

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Gindele Réka**

**GENOTÍPUS-FENOTÍPUS ÖSSZEFÜGGÉSEK  
TANULMÁNYOZÁSA HEMOSZTAZEOLÓGIAI  
KÓRKÉPEKBEN; ANTITROMBIN DEFICIENCIA ÉS AZ  
OSLER-RENDU-WEBER KÓR**

**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2018**

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **GENOTÍPUS-FENOTÍPUS ÖSSZEFÜGGÉSEK TANULMÁNYOZÁSA HEMOSZTAZEOLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN; ANTITROMBIN DEFICIENCIA ÉS AZ OSLER-RENDU-WEBER KÓR**

**Írta: Gindele Réka**

**Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna**



**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2018**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	6
1. Bevezetés .....	8
2. Irodalmi áttekintés .....	11
2.1 Az Antitrombin fehérje szerepe a véralvadás szabályozásában.....	11
2.1.1 Az Antitrombin fehérje struktúrája, funkciója, genetikai jellemzői .....	11
2.1.2 Az Antitrombin deficiencia molekuláris genetikai háttere, genotípus- fenotípus összefüggései .....	13
2.1.3 Az Antitrombin deficiencia tünettana, epidemiológiája, terápiája .....	15
2.1.4 Az Antitrombin deficiencia laboratóriumi diagnosztikai módszerei .....	16
2.2 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia .....	18
2.2.1 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia klinikai jellemzése .....	18
2.2.2 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia klinikai diagnózisa.....	18
2.2.3 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia patogenezeise .....	19
2.2.4 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia genotípus-fenotípus összefüggései .....	19
2.2.5 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia terápiája .....	20
2.3 Az alapító hatás .....	21
2.3.1 Az alapító hatás jelentősége, következménye.....	21
2.3.2 Az alapító hatás vizsgálata.....	21
2.3.3 Alapító hatás előfordulása a hemosztázist érintő megbetegedésekben..	22
2.3.4 Alapító mutációk az Antitrombin deficiens populációkban .....	22
2.3.5 Alapító hatás hereditár hemorrhagias teleangiectasias populációkban..	22
3. Célkitűzések.....	24
4. Vizsgált személyek, anyagok és módszerek .....	25
4.1 Betegek.....	25
4.1.1 Antitrombin deficiencia .....	25

4.1.2	Osler-Rendu-Weber kór.....	26
4.2	Populációs kontroll személyek.....	26
4.3	Rutin laboratóriumi módszerek Antitrombin deficienciában.....	27
4.4	Okozati mutációk kimutatása fluoreszcens direkt szekvenálással és MLPA analízissel.....	27
4.4.1	Antitrombin deficiencia .....	28
4.4.2	Osler-Rendu-Weber kór.....	28
4.5	Alapító hatás vizsgálata polimorf genetikai markerekkel .....	31
4.5.1	Egy nukleotidot érintő eltérések kimutatása olvadáspont görbe analízissel, FRET detektálással.....	32
4.5.2	Egy nukleotidot érintő eltérések kimutatása fluoreszcens direkt szekvenálással .....	37
4.5.3	Mikroszatellita markerek fluoreszcens fragmentanalízise.....	38
4.6	Új mutációk patogenitásának meghatározása .....	43
4.6.1	A <i>SERPINC1</i> p.Leu205Pro új genetikai eltérés biokémiai karakterizálása.....	43
4.6.2	<i>In silico</i> predikciós módszerek.....	44
4.7	Statisztikai módszerek.....	45
5.	Eredmények .....	46
5.1	Antitrombin deficiencia.....	46
5.1.1	Antitrombin deficiens betegek genotípus-fenotípus összefüggései.....	46
5.1.2	Alapító hatás kimutatása Antitrombin deficiens betegekben.....	57
5.1.4	Genotípus-fenotípus összefüggések a <i>SERPINC1</i> mutációhordozó gyermekekben és fiatal felnőttekben .....	69
5.2	Osler-Rendu-Weber kór .....	75
5.2.1	Osler-Rendu-Weber kóros betegek diagnosztizálása .....	75
5.2.2	Alapító hatás kimutatása Osler-Rendu-Weber kóros betegekben .....	76
6.	Megbeszélés .....	85

6.1	Genetikai vizsgálatok Antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban; alapító mutációk.....	85
6.1.1	Alapító mutációk jelentősége, megjelenése Antitrombin deficienciában, egyéb trombofiliákban és Osler-Rendu-Weber kórban .....	85
6.1.2	A mutáció detektálási arány Antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban .....	88
6.1.3	Új mutációk Antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban 90	
6.2	Genotípus-klinikai fenotípus összefüggések Antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban .....	92
6.2.1	Az antitrombin deficiencia klinikai megjelenési formái.....	92
6.2.2	Az antitrombin deficiencia megnyilvánulása gyermekkorban .....	93
6.2.3	Az antitrombin deficiencia terápiás vonatkozásai .....	94
6.2.4	Az Osler-Rendu-Weber kór klinikai megjelenési formái .....	94
6.3	Laboratóriumi szempontok antitrombin deficienciában .....	95
7.	A jelölt saját eredményei, új megállapításai .....	98
8.	Összefoglalás .....	99
8.	Summary .....	100
9.	Irodalomjegyzék és publikációs lista .....	101
9.1	Irodalomjegyzék.....	101
9.2	Publikációs lista.....	113
10.	Tárgyszavak .....	116
11.	Köszönetnyilvánítás .....	117
12.	Függelék.....	118

## **Rövidítések jegyzéke**

5'LP – 5' hossz polimorfizmus

ACVRL1 - Activin receptor-like kinase 1 gén

AT - Antitrombin

AT Bp3 - Antitrombin Budapest 3 mutáció

ATE - artériás trombotikus esemény

AVM - arteriovenózus malformációk

BMP - csont morfogén fehérje

cM - centimorgan

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Médium

DMSO - Dimethyl Sulfoxide

ENG - endoglin gén

FIIG20210A – protrombin gén 20210G>A polimorfizmus

FRET - fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

FVL – Faktor V Leiden polimorfizmus

FXa - aktív X-es faktor

GI - gasztrointesztinális traktus

hc-anti-FXa - heparin-kofaktor-anti-FXa

HGVS - Human Genome Variation Society

HHT - hereditær haemorrhagias teleangiectasia

HMAP - Háziorvosi Morbiditási Adatgyűjtés Program

HSPG - heparán szulfát proteoglikán

II.HBS - heparin-kötőhelyet érintő II-es típusú Antitrombin deficiencia

II.PE – pleiotróp hatású II-es típusú Antitrombin deficiencia

II.RS – reaktív helyet érintő II-es típusú Antitrombin deficiencia

ISTH - Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság

JPS - juvenilis polyposis szindróma

KLKT - Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék

LD - linkage disequilibrium, kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság

MAF - minor allél frekvencia

MI - miokardiális infarktus

MLPA - multiplex ligáció függő próba amplifikáció

mtsai - munkatársai

MVT - mélyvénás trombózis

NOAC - új típusú orális antikoaguláns  
OR - odds ratio, esélyhányados  
p-anti-FXa - progresszív anti-FXa  
RCL - reaktív center hurok  
SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
*SERPINC1* - az antitrombint kódoló gén  
*SMAD4* - Mothers against decapentaplegic homolog 4 gén  
SNP - egy nukleotidot érintő polimorfizmus  
SPSS - Statistical Package for the Social Sciences  
STR - rövid tandem ismétlődő szekvencia  
TA - teleangiectasia  
TE - trombotikus esemény  
TF - szöveti faktor  
TGF $\beta$  - transzformáló növekedési faktor beta  
USP - United States Pharmacopeia  
VTE - vénás tromboembólia  
WB - Western blot  
WT - vad típusú fehérje

## 1. Bevezetés

A véralvadási rendszer megfelelő működéséhez a hemosztázis rendszer 3 pillérének, így az érfal épségének (vaszkuláris rendszer), a véralvadás komponenseinek (humorális rendszer) és a trombociták megfelelő mennyiségének és minőségének (celluláris rendszer) összehangolt egyensúlyára van szükség [1].

A jellegzetes humorális véralvadási folyamatok nagy része biológiai felületeken játszódik le. A véralvadás inhibitorai, mint például az antitrombin (AT) vagy a heparin kofaktor II, sokkal hatékonyabban végzik el feladatukat, amennyiben a reakciók valamilyen felületen játszódnak le. Az ilyen jellegzetes reakciófelszínek a glükózaminoglikánok, mint a heparin, heparán szulfát és dermatán szulfát. A heparin templátként működik a hármas komplex kialakulásához, ami összehozza az AT-t a célproteázával, így akár 1000-szeresre növelve a kölcsönhatást az áthidaló mechanizmusok és a heparin-függő konformációváltozás révén [2].

A véralvadásban résztvevő prokoaguláns, antikoaguláns és fibrinolitikus faktorok különböző genetikai variánsai vérzésre vagy trombózisra hajlamosító tényezők lehetnek [2]. Az AT deficienciák esetében jól karakterizálható altípusokról beszélhetünk annak megfelelően, hogy az AT génjében (*SERPINC1*) mely régióban alakul ki okozati mutáció. Az AT deficienciákat kvantitatív (I-es típus) és kvalitatív (II-es típus) csoportba sorolhatjuk. Az I-es típusban csökkent a fehérje aktivitása és antigén szintje is, ami hibás fehérje szintézisre vagy szekrécióra világít rá. A II-es típusú deficienciában a működésképtelen fehérje csökkent AT aktivitáshoz és normál vagy kissé csökkent antigén szinthez vezet. A II-es típusú AT deficiencia 3 altípusa a következő: heparin kötés zavara (II.HBS), reaktív centrumot érintő (II.RS) és pleiotróp hatású (II.PE) defektus. A *SERPINC1* génben eddig több mint 310 különböző mutációt azonosítottak. A különböző AT deficiencia altípusok nem feltétlenül azonos klinikai megjelenést mutatnak, habár eddig kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre; részben esettanulmányok, részben kis létszámú populációs vizsgálatok kerültek eddig közlésre. Ezen túlmenően, még azonos altípuson belül is lehetnek fenotípusban megjelenő különbségek, melyek visszavezethetők az egyes mutációkra. Tekintettel az AT deficiencia ritka előfordulására (1:2000 – 1:5000), ez utóbbi felvetéssel kapcsolatban sincs elegendő bizonyíték. Az AT deficiencia laboratóriumi diagnosztikája funkcionális teszten alapul, mely során heparin jelenlétében vizsgáljuk az AT aktív X-es faktort (FXa), vagy trombint (FIIa) gátló hatását. Megfigyelték, hogy a jelenleg rendelkezésre álló funkcionális tesztek nem

azonos érzékenységet mutatnak bizonyos AT deficiencia altípusok iránt, ami a laboratóriumi diagnosztikát rendkívül megnehezíti. Az egyes tesztek evaluálása ezért lényeges feladat és jelenleg nem áll rendelkezésre elegendő adat e tekintetben sem. Az egy populáción belüli gyakori mutációk előfordulása alapító hatás eredménye lehet. Az AT deficiencia esetében eddig három mutációról igazolták az alapító jelleget [3, 4]. Az alapító mutációk azonosítása egy populációban rendkívül hasznos mind diagnosztikai, mind terápiás szempontból. Új, az irodalomban eddig nem közölt mutációk esetében fontos az okozati szerep bizonyítása indirekt és direkt (biokémiai) módszerekkel, de e mutációk karakterizálása érdekes adatokat szolgáltat az adott fehérje struktúrájáról, funkciójáról és kölcsönhatásairól is.

Az érfal központi szerepet játszik érrendszeri károsodás esetén a hemosztatisz válasz összehangolásában. Az erek dinamikus egységek, számos különböző feladatban vesznek részt, beleértve a vazomotoros működést, a megfelelő vérnyomás fenntartását, a sejtek és az oldott anyagok szelektív permeabilitását a vér és a környező szövetek között, a veleszületett és szerzett immunitást, regenerációt és javítást, valamint a hemosztázis szabályozását. A vaszkuláris rendellenességeket számos különböző módon csoportosíthatjuk, például etiológia szerint beszélhetünk öröklött vagy szerzett formákról. A legkiemelkedőbb örökletes vaszkuláris betegségek a kötőszöveti rendellenességek, az arteriovenózus malformációk (AVM), az örökletes hemorrhagias teleangiectasiák (TA) és az agyi cavernosus rendellenességek [5]. A hereditær hemorrhagias teleangiectasia (HHT; Osler-Rendu-Weber kór) egy multisisztémás érfejlődési rendellenesség, melynek leggyakoribb tünetei a spontán visszatérő orrvérzések, a bőrön és nyálkahártyákon előforduló TA-k, valamint a tüdőben, az agyban és a gastrointestinalis traktusban (GI) vérzéssel járó AVM-k [6]. Az Osler-kór esetében jelenleg 3 gén mutációinak szerepét tartják hangsúlyosnak. A leggyakrabban érintett az *ENG* gén, mely az endoglin fehérjét, az endothél egy fő glikoproteinjét kódolja. A másik gyakran érintett a legfőképpen az endothél sejteken kifejeződő Activin receptor-like kinase 1 (*ACVRL1*) génje. A harmadik leggyakoribb HHT-vel összefüggésbe hozott gén a *SMAD4* (Mothers against decapentaplegic homolog 4). A *SMAD4* által kódolt fehérje egy intracelluláris szignál molekula a transzformáló növekedési faktor beta ( $TGF\beta$ ) és a csont morfogén fehérje (BMP) útvonalon. Az Osler-Rendu-Weber kórkép autoszomális domináns öröklésmentet mutat és a különböző populációkban eltérő a mutációs spektrum, forró pontokat e génekben nem azonosítottak.

Jelen értekezésben az AT deficienciákkal kapcsolatos genetikai, klinikai, laboratóriumi és fehérjebiokémiai vizsgálatainkat, valamint a HHT-vel kapcsolatos genetikai analízisünk eredményeit foglaljuk össze.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 Az antitrombin fehérje szerepe a véralvadás szabályozásában

#### 2.1.1 Az antitrombin fehérje struktúrája, funkciója, genetikai jellemzői

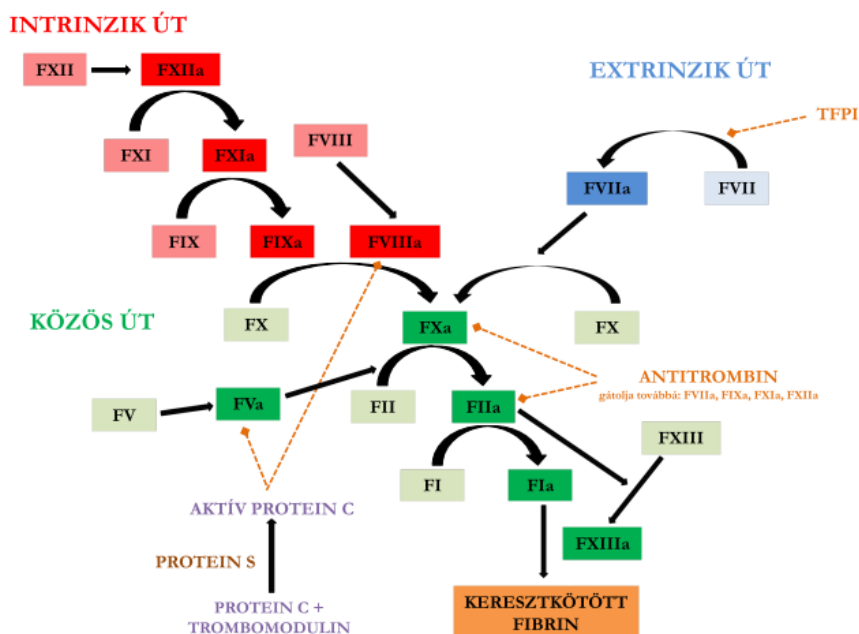
Az AT a szerpinek családjába tartozó egyláncú glikoprotein, mely a májban szintetizálódik, molekulatömege 58200 Da [7]. A propeptid lehasadása után az érett fehérje 432 aminosavból épül fel. Az AT két glikoformája van jelen a keringésben, túlnyomó többségben (90-95%) az  $\alpha$ -glikoforma, míg <10%-ban a  $\beta$ -glikoforma. Mindkét izoforma azonos polipeptid vázzal rendelkezik, melyek teljes aminosav összetétele ismert és azonos, csak a glikoziláció mértékében különböznek. Az  $\alpha$ -glikoforma 4 aszparagin reziduumon (128, 167, 187 és 224) glikozilált, míg a  $\beta$ -glikoforma a 167-es pozícióban nem glikozilált. A  $\beta$ -glikoforma erősebben kötődik heparinhoz. A fehérje harmadlagos szerkezetét tekintve három  $\beta$ -redőt (A-C) és kilenc  $\alpha$ -hélixet (A-I) tartalmaz. A molekula külső részén helyezkedik el a reaktív center hurok (RCL), mely régió a target proteázokkal komplementer szekvenciát tartalmazza. Az AT nem hasított formájának két konformációs állapota létezik. A natív forma esetén a 24 tagú RCL - beleértve a P1-P1' (Arg425-Ser426) hasító helyet - a molekula külső felszínén helyezkedik el. A látens konformációban viszont az RCL a  $\beta$ -redőbe illeszkedik be. Az utóbbi konformáció termodinamikailag stabilabb, mint a natív forma; a natív forma kinetikusan egy nagy energiájú állapotban rekedt meg. Az AT elsősorban ebben a kinetikusan csapdába ejtett, natív állapotban található meg a keringésben.

A humán AT génje (*SERPINC1*) az 1q23-q25 pozícióban helyezkedik el, 1,4 kb mRNS-t eredményező 7 exont és 6 intront tartalmaz. Minden exon-intron határ követi a GT-AG szabályt. A vezető szekvencia 32 aminosavat tartalmaz, mely az érés során lehasad. A 2. és 3. exon a heparin kötő régiót, míg a 7. exon a C-terminális végen a reaktív helyet kódolja. Kilenc teljes és egy részleges *Alu* ismétlődő szekvenciát azonosítottak az 1., 2., 4., 5. és 6. intronban. Több egy nukleotidot érintő polimorfizmus (SNP) is ismert a gén teljes hosszában, melyek általában ártalmatlanok és különböző gyakorisággal fordulnak elő a különféle populációkban.

Az AT egy szerin proteáz inhibitor, ami gátolja a trombint és azon enzimeket, melyek a trombin generációért felelősek [8]. Egy nagyon fontos endogén antikoaguláns molekula, ez magyarázza, hogy az elvileg enyhe AT hiányos betegek (heterozigóták) is magas trombotikus kockázattal rendelkeznek. Az AT-t progresszív

inhibitoroknak nevezzük, mivel reakciókészsége az aktív alvadási faktorokkal kismértékű, azonban heparin vagy heparán szulfát proteoglikánok (HSPG) jelenlétében a gátló hatása 500-szorosra emelkedik. Antikoaguláns aktivitásán kívül az AT gyulladáscsökkentő, antiproliferatív, antiangiogén, és vírusellenes tulajdonságokkal is rendelkezik.

Az AT a hemosztázis és trombózis kialakulásának számos pontján fontos szabályozó szerepet tölt be, gátolva [a] a trombin-mediálta fibrin alvadékképződést, [b] az aktív X-es faktor (FXa) mediálta trombin generációt, [c] azon véralvadási faktorokat, melyek az intrinzik és extrinzik útvonalon (FIXa, FXIa, FXIIa, plazma kallikrein és FVIIa-szöveti faktor (TF) komplex) korábban fejtik ki hatásukat (1. ábra). A trombin AT általi gátlása szabályozza a trombin egyéb funkcióit is, azaz a vérelemek aktivációt és a sejt szignalizációt, valamint a sejtproliferációt. Az AT trombin és FXa gátló mechanizmusát alaposan feltérképezték, melyek különböznek egymástól. A trombin esetében a pentaszacharid egység kötődése révén kialakult konformációváltozás nem elegendő, a hatékony trombin-AT interakcióhoz az is szükséges, hogy a 18 vagy annál több egységből álló heparin hidat képezzen a trombinnal [9, 10]. A FXa esetében azonban elegendő a pentaszacharid HBS régióhoz kötődése az RCL szabaddá válásához.



1. ábra Az antitrombin szerepe a véralvadás szabályozásában

### 2.1.2 Az antitrombin deficiencia molekuláris genetikai háttere, genotípus-fenotípus összefüggései

Az AT deficienciát először Egeberg és mtsai. írták le 1965-ben [11]. Az első funkcionális defektusról (AT Budapest) 1974-ben Sas és mtsai. számoltak be [12]. A Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság (ISTH) ajánlása szerint az AT deficienciát két típusba sorolják, a kvantitatív (I-es típus) és kvalitatív (II-es típus) típusokba [13]. Az I-es típusú AT deficienciában az AT aktivitás- és antigén szintje egyaránt csökkent, ami hibás fehérje szintézisre vagy szekrécióra utal. A II-es típusú deficienciában a defektus érintheti a reaktív helyet (II.RS), a heparin-kötőhelyet (II.HBS) és lehet pleiotróp (II.PE) hatású is [14].

Az AT deficiencia autoszomális domináns öröklésmentet követ, azonban a II.HBS deficienciákban inkomplett penetrancia vagy autoszomális recesszív mintázat is előfordulhat. Az AT deficiens betegek többsége heterozigóta formában hordozza a genetikai eltérést, ehhez 50% körüli AT aktivitás társul. Az AT deficiencia homozigóta formában az élettel összeegyeztethetetlen, kivéve a II.HBS altípust. A betegség molekuláris genetikai háttere igen heterogén, mára már több mint 310 okozati mutációról számoltak be (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Az adatbázisban szereplő *SERPINC1* mutációk körülbelül 50%-a misszensz eltérés, a kis deléciók/inzerciók szintén gyakoriak (28%). A nonszensz és splicing eltérések (6%), valamint a nagyobb génszakaszokat érintő átrendeződések kisebb arányban fordulnak elő. Az I-es típusú AT deficienciát nagy arányban inzerciók vagy deléciók okozzák (10%), melyek kereteltolódáshoz, ezáltal korai STOP kodon kialakulásához vezetnek. A II-es típusú AT deficiencia hátterében leggyakrabban misszensz mutációk állnak. A II.RS altípusért felelős eltérések a reaktív helyet és a „hinge” régiót érintik. A leggyakoribb misszensz eltérések, így a p.Pro73Leu (AT Basel), a p.Arg79His (AT Padua I) és a p.Leu131Phe (AT Budapest 3; AT Bp3) II.HBS AT deficienciát eredményeznek. A II.PE altípust eredményező eltérések a 434, 436-439 és 461 aminosavakat érintik, mely régiók az AT szerkezeti és funkcionális integritásáért jelentős mértékben felelősek.

