinogen stabilizes placental- maternal attachment during embryonic development in the mice. *Am J Pathol.* 2002, 160(3), 1021-34.
- 5) Roy SN, Procyk R, Kudryk BJ, Redman CM. Assembly and secretion of recombinant human fibrinogen. *J Biol Chem.* 1991, 266(8), 4758-63.
- 6) Neerman-Arbez M, Vu D, Abu-Libdeh

- B, Bouchardy I, Morris MA. Prenatal Diagnosis for Congenital Afibrinogenemia Caused by a Novel Nonsense Mutation in the FGB Gene in a Palestinian Family. *Blood*, 2003, 101(9), 3492–94
- 7) Asselta R, Duga S, Spena S, Santagostino E, Peyvandi F, Piseddu G, Targhetta R, Malcovati M, Mannucci PM, Tenchini ML. Congenital Afibrinogenemia: Mutations Leading to Premature Termination Codons in Fibrinogen A α -Chain Gene Are Not Associated with the Decay of the Mutant mRNAs. *Blood*, 2001, 98(13), 3685–92
- 8) Terasawa F, Okumura N, Kitano K, Hayashida N, Shimosaka M, Okazaki M, Lord ST. Hypofibrinogenemia Associated with a Heterozygous Missense Mutation gamma153Cys to Arg (Matsumoto IV): In Vitro Expression Demonstrates Defective Secretion of the Variant Fibrinogen. *Blood*, 1999, 94(12), 4122–31
- 9) Hartwig R, Danishefsky KJ. Studies on the assembly and secretion of fibrinogen. *J Biol Chem*. 1991; 266(10), 6578-85.
- 10) Watanabe K, Shibuya A, Ishii E, Kurihara M, Inoue S, Ono M, Wada Y, Wakiyama M, Zaito M, Iida H, Muraoka K, Kinoshita S, Hamasaki N. Identification of simultaneous mutation of fibrinogen alpha chain and protein C genes in a Japanese kindred. *Br J Haematol*. 2003, 120(1), 101-8.
- 11) Wu S, Wang Z, Dong N, Bai X, Ruan C. A novel nonsense mutation in the FGA gene in a Chinese family with congenital afibrinogenemia. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2005, 16(3), 221-6.
- 12) Takezawa Y, Terasawa F, Matsuda K, Sugano M, Tanaka A, Fujiwara M, Kainuma K, Okumura N. Molecular analysis of afibrinogenemic mutations caused by a homozygous FGA1238 bp deletion, and a compound heterozygous FGA1238 bp deletion and novel FGA c.54+3A>C substitution. *Int J Hematol*, 2012, 96(1), 39-46.
- 13) Asselta, R., S. Duga, and Maria Luisa Tenchini. The Molecular Basis of Quantitative Fibrinogen Disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2006, 4(10), 2115–29
- 14) Neerman-Arbez M, Honsberger A, Antonarakis SE, Morris MA. Deletion of the fibrinogen [correction of fibrogen] alpha-chain gene (FGA) causes congenital afibrinogenemia. *J Clin Invest*. 1999; 103(2), 215-8. Erratum in: *J Clin Invest*, 1999 Mar;103(5):759.
- 15) Spena S, Duga S, Asselta R, Peyvandi F, Mahasandana C, Malcovati M, Tenchini ML. Congenital afibrinogenemia caused by uniparental isodisomy of chromosome 4 containing a novel 15-kb deletion involving fibrinogen Aalpha-chain gene. *Eur J Hum Genet.*, 2004, 12(11), 891-8.
- 16) Vu D, Di Sanza C, Caille D, de Moerloose P, Scheib H, Meda P, Neerman-Arbez M. Quality control of fibrinogen secretion in the molecular pathogenesis of congenital afibrinogenemia. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14(21), 3271–80
- 17) Okumura N, Terasawa F, Tanaka H, Hirota M, Ota H, Kitano K, Kiyosawa K, Lord ST. Analysis of fibrinogen gamma-chain truncations shows the C-terminus, particularly gamma1387, is essential for assembly and secretion of this multichain protein. *Blood*, 2002, 99(10), 3654-60.