Az I-es típusú eltérést okozó mutációk homozigóta formában az élettel összeegyeztethetetlenek, míg a heterozigóta egyének általában fiatal korban súlyos trombotikus eseményeken esnek át. Hasonló fenotípusos megjelenést írtak le a II.RS és II.PE altípusok esetében. A II.RS deficienciák közé sorolható p.Ala416Ser (AT

Cambridge II) eltérés kivétel, ugyanis az homozigóta formában is előfordulhat és enyhébb klinikai fenotípussal társul [3, 15]. A II.HBS altípus feltehetően kisebb trombózis-kockázatot jelent a többi altípusnál [16, 17]. A homozigóta II.HBS mutációt hordozó egyének életképesek, korai életkorban alakul ki náluk trombózis, míg a heterozigóta betegek későbbi életkorban és enyhébb trombotikus eseményeket szenvednek el.

### **2.1.3 Az antitrombin deficiencia klinikuma, epidemiológiája, terápiája**

Az AT deficiencia következményei közé tartozik a mélyvénás trombózis (MVT) és/vagy tüdőembólia, ami gyakran visszatérő is lehet. Az MVT gyakran szokatlan helyen is kialakulhat, így a felsővétagokban, a mezenteriális, vese, portális, retinális és agyi erekben [18-21]. Néhány esetben artériás trombózisokról is beszámoltak [22-25]. Terhes, AT deficiens nőknél fokozott a trombózis kockázata [26, 27]. Egy tanulmány szerint AT deficiens gyerekekben az iszkémiás stroke és az agyi vénás sinus trombózis esélye igen magas [28].

Szerzett AT deficienciát figyelhetünk meg májbetegségben, nefrózis szindrómában, illetve más vesefunkció- vagy fehérjevesztéssel járó betegségekben. Alacsony AT koncentrációt észlelhetünk szepszisben, disszeminált intravaszkuláris koagulációban, trombotikus mikroangiopátiákban, akut hemolitikus transzfúziós esetekben és rosszindulatú megbetegedésekben [29]. Két gyógyszeres kezelés okozta AT hiányt is leírtak, nem frakcionált heparin hosszú távú alkalmazása esetén nagyobb mértékben képződik trombin-AT komplex, valamint az L-aszparaginázzal végzett terápia intracelluláris AT-visszatartást eredményez [30, 31].

Az AT deficiencia gyakorisága az általános populációban 1:2000 és 1:5000 közé tehető [32]. Vénás tromboembólián (VTE) átesett betegekben ez az arány magasabb, 1:20 és 1:200 közötti lehet [33]. Ezek az adatok azonban nem feltétlenül vonatkoztathatóak minden populációra; az epidemiológiai tanulmányok többsége Nyugat-Európából származik.

Több prospektív és eset-kontroll tanulmányban határozták meg az AT deficiencia által okozott VTE kockázatot, melyet igen magasnak találtak. A ma ismert öröklött trombofília tényezők közül az AT deficiencia tűnik a legsúlyosabbnak. Az AT deficiencia a tüdőembólia és az ismétlődő VTE tekintetében is jelentős rizikófaktor [34-38].

A VTE-n átesett AT deficiens betegek akután általában heparin és heparin-AT koncentrátum terápiában részesülnek [39-41]. Profilaktikus antikoagulálásra a K-vitamin antagonisták, vagy az új típusú orális antikoagulánsok (NOAC) a javalltak [42]. Az antikoagulálás javasolt időtartama VTE után nem egyértelmű, különösen nehéz a profilaxis stratégiáját megválasztani AT deficienciában. Úgy gondoljuk, hogy a deficiencia altípusa (és esetleg a konkrét mutáció azonosítása) segíthet a kérdés eldöntésében, természetesen egyéb faktorok figyelembevétele mellett. Profilaktikus

heparin terápia és esetleg AT koncentrátum adása lehet szükséges a tünetmentes *SERPINC1* mutáció hordozókban terhesség, műtét, trauma és fertőzések esetén. Ösztrogén tartalmú fogamzásgátló és posztmenopauzális hormonpótló terápia kerülendő az AT deficiens nőkben. (Progeszteron tartalmú fogamzásgátlók nem csökkentik az AT szintjét.)

#### 2.1.4 Az antitrombin deficiencia laboratóriumi diagnosztikai módszerei

Elsővonalbeli szűrőtesztként egy funkcionális teszt, az AT aktivitás meghatározása történik [7]. Az amidolitikus teszt kromogén szubsztrátot használva a trombin vagy FXa AT által történő gátlásának mértékét határozza meg. A módszer elvégezhető heparin jelenlétében (heparin-kofaktor aktivitás) vagy annak hiányában (progresszív aktivitás). Az előbbi teszt esetében az aktív véralvadási faktorok gátlása igen gyorsan valósul meg, míg utóbbi esetben hosszabb időre van szükség az AT gátló hatásának kifejlődéséhez. Amennyiben csökkent AT aktivitást tapasztalunk, AT antigén meghatározás is történik. Mindhárom módszer elvégzése lehetőséget ad az AT deficiencia típusba sorolására (lásd 1. táblázat).

**1. táblázat** Az antitrombin deficiencia laboratóriumi diagnózisa és osztályozása

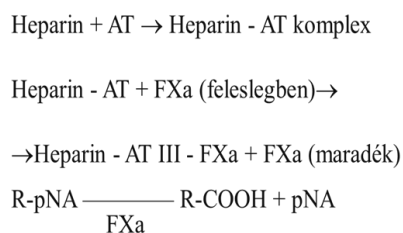
AT deficiencia altípusa	Heparin kofaktor AT aktivitás	Progresszív AT aktivitás	AT antigén
I-es típus	↓	↓	↓
II.RS	↓	↓	N
II.HBS	↓	N	N
II.PE	↓	↓	N vagy alacsony N

N, normál

A heparin kofaktor funkcionális teszt során a heparin a vizsgálandó trombocita szegény plazma mintában lévő AT-hoz kapcsolódik, amely fokozza a trombinral vagy az aktív X-es faktorról történő AT-trombin, vagy AT-FXa komplex képződését. Egy adott funkcionális teszt során csak az egyik enzimet (trombint vagy FXa-t) visszük a rendszerbe, tisztított formában, feleslegben. A feleslegben bevitt trombin vagy FXa-t az AT gátolja, majd a szabadon maradó (nem gátolt) enzim aktivitását határozzuk meg trombinra, vagy FXa-ra specifikus kromogén szubsztrát

alkalmazásával. A kromogén szubsztrát rövid, az adott enzim hasító helyére specifikus szekvenciával rendelkező peptid, a rajta lévő para-nitro anilint (pNA) hasítja le a trombin vagy FXa, mely a nem kötődött állapotban 405 nm-en jól mérhető, színes terméket eredményez. Így a tesztben fordított arányosság van az AT aktivitása és a mért abszorbancia változás között. Korábban humán eredetű trombint alkalmaztak a trombint gátló esszékben, azonban ez a heparin kofaktor II-vel is reagál, ezáltal nem volt kellően érzékeny az AT deficienciára [43, 44]. A legtöbb kitben már szarvasmarha eredetű trombint, vagy FXa-t használnak, mivel ezek nem reagálnak a heparin kofaktor II-vel és elvileg hasonló érzékenységek. Normál AT aktivitással rendelkező személyekben a ma használt trombin, vagy FXa alapú funkcionális tesztek (2. ábra) azonos eredményt adnak a nemzetközi körkontroll vizsgálatok tanúságai szerint [45]. Az AT deficiens betegek esetében azonban a mutációk típusa szerint lehet különbség a tesztek érzékenysége között. Felvetették, hogy az AT Cambridge II (p.Ala416Ser) mutáció iránt, mely viszonylag gyakorinak számít elsősorban a brit AT deficiens populációban, a FXa alapú tesztek nem kellően érzékenyek [3, 15]. A II.HBS AT deficienciákban (pl. az AT Budapest 3; p.Leu131Phe esetében) ezzel szemben kimutatták, hogy a trombin alapú tesztek nem, a FXa alapúak viszont érzékenyek bizonyultak [46]. Később felmerült, hogy a FXa alapú tesztek érzékenysége között is lehetnek különbségek, ezt azonban szisztematikusan még nem vizsgálták.

A progresszív AT teszt, ami az előbbieken ismertetett funkcionális teszthez hasonlóan működik, csupán néhány változtatást tartalmaz (nincs benne heparin és hosszabb inkubációs idővel dolgozik, alacsonyabb plazmahígítást igényel) a II.HBS altípust segít elkülöníteni a többi II-es típusú AT deficienciától, azonban kevésbé elterjedt a használata. Az AT antigén koncentráció meghatározás szintén az AT deficienciák osztályozásában segít. Manapság az immunnefelometria a leggyakrabban alkalmazott módszer az AT koncentráció meghatározására.



**2. ábra** Az anti-FXa antitrombin aktivitás meghatározásának elve

## **2.2 A hereditær hemorrhagiás teleangiectasia**

### **2.2.1 A hereditær hemorrhagiás teleangiectasia klinikai jellemzése**

A HHT egy heterogén klinikummal jellemezhető, autoszómális domináns öröklésmentet mutató betegség. Az Osler-Rendu-Weber kórban az AVM-k különböző típusai fordulhatnak elő [6]. A kis AVM-kat teleangiectasiának (TA) nevezzük, melyek leginkább az ajkakon, az arcbőrön, az ujjakon, valamint az orr-, száj- és gastrointestinális traktus (GI) nyálkahártyáin fordulnak elő. A TA-k minimális trauma hatására vagy anélkül is gyors vérzésnek indulnak és nehéz őket megállítani, mivel az érfalából hiányoznak a kontraktilis elemek. Az AVM-k leggyakrabban a májban, a tüdőben vagy az agyban fordulnak elő. A HHT legjellemzőbb tünete a spontán, visszatérő orrvérzés. Bár a HHT általában egy progresszív rendellenesség, az újszülöttek súlyosabban érintettek a tüdő vagy agyi AVM-k tekintetében. A HHT betegek életkora a diagnózis felállítása idején igen heterogén, előfordulnak egészen idős betegek is.

### **2.2.2 A hereditær hemorrhagiás teleangiectasia klinikai diagnózisa**

A HHT klinikai diagnózisa az AVM-k és/vagy TA-k jelenlétén alapul [6]. A megfelelő diagnózis felállítása a 2000-ben elfogadott és publikált Curaçao kritériumok alapján történik [47].

A Curaçao kritériumok a következők:

1. Spontán, rekurrens orrvérzések.
2. Több, jellegzetes helyen (ajkak, szájüreg, ujjak és orr) előforduló TA-k.
3. Belső szerveket (tüdő, agy, máj, GI, gerincvelő) érintő AVM-k.
4. Családi anamnézis: olyan elsőfokú rokon, akinél a Curaçao kritériumok alapján diagnosztizálták a HHT-t.

A HHT jelenléte „biztosan állítható” amennyiben legalább 3 kritérium teljesül. „Lehetséges vagy gyanítható” a HHT betegség, ha 2 kritérium van jelen. Ha kevesebb, mint 2 kritérium teljesül „kevésbé valószínű” a HHT betegség fennállása.

A jelen ajánlások szerint olyan gyermekekben, akiknek valamely szülője érintett, molekuláris genetikai analízist kell végezni annak érdekében, hogy igazolják vagy kizárják a HHT jelenlétét, mivel gyerekeknél nem használható biztonsággal a fentebb említett diagnosztikai kritériumrendszer. Ez azonban azt feltételezi, hogy az index személyekben az okozati mutáció feltérképezésre kerül.

### 2.2.3 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia patogeneze

Három fő gént azonosítottak, melyek a HHT kialakulásáért felelősek [48].

A leggyakrabban érintett az *ENG* (endoglin; 9q33-34) gén, mely egy homodimer transzmembrán fehérjét kódol, ami az érendotél egy fő glikoproteinje. Ez a fehérje a transzformáló növekedési faktor beta ( $TGF\beta$ ) és a csont morfogén fehérje (BMP) receptor komplex egyik alkotója, a  $TGF\beta$ 1-hez és  $TGF\beta$ 3-hoz nagy affinitással kötődik. Főként az endotél sejtekben, a syncytiotrophoblast sejteken, aktivált monocitákon és szöveti makrofágokon fejeződik ki.

A második leggyakrabban érintett gén az *ACVRL1* (vagy ALK-1, Activin receptor-like kinase 1; 2q11-q14), amely által kódolt fehérje a TGF-szupercsalád tagja, egy szerin/treonin-protein kináz típusú receptor, mely főként endotél sejteken expresszálódik [49].

A betegséget összefüggésbe hozták még a *SMAD4* (Mothers against decapentaplegic homolog 4; 18q21.2) génnel. A kódolt fehérje egy intracelluláris szignál molekula a  $TGF\beta$ /BMP útvonalon. A génben előforduló patogén eltérések okozhatnak juvenilis polyposis szindrómát (JPS) vagy HHT-t, illetve ezek kombinált előfordulását is [50].

Igen ritka a *GDF2* (vagy BMP9; Growth/differentiation factor 2; 10q11.22) érintettsége HHT-ben. A *BMP9* a növekedési/differenciálódási faktor 2-t kódolja. A csont morfogén fehérjecsald és a  $TGF\beta$  szupercsalád tagja. Ezen családok fehérjetagjai a sejt-növekedés és differenciálódás szabályozói mind embrionális, mind felnőtt szövetekben [48]. Kapcsoltsági analízissel továbbá számos egyéb gént is összefüggésbe hoztak a HHT-vel.

Ezen gének analízise során nem találtak mutációs forrópontokat (HHT Mutation Database: <http://arup.utah.edu/database/hht/>). A HHT-t eredményező eltérések a gének teljes hosszában megfigyelhetők [48]. A misszensz mutációk a leggyakoribbak, ezt követik a nonszensz eltérések, a deléciók/inzerciók és a splicing variánsok. Néhány esetben exon deléciókról/duplikációkról számoltak be. A mutáció detektálási arány körülbelül 75%-ra tehető [51-53].

### 2.2.4 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia genotípus-fenotípus összefüggései

A tüdőben előforduló AVM-k a patogén *ENG* variánst hordozó egyének között fordulnak elő gyakrabban, míg a májban előforduló AVM-k az *ACVRL1* mutációkkal

hozhatók inkább összefüggésbe. Ugyanakkor mindkét típus vaszkuláris diszpláziában nyilvánul meg [54]. A *SMAD4* gén patogén variánsai a HHT-s betegekben leginkább JPS-al kombináltan fordulnak elő [55]. Az eddigi adatok alapján nincs egyértelmű genotípus-fenotípus összefüggés a klinikai fenotípus és az egyes patogén variánsok között.

### **2.2.5 A hereditær hemorrhagias teleangiectasia terápiája**

A HHT kezelésének időtartama, módja és típusa szervfüggő. Az orrvérzések kezelhetők párásítással, nazális kenőanyagok és hemosztatikus termékek használatával, lézer ablációval, helyi vagy orális gyógyszereléssel [48]. A GI vérzések esetén vaspótlás, endoszkópos abláció, a vérzés helyének műtéti rezekciója és/vagy gyógyszeres kezelés alkalmazható. Az agyi AVM-k jelenlétekor emboloterápiás és/vagy sztereotaktikus sugársebészeti beavatkozásokat végeznek. A tünetekkel járó hepaticus AVM-eket gyógyszeresen kezelik, akik nem reagálnak a kezelésre, májátültetésre szorulnak. A terhes HHT-s betegeket folyamatosan szűrik, valamint kezelik a tüdőben és agyban jelenlévő AVM-eket. Vaspótlásra, vörösvértestek transfúziójára anémia esetén kerül sor.

## **2.3 Az alapító hatás**

### **2.3.1 Az alapító hatás jelentősége, következménye**

Az alapító hatás a populáció genetikai összetételének véletlen hatásra bekövetkező változásának, azaz a genetikai sodródás (drift) egyik speciális esete. Az alapító hatás esetén elvész a genetikai változatosság, ami akkor következik be, ha az új népességet egy nagyobb populáció kevés egyede hozza létre, így az új népesség a szülői populáció genetikai variánsainak csak a töredékét hordozza. Általában allélvesztés nem szokott megtörténni; ha nagyon kis létszámú az alapító népesség, akkor is két különböző alléllal rendelkezik. Ugyanakkor az izolált populációkban a ritka allélok nagyobb gyakorisággal fordulnak elő. Számos elszigetelten élő populációban az alapító hatás a magyarázata sok mendeli öröklődésű betegség gyakori előfordulásának [56]. Számos tanulmány foglalkozik az askenázi zsidók között előforduló gyakori betegségekkel, melyek alapító hatás eredményeképpen jöttek létre [57-60], illetve alapító hatás eredménye például az I-es típusú tirozinémia is a Quebec-ben élő francia kanadaiaknál [61].

A betegségek diagnózisa és terápiája tekintetében igen hasznos az alapító mutációk felderítése, mert diagnosztikus algoritmusok kidolgozását teszik lehetővé, melyek alkalmazásával adott populációban egyszerűsíthető a betegek diagnosztizálása. Az adott alapító mutációt hordozó betegek klinikai fenotípusa nagy valószínűséggel igen hasonló, ami a terápiás, vagy prevenciós stratégiák megválasztását teszik egyszerűbbé az alapító mutációt hordozó populációban.

### **2.3.2 Az alapító hatás vizsgálata**

Gyakori mutációk jelenléte esetén az alapító hatás vizsgálata haplotípus analízissel történik. Ennek során az SNP-k és a mikroszatellita markerek elemzése zajlik az adott génen belül és annak környezetében. A mikroszatelliták vagy STR-k olyan egyszerű, ismétlődő szekvenciákból álló polimorfizmusok, melyek különböző hosszvariációkban fordulnak elő [62]. Lehetnek mono-, di-, tri-, tetra-, penta- vagy hexanukleotid hosszúságú régiók, melyek a különböző alléleket jellemzik [63]. Az STR-ek meghatározását követően kapcsoltsági analízis révén következtetnek a mutáció korára, eredetére, valamint családfakutatás is történhet [64].

### **2.3.3 Alapító hatás előfordulása a hemosztázist érintő megbetegedésekben**

Számos alapító mutációt írtak le eddig az irodalomban, melyek vérzésemes vagy trombotikus következményekkel járnak. Így Lannoy és mtsai. enyhe hemofília A-t okozó 2 alapító mutációt (p.Ser2030Asn és p.Pro2311His) mutatott ki a belga hemofiliában szenvedő populációban [65]. Az észak-olasz populációban egy másik hemofília A-t eredményező alapító mutációt (p.Arg2016Trp) írtak le [66]. Szintén az olasz populációban került felfedezésre az I-es típusú von Willebrand betegségért felelős p.Cys1130Phe alapító mutáció [67]. A FXI deficiens zsidó népességben a p.Glu117\* és a p.Phe283Leu gyakori mutációk esetében haplotípus analízissel igazolták az alapító hatást [68]. A gyakori trombózis rizikófaktor, a Faktor V Leiden polimorfizmus (FVL; p.Arg506Gln) szintén alapító hatás eredménye [69].

### **2.3.4 Alapító mutációk az antitrombin deficiens populációkban**

Perry DJ és mtsai. az AT Cambridge II (p.Ala416Ser) variánst hordozó 18 látszólag rokonságban nem álló család DNS mintáin végeztek haplotípus analízist és igazolták az alapító hatást [3]. Olds és mtsai. a *SERPINC1* génen belüli 2 (ATT)<sub>n</sub> trinukleotid rövid tandem ismétlődő (STR) szekvenciát és 4 polimorfizmust vizsgáltak haplotípus térképet készítve a kaukázusi populációban. A mutáns AT-hoz kapcsolódó haplotípusokat 5 AT Budapest 3 (p.Leu131Phe) és 5 p.Arg161\* *SERPINC1* mutációt hordozó családban hasonlították össze és alapító hatás jelenlétét vetették fel [70]. Hasonló kapcsoltsági analízist végeztek el Ni és mtsai. az AT Hamilton (p.Ala414Thr) és az AT Amiens (p.Arg79Cys) mutációkat hordozó családok esetében [4]. Az AT Basel (p.Pro73Leu) mutáció a finn AT deficiens populációban feltehetően alapító hatás eredménye, azonban itt genetikai alátámasztás nem történt [71]. Nagy számú beteget involváló kiterjedt genetikai vizsgálatot az alapító mutációk vonatkozásában eddig egyetlen AT deficiens populációban sem végeztek.

### **2.3.5 Alapító hatás hereditér hemorrhagias teleangiectasias populációkban**

A HHT széles körben fordul elő minden etnikai csoportban és földrészen. A HHT mutációk családi halmozódást mutatnak, azonban számos, látszólag egymással rokonságban nem álló, egy adott mutációval rendelkező betegről számoltak be. Amennyiben egy adott mutációt hordozó, egymással nem rokon betegcsoportban

ugyanaz a haplotípus fordul elő, felmerül az alapító hatás kérdése [72]. Néhány populációban, így a holland Antillákon két *ENG* mutáció, *ACVRLI* alapító mutációk francia és olasz HHT-s betegekben, *ENG* és *ACVRLI* mutációk dán populációban, valamint *ACVRLI* alapító mutációt norvég HHT-s betegekben fedeztek fel [72-75].

### 3. Célkitűzések

- I. Antitrombin deficienciában szenvedő betegek és családtagjaik bevonásával klinikai, laboratóriumi és genetikai adatbázist kívántunk kialakítani, majd az így rendelkezésünkre álló nagy létszámú AT deficiens populációban a klinikai és laboratóriumi jellegzetességeket kívántuk vizsgálni. Célul tűztük ki a genetikai háttér felkutatását, esetleg új és gyakori mutációk leírását. Célunk volt a funkcionális AT esszék érzékenységének vizsgálata, ezáltal új adatokat szolgáltatni a hatékony laboratóriumi diagnosztikához.
- II. Az általunk vizsgált AT deficiens populációban körülbelül 75%-ban az antitrombin Budapest 3 mutáció fordult elő. Ez a gyakori előfordulás alapító hatás jelenlétét vetette fel, melyet polimorf genetikai markerekkel kívántunk igazolni.
- III. Egy új *SERPINCI* mutáció esetében az eltérés okozati jellegét direkt biokémiai módszerekkel *in vitro* expresszált mutáns AT fehérjén kívántuk meghatározni.
- IV. Célunk volt az Osler-Rendu-Weber kórban előforduló gyakori *ACVRLI* mutáció esetében alapító hatás vizsgálata.

## 4. Vizsgált személyek, anyagok és módszerek

### 4.1 Betegek

#### 4.1.1 Antitrombin deficiencia

Az AT deficiens betegcsoportba tromboembólián és/vagy terhességi trombotikus komplikáción átesett olyan betegek kerültek beválogatásra, akiknél legalább két alkalommal igazoltak csökkent heparin-kofaktor-anti-FXa (hc-anti-FXa) AT aktivitást. A trombotikus események diagnózisának csak azt fogadtuk el, ha az a Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis társaság ajánlása alapján történt [42]. Ezen elvek alapján 2007-2016 között 156 egymással nem rokon AT deficiens egyén és családtagjaik (összesen 246 személy) kerültek bevonásra. (A tanulmány etikai engedély azonosítója: 3166/2012/HER.)

A személyek bevonásával párhuzamosan AT deficiencia adatbázist hoztunk létre, melybe a klinikai, a laboratóriumi és a molekuláris genetikai adatokat rögzítettük. Az adatbázisba a következő klinikai adatok kerültek bevitelre: nem, TE típusa (véna, artériás események, szülészeti komplikációk), a TE veleszületett (vascularis anomáliák, öröklött thrombophiliák), szerzett kockázati tényezői, illetve provokáló tényezői. Provokáló tényezőnek tekintettük, ha egy hónappal a TE-t megelőzően fordult elő trauma, műtét, akut betegség, centrális véna katéterezés, immobilizáció, terhesség, orális fogamzásgátló szedése, hormonális kezelés, hosszabb utazás, vagy L-aszparagináz kezelés. Szerzett rizikófaktornak tekintettük a krónikus állapotokat, így a daganatos megbetegedést, a paroxizmális nokturnális hemoglobinuriát, az autoimmun betegségeket, az antifosfolipid szindrómát, az elhízást (BMI >30), a visszeres vénákat, a nefrózis szindrómát, a szívelégtelenséget, a tartós immobilizációt. Amennyiben a TE-t megelőzően provokáló tényező, vagy krónikusan fennálló szerzett tényező nem volt kimutatható, a TE-t nem provokálnak tekintettük („unprovoked”). Rögzítésre került továbbá a TE-k száma, a beteg életkora az első TE alkalmával, a tüdőembólia ténye, az artériás esemény típusa (miokardiális infarktus (MI); stroke), a terhességi komplikáció típusa (vetélés, koraszülés, halvaszülés). Amennyiben proximális vénás trombózist észleltek, e tény is rögzítettük. A laboratóriumi adatok között feltüntetésre került az AT aktivitása (többféle módszerrel kapott eredmények, ld. később), AT antigén koncentrációja, a FVL és FII 20210A polimorfizmusok jelenléte, a fibrinogén és protein C és S szintek. Végül a *SERPINC1* génben detektált mutáció is rögzítésre került, illetve megjelöltük

a mutáció negatív eseteket. Elkülönítettük az index személyeket és a családtagok esetében a rokonsági kapcsolatokat egyértelműen megjelenítettük.

#### **4.1.2 Osler-Rendu-Weber kór**

A diagnózis felállítása a HHT diagnosztikus irányelveket megalkotó munkacsoport útmutatása szerint történt [47]. Ez alapján a HHT-ra jellemző orrvérző és TA-val rendelkező betegeket alapos általános és fül-orr-gégészeti fizikai vizsgálatnak vetették alá. A családi anamnézis felvétele során az orrvérző, TA-val vagy AVM-mel rendelkező családtagok is azonosításra kerültek. Az agyi AVM szűrés kontrasztos MR-vizsgálattal, a tüdő és máj AVM-k vizsgálata CT-vel történt. A betegek szívvultrahang vizsgálaton is átestek. Az emésztőrendszer felső szakaszának endoszkópos vizsgálatát akkor végezték el, ha felmerült a gyomor-bélrendszeri vérzés gyanúja vagy a beteg hosszú ideje fennálló vérszegénysége.

Öt, egymással látszólag nem rokon családhoz tartozó, HHT gyanús beteg (index személyek: 53 éves férfibeteg, 82 éves nőbeteg, 37 éves nőbeteg, 56 éves férfibeteg és egy 56 éves nőbeteg) esetében került sor először genetikai vizsgálatra a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken (KLKT), mely az *ENG* és *ACVRL1* gén analízisét jelentette (lásd később). Ezután sor került a HHT-gyanús családtagok vizsgálatára is (összesen 34 egyén).

#### **4.2 Populációs kontroll személyek**

A magyar általános népességre reprezentatív, ún. populációs kontroll személyek DNS mintái a Háziiorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP)-ból származtak [76]. A HMAP a Debreceni Egyetem Népegészségügyi Iskola és az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat összefogásával indult el 1998 májusában. A minták Hajdú-Bihar, Győr-Moson-Sopron, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Zala, Bács-Kiskun és Komárom-Esztergom megyei ÁNTSZ intézetek, illetve a csatlakozó háziiorvosi praxisok részvételével kerültek begyűjtésre. A program célja, hogy az ország lakosságára nézve kor és nem szerint reprezentatívnek tekinthető adatokat szolgáltatson a legnagyobb népegészségügyi jelentőségű betegségek prevalenciája és incidenciája kapcsán. A populációs kontroll személyek DNS mintáit az AT és a HHT alapító mutációk vizsgálata során a haplotípus analízishez használtuk. Az AT Bp3 és

az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációk alapító jellegének igazolására 200, illetve 50 kontroll egyén mintáján végeztünk haplotípus analízist.

### **4.3 Rutin laboratóriumi módszerek antitrombin deficienciában**

Az éhgyomri vérmintákat 0,109 mol/L citráttal alvadásgátolt csőbe (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) vették le, legalább 3 hónappal a trombózis követően. Az öröklött trombofilia tényezőket (Protein C és S, APC rezisztencia, diszfibrinogénémia) BCS-XP koagulométeren (Siemens, Marburg, Németország) határozták meg. A FVL mutációjának és a protrombin gén 20210G>A (FIIG20210A) polimorfizmusának jelenlétét LightCycler®480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) készüléken, olvadáspont görbe analízissel identifikálták a Laboratóriumi Medicina Intézet Molekuláris genetikai részlegén.

Az AT deficiencia diagnosztizálásához a KLK Tanszéken kifejlesztett hc-anti-FXa és progresszív anti-FXa (Labexpert Antithrombin H+P, Labexpert Kft, Debrecen, Magyarország) tesztek alkalmaztuk Siemens BCS-XP koagulométeren (Siemens) [77]. Az AT antigén szintek immunnefelometriás módszerrel kerültek meghatározásra (Siemens, N Antiserum to Human Antithrombin III, Siemens). Amennyiben elegendő minta állt rendelkezésre az AT aktivitás két másik, a kereskedelemben kapható esszével (Siemens, Innovance AT és HemosIL AT, Instrumentation Laboratory, MA, USA) is meghatározásra került.

### **4.4 Okozati mutációk kimutatása fluoreszcens direkt szekvenálással és MLPA analízissel**

A genomiális DNS izolálása perifériás fehérvérsejtekből történt a QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával tanszékünkön. A gének (*SERPINC1*, *ENG*, *ACVRL1*) kódoló régióit, az exon-intron határokat, valamint a promóter régiót fluoreszcens direkt szekvenálással vizsgáltuk. A szekvenáló reakciót a PCR amplifikációban alkalmazott oligonukleotidokkal (0,16 µM koncentrációban), a fluoreszcensen jelölt ddNTP-eket, dNTP-eket, DNS polimerázt és puffert tartalmazó BigDye Terminator 1.1 Cycle Seq Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és a szűrt PCR termék felhasználásával hajtottuk végre. A szekvenáló reakció termékeket DyeEx 2.0 Spin Kit-tel (Qiagen) tisztítottuk a gyártó útmutatása szerint, majd denaturálást követően ABI3130 Genetic Analyzer (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készüléken történt a kapilláris elektroforézis, az elektroferogramok analízise a Sequencing Analysis 5.4 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific) történt.

#### **4.4.1 Antitrombin deficiencia**

A *SERPINC1* gén vizsgálatához alkalmazott oligonukleotidok szekvenciája és PCR protokollja azonos a Maruyama és mtsai. által leírtakkal [78].

Azokban a laboratóriumi módszerekkel AT deficiensnek tűnő esetekben, ahol a *SERPINC1* génben direkt szekvenálással nem tudtunk mutációt kimutatni, multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MLPA) analízist végeztünk a SALSA MLPA P227 Kit-tel (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia), szintén az ABI3130 genetikai analizátoron. Az MLPA fragmentek analízise a GeneMapper szoftver 4.1 (Thermo Fisher Scientific) verziójával történt.

#### **4.4.2 Osler-Rendu-Weber kór**

Az *ENG*, *ACVRL1* és *SMAD4* gének analíziséhez általunk tervezett oligonukleotidokat alkalmaztunk (2. táblázat). Az amplifikáció 50 µL végtérfogatban 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega, Madison, WI, USA), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 250 µM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY), 0,2-0,2 µM forward és reverz primer (Integrated DNA Technologies, München, Németország), 5% DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Németország), 0,025 U GoTaq HotStart Polymerase (Promega) és 100 ng genomiális DNS felhasználásával történt. A PCR reakciókat 40-szeres ciklusszámmal, GeneAmp2700 típusú PCR készülékkel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) végeztük.

2. táblázat A HHT diagnosztizálásához alkalmazott oligonukleotidok

Primer neve	Bázissorrend (5' - 3')	Amplikon mérete (bp)	T <sub>an</sub>	
ENG_E1_F	CCCTGTGTCCACTTCTCC	542	60°C	
ENG_E1_R	AGAGTCAGCCCAGTTTGC			
ENG_E2_F	CCGTTAGCTCATGTCAAGTCC	436		
ENG_E2_R	GCCCCTAGAAATGCCACC			
ENG_E3_F	AGAGGGACAGGCACTACC	421		
ENG_E3_R	ATGAAAGGGAGAAGCAGG			
ENG_E4_F	TGGGCTGACTCCACAAATTAC	373		
ENG_E4_R	GTGTCCCCTCCTGCACTCT			
ENG_E5_F	CTGCCCCACCACTATCTTTG	307		
ENG_E5_R	GGGGTGGGGACTAGTGTC			
ENG_E6_F	ATCCCATAAACCCACACC	356		
ENG_E6_R	ATTTGTCCCTTCAGCTCAGC			
ENG_E7_F	GAGCTGAAGGACAAATCACC	483		
ENG_E7_R	GTGCAGATGAGAAAAATGAGG			
ENG_E8_F	GCCTGAGAATCGCTTGAACC	385		
ENG_E8_R	GAACCAGATGTCCATGTCATCC			
ENG_E9_F	GGACCCCTGGGTTGTGG	333	62°C	
ENG_E9_R	CCCTGCAGCCTGCTCTC			
ENG_E10_F	GAGGTGTGTTTGGGAGAG	399	60°C	
ENG_E10_R	TCTGACTTGAGAGACCAAGAGC			
ENG_E11_F	AAAAGAGAGTCAGGCAACTCC	407		
ENG_E11_R	CTTGTCAGTGCCCTGAGC			
ENG_E12_F	AATTCTAGCCGATATTTGAAG	391	55°C	
ENG_E12_R	GAAGCTCCCACCTGAAGC			
ENG_E13_F	ACAGATCTTCCAGGACTCACC	324	60°C	
ENG_E13_R	TTGCCATGTGCTATGTGC			
ENG_E14_F	AGAGTGGCAGTGCTGATGG	233		
ENG_E14_R	CAATCCCTCAGAGGCTTCAC			
ENG_E15_F	TGGTACATCTACTCGCACACG	407		
ENG_E15_R	GAGCAGGCTCCATTCTGG			
ACVRL1_E1_F	ACAGTCTCGGCTCTGTCTCC	694		62°C
ACVRL1_E1_R	GGAGCAGCTTGCCTTTCTAA			

ACVRL1_E2_F	AGCGGCTGTCACACTTCAT	228	60°C
ACVRL1_E2_R	ACATTCTCCCCAGCTTCTCA		
ACVRL1_E3_F	GTAGGACAGAAATGGGTGTCCG	368	
ACVRL1_E3_R	AAGAAGATGGGGAGGGAGTG		
ACVRL1_E4-5_F	GGCAGGACTCTGGGATCTAAC	687	
ACVRL1_E4-5_R	GTAGCCAAAAACTCCCTCACC		
ACVRL1_E6_F	TGTGTGCCCAGTGTGTAACC	260	
ACVRL1_E6_R	CTGCAAACTTGAGCCCTGA		
ACVRL1_E7_F	CTCCAGCCTCCCTTAGCC	398	
ACVRL1_E7_R	GGAGAGGAGAGCGCACAA		
ACVRL1_E8_F	ATCTGCCTTCCCCTCTCTGT	347	
ACVRL1_E8_R	CTGATTCCCCTTTCCCTACC		
ACVRL1_E9_F	GCCCTTGGATAGAGGGTAGAA	381	62°C
ACVRL1_E9_R	CCAGGGTTGAAAGAGGGAGTA		
ACVRL1_E10_F	CTCTCTCTGCCTCCTCTCCTC	283	64°C
ACVRL1_E10_R	CAGCACACACCACACTCACA		
SMAD4_E2_F	CCAGAGCAATTTTCATCTTTTCC	575	58°C
SMAD4_E2_R	TCTGAAGAGATGGAGCACAAA		
SMAD4_E3_F	TGAGTTGGTAGGATTGTGAGGA	496	
SMAD4_E3_R	CAATGTTCTAAAGGGGCAAAA		
SMAD4_E4_F	TTTTGCCCCCTTTAGAACATTG	345	
SMAD4_E4_R	CTGCCGCTCACACAAACTAA		
SMAD4_E5_F	TGACTTTTGCTGGTAAAGTAGTATGC	492	
SMAD4_E5_R	TTTAATGTTTACTTACTTGGAGTTTCC		
SMAD4_E6/7_F	CTGATAGGCCATGGGTGAGT	588	
SMAD4_E6/7_R	TGAAACAAAATCACAGGATGAA		
SMAD4_E8_F	GCACTTGGCAGATAGCACTG	378	
SMAD4_E8_R	TGAGAAGTGACCCCATTAATTCC		
SMAD4_E9_F	CCAGTTGTTTTGGGTGCATT	492	
SMAD4_E9_R	CCGACAATTAAGATGGAGTGC		
SMAD4_E10_F	TTCATACTACATGCTCCTGACACA	479	
SMAD4_E10_R	TTCTTCCACCCAGATTTCA		
SMAD4_E11_F	TCATGTGAGAGGTATAATGAAACTGA	379	
SMAD4_E11_R	TCAAAAATGTCATCATCCCAGT		
SMAD4_E12_F	TTCTTGGCACTTTAGCAGAGAA	496	
SMAD4_E12_R	CTAGGAGCAAGGCAGCAAAC		

#### 4.5 Alapító hatás vizsgálata polimorf genetikai markerekkel

Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának jelenlétét 63 AT Bp3 mutációt hordozó proband egyén (családtagokkal együtt 102 személy összesen) és 200, a HMAP-ból származó kontroll egyén mintáján vizsgáltuk.

Az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutáció alapító hatásának vizsgálata 5 proband (összesen 34 személy családtagokkal együtt) és 50, a HMAP-ból származó kontroll egyén mintáján valósult meg.

Az SNP-k és a mikroszatellita markerek vizsgálatához magunk terveztük az oligonukleotidokat. A módszerek beállításának első lépéseként a PCR reakciók optimalizálását végeztük el, vagyis megállapítottuk a PCR reakcióhoz szükséges reagensek megfelelő koncentrációit, valamint az oligonukleotidok optimális olvadási hőmérsékletét ( $T_m$ ). Minden esetben ellenőriztük, hogy az általunk tervezett oligonukleotidok a megfelelő DNS szekvencia régiót amplifikálják.

A PCR reakciók összetétele minden esetben 25  $\mu$ L végtérfogatban a következő protokoll szerint történt (a feltüntetett mennyiségek a végkoncentrációkat jelölik):

- 0,2-0,2  $\mu$ M forward és reverz primer (Integrated DNA Technologies)
- 192  $\mu$ M dNTP mix (Life Technologies)
- 2 mM  $MgCl_2$  (Promega)
- 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega)
- 0,025 U Go Taq polimeráz (Promega)
- steril desztillált víz
- 50 ng genomiális DNS

Az SNP-k egy részét FRET alapú technikával, más részét fluoreszcens direkt szekvenálással detektáltuk; a mikroszatellita markereket fluoreszcens fragment analízissel mutattuk ki. A *SERPINC1* 5'-hossz polimorfizmus (ld. később) kimutatása PCR-t követő agaróz gélelektroforézissel történt. A módszerek részletes leírását a következő fejezetek tartalmazzák.

#### **4.5.1 Egy nukleotidot érintő eltérések kimutatása olvadáspont görbe analízissel, FRET detektálással**

Az SNP-k egy részének kimutatása olvadáspont görbe analízissel, FRET detektálással LightCycler®480 (Roche) készüléken történt. Ennek során a sensor próbák a vad típusú nukleotidra komplementerek, fluoreszcenciával vannak ellátva a 3' végen. A LightCycler®480 készülék egy gyors, valós idejű detektálást tesz lehetővé, 96 minta egyidejű vizsgálatára van lehetőség. Az olvadáspont görbe analízis során két különböző fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotidot alkalmaztunk, melyeket egymástól 1-3 nukleotid távolságra terveztünk. A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) során a gerjesztett donor festék gerjeszti az akceptor festéket, utóbbi fényemissziója detektálható. A PCR reakciót követően a hőmérséklet emelésével a próbák az olvadáspontjuknál megolvadnak, azaz leválnak a DNS szakasról és már nem hoznak létre FRET-et. Az olvadási hőmérséklet a mögöttes szekvencia függvénye. Ha jelen van egy mutáció a sensor-próba kötő régióban, a „próba-DNS komplex” nem kötődik 100%-osan egymáshoz és alacsonyabb hőmérsékleten fog leválni a próba. Amennyiben nincs jelen mutáció, 100% kötődés tapasztalható a „próba-DNS komplex” között, ezért magasabb hőmérsékletre van szükség, hogy a próba leváljon. Ezeket az eltérő olvadási hőmérsékleteket képes detektálni a készülék, mely adatokból következtethetünk az adott régióban vizsgált eltérés jelenlétére és a genotípusra.

**Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának vizsgálata során elvégzett SNP genotipizálás**

Az AT Bp3 mutáció gyakoriságának és e variáns alapító hatásának vizsgálatához 5 SNP-t vizsgáltunk olvadáspont görbe analízissel. Az ezekhez használt primerek és fluoreszcensen jelölt próbák a következők voltak (3. táblázat):

**3. táblázat** Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának vizsgálata során történő SNP genotipizáláshoz használt oligonukleotidok jellemzői

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T <sub>an</sub> (°C)	Fragment mérete (bp)
AT Bp3 (c.391C>T)	F	GGCAGATTCCAAGAATGACA		53	197
	S	CAGTTGCTGGAGGGGTGTCATTA	FL		
	A	AGGCACCCAGCTTGGTCATA	LCRed610-PH		
	R	TGAGGAATCATTGGACTTGG			
rs2227596	F	GTGGAAGTGTCCAGCAAATAG		57	262
	S	TGCACTCCAACCTGGG <u>T</u> GACA	FL		
	A	AGTGAGACTGTGTCTCAAAACAGCAA	LCRed610-PH		
	R	CTAGTAGCTTGGGACTACAGGTG			
rs941989	F	GTACTTCCATATCACTCATGTCTCTG		57	251
	S	CAAAGCTTGGTGCTGAAT <u>C</u> TCTCT	FL		
	A	TTCTCCAGAGAGATTTCAGTCTCACCC	LCRed670-PH		
	R	GCCTATTGGAGCAAAATCAG			
rs2227612	F	CTCATGGGAGATGAACAGTACACAC		57	361
	S	TAACTACTGCTGTTGGTCCATAGTT <u>T</u> AGTGT	FL		
	A	TACTTGAGAACCAGAAGTTCCACAGG	LCRed610-PH		
	R	TACTTGAGAACCAGAAGTTCCACAGG			
rs1799876	F	AGGGAAGTTTGTCTTGGATCT		58	178
	S	ATGGGCCAGC <u>T</u> AGCACTG	FL		
	A	TGCCCTGTGAGTCTGTATCAGGT	LCRed610-PH		
	R	CAGTGAGGCCTGTGTAATGG			
rs677	F	GGCCGAGATGACCTCTATGT		56	217
	S	CCTTTCTGTACCC <u>C</u> TAAGAGAGTGGG	FL		
	A	AAGGTGTACTCACCTCAAGAAATGC	LCRed670-PH		
	R	GAAGGCAGAACAATCACACC			

F - forward primer; R - reverz primer; A - anchor próba; S - sensor próba; FL – Fluorescein; PH – foszfát; T<sub>an</sub> - annealing hőmérséklet; a vastag betűvel szedett aláhúzott betűk a vizsgált SNP-re komplementer nukleotidokat jelölik

Az AT Bp3 mutáció detektálása 20 µl végtérfogatban a következő végkoncentrációkkal zajlott: 0,5-0,5 µM forward és reverz primer (Integrated DNA Technologies), 0,1-0,1 µM anchor és sensor próba (TIB MOLBIOL, Berlin, Németország), 250 µM dNTP mix (Life Technologies), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega), 0,025 U GoTaq polimeráz (Promega), steril desztillált víz és 100 ng genomiális DNS. Az alkalmazott protokollban az amplifikáció 40 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 53<sup>o</sup>C.

Az rs677 polimorf marker vizsgálata 20 µl végtérfogatban a következő végkoncentrációkkal zajlott: 1,5-1,5 µM forward és reverz primer (Integrated DNA Technologies), 0,15-0,15 µM anchor és sensor próba (Kromat Kft, Budapest, Magyarország), 1x koncentrációjú Genotyping Master (Roche), steril desztillált víz és 100 ng genomiális DNS. Az amplifikáció 40 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 56<sup>o</sup>C.

Az rs1799876 polimorf marker vizsgálatának reakció összetétele 20 µl végtérfogatban a következő: 1,5-1,5 µM forward és reverz primer (Integrated DNA Technologies), 0,15-0,15 µM anchor és sensor próba (Kromat Kft), 0,625 mM Genotyping Master MgCl<sub>2</sub> (Roche), 1x koncentrációjú Genotyping Master (Roche), steril desztillált víz és 100 ng genomiális DNS. Az amplifikáció 50 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 58<sup>o</sup>C.

Az rs2227596 polimorf marker vizsgálatának reakció összetétele 20 µl végtérfogatban a következő: 1-1 µM forward és reverz primer (Integrated DNA Technologies), 0,2-0,2 µM anchor és sensor próba (Kromat Kft), 1,25 mM Genotyping Master MgCl<sub>2</sub> (Roche), 1x koncentrációjú Genotyping Master (Roche), steril desztillált víz és 100 ng genomiális DNS. Az amplifikáció 40 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 57<sup>o</sup>C.

A LightCycler®480 készülékkel több fluoreszcens jel egyidejű detektálására is van lehetőség. Az emissziós spektrumok átfedése miatt színekompensációval tudjuk kiküszöbölni a detektálási csatornák közötti „áthallást”.

Az rs941989 és rs2227612 polimorfizmusok vizsgálatánál multiplex reakciókat állítottunk össze, majd az analízis során színekompensációt alkalmaztunk.

A multiplex reakciómix összetétele (V=20 µl):

- 1,5-1,5 µM forward és reverz primerek (Integrated DNA Technologies)
- 0,3-0,3 µM anchor és sensor próbák (Kromat Kft)
- 250 µM dNTP mix (Life Technologies)
- 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega)
- 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega)
- 0,025 U GoTaq polimeráz (Promega)
- steril desztillált víz
- 100 ng genomiális DNS

Az amplifikáció 40 cikluson át zajlott, a primerek olvadáspontja 57<sup>0</sup>C.

A valós idejű PCR-t követő mutáció detektálás során egy gyors lehűtést követően egy lassú melegítés (1,5°C/sec) játszódik le, ez alatt történik a folyamatos fluoreszcencia detektálás.

A beállított olvadáspont görbe analízis módszereket fluoreszcens direkt szekvenálással validáltuk 40-40 személy mintáján, ahol minden esetben 100% egyezést kaptunk.

***Az ACVRLI c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának vizsgálata során elvégzett SNP genotipizálás***

A HHT háttérben álló ACVRLI c.625+1 G>C mutáció szűrése 50 kontroll egyén mintáján, az rs2071219 polimorfizmus kimutatása a 34 családtag és 50 kontroll egyén esetében olvadáspont görbe analízissel valósult meg LightCycler®480 (Roche) készüléken. Ehhez a 4. táblázatban szereplő oligonukleotidokat alkalmaztuk.

**4. táblázat** Az ACVRLI c.625+1 G>C mutáció és az rs2071219 polimorfizmus szűréséhez tervezett oligonukleotidok

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T <sub>an</sub> (°C)	Fragment mérete (bp)
rs2071219	F	GGCAGGACTCTGGGATCTAAC		58	267
	S	GGAGCTGACCT <u>A</u> GTGGAAGCTGAG	FL		
	A	CTCAGTGTCCCCCTCCCTCAG	LCRed610-PH		
	R	AGACTGGACTCTCCAGCTC			
c.625+1 G>C	F	CTCTCCGTACCCCCAGGAC		58	250
	S	GAGTGTGTGG <u>G</u> TGAGCAGTGG	FL		
	A	TGAGCCCGGTGGATGAGG	LCRed670-PH		
	R	CTCCCTGCCAGCAGAAT			

F: Forward primer; R: Reverz primer; S: Sensor próba; A: Anchor próba; a vastag betűvel szedett aláhúzott betűk a vizsgált SNP-re komplementer nukleotidokat jelölik

A LightCycler reakciók protokollja 20 µL végtérfogatban a következő: 1x koncentrációjú Genotyping Master (Roche), 1-1 µM forward és reverz primer (Kromat Kft), 0,2-0,2 µM anchor és sensor próba (Kromat Kft), 100 ng genomiális DNS és steril desztillált víz. Az amplifikáció 40 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 58°C.

#### **4.5.2 Egy nukleotidot érintő eltérések kimutatása fluoreszcens direkt szekvenálással**

##### ***Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának vizsgálata során elvégzett SNP genotipizálás***

A *SERPINC1* gén ötödik exonjában található két, aminosavcserével nem járó eltérést is analizáltunk a kapcsoltsági vizsgálatok során. Ezek a p.Val327 (rs5877) és p.Glu337 (rs5878) aminosavakat érintik. A genotipizálás az 5. exon fluoreszcens direkt szekvenálásával történt az AT Bp3 mutációhordozók, családtagjaik és a 200 kontroll személy esetében.

##### ***Az ACVRL1 c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának vizsgálata során elvégzett SNP genotipizálás***

Az *ACVRL1* gén 9-es exonját követő introni régióban található rs706815 és rs706816 polimorfizmusok vizsgálata fluoreszcens direkt szekvenálással valósult meg, az *ACVRL1* 9-es exon amplifikációjához használatos oligonukleotidokkal.

##### ***A SERPINC1 gén 5' hossz polimorfizmusának vizsgálata az AT Bp3 mutációt hordozó egyénekben, családtagjaikban és kontroll személyekben***

Napjainkig csak néhány olyan tanulmány lelhető fel, mely a *SERPINC1* gén promoter régiójának 5'hossz polimorfizmusával (5'LP) foglalkozik. Az 5'LP a *SERPINC1* gén kezdőkodonja előtt 345 bázispárnyira helyezkedik el, egy 32 és/vagy 108 bázispárból álló nem homológ szekvencia [79]. A két genotípus hordozása nem jelent szignifikáns eltérést az AT aktivitás tekintetében, így az általános populációban a két variáns nem befolyásolja a plazma AT aktivitását [80].

A genotipizáló PCR reakciót 25 µl végtérfogatban a következő protokoll alapján végeztük: 0,2-0,2 µM forward (5'-GTGTTTTTCCTTGTCTGTGCCAG-3') és reverz primer (5'-TTGGAGGTCATTCCTTGTAGTC-3') (Integrated DNA Technologies), 192 µM dNTP mix (Life Technologies), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega), 0,025 U Go Taq HotStart polimeráz (Promega), 250 mM Betaine Solution PCR Reagent (Sigma Aldrich GmbH), steril desztillált víz és 50 ng genomiális DNS. Az amplifikáció 45 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 62<sup>0</sup>C.

A PCR reakció során keletkezett fragmenseket 2%-os agaróz gélelektroforézissel szétválasztottuk. Minden esetben fluoreszcens direkt szekvenálással igazolt pozitív kontrollokhoz (vad típus, heterozigóta, homozigóta mutáns) hasonlítottuk az ismeretlen genotípusú mintákat.

#### 4.5.3 Mikroszatellita markerek fluoreszcens fragmentanalízise

Első lépésben multiplex PCR reakciókat állítottunk össze, melyben fluoreszcensen jelzett oligonukleotidokat alkalmaztunk. A felsokszorozott PCR termékekhez GeneScan™-500 LIZ™ méret standard és Hi-Di Formamide™ hozzáadása után kapilláris elektroforézist végeztünk az ABI3130 genetikai analizátoron (Life Technologies) a DNS fragmentumok elválasztására. Az STR fragmentumok analízise a GeneMapper v4.1 szoftver (Life Technologies) segítségével valósult meg.

#### *Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának vizsgálata során alkalmazott mikroszatellita markerek kimutatása*

Az 1-es kromoszóma q24,2 – q25,2 régiójában a *SERPINC1* génen belül és annak 12,8 cM környezetében 4 mikroszatellita marker (*SERPINC1*-Alu5 és Alu8, D1S196, D1S218), valamint negatív kontrollként a 6p25,3 régióban elhelyezkedő F13A1-STR analízisét végeztük el az AT Bp3 mutáció hordozók, családtagjaik és 200 kontroll egyén mintáján. A multiplex PCR reakciókhoz használt fluoreszcensen jelzett oligonukleotidokat (5. táblázat) magunk terveztük.

**5. táblázat** Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának vizsgálatához használt oligonukleotidok jellemzői fragment analízis esetén

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T <sub>an</sub> (°C)	Fragment mérete (bp)
Alu8	F	AAGCTGAAGCCTGAGAATGAAT	6FAM™	62	138-177
	R	GTTGCAGTGAGCCAAGATCA			
D1S196	F	TTGGGCCCTTATTACATACCAGA	PET™		271-287
	R	GATTTGGATTTCGTTACATGTTTTCTCTT			
D1S218	F	CTGTTTATGTTATCACCAAGGCTTCT	VIC®		345-365
	R	TCGTGAAATGTAATCCTCATGAATAAC			
F13A1-STR	F	GAGGTTGCACTCCAGCCTTT	NED®	60	211-247
	R	GCCCCAAGGAAGATGAGTAAAC			
Alu5	F	GATATTAAGAGCTGGGGAAATGTG	6FAM™		172-183
	R	GGCATGAGAATCGCTTGAAC			

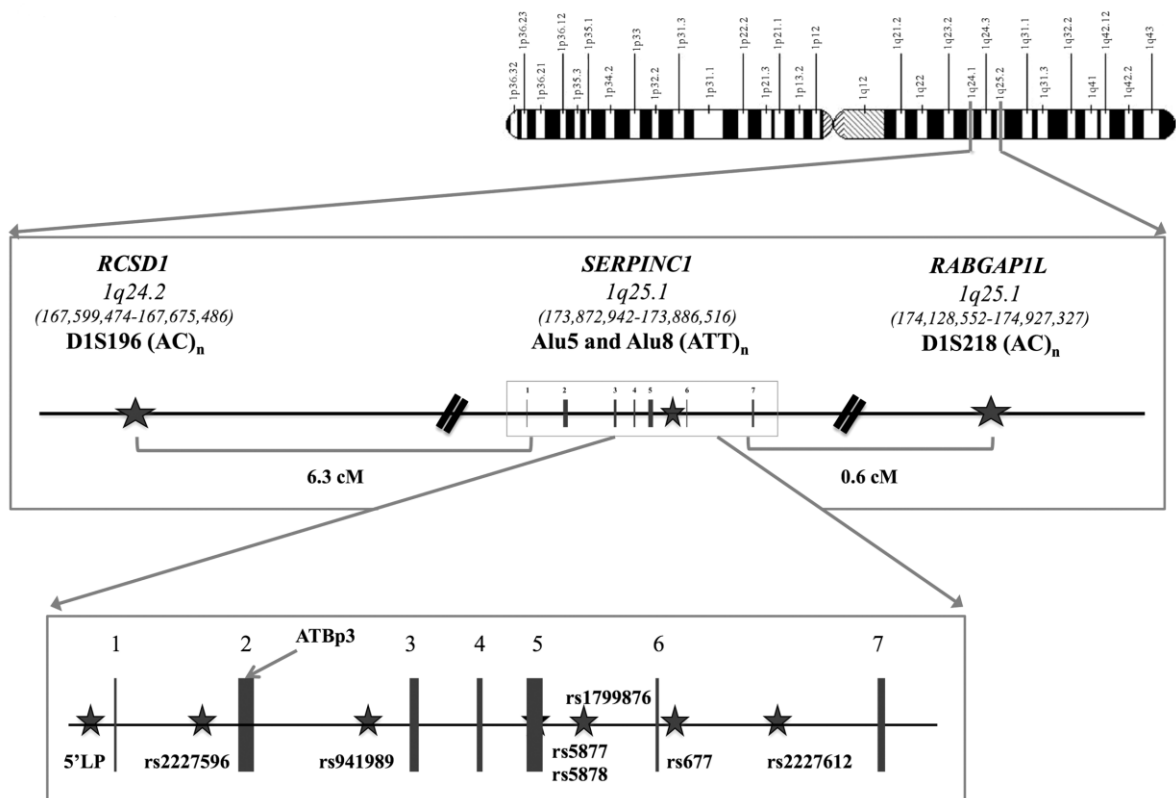
F: Forward primer; R: Reverz primer

Az I. multiplex PCR reakciót 25 µl végtérfogatban a következő protokoll alapján végeztük: 0,8-0,8-0,8 µM Alu8, D1S196 és D1S218 primermix, (Life Technologies), 0,25 mM dNTP mix (Life Technologies), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega), 4 U Go Taq HotStart polimeráz (Promega), steril desztillált víz és 40 ng genomiális DNS. Az amplifikáció 35 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 62<sup>0</sup>C.

A II. multiplex PCR reakciót 25 µl végtérfogatban a következő protokoll alapján végeztük: 0,4-0,8 µM Alu5 és F13A1-STR primermix, (Life Technologies), 0,05 mM dNTP mix (Life Technologies), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega), 2,5 U Go Taq HotStart polimeráz (Promega), steril desztillált víz és 40 ng genomiális DNS. Az amplifikáció 35 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 60<sup>0</sup>C.

A primermix mindkét esetben a forward és a reverz primer 1:1 arányú keveréke és 10 µM koncentrációjú volt.

Fenti módszereket alkalmazva (3.5.1; 3.5.2; 3.5.3 és 3.5.4 fejezetek) az AT Bp3 mutáció alapító hatásának igazolására 7 SNP-t (rs677, rs1799876, rs2227596, rs941989, rs2227612, rs5877 és rs5878), az 5'LP-t és 4 STR markert (Alu5, Alu8, D1S196 és D1S218) vizsgáltunk, ezek elhelyezkedése az 1-es kromoszómán a 3. ábrán látható.



**3. ábra** Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának igazolására vizsgált 12 polimorf genetikai marker elhelyezkedése a 1-es kromoszómán.

Az rs677, rs1799876, rs2227596, rs941989, rs2227612, rs5877 és rs5878 és az 5'LP polimorf markerek genotipizálását követően haplotípusokat generáltunk a Haploview (<http://www.broadinstitute.org/haploview>) szoftver segítségével [81].

***Az ACVRL1 c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának vizsgálata során alkalmazott mikroszatellita markerek vizsgálata***

A 12-es kromoszóma 5 mikroszatellita markerét vizsgáltuk az ACVRL1 c.625+1 G>C eltéréssel összefüggésben a 34 családtag és az 50 kontroll egyén esetében. Az STR-ek fragmentanalíziséhez magunk terveztük a fluoreszcensen jelzett oligonukleotidokat (6. táblázat), melyeket multiplex PCR reakcióban alkalmaztunk.

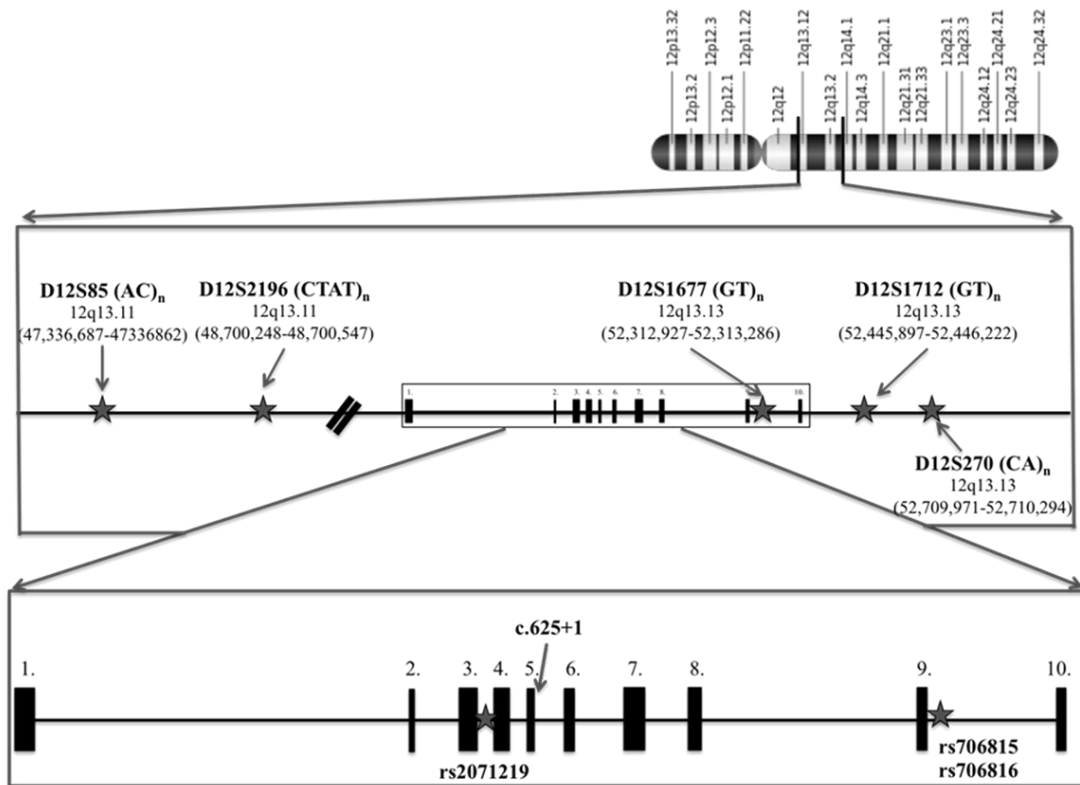
A PCR reakciókat 20 µL végtérfogatban az alábbi protokoll szerint állítottuk össze: 1x koncentrációjú PCR puffer (Promega), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 250 mM Betaine Solution PCR Reagent (Sigma Aldrich GmbH), 1 mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific), 1 U FastStart Taq polimeráz (Roche), 40 ng genomiális DNS, steril desztillált víz, 0,2 µM D12S85, 0,8 µM D12S1677, 0,4 µM D12S2196, 0,4 µM D12S1712 és 2 µM D12S270 primermix (Thermo Fisher Scientific). A primermix: forward és reverz primer 1:1 arányú keveréke és 10 µM koncentrációjú. Az amplifikáció 40 cikluson át történt, a primerek olvadáspontja 60°C.

**6. táblázat** Az ACVRL1 c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának vizsgálatához használt oligonukleotidok jellemzői fragment analízis esetén

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T <sub>an</sub> (°C)	Fragment mérete (bp)
D12S85	F	GGCACCTCTCACTCCATTACA	PET®	60	100-135
	R	TAAATGAAAGTCAAGGGGAACAG			
D12S2196	F	GGGCAATGAGGCAAAATC	VIC®		140-170
	R	CCAAGGATCTGGAATTTTGT			
D12S1677	F	CATCTGGTCATTCTGGGATTT	NED™		175-220
	R	CAGTTGAGCCGAGGAGTTT			
D12S1712	F	GCAGGGTCTCTGTAAGCACA	PET®	240-270	
	R	AGGGGGCATAGGGATGAT			
D12S270	F	TCTTGAAATCCCAGTCTCCAA	6FAM™	280-315	
	R	CCACCCCTCAGTGTAGGAAG			

F: Forward primer; R: Reverz primer

Az *ACVRL1* c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának igazolására 3 SNP-t és 5 STR markert vizsgáltunk, ezek elhelyezkedése az 12-es kromoszómán a 4. ábrán látható.



**4. ábra** Az *ACVRL1* c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának igazolására vizsgált 8 polimorf genetikai marker elhelyezkedése a 12-es kromoszómán.

## 4.6 Új mutációk patogenitásának meghatározása

Új mutációk detektálása esetén lényeges kérdés a genetikai eltérés patogenitásának igazolása. Erre a célra direkt és indirekt módszereket alkalmazhatunk. A direkt módszerek a mutáció *in vitro* biokémiai karakterizálását foglalják magukba, az indirekt módszerek egyik lehetősége az *in silico* mutáció predikciós analízis.

### 4.6.1 A *SERPINC1* p.Leu205Pro új genetikai eltérés biokémiai karakterizálása

A p.Leu205Pro mutációt hordozó probandnál egyaránt csökkent AT aktivitás (58%) és antigén szintet (0,19 g/L, mely megfelel 76%-nak) észleltünk, így került sor a genetikai vizsgálat elvégzésére. A genetikai diagnózis időpontjában már 68 éves betegnél több MVT is előfordult korábban. A mutáció kapcsán lehetőségünk volt egy nagy kiterjedésű 4 generációs családfa (n=47 fő) elemzésére; ahol többen szenvedtek MVT-t.

A család klinikumának és az új mutáció biokémiai és *in silico* karakterizálásának részletes bemutatása egy másik értekezés témája, itt nem kerül részletezésre, csak a mutáció biokémiai vizsgálatainak egy részlete.

A vad típusú (*SERPINC1*\_pcDNA3.1(+)) és a p.Pro205 (*SERPINC1*\_L205P\_pcDNA3.1(+)) mutáns plazmidot az ImaGenes GmbH-től (Berlin, Németország) szereztük be. HEK293 (humán embrionális vesesejt) letapadó sejtekbe történt a tranziens transzfekció X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (3:1 arány; Roche) kit alkalmazásával. A pCMV Sport  $\beta$ -GAL plasmid (Invitrogen, Life Technologies) bevitelével kotranszfekciót (LacZ gén) végeztünk el, melynek segítségével a későbbiekben következtetni tudtunk a transzfekciós hatékonyságra. A transzfekciót követően 48 óra elteltével leszívtuk a felülúszót a sejtekről, majd lizáltuk a sejteket (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0,5% nátrium-dezoxikolát és proteáz inhibitor, Roche). A transzfekciós hatékonyságot a FluorReporterlacZ/Galactosidase Quantitation Kit (Molecular Probes, Life Technologies) segítségével állapítottuk meg.

Az összegyűjtött sejtfeülúszókban és sejlizátumokban meghatároztuk az AT antigén koncentrációt ELISA (AssayMax Human Antithrombin III ELISA Kit, Assaypro, St.Charles, MO) módszer alkalmazásával. Három független transzfekcióból mértük az AT antigén koncentráció értékeket Labsystems iEMS Reader MF (Thermo Scientific) készüléken.

A sejtlizátumokat és sejtfeülűszókat SDS-PAGE analízisnek is alávetettük és Western-Blottal detektáltuk a fehérjemennyiségeket. Az AT-t kecskében termeltetett humán AT ellenes antitesttel (10000x hígítás; Affinity Biologicals, Ancaster, Canada) és nyúlban termeltetett, biotinált kecske ellenes IgG-vel (5000x hígítás) tettük láthatóvá. Az immunreakciót Vectastain Elite ABC kit-tel (Vector Laboratories, Burlingame, CA) váltottuk ki és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Invitrogen) reagenssel vizualizáltuk. Belső kontrollként a  $\beta$ -aktint (8H10D10, CellSignaling Technology, Leiden, Hollandia) alkalmaztuk.

Az AT aktivitásának meghatározása koncentrált feülűszóban az LX Antithrombin Hc+P(FXa) (Labexpert Kft) kit segítségével, kisebb módosításokkal (kisebb mintahígítás és alacsonyabb heparin koncentráció) történt. Az AT aktivitás és antigén értékekből specifikus aktivitást kalkuláltunk, azaz meghatároztuk az egységnyi fehérjemennyiségre vonatkoztatott AT aktivitást U/mg-ban.

#### **4.6.2 *In silico* predikciós módszerek**

A talált új mutációk patogenitását 3 predikciós módszer, a PolyPhen2 [82], (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), a MutPred [83, 84], (<http://mutpred.mutdb.org>) és a PhD-SNP [85] (<http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>) segítségével vizsgáltuk. Számos egyéb módszer létezik, de mi azért ezt a hármat választottuk, mivel Luxembourg és mtsai. tanulmánya alapján ezek bizonyultak a leghatékonyabbnak az AT mutációkra nézve [86]. Az alkalmazott predikciós módszerek mindegyik egy 0 és 1 közötti számot jelenít meg számunkra. 0,5 és 1,0 közötti érték esetén valószínűleg patogén mutációról, <0,5 érték esetén valószínűleg benignus, jóindulatú eltérésről beszélhetünk.

#### 4.7 Statisztikai módszerek

A vizsgált változók eloszlását a Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A nem normál eloszlású változók mediánját és az ahhoz tartozó totál tartományokat tüntettük fel. A folyamatos változók közötti különbségeket Mann-Whitney U teszttel és Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk.  $\chi^2$  statisztikát használtunk a kategórikus változók összehasonlítására. Az AT Bp3 homozigóta hordozásának a trombózis kialakulására gyakorolt fokozott kockázatát logisztikus regressziós modellel is analizáltuk, megadtuk az esélyhányadost (odds ratio, OR) és a 95%-os konfidencia intervallumot. Kaplan-Meier túlélési görbékkel szemléltettük az első trombotikus esemény kialakulásáig eltelt időt (életkor) a különböző AT deficiencia típusokban. A 0,05 vagy annál kisebb p-értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai analíziseket a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 22.0; Chicago, IL, USA) szoftverrel végeztük el.

## 5. Eredmények

### 5.1 Antitrombin deficiencia

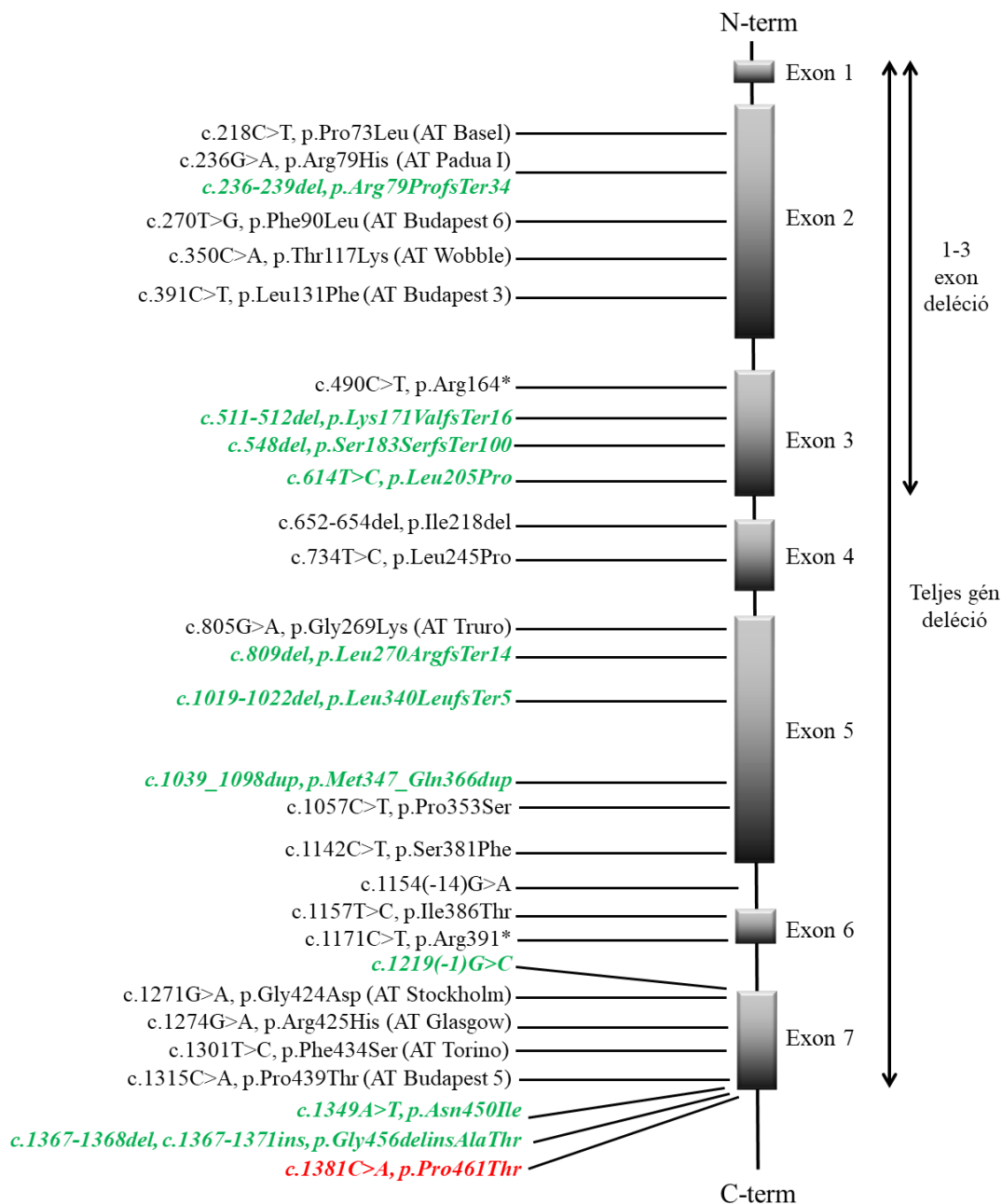
#### 5.1.1 Antitrombin deficiens betegek genotípus-fenotípus összefüggései

A 2007 és 2016 között bevont betegek (n=156 nem rokon személy; AT deficiens családtagokkal együtt 246 személy) vizsgálatával 31 genetikai eltérést találtunk a *SERPINC1* génben (5. ábra). A 31 mutáció közül 22 I-es típusú és 9 II-es típusú AT deficienciát eredményez; 36,0% új genetikai eltérés (n=11). A leggyakoribbnak a II.HBS altípus (75,6%) bizonyult, ezen belül is az AT Bp3 mutáció, melyet 63 család, 102 egyén hordozott (a II.HBS típus 80,0%-a). A talált mutációk heterozigóta formában fordultak elő, kivéve az AT Bp3 mutációt, ahol homozigóta egyéneket is detektáltunk. Az egyéb II.HBS altípusok közül az AT Baselt 5, az AT Padua I-et 11 családnál regisztráltuk. A II.RS altípusok mutációi (AT Stockholm, AT Glasgow és p.Ile386Thr) 1-1 családban fordultak elő. A II.PE altípusba tartozó AT Torino-t egy, míg az AT Budapest 5 mutációt öt családban mutattuk ki.

Mindössze három esetben nem találtunk genetikai eltérést sem fluoreszcens direkt szekvenálással, sem MLPA analízissel; e betegeknél mérsékelten csökkent hc-anti FXa AT aktivitást mértek (79, 75 és 76%). E betegekből az AT antigén szintek minden esetben a referencia tartományba estek (0,22, 0,21 és 0,22 g/L).

Az egyes AT deficiencia típusokba tartozó betegek klinikai fenotípusa a 7. táblázatban került összesítésre. Részletesebb összefoglalás a betegekről pedig a 8. és 9. táblázatban látható.

Az I-es típusú mutációt hordozók (heterozigóták) között szignifikánsan gyakrabban fordult elő VTE, mint a II-es típusú heterozigóta egyének között (p=0,015). Amennyiben a II.HBS altípushoz hasonlítjuk, még magasabb volt a VTE előfordulási aránya az I-es típusban (66,0% vs. 41,8 %, p=0,003). Ezzel szemben a terhességi komplikációk előfordulási gyakorisága a II.HBS altípusban volt a gyakoribb az I-es típushoz képest (2.1% vs. 7.1%, p=0,046). Az I-es típusú deficiensek között mindössze egy p.Arg164\* mutációhordozó nő esetében fordult elő terhességi komplikáció. Ugyanígy mindössze egy I-es típusú AT Wobble hordozónál jelentkezett artériás esemény MI formájában, azonban ez a beteg számos MI rizikófaktorral is rendelkezett (dohányzás, magasvérnyomás, hiperlipidémia). A II.RS és II.PE altípusokban nem regisztráltak sem artériás eseményt, sem terhességi komplikációt.



**5. ábra** Az általunk vizsgált AT deficiens populációban talált *SERPINC1* mutációk

A nukleotidok számozása a kezdő ATG (Met) első nukleotidjától történik. A mutációk elnevezése a Human Genome Variation Society irányelvei alapján történt. Az I-es típusú új mutációk zöld színű dőlt és félkövér jelzéssel szerepelnek az ábrán. A II-es típusú új mutáció piros színű dőlt és félkövér jelzéssel szerepel az ábrán

**7. táblázat** Az antitrombin deficienciák klinikai jellemzői

	I-es típus <i>n=47</i>	II.HBS altípus				II.RS altípus <i>n=3</i>	II.PE altípus <i>n=12</i>
		AT Basel <i>n=7</i>	AT Padua I <i>n=15</i>	AT Bp3 homozigóták <i>n=26</i>	AT Bp3 heterozigóták <i>n=76</i>		
Nő	24/47 (51,1%)	5/7 (71,4%)	12/15 (80,0%)	13/26 (50,0%)	34/76 (44,7%)	3/3 (100%)	4/12 (33,3%)
Férfi	23/47 (48,9%)	2/7 (28,6%)	3/15 (20,0%)	13/26 (50,0%)	42/76 (55,3%)	0/3 (0%)	8/12 (66,7%)
Tünettel rendelkezők aránya	34/47 (72,3%)	5/7 (71,4%)	8/15 (53,3%)	24/26 (92,3%) <sup>c,d</sup>	43/76 (56,6%)	3/3 (100%)	9/12 (75,0%)
Az első TE átesett egyének életkora évben kifejezve - medián (tartomány)	27 (22 nap-64)	29 (15-51)	44 (22-53)	14 (2 nap-26) <sup>c,d</sup>	33 (2-68)	25 (23-28)	38 (16-62)
Minimum egy VTE	31/47 (66,0%) <sup>b</sup>	1/7 (14,3%)	3/15 (20,0%)	24/26 (92,3%) <sup>c,d,e</sup>	37/76 (48,7%) <sup>g,h</sup>	3/3 (100%)	8/12 (66,7%)
Rekurrens VTE	11/31 (35,5%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)	8/24 (33,3%) <sup>d</sup>	6/37 (16,2%) <sup>h</sup>	1/3 (33,3%)	3/8 (37,5%)
Izolált PE	1/31 (3,2%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	2/24 (8,3%)	4/37 (10,8%)	0/3 (0%)	0/8 (0%)
MVT+PE	1/31 (3,2%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)	4/24 (15,4%)	9/37 (24,3%)	0/3 (0%)	1/8 (12,5%)
Artériás trombozisz	1/47 (2,1%)	3/7 (42,9%) <sup>e,f</sup>	1/15 (6,7%)	0/26 (0%)	8/76 (10,5%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)
Rekurrens artériás trombozisz	0/47 (0%)	1/7 (14,3%)	0/15 (0%)	0/26 (0%)	2/76 (2,6%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)
Terhességi komplikációk	1/47 (2,1%) <sup>b</sup>	1/7 (14,3%)	4/15 (26,7%)	3/26 (11,5%)	2/76 (2,6%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)
A FVL vagy FII mutációk hordozóinak aránya <sup>a</sup>	7/47 (14,9%)	0/7 (0%)	4/11 (36,4%)	3/26 (11,5%)	17/76 (22,4%)	1/3 (33,3%)	0/12 (0%)
Provokált VTE-n átesett betegek	9/33 (27,3%)	0/5 (0%)	2/8 (25,0%)	2/24 (8,3%)	9/41 (22,0%)	1/3 (33,3%)	1/9 (11,1%)
VTE-n átesett betegek szerzett rizikófaktorának aránya	1/47 (2,1%)	0/5 (0%)	1/8 (12,5%)	0/24 (0%)	4/41 (9,8%)	0/3 (0%)	1/9 (11,1%)
Érfejlődési rendellenességek	1/47 (2,1%)	0/7 (0%)	1/15 (6,7%)	3/26 (11,5%)	1/76 (1,3%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)

TE = trombotikus esemény, VTE = vénás tromboembólia, PE = tüdőembólia, MVT = mélyvénás trombozisz, az artériás trombozisz elnevezés magában foglalja a miokardiális infarktust és az iszkémiás stroke-t

<sup>a</sup>egyéb trombózis rizikófaktort nem regisztráltunk

<sup>b</sup> $p < 0,05$  az I-es típusú AT deficienseket a II.HBS heterozigótákkal összehasonlítva

<sup>c</sup> $p < 0,05$  az AT Bp3 homozigótákat az AT Bp 3 heterozigótákkal összehasonlítva

<sup>d</sup> $p < 0,05$  az AT Bp3 homozigótákat az AT Padua I hordozókkal összehasonlítva

<sup>e</sup> $p < 0,05$  az AT Bp3 homozigótákat az AT Basel hordozókkal összehasonlítva

<sup>f</sup> $p < 0,05$  az AT Bp3 heterozigótákat az AT Basel hordozókkal összehasonlítva

<sup>g</sup> $p < 0,05$  az AT Bp3 heterozigótákat az AT Padua I hordozókkal összehasonlítva

<sup>h</sup> $p < 0,05$  az AT Bp3 heterozigótákat az AT Basel és az Padua I csoporttal összehasonlítva

**8. táblázat** Az ismert I-es típusú AT deficienciát eredményező betegek genotípus-fenotípus összefüggései

Sorszám	Az AT deficiencia típusa	Nukleotid pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Aminosav pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Mutáció-hordozók száma	hc-anti-FXa aktivitás (%)	p-anti-FXa aktivitás (%)	AT antigén (g/L)	A p-anti-FXa/hc-anti-FXa értékek aránya	Tünetekkel rendelkező betegek aránya	TE tünetekkel rendelkező betegek aránya (≤20 év)	TE tünetekkel rendelkező betegek száma (21 – 50 év)	A provokált MVT-k száma <sup>f</sup>	A FVL és FII mutációhordozók aránya <sup>g</sup>
1	I-es típus	c.270T>G	p.Phe90Leu (AT Budapest 6)	3	<b>62</b> (60-66)	<b>73</b> (68-81)	<b>0,17</b> (0,16-0,18)	<b>1,22</b> (1,10-1,23)	1/3	1/1	0	0/1	3/3 (FVL HeZ)
2		c.350C>A	p.Thr117Lys (AT Wobble)	1	<b>47</b>	<b>65</b>	<b>0,16</b>	<b>1,38</b>	1/1 (artériás)	0/1	0	NA	1/1 (FVL HeZ)
3		c.490C>T	p.Arg164*	3	<b>53</b> (43-56)	<b>70</b> (53-71)	<b>0,14</b> (0,14-0,15)	<b>1,27</b> (1,23-1,32)	2/3 (1 terhessági komplikáció <sup>a</sup> )	0/1	2	1/2 (OA)	0/3
4		c.652-654_del	p.Ile218del	1	<b>51</b>	NA	NA	NA	1/1	1/1	0	1/1 (mútét)	0/1
5		c.734T>C	p.Leu245Pro	1	<b>59</b>	<b>65</b>	<b>0,18</b>	<b>1,10</b>	1/1	0/1	1	1/1 (immobilizáció)	0/1
6		c.805G>A	p.Gly269Lys (AT Truro)	4	<b>57</b> (46-61)	<b>69</b> (69-86)	<b>0,18</b> (0,16-0,19)	<b>1,5</b> (1,13-1,51)	3/4	1/3	1	1/3 (OA)	1/4 (FIG20210A HeZ)
7		c.1057C>T	p.Pro353Ser	1	<b>39</b>	NA	NA	NA	1/1	0/1	1	1/1 (OA)	0/1
8		c.1142C>T	p.Ser381Phe	1	<b>57</b>	<b>71</b>	<b>0,17</b>	<b>1,25</b>	1/1	0/1	1	0/1	0/1
9		c.1154-14G>A	-	1	<b>46</b>	<b>55</b>	<b>0,17</b>	<b>1,20</b>	1/1	0/1	1	0/1	0/1
10		c.1171C>T	p.Arg391*	2	<b>55</b> (55-56)	NA	NA	NA	1/2	0/1	1	1/1 (posztpartum)	0/2
11		c.1-624del	p.Met1-Lys176	1	<b>54</b>	<b>68</b>	<b>0,15</b>	<b>1,26</b>	1/1	0/1	0	0/1	0/1
12		c.1-1392del	p.Met1-Term464	2	<b>56</b> (55-56)	<b>57</b> (55-59)	<b>0,14</b> (0,13-0,16)	<b>1,18</b>	1/2 (rekurrens)	1/1	0	0/1	1/2 (FVL HeZ)

**9. táblázat** Az ismert II-es típusú AT deficienciát eredményező betegek genotípus-fenotípus összefüggései

Sorszám	Az AT deficiencia típusa	Nukleotid pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Aminosav pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Mutáció-hordozók száma	hc-anti-FXa aktivitás (%)	p-anti-FXa aktivitás (%)	AT antigén (g/L)	A p-anti-FXa/hc-anti-FXa értékek aránya	Tünetekkel rendelkező betegek aránya	TE tünetekkel rendelkező betegek aránya (≤20 év)	TE tünetekkel rendelkező betegek száma (21 – 50 év)	A provokált MVT-k száma <sup>f</sup>	A FVL és FII mutációhordozók aránya <sup>g</sup>
1	II.RS	c..1157T>C	p.Ile386Thr	1	54	77	0,22	1,43	1/1	0/1	1	0/1	0/1
2		c.1271G>A	p.Gly424Asp (AT Stockholm)	1	52	NA	0,27	NA	1/1 (rekurrens)	0/1	1	0/1	1/1 (FVL HeZ)
3		c.1274G>A	p.Arg425His (AT Glasgow)	1	50	61	0,26	1,22	1/1	0/1	1	1/1 (műtét)	0/1
4	II.PE	c.1301T>C	p.Phe434Ser (AT Torino)	2	54 (53-54)	NA	NA	NA	2/2 (rekurrens)	0/2	2	2/2 (terhesség)	0/2
5		c.1315C>A	p.Pro439Thr (AT Budapest 5)	9	65 (53-76)	69 (58-78)	0,22 (0,20-0,26)	1,06 (1,03-1,23)	4/9 (rekurrens/2 egyén)	1/4	2	0/4	0/9
6	II.HBS	c.218C>T	p.Pro73Leu (AT Basel)	7	64 (52-74)	99 (87-117)	0,28 (0,25-0,32)	1,66 (1,53-2,05)	5/7 (3 artériás; 1 terhességi komplikáció <sup>b</sup> )	2/4	1	0/5	0/7
7		c.236G>A	p.Arg79His (AT Padua I)	15	65 (48-69)	119 (97-126)	0,30 (0,28-0,35)	1,89 (1,71-2,10)	8/15 (1 stroke; 4 terhességi komplikáció <sup>c</sup> )	0/4	3	1/8 (műtét)	3/11 (1 FIIG20210A HeZ, 2 FVL HeZ)
8		c.391C>T	p.Leu131Phe (AT Budapest 3)	26 HoZ	11 (8-28)	71 (56-100)	0,21 (0,13-0,32)	5,60 (2,88-8,85)	24/26 (8 rekurrens; 3 terhességi komplikáció <sup>d</sup> )	16/24	8	5/24	3/24 (1 FIIG20210A HeZ, 2 FVL HeZ)
	76 HeZ			56 (9-71)	84 (63-122)	0,24 (0,19-0,35)	1,51 (1,28-2,11)	43/76 (6 rekurrens; 8 artériás; 2 terhességi komplikáció <sup>e</sup> )	5/41	32	22/43	14/41 (3 FIIG20210A HeZ, 11 FVL HeZ)	

HGVS, Human Genome Variation Society; HoZ, homozigóta; HeZ, heterozigóta; OA, orális antikoncepció; FVL, Faktor V Leiden; TE, trombotikus esemény, beleértve a vénás és artériás eseményeket; NA, nincs adat

<sup>a</sup> halvaszülés a 33. terhességi héten

<sup>b</sup> két spontán abortusz a 24. terhességi hét előtt

<sup>c</sup> egy vagy több spontán abortusz a 24. terhességi hét előtt 3 személy esetében, illetve magzati halál a 36. terhességi héten 1 személy esetében

<sup>d</sup> egy-egy személy esetében: három magzati halál a 20., 19. és a 28. terhességi héten; egy magzati halál a 17. terhességi héten; valamint egy a 25. terhességi héten

<sup>e</sup> hét személy esetében: egy vagy több spontán abortusz a 24. terhességi hét előtt vagy magzati halál a 25. és a 34. terhességi héten

<sup>f</sup> az AT Budapest 3 mutáció hordozókat kivéve csak provokáló tényezőket (vagyis a VTE diagnózisa előtt 1 hónapon belül valamilyen szerzett rizikófaktort regisztráltak) detektáltunk és ún. "szerzett kockázati tényezők" (pl. krónikus események) nem fordultak elő

<sup>g</sup> a VTE szempontjából jelentős öröklött rizikófaktorok közül az érfejlődési rendellenességek, a FVL mutáció és a FII20210G>A polimorfizmus volt jelen

Referencia tartományok:

- hc-anti-FXa aktivitás: 80-120%,
- p-anti-FXa aktivitás: 82-118%
- AT antigén: 0,19-0,31 g/L

Összehasonlítottuk a VTE, illetve minden trombotikus esemény (vénás, artériás történést, terhességi komplikáció) bekövetkezésének idejét az I-es típusú, a II.HBS heterozigóták és az AT Bp3 homozigóták között (6A. és 6B. ábra). Amennyiben csak a VTE-t tekintettük klinikai kimenetnek, az I-es típusú AT deficiensek esetében szignifikánsan fiatalabb korban következett be az első esemény, mint a II.HBS heterozigóta formában ( $p=0,002$ ), azonban az I-es típusú deficienciában szignifikánsan magasabb életkorban következett be a VTE, mint az AT Bp3 homozigóta hordozóknál ( $p<0,001$ ). Amikor klinikai kimenetnek tekintettünk bármilyen trombotikus történést (beleértve a vénás és artériás, valamint a terhességi komplikációkat), az első manifesztációig eltelt idő nem különbözött szignifikánsan az I-es típusú és a II.HBS heterozigóták között ( $p=0,064$ ). Az AT Bp3 mutáció homozigóta formában történő hordozása ebből a nézőpontból is súlyosabb volt, mint az I-es típusú AT deficiencia ( $p<0,001$ ). Továbbá a proximálisan jelentkező trombózisok szintén az AT Bp3 homozigóta hordozókban voltak gyakoribbak az I-es típusú AT deficiensekhez képest (62,5% vs. 14,3%,  $p = 0,002$ ), míg az I-es típusú és a II.HBS heterozigóták között nem volt különbség.

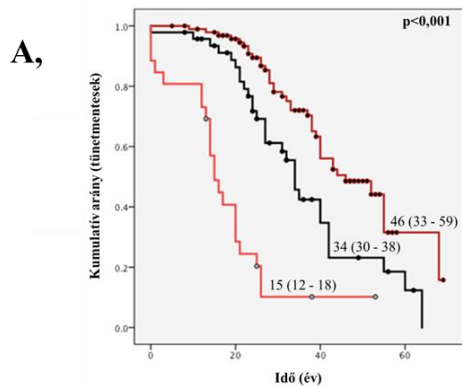
A különböző AT deficiens csoportok között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető a FVL és a FIIG20210A mutációk hordozásának gyakoriságában; egyéb öröklött trombofilia tényezőt nem találtunk. Antifoszfolipid szindróma sem volt fellelhető egyik alcsoportban sem. A veleszületett érfejlődési rendellenesség előfordulási gyakorisága alacsony volt minden csoportban.

A betegek között igen magas számban előforduló II.HBS deficiencia lehetővé tette azt, hogy összehasonlításokat végezhessünk ezen alcsoporton belül (AT Bp3 homozigóták, AT Bp3 heterozigóták, AT Basel és AT Padua I). Az AT Bp3 homozigótáknál fordult elő legmagasabb arányban (92,3%) a trombotikus tünetek; ez szignifikánsan magasabb arány, mint az AT Bp3 heterozigótákban ( $p=0,001$ ) és az AT Padua I hordozókban ( $p=0,006$ ) (7. táblázat). A VTE előfordulása sokkal gyakoribb az AT Bp3 mutáció hordozókban, mint az AT Basel és AT Padua I hordozókban (AT Padua I vs. AT Bp3 heterozigóták  $p=0,041$ ; AT Padua I vs. AT Bp3 homozigóták  $p<0,001$ ; AT Basel vs. AT Bp3 homozigóták  $p<0,001$ ). A VTE gyakorisága az AT Bp3 homozigótákban a legmagasabb (AT Bp3 heterozigóták vs. AT Bp3 homozigóták  $p<0,001$ ). Az artériás események előfordulása az AT Basel hordozókban fordult elő leggyakrabban (AT Basel vs. AT Bp3 heterozigóták  $p=0,046$ ; AT Basel vs. AT Bp3 homozigóták  $p=0,006$ ). Terhességi komplikációt leggyakrabban az AT Padua I hordozókban regisztráltunk, bár ez statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak a többi II.HBS alcsoporttal történő összehasonlításban. Az AT Bp3 homozigóták esetében

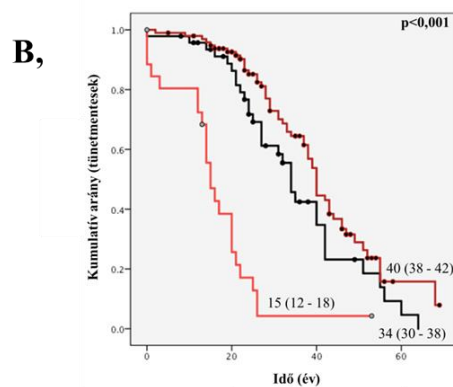
szignifikánsan gyakrabban regisztráltak proximálisan elhelyezkedő trombólizist az AT Bp3 heterozigótákhoz viszonyítva ( $p=0.001$ ). Nincs szignifikáns különbség a trombólizis rizikófaktorok tekintetében a II.HBS alcsoportok között.

Az AT Basel és AT Padua I hordozókban nincs különbség az első VTE megjelenésének idejében ( $p=0,982$ ), valamint az AT Basel és AT Bp3 heterozigóták között ( $p=0,095$ ) sincs (6C. és 6D. ábra). Az AT Bp3 heterozigótákban szignifikánsan korábban fordult elő VTE, mint az AT Padua I hordozókban ( $p=0,010$ ). Az AT Bp3 homozigóták voltak a legfiatalabbak az első trombotikus esemény elszenvedésének idején (AT Bp3 homozigóták vs. AT Basel  $p=0,002$ ; AT Bp3 homozigóták vs. AT Padua I és vs. AT Bp3 heterozigóták  $p<0,001$ ). Amennyiben kimenetnek tekintettünk minden trombotikus eseményt, az első esemény megjelenésének ideje nem különbözik szignifikánsan az AT Basel és AT Padua I ( $p=0,459$ ), az AT Bp3 heterozigóták és az AT Basel ( $p=0,997$ ), valamint az AT Bp3 heterozigóták és az AT Padua I hordozók között ( $p=0,130$ ). Az első esemény megjelenése az AT Bp3 homozigóták esetében a legkorábbi (AT Bp3 homozigóták vs. AT Bp3 heterozigóták  $p<0,001$ , AT Bp3 homozigóták vs. AT Padua I  $p<0,001$  és AT Bp3 homozigóták vs. AT Basel  $p=0,018$ ).

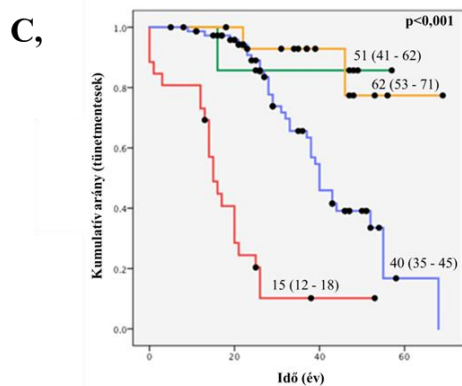
Az igen nagyszámú AT Bp3 homozigóta hordozó (az irodalomban a legnagyobb számú beteg) detektálása lehetővé tette több szempontból az AT Bp3 heterozigótákkal való összehasonlítást (10. táblázat). Az AT Bp3 homozigóták között 13-an súlyos vagy szokatlan lokalizációjú MVT-n estek át. Hét beteg iliofemorális, 2 beteg pedig vena cava inferior trombólizist szenvedett. Egy betegnél vena cava inferior és vesevéna trombólizis fordult elő. Mesenterialis trombólizist egy, tricuspidalis billentyű trombólizist szintén egy beteg szenvedett. Az AT Bp3 homozigóták között mindössze 2 tünetmentes egyént regisztráltunk. Az AT Bp3 heterozigóták között 8 esetben fordult elő artériás esemény (4 betegnél csak ATE, 4 betegnél ATE+VTE), ezzel szemben a homozigóták egyikénél sem. A tünetmentes Bp3 heterozigóták igen fiatalok az adatok analízisének időpontjában (medián: 21 év, tartomány: 2-53 év), kizárólag 2 esetben hordoznak egyéb genetikai rizikófaktort, a FVL mutációt heterozigóta formában. A TE kockázatot összehasonlítva az AT Bp3 homozigóták és heterozigóták között, az AT Bp3 homozigótáknak 14,06-szor (95%-os konfidencia intervallum: 3,10 - 63,74) nagyobbnek tűnik az esélyük a TE kialakulására, mint a heterozigótáknak.



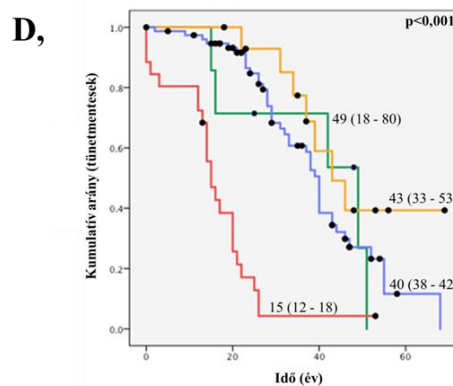
I-es típus vs. II.HBS heterozigóták  $p=0,002$   
 I-es típus vs. II.HBS homozigóták  $p<0,001$   
 II.HBS heterozigóták vs. II.HBS homozigóták  $p<0,001$



I-es típus vs. II.HBS heterozigóták  $p=0,064$   
 I-es típus vs. II.HBS homozigóták  $p<0,001$   
 II.HBS heterozigóták vs. II.HBS homozigóták  $p<0,001$



AT Basel vs. AT Padua I  $p=0,982$   
 AT Basel vs. AT Bp3 homozigóták  $p=0,002$   
 AT Basel vs. AT Bp3 heterozigóták  $p=0,095$   
 AT Padua I vs. AT Bp3 homozigóták  $p<0,001$   
 AT Padua I vs. AT Bp3 heterozigóták  $p=0,010$   
 AT Bp3 homozigóták vs. AT Bp3 heterozigóták  $p<0,001$



AT Basel vs. AT Padua I  $p=0,459$   
 AT Basel vs. AT Bp3 homozigóták  $p=0,018$   
 AT Basel vs. AT Bp3 heterozigóták  $p=0,997$   
 AT Padua I vs. AT Bp3 homozigóták  $p<0,001$   
 AT Padua I vs. AT Bp3 heterozigóták  $p=0,130$   
 AT Bp3 homozigóták vs. AT Bp3 heterozigóták  $p<0,001$

6. **ábra** A vénás trombózis első megnyilvánulási idejének (A és C) és bármilyen trombotikus esemény első megnyilvánulási idejének (B és D) összehasonlítása az I-es típusú, a II.HBS heterozigóták és az AT Bp3 homozigóták között

*A különböző AT deficiencia típusok jelölése:*

fekete – I-es típusú AT deficienssek

barna – II.HBS heterozigóták

piros – AT Bp3 homozigóták

kék – AT Bp3 heterozigóták

zöld – AT Basel heterozigóták

narancssárga- AT Padua I heterozigóták

**10. táblázat** A klinikai és laboratóriumi paraméterek összehasonlítása AT Bp3 heterozigóta és homozigóta betegek között

Klinikai és laboratóriumi paraméterek	AT Bp3 heterozigóták, n = 76	AT Bp3 homozigóták, n=26	p-érték
MVT-n átesett betegek	37/76 (48,7%)	24/26 (92,3%)	<0,001
MVT-n és/vagy ATE-n átesett betegek*	41/76 (53,9%)	24/26 (92,3%)	0,001
Medián életkor (években) az első trombotikus esemény idején (tartomány)	33 (2-68)	14,5 (2 nap-26)	<0,001
Jelen életkor mediánja években kifejezve (tartomány)	35 (2-70)	21 (3-68)	0,009
Rekurrens MVT	6/37 (16,2%)	8/24 (33,3%)	0,370
PE átesett betegek	13/76 (17,1%)	4/26 (15,4%)	0,999
ATE-n átesett betegek*	8/76 (10,5%)	0/26 (0%)	NÉ
Terhességi komplikációt elszenvedett nők†	7/34 (20,6%)	3/13 (23,1%)	0,883
20 éves kor előtt MVT-n vagy ATE-n átesett betegek	5/41 (12,2%)	16/24 (66,7%)	<0,001
50 éves kor előtt MVT-n vagy ATE-n átesett betegek	37/41 (90,2%)	24/24 (100%)	0,288
Öröklött trombofília rizikófaktorok aránya a tünetekkel rendelkező betegekben‡	14/41 (34,1%)	3/24 (12,5%)	0,544
Vénás trombózisra hajlamosító provokáló vagy szerzett rizikófaktorok aránya§	12/41 (29,3%)	2/24 (8,3%)	0,073
Artériás trombózisra hajlamosító rizikófaktorokkal rendelkezők aránya¶	10/41 (24,4%)	0	NÉ

NÉ: nem értelmezhető; MVT: mélyvénás trombózis; ATE: artériás trombotikus esemény; \*izolált artériás trombózt (iszkémiás stroke) 4 esetben regisztráltunk. MVT-t és artériás trombózt 4 betegnél jegyeztünk fel, közülük 1 stroke-n és miokardiális infarktuson (MI) is átesett (stroke 19 évesen, MI 24 évesen és MVT 27 évesen), valamint ez a beteg a FV Leiden mutációt heterozigóta formában hordozza és az MVT elszenvedésének idején heretumor miatt kemoterápiában részesült; 1 beteg MI-n esett át (MVT 47 évesen, MI 48 évesen), valamint a FV Leiden mutációt heterozigóta formában hordozza és régóta dohányos; 2 beteg iszkémiás stroke-n esett át (egyikük 26 évesen terhes volt az MVT idején és 49 éves a stroke során; a másik beteg 23 évesen esett át stroke-n, majd fogamzásgátló tablettát szedett 24 évesen az MVT idején; †a szülészeti komplikációk a 24.terhességi hét előtt bekövetkezett egy vagy több spontán abortuszt, vagy a 25 és 34.hét között megtörtént magzati halált jelentették; ‡a Faktor V Leiden heterozigóta és protrombin 20210G>A heterozigóta hordozókat csak az MVT-n átesett betegek között találtunk (izolált ATE-n átesett betegekben nem); §terhesség, fogamzásgátló szedése, tumoros megbetegedés, 1 hónapon belül történt trauma (csak az MVT-n átesett betegek között találtunk, izolált ATE-n átesett betegekben nem); ¶dohányzás (5 MVT-n átesett, valamint 1 MVT-n és MI-n átesett beteg volt dohányos), cukorbetegség (2 MVT-n átesett beteg).

Referencia tartományok: hc-anti-FXa aktivitás: 80-120%; p-anti-FXa aktivitás: 82-118%; AT antigén: 0,19-0,31 g/L

### 6.1.1 Alapító hatás kimutatása antitrombin deficiens betegekben

Az AT Bp3 mutáció igen magas arányú előfordulása a vizsgálati populációban felvetette az alapító hatás lehetőségét. Az alapító hatás tisztázására 7 SNP-t, az 5'-LP-t és 4 mikroszatellita markert vizsgáltunk. Az AT Bp3 mutációt hordozók minor allél frekvencia (MAF) értékei különböztek a 200 egészséges egyén értékeitől és a HapMap projektből származó európai populációra vonatkoztatott értékektől (11. táblázat).

**11. táblázat** A vizsgált polimorf markerek MAF értékeinek összehasonlító táblázata az AT Bp3 betegek, a populációs kontroll csoport és a HapMap adatok esetében.

Marker neve vagy rs azonosító	AT Bp3 homozigóta betegek (n=26) MAF	AT Bp3 deficiens probandok (n=63) MAF	AT Bp3 deficiens betegek (n=102) MAF	Kontroll csoport (n=200) MAF	HapMap CEU adat (MAF)
rs5877 (A>G)	0,00	0,17	0,21	NA	0,33
rs5878 (A>G)	0,00	0,17	0,21	NA	0,33
5'-LP (R>H)	0,00	0,15*	0,19*	0,29	0,21
rs2227596 (A>G)	0,00	0,06*	0,09*	0,19	0,21
rs941989 (G>A)	0,00	0,17*	0,22*	0,37	0,33
rs2227612 (A>C)	0,00	0,06*	0,09*	0,15	0,13
rs1799876 (T>C)	0,00	0,14	0,18	NA	0,34
rs677 (G>C)	0,00	0,06	0,09	NA	0,16 <sup>‡</sup>

Az AT Bp3 deficiens probandokba a homo- és heterozigóták is beletartoznak; az AT Bp3 deficiens betegekbe pedig a probandokon kívül a családtagok is beletartoznak.

MAF: Minor Allél Frekvencia; NA: nincs adat; R: rövid; H: hosszú; \* $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva; az AT Bp3 homozigóták között egy esetben sem fordultak elő a minor allélok, ezért statisztikai analízist nem tudtunk végezni; <sup>‡</sup>mivel ezen SNP esetében HapMap adat nem áll rendelkezésre, ezért a PGA-EUROPEAN-PANEL adatait használtuk.

A minor allélok egyetlen esetben sem fordultak elő az SNP-k és az 5'LP esetén az AT Bp3 homozigóták között. Az rs5877, rs5878, rs1799876, rs941989, rs677 és rs2227596 SNP-k kapcsolt öröklődést mutattak.

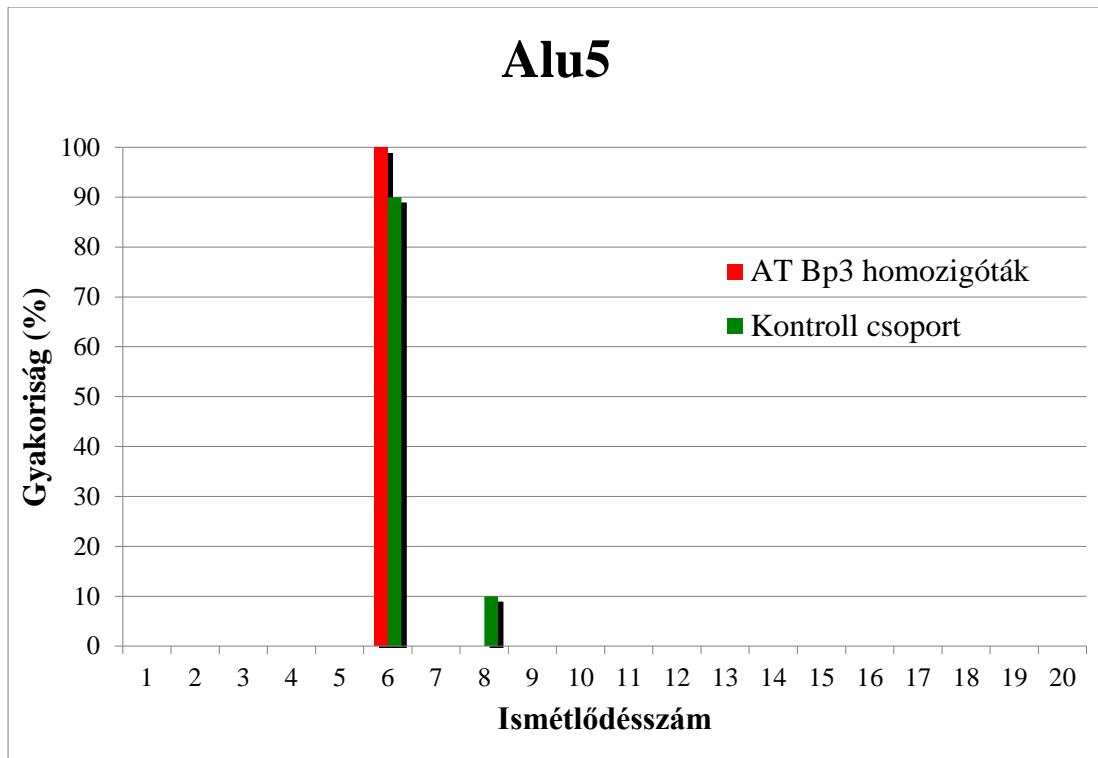
A haplotípus analízis során kimutattuk, hogy a patogén „T allél” egyetlen haplotípussal társult (12. táblázat). A normál „C allél” különböző haplotípusokkal társult mind az AT Bp3 mutáció hordozókban, mint a kontroll csoportban. Az AT

Bp3 homozigóták esetében kizárólag egyféle ismétlődésszámot találtunk az Alu5 (7. ábra) és Alu8 (8. ábra) mikroszatellita markerek analízisekor, a (ATT)<sub>6</sub> és (ATT)<sub>15</sub> ismétlődéseket. A kontroll csoportban az Alu5 esetében a 6-os és 8-as ismétlődésszámok, míg az Alu8 esetében 1-től 19-ig mindenféle ismétlődésszámok előfordultak. A *SERPINC1* génhez közelebbi, disztálisan elhelyezkedő D1S218 marker (AC)<sub>24</sub> és (AC)<sub>25</sub> formában fordult elő az AT Bp3 homozigótákban, míg a kontroll csoportban heterogén az ismétlődésszámok megjelenése, (AC)<sub>19</sub>-tól (AC)<sub>33</sub>-ig (9. ábra). A *SERPINC1* génhez távolabb, proximálisan elhelyezkedő D1S196 marker változatos ismétlődésszámokat mutatott mind az AT Bp3 homozigóta, mind a kontroll személyekben (10. ábra). A negatív kontrollként alkalmazott F13A1-STR ismétlődésszámjai hasonló eloszlást mutatnak mind a beteg, mind a kontroll csoportban (11. ábra).

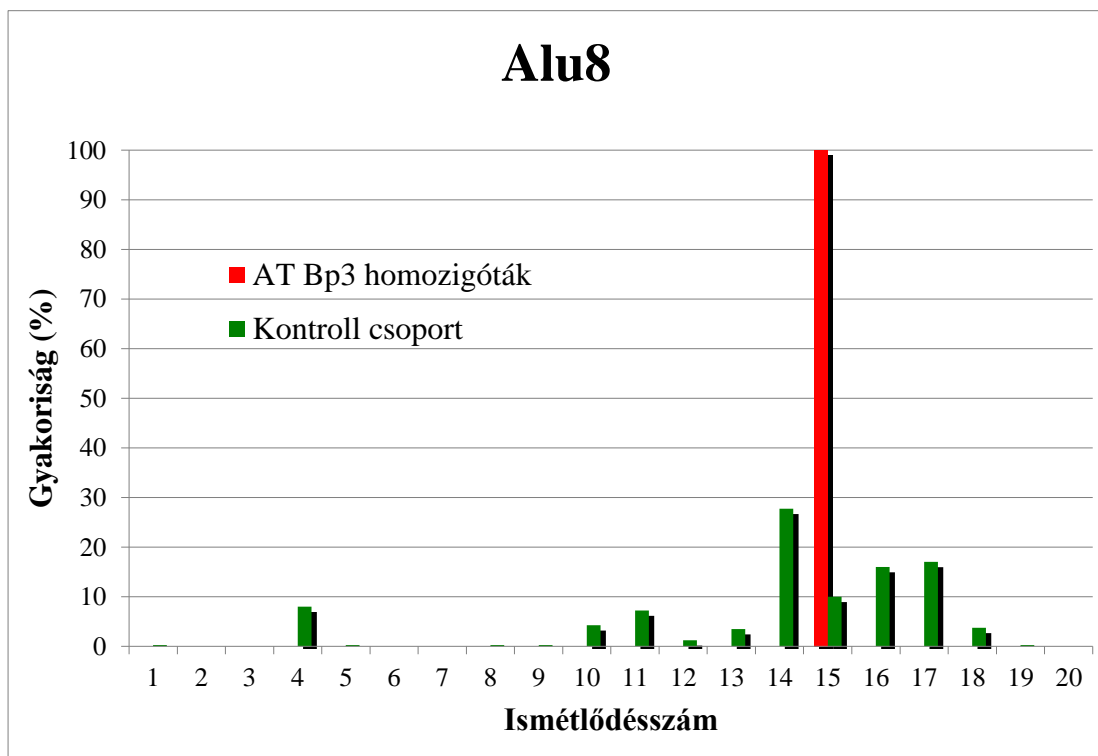
**12. táblázat** A haplotípus analízis eredménye AT Bp3 mutáció hordozókban és a kontroll csoportban

AT Bp3 mutáció hordozók (n=102)										Kontroll csoport (n=200)					
	rs5877	rs5878	5'LP	rs2227612	rs941989	rs2227596	rs1799876	rs677	Gyakoriság		5'LP	rs2227612	rs941989	rs2227596	Gyakoriság
c.391 „T allél”	A	A	R	A	G	A	T	G	0,592						
c.391 „C allél”										c.391 „C allél”					
<b>Haplotípus 1</b>	A	A	R	A	G	A	T	G	0,183	<b>Haplotípus 1</b>	R	A	G	A	0,630
<b>Haplotípus 2</b>	G	G	H	A	A	A	C	G	0,083	<b>Haplotípus 2</b>	H	A	A	A	0,104
<b>Haplotípus 3</b>	G	G	H	C	A	G	C	C	0,058	<b>Haplotípus 3</b>	H	C	A	G	0,147
<b>Haplotípus 4</b>	G	G	H	C	A	G	T	C	0,025	<b>Haplotípus 4</b>	R	A	A	A	0,077
<b>Haplotípus 5</b>	G	G	R	A	A	A	C	G	0,025						

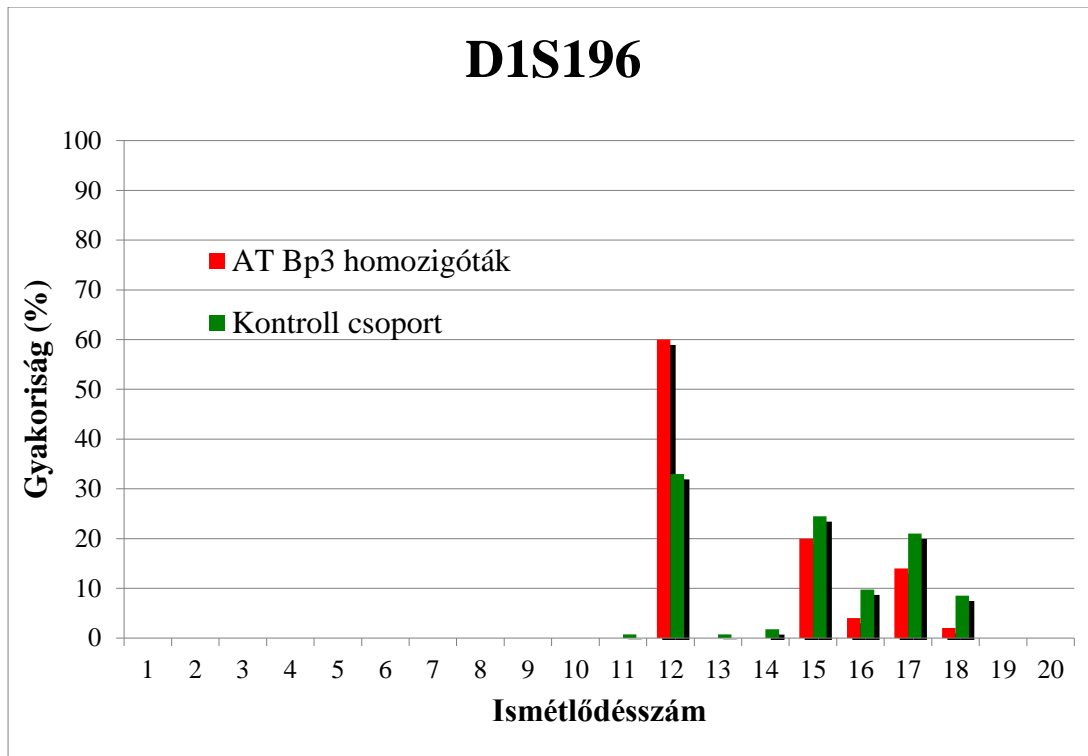
\*R: rövid, 32 bp; H: hosszú, 108 bp



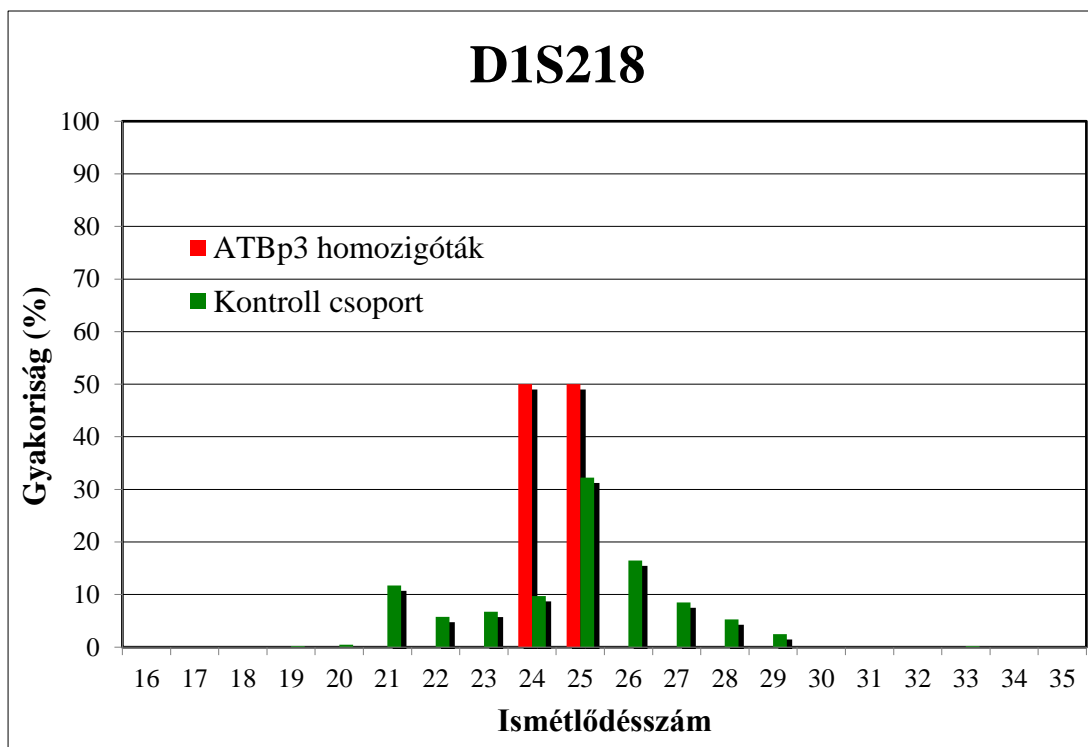
**7. ábra** Az alapító hatás kapcsán vizsgált Alu5 mikroszatellita marker ismétlődésszámjai az AT Bp3 homozigóta és a kontroll csoport esetében.



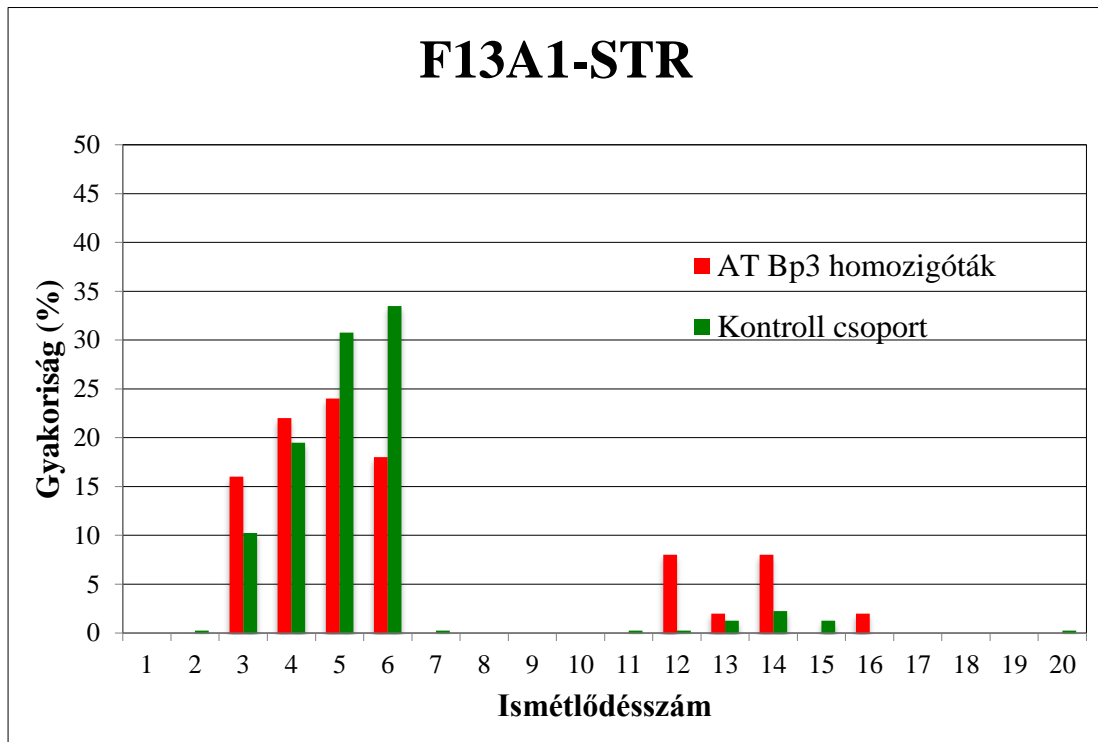
**8. ábra** Az alapító hatás kapcsán vizsgált Alu8 mikroszatellita marker ismétlődésszámjai az AT Bp3 homozigóta és a kontroll csoport esetében.



**9. ábra** Az alapító hatás kapcsán vizsgált D1S196 mikroszatellita marker ismétlődésszámjai az AT Bp3 homozigóta és a kontroll csoport esetében.



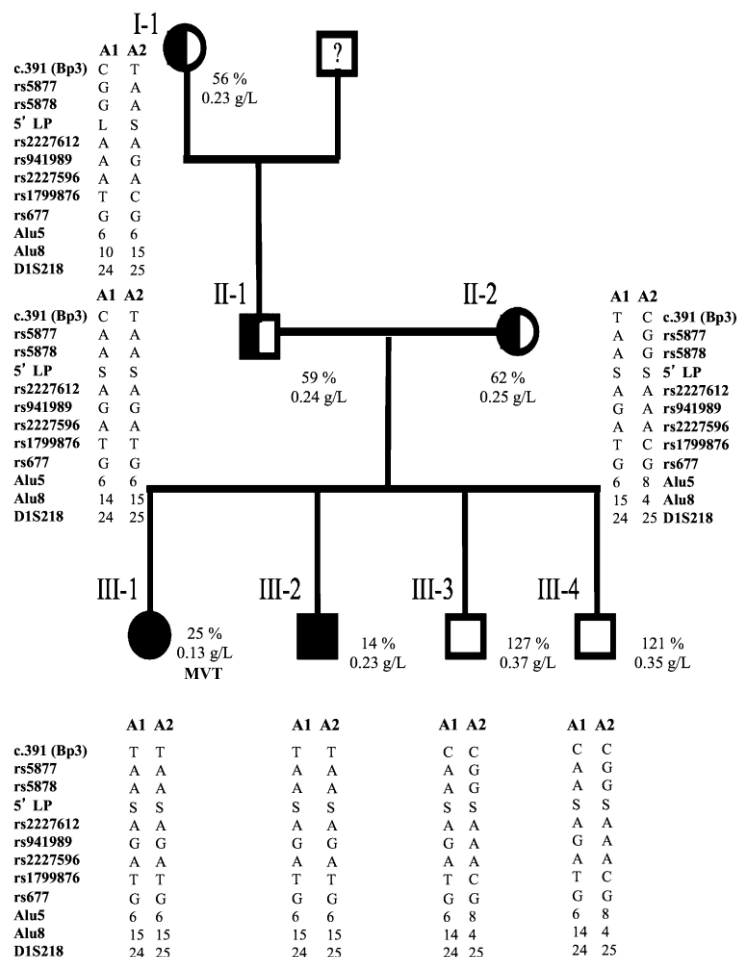
**10. ábra** Az alapító hatás kapcsán vizsgált D1S218 mikroszatellita marker ismétlődésszámjai az AT Bp3 homozigóta és a kontroll csoport esetében.



**11. ábra** Az alapító hatás kapcsán vizsgált F13A1-STR marker ismétlődésszámai az AT Bp3 homozigóta és a kontroll csoport esetében.

Az Alu5 és Alu8 (ATT)<sub>n</sub> markerek a *SERPINC1* gén 5 intronjában, a D1S218 (AC)<sub>n</sub> a *SERPINC1* géntől disztálisan, a D1S196 (AC)<sub>n</sub> marker a *SERPINC1* géntől proximálisan helyezkedik el.

Ahol lehetőségünk volt, informatív családfákat is generáltunk, feltüntetve a megfigyelt haplotípusokkal; erről egy példa a 12. ábrán látható.



**12. ábra** Az AT Bp3 mutációt hordozó, három generációt reprezentáló család

Ahol alkalmunk volt rá, feltüntettük a mért hc-anti-FXa AT aktivitást és AT antigén értékeket. Az A1 és A2 minden beteg két allélját jelöli.

Az üres szimbólum az AT Bp3 mutációt nem hordozó, a teli szimbólum az AT Bp3 mutációt homozigóta formában hordozó, a félig teli szimbólum az AT Bp3 heterozigóta egyéneket jelöli, A “?” az ismeretlen genotípusra utal.

## 6.1.2 Új *SERPINC1* eltérések

### *Genotípus-fenotípus összefüggések az új SERPINC1 eltérést hordozó betegekben*

A 31 különböző *SERPINC1* genetikai eltérés közül 11 új, az irodalomban még nem ismertetett eltérés. A 13. táblázat mutatja ezen mutációkat, az adott mutációkat hordozó betegek legfontosabb klinikai és laboratóriumi jellemzőit. E mutációk közül tíz I-es típusú, egy II-es típusú AT deficienciát eredményez.

Tízből 5 mutáció korai STOP kodont (p.Arg79ProfsTer34, p.Lys171ValfsTer16, p.Ser183SerfsTer100, p.Leu270ArgfsTer14 és p.Leu340LeufsTer5) eredményez, mely eltéréseket összesen 7 egyén hordozza. Egy tünetmentes hordozó kivételével (aki 37 éves a diagnózis idején), mindegyikük fiatal korban (<40 év) már átesett az első TE-n. További rizikófaktort egy esetben sem tudtunk kimutatni. Egy-egy p.Lys171ValfsTer16, p.Arg79ProfsTer23 és p.Leu270ArgfsTer14 mutációt hordozó egyén két vagy több TE-t szenvedett el; utóbbi összesen 4 TE-t, annak ellenére, hogy K-vitamin antagonistá és LMWH (kis molekulású heparin) terápián volt. Jelenleg ez a beteg rivaroxaban terápiában részesül.

A p.Gly456delinsAlaThr mutációt hordozó nőbeteg két MVT-n esett át, az egyik alkalommal terhesség alatt.

A misszensz p.Leu205Pro mutációt összesen 11 személy hordozta, ezen mutáció biokémiai karakterizálását is elvégeztük (lásd később). Két p.Asn450Ile mutáció hordozó egyén MVT-n esett át; egyikük kétszer, ő FVL heterozigóta is.

Az egyetlen II-es típusú eltérés valószínűleg II.PE altípusba sorolható. A mutációt hordozó hölgy 62 évesen szenvedett el TE-t, kiemelendő, hogy a BMI-je 32.

Az új I-es típusú mutációk mindegyike súlyos TE-val jár, az analízis idején tünetmentes személyek még fiatalok. A tünetet mutató személyeknél gyakori volt a rekurrens trombózis előfordulása és az esetek többségében nem provokált TE zajlott.

13. táblázat Genotípus-fenotípus összefüggések az új *SERPINC1* eltérést hordozó betegekben

Sor-szám	Exon	Nukleotid pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Aminosav pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Beteg azonosító	Nem	hc-anti- FXa aktivitás (%)	p-anti FXa aktivitás (%)	AT antigén (g/L)	Tünetek	Kor az első esemény idején (évek)	Kor a diagnózis idején (évek)	provokált trombózis (igen/nem)
1	2	c.236-239del	p.Arg79ProfsTer34	1/1	N	62	67	0,14	IPE, rekurrens MVT	21	27	igen (OA)
2	3	c.511-512del	p.Lys171ValfsTer16	2/1	N	59 <sup>a</sup>	NA	NA	Trombózis sinus cerebri, MVT/PE	34	40	nem
				2/2	N	61 <sup>a</sup>	NA	NA	1 MVT	21	61	igen (terhesség)
				2/3	F	49 <sup>a</sup>	NA	NA	0	NÉ	37	NÉ
3	3	c.548Cdel	p.Ser183SerfsTer100	3/1	N	58 <sup>a</sup>	NA	NA	1 MVT	19	21	igen (OA)
4	3	c.614T>C	p.Leu205Pro	4/1	F	50	66	0,16	1 MVT	34	39	nem
				4/2	F	61	76	0,16	0	NÉ	15	nem
				4/3	N	58	-	0,18	rekurrens MVT, rekurrens FVT	35	69	nem
				4/4	N	55	-	0,18	rekurrens MVT	40	64	nem
				4/5	N	65	-	0,15	rekurrens MVT	42	66	nem
				4/6	F	63	-	-	1 MVT	32	20	nem
				4/7	F	56	75	0,15	0	NÉ	17	NÉ
				4/8	F	57	63	0,15	0	NÉ	17	NÉ
				4/9	N	54	56	0,16	2 MVT	34	72	igen (terhesség)
				4/10	N	58	62	0,16	2 MVT	31	47	igen (terhesség)
				4/11	N	59	65	0,15	0	NÉ	19	NÉ
5	5	c.809del	p.Leu270ArgfsTer14	5/1	F	56	60	0,16	5 MVT	16	59	nem
6	5	c.1019-1022del	p.Leu340LeufsTer5	6/1	N	42 <sup>a</sup>	NA	NA	1 MVT	22	23	nem

7	5	c.1039_1098dup	p.Met347_Gln366dup	7/1	F	48	71	0,14	1 MVT	27	27	igen (1,5 óras repülőút)
				7/2	N	56	76	0,16	1 MVT	60	58	nem
8	IVS6	c.1219-1G>C	-	8/1	F	60	61	0,14	1 PE	24	24	nem
9	7	c.1349A>T	p.Asn450Ile	9/1	N	55	60	0,15	1 MVT	23	30	nem
				9/2	F	59	62	0,16	2 MVT <sup>b</sup>	40	55	nem
				9/3	N	49	52	0,14	0	NÉ	27	NÉ
				9/4	F	60	59	0,15	0	NÉ	27	NÉ
10	7	c.1367-1368del, c.1367-1371ins	p.Gly456delinsAlaThr	10/1	N	54	46	0,15	2 MVT <sup>b</sup>	27	33	igen (terhesség)
11	7	c.1381C>A	p.Pro461Thr	11/1	N	31 <sup>a</sup>	-	0,21	1 MVT <sup>c</sup>	62	62	nem

HGVS: Human Genome Variation Society; NA: nincs adat; NÉ: nem értelmezhető; F: férfi; N: nő; MVT: mélyvénás trombózis; PE: tüdőembólia; FVT: felületes véna

trombózis, OA: orális antikoncpciens

Referencia tartományok:

- hc-anti-FXa aktivitás: 80-120%
- p-anti-FXa aktivitás: 82-118%
- AT antigén: 0,19-0,31 g/L

<sup>a</sup> más laboratóriumban mért érték

<sup>b</sup> Faktor V Leiden heterozigóta

<sup>c</sup> BMI: 32 kg/m<sup>2</sup>

## Új mutációk patogenitásának vizsgálata *in silico* módszerekkel

Az általunk alkalmazott *in silico* predikciós módszerek (PolyPhen2, MutPred és PhD\_SNP) a misszensz mutációk patogenitásának vizsgálatára alkalmasak. Pozitív kontrollként az AT Bp3 (p.Leu131Phe; II.HBS) és az AT Cambridge II (p.Ala416Ser; II.RS) mutációkat alkalmaztuk, mivel ezek patogenitását már *in vitro* módszerekkel is igazolták. A predikciós módszerek mindhárom (p.Leu205Pro, p.Asn450Ile és p.Pro461Thr) új misszensz mutációt patogénnek minősítették (14. táblázat). Érdekes, hogy az AT Bp3 mutáció esetében a PhD\_SNP módszer határérték eredményt mutatott.

**14. táblázat** Az *in silico* módszerekkel kapott predikciós értékek

		PolyPhen2				MutPred		PhD_SNP	
		humdiv		humvar					
Mutáció	típusa	predikció	érték	predikció	érték	predikció	érték	predikció	érték
p.Leu131Phe	II. HBS	patogén	1,000	patogén	0,999	patogén	0,924	határérték	0,490
p.Leu205Pro	új	patogén	1,000	patogén	0,999	patogén	0,822	patogén	0,870
p.Ala416Ser	II. RS	patogén	1,000	patogén	1,000	patogén	0,961	patogén	0,746
p.Asn450Ile	új	patogén	1,000	patogén	0,999	patogén	0,688	patogén	0,840
p.Pro461Thr	új	patogén	1,000	patogén	0,993	patogén	0,938	patogén	0,703

A mutációk valószínűleg ártalmatlanok, ha a predikció értéke 0,5 alatt vagy valószínűleg patogének, ha az érték 0,5 fölött van. (Balogh Gábor és Komáromi István elemzése)

Homológia vizsgálatot is végeztünk e három misszensz eltérés esetében. Összehasonlítottuk a humán, az orángután, az egér, a szarvasmarha és a juh AT fehérje mintázatát (13. ábra). Mindhárom eltérés konzervatív régióra esik, ez is megerősíti a predikciós módszerek eredményét, azaz ezen új eltérések patogénnek mondhatóak.

A,

**p.Leu205Pro**

↓

```

SP|P01008|ANT3_HUMAN      190 QDISELVYGAKLQPLDFKENAEQSRRAINKWVSNKTEGRITDVI PSEAINELTVLVLVNTIYFKG 255
SP|Q5R5A3|ANT3_PONAB     190 QDISELVYGAKLQPLDFKENAEQSRRAINKWVSNKTEGRITDVI PPEAINELTVLVLVNTIYFKG 255
SP|P32261|ANT3_MOUSE     191 QDVSEVVYGAKLQPLDFKENPEQSRVTINNWVANKTEGRIKDVI PPGAINELTALVLVNTIYFKG 256
SP|P41361|ANT3_BOVIN     191 QDISEVVYGAKLQPLDFKGNAEQSRLTINQWISNKTEGRITDVI PPAINEFTVLVLVNTIYFKG 256
SP|P32262|ANT3_SHEEP     191 QDISEVVYGAKLQPLDFKGNAEQSRLTINQWISNKTEGRITDVI PPAIDEFTVLVLVNTIYFKG 256
    
```

B,

**p.Asn450Ile p.Pro461Thr**

↓ ↓

```

SP|P01008|ANT3_HUMAN      399 FHKAFLEVNEEGSEAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLV FVIREVPLNTIIFMGRVANPCVK 464
SP|Q5R5A3|ANT3_PONAB     399 FHKAFLEVNEEGSEAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLV FVIREVPLNTIIFMGRVANPCVK 464
SP|P32261|ANT3_MOUSE     400 FHKAFLEVNEEGSEAAASTSVVITGRSLNPNRVTFKANRPFLV LIREVALNTIIFMGRVANPCVN 465
SP|P41361|ANT3_BOVIN     400 FHKAFLEVNEEGSEAAASTVISIAGRSLNSDRVTFKANRPILV LIREVALNTIIFMGRVANPCVD 465
SP|P32262|ANT3_SHEEP     400 FHKAFLEVNEEGSEAAASTVISIAGRSLNPNRVTFQANRPFLV LIREVALNTIIFMGRVANPCVN 465
    
```

## 13. ábra Szekvencia összehasonlítás a humán és egyéb fajok antitrombin fehérjében

HUMAN: Homo Sapiens; PONAB: orángután; MOUSE: egér; BOVIN: szarvasmarha; SHEEP: juh

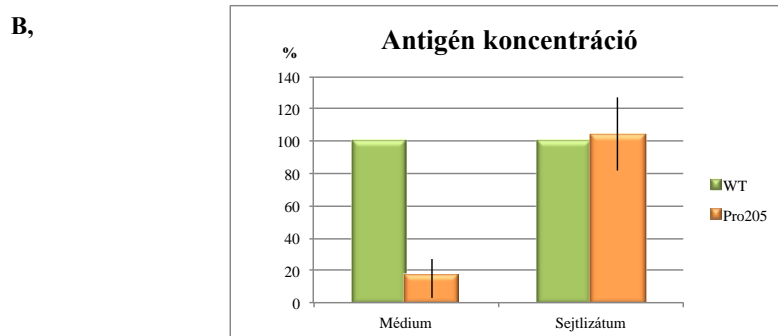
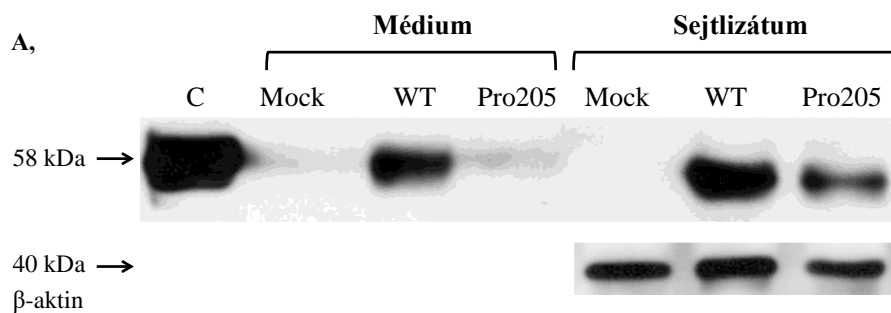
### ***Új mutáció patogenitásának vizsgálata biokémiai módszerekkel***

A dolgozat megírásának időpontjáig a p.Leu205Pro mutáció következményeinek *in vitro* módszerekkel történő vizsgálata fejeződött be. Tranziens transzfekeciót alkalmazva HEK293 sejtekben termeltettük meg a vad típusú (WT) és a mutáns (Pro205) AT fehérjét. Az expresszált fehérjék szintjét ELISA módszer segítségével határoztuk meg és Western blot technikával vizualizáltuk (15. ábra). A termeltetett AT funkcionális tulajdonságait hc-anti-FXa teszttel tanulmányoztuk.

A termeltetett WT AT egy markáns sávként, míg a Pro205 AT fehérje egy halvány sávként jelent meg 58 kDa magasságnál a sejtek felülúszójából (14A. ábra). A sejtlyátumban szintén egy magasságban jelentek meg a termeltetett fehérjék. Ahogy várható volt, a Mock mintában nem tudtuk AT fehérjét kimutatni.

Az AT antigén koncentrációt 4 független transzfekecióból, ELISA módszerrel határoztuk meg (duplikátumban, 48 órával a transzfekeciót követően). A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásra korrigáltuk a transzfekeciós hatékonyságot. Az AT koncentráció a WT plazmiddal transzfekektált sejtek felülúszójában  $2,33 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$ , míg a Pro205 mutánssal transzfekektált sejtekében csak  $0,56 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$  volt (14B. ábra). A WB-nak megfelelően a sejtlyátumban az AT koncentráció  $2,83 \pm 1,40 \mu\text{g/mg}$  fehérje a WT és  $2,86 \pm 1,10 \mu\text{g/mg}$  fehérje a mutáns AT esetében.

A rekombináns fehérjék specifikus aktivitásának meghatározásához a termeltetett fehérjék hc-anti-FXa aktivitását határoztuk meg 3 független kísérletben az AT antigén koncentráció mérése mellett. Az így kapott AT antigén koncentrációk a WT esetében  $0,21 \pm 0,06 \text{ mg/mL}$  és a Pro205 esetében  $0,06 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ . Az amidolitikus tesztet elvégezve az AT aktivitás értékek WT esetében  $1,576 \pm 0,001 \text{ U/mL}$  és a Pro205 esetében  $0,221 \pm 0,058 \text{ U/mL}$ -nek adódtak. Így az átlagos specifikus aktivitás (1 mg AT fehérjére vonatkoztatva) 3 független kísérletből a WT AT-ra nézve  $7,79 \pm 2,10 \text{ U/mg}$  volt, míg a Pro205 AT-ra vonatkoztatva  $3,94 \pm 0,95 \text{ U/mg}$ .



**14. ábra** A vad típusú (WT) és a Pro205 mutáns AT fehérjék expressziójának detektálása Western blot (A) és ELISA (B) módszerekkel

A. Az SDS-PAGE analízis nem-redukáló körülmények között zajlott. A pozitív kontrol (C) 5 egészséges egyéntől származó, 40-szeresen hígított plazma volt. Negatív kontrollként a „mock” transzfektált sejteket használtuk. A béta-aktint alkalmaztuk, mint belső kontroll.

B. Az AT antigén szinteket 4 független kísérletben, ELISA módszer segítségével határoztuk meg a transzfektált HEK293 sejtek médiumából és sejtlizátumából. Az eredményeket normalizáltuk a transzfekciós hatékonyságra és az expresszió mértéke a WT átlag koncentrációjának százalékában lett megadva. A szórások fel vannak tüntetve az oszlopdigrammon.

### 6.1.3 Genotípus-fenotípus összefüggések a *SERPINC1* mutációhordozó gyermekekben és fiatal felnőttekben

A 246 AT deficiens beteg közül 32-en gyermek- és fiatal felnőttkorban ( $\leq 18$  éves kor) estek át trombotikus eseményen (15. táblázat). A gyermekek és fiatal felnőttek többsége ( $n=25$ ) II.HBS altípusú mutációt és többségük ( $n=18$ ) az AT Bp3 mutációt hordozza homozigóta formában. Az AT Bp3 mutációt 7 gyermek és fiatal felnőtt hordozta heterozigóta formában, 2 gyermek AT Basel, egy gyermek AT Truro hordozó. Egyikük egy II.PE (AT Bp5) eltérést és 3 gyermek I-es típusú (p.Ile218del, p.Leu270ArgfsTer13 és teljes *SERPINC1* gén deléció) mutációt hordozott.

A 0-1 éves korcsoportban ( $n=7$ ) egy gyermek kivételével mindegyikük AT Bp3 homozigóta hordozó. Egyikük FVL heterozigóta, míg 2 gyermek érfejlődési rendellenességgel (vena cava inferior aplasia és hypoplasia mindkét oldali vena iliaca hypoplasiaival és vena cava inferior, ill. vena iliaca communis hypoplasia) született. A trombózist közvetlenül kiváltó provokáló tényezőt egyiküknél sem regisztráltunk. Az AT Truro mutációt hordozó újszülött sinus sagittalis trombózison esett át és agyi vena hypoplasiaja van.

A 2-11 éves korcsoportban csak 4 esetet találtunk, egy 2 éves gyermek érfejlődési rendellenességgel született és egy 10 évesen TE-n átesett gyermek FVL heterozigóta hordozó is.

A 12-18 éves korcsoportban ( $n=20$ ) 15 AT Bp3 mutáció hordozót detektáltunk, 4 esetben fordult elő provokáló tényező (2 terhesség, 1 szülés után, 1 műtét). Nem találtunk továbbá sem egyéb öröklött, sem szerzett trombózis rizikó faktorokat a háttérben. Egy AT Basel mutáció hordozó MI-n és iszkémiás stroke-n is átesett, 2 AT Bp3 heterozigóta pedig szintén iszkémiás stroke-n esett át.

**15. táblázat** Genotípus-fenotípus összefüggések a *SERPINC1* mutációhordozó gyermekekben.

Sorszám	Exon	Nukleotid pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Aminosav pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Beteg azonosító	Nem	Tünetek	Kor az első esemény idején (évek)	provokált trombózis <sup>b</sup> (igen/nem)
1	2	c.218C>T	p.Pro73Leu (AT Basel)	1/1	N	MVT	16	nem
				1/2	F	1 MI, 1 stroke	15	nem
2	2	c.391C>T	p.Leu131Phe (AT Bp3) homozigóta	2/1	N	MVT	1	nem
				2/2	F	MVT	3	nem
				2/3	F	MVT	14	nem
				2/4	F	PE	14 nap	nem
				2/5	F	MVT	12	nem
				2/6	N	MVT	14	nem
				2/7	N	2 MVT, 1 PE	15	nem
				2/8	F	MVT, PE	7 nap	nem
				2/9	N	2 MVT	17	igen (terhesség)
				2/10	F	5 MVT	13	nem
				2/11	N	2 MVT	16	igen (terhesség)
				2/12	N	MVT	2 nap	nem
				2/13	F	4 MVT	16 nap <sup>a</sup>	nem
				2/14	N	MVT	14	nem
				2/15	N	MVT	15	nem
				2/16	N	MVT	12	nem
				2/17	N	MVT	13	nem
				2/18	N	MVT	14	nem
			p.Leu131Phe (AT Bp3) heterozigóta	2/17	F	stroke	14	nem
				2/18	F	MVT	13	nem
				2/19	F	stroke	2	nem
				2/20	N	MVT	9	nem
				2/21	N	6 MVT, 1 PE	17	nem
2/22	F	MVT		1	nem			
2/23	N	stroke	18	igen (posztpartum)				
3	4	c.652-654del	p.Ile218del	3/1	N	1 MVT	14	igen (műtét)
4	5	c.805G>A	p.Gly269Lys (AT Truro)	4/1	F	sinus sagittalis trombózis	22 nap	nem
5	5	c.807del	p.Leu270ArgfsTer13	5/1	F	5 MVT	16	nem
6	7	c.1318C>A	p.Pro439Thr (AT Budapest 5)	6/1	F	2 MVT	16	nem
				6/2	F	0	NÉ	nem
7	5	c.1-1392del	p.Met1-Term464	7/1	N	2	10 <sup>a</sup>	nem
				7/2	F	0	NÉ	nem

<sup>a</sup> Faktor V Leiden mutáció hordozó heterozigóta formában, más öröklött rizikófaktort nem detektáltunk

<sup>b</sup> kizárólag provokáló tényezőket (vagyis a VTE diagnózisa előtt 1 hónapon belül valamilyen szerzett rizikófaktort regisztráltak) detektáltunk és ún. "szerzett kockázati tényezők" (pl.krónikus események) nem fordultak elő

NÉ: nem értelmezhető; F: férfi; N: nő; MVT: mélyvénás trombózis; PE: tüdőembólia; MI: miokardiális infarktus

#### 6.1.4 Antitrombin deficiens betegek laboratóriumi fenotípusa

A hc-anti-FXa AT aktivitás és a p-anti-FXa aktivitás értékek alacsonyak és jól korrelálnak az I-es típusú AT deficiens betegekben (8. és 16. táblázat). Az AT antigén értékek is minden esetben a referencia tartomány alsó határa alá esnek.

Mind a hc-anti-FXa AT aktivitás és a p-anti-FXa aktivitás értékek alacsonyak a II.RS és II.PE betegekben és az AT antigén szintek a referencia tartományba esnek (9. és 16. táblázat). A II.HBS betegek AT szintjei különböznek a mutáció típusától függően. A hc-anti-FXa AT aktivitás alacsony a II.HBS altípusban, míg a p-anti-FXa AT aktivitás normál, így a magas p-anti-FXa/hc-anti-FXa AT aktivitás arány segít különbséget tenni a II.HBS és a többi II.altípus között [7, 77].

Az általunk használt hc-anti-FXa diagnosztikus teszt minden esetben alacsony, azaz a referencia tartomány alsó határa alatti AT aktivitás értéket mutatott a II.HBS egyénekben (100% szenzitivitású). Az AT Basel és az AT Padua I esetében a p-anti-FXa aktivitás és az AT antigén koncentráció minden esetben a referencia tartományon belül van; a p-anti-FXa/hc-anti-FXa arány mediánja AT Basel esetében: 1,66 (tartomány 1,53-2,05) és AT Padua I esetében: 1,89 (tartomány 1,71-2,10) (9. táblázat). Néhány AT Bp3 mutációt hordozó egyén esetében referencia tartomány alatti p-anti-FXa aktivitás és AT antigén koncentráció értékeket detektáltunk, ez leginkább a homozigóta egyéneknél fordult elő. A p-anti-FXa/hc-anti FXa arány mediánja a heterozigótáknál: 1,51 (tartomány: 1,28-2,11) és a homozigótáknál: 5,60 (tartomány: 2,88-8,85). Amennyiben a Bp3 heterozigóta egyéneket két csoportba osztjuk az alapján, hogy volt-e trombotikus eseményük vagy sem, a hc-anti-FXa aktivitások hasonlóak (medián AT aktivitás: 53%, tartomány 34-65% mindkét csoportban;  $p=0,617$ ). Az AT antigén koncentráció sem különbözik a két csoportban (tünetesek mediánja: 0,25 g/L, 0,18-0,28 g/L és tünetmentesek mediánja: 0,24 g/L, tartomány: 0,21-0,30 g/L;  $p=0,691$ ). A p-anti-FXa aktivitás a tünetekkel rendelkező AT Bp3 heterozigóta hordozókban szignifikánsan alacsonyabb (tünetesek mediánja: 85%, tartomány 60-107% és tünetmentesek mediánja: 91%, tartomány: 74-111%;  $p=0,011$ ).

A diagnózishoz használt funkcionális esszét 2 hasonló (FXa alapú, heparin jelenlétében), a kereskedelemben kapható kittel hasonlítottuk össze (16. táblázat). Az esszék hasonló eredményt adtak a II.RS és II.PE betegek esetén. A II.HBS AT Padua I és Basel AT aktivitás értékei közül egy jelentősen különbözött a három esszé

alkalmazásakor. Míg a Siemens AT esszé és a mi diagnosztikus teszünk alacsony AT aktivitást mutatott minden esetben, addig a HemosIL teszt nem érzékelte ezeket a mutánsokat, mivel a mért AT aktivitás értékek a referencia tartományba estek. Az AT Bp3 homozigóta AT aktivitás értékek mindhárom teszttel csökkent értéket mutattak, azonban a HemosIL teszttel szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk, mintha ezen egyének heterozigóta genotípusúak lennének. A HemosIL teszt érzékenysége az AT Bp3 heterozigóták esetében mindössze 44% volt.

Annak vizsgálatára, hogy a hc-anti-FXa tesztek esetében mely tényezők befolyásolhatják a tesztek szenzitivitását, saját, diagnosztikus tesztként használt hc-anti-FXa tesztrendszerünkben, mely 100%-os szenzitivitású, változtattuk a heparin koncentrációt és a pH-t (15. ábra és 17. táblázat). Az eredeti reagens pH csökkentésével az AT Bp3 heterozigóta minták esetében csekély hc-anti-FXa szint változást tapasztaltunk, míg az AT Basel, de főként az AT Padua I minták esetében jelentősen emelkedett a detektált hc-anti-FXa aktivitás, két AT Padua I minta esetében a mért érték a normál tartományba esett. A heparin koncentráció emelésével minden esetben emelkedett az AT aktivitás, egy AT Padua I minta esetében el is érte a referencia tartomány alsó határát. Ha az esszé körülményei pH 7.4-re változtak az emelt heparin koncentráció mellett, az AT aktivitás értékek tovább emelkedtek elérve, vagy meghaladva a referencia tartomány alsó határát 2 AT Basel és 1 AT Padua I minta esetében. Amennyiben a heparin koncentrációt az eredeti 8-szorosára emeltük az AT Basel és az AT Padua I minták mindegyike normál AT aktivitás értéket mutatott. Az AT Bp3 minták AT aktivitás értékei nem növekedtek tovább.

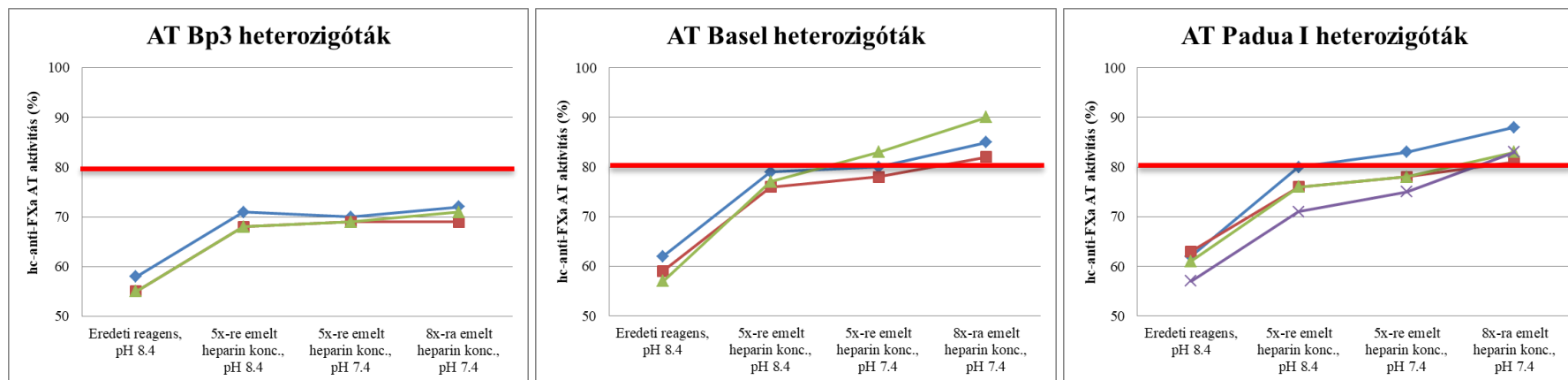
16. táblázat A laboratóriumi fenotípusok összehasonlítása a különböző AT deficienciákban

	Aminosav pozíció	Heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitás (%)			Progresszív anti-FXa AT aktivitás (%)	AT antigén (g/L)
		Siemens Innovance AT	HemosIL AT	Labexpert Antithrombin H+P		
<b>I-es típus</b>		57 (39-67) n=22	45 (30-62) n=11	53 (43-66) n=21	67 (53-81) n=22	0,16 (0,13-0,19) n=22
<b>II.RS típus</b>		53 (52-64) n=2	58 n=1	52 (50-54) n=2	69 (61-77) n=2	0,26 (0,22-0,27) n=3
<b>II.PE típus</b>		56 (53-73) n=9	55 (54-56) n=3	65 (53-76) n=9	69 (58-78) n=9	0,21 (0,18-0,26) n=9
<b>II.HBS típus</b>	p.Pro73Leu (AT Basel)	59 (50-68) n=5	<b>107 (105-108)</b> n=3	64 (52-74) n=5	99 (97-117) n=6	0,28 (0,25-0,32) n=7
	p.Arg79His (AT Padua I)	63 (54-73) n=14	<b>112 (96-129)</b> n=10	65 (48-69) n=14	118 (73-126) n=15	0,30 (0,28-0,35) n=15
	p.Leu131Phe (AT Budapest3) <i>Homozigóták</i>	17 (12-46) n=18	<b>45 (42-53)</b> n=10	11 (8-28) n=20	70 (56-100) n=21	0,20 (0,13-0,28) n=25
	p.Leu131Phe (AT Budapest3) <i>Heterozigóták</i>	58 (42-73) n=85	<b>82 (55-103)</b> n=25	56 (36-71) n=85	84 (60-122) n=92	0,25 (0,19-0,35) n=102

AT: antitrombin; II.HBS: heparin kötő régió; II.RS típus: reaktív centrumot érintő régió; II.PE típus: pleiotrop hatást eredményező altípus.

Referencia tartományok:

- hc-anti-FXa aktivitás: 80-120%
- p-anti-FXa aktivitás: 82-118%
- AT antigén: 0,19-0,31 g/L



15. ábra Az esszé módosítások hatása az AT Budapest 3 (A), az AT Basel (B) és az AT Padua I (C) heterozigóta mintákon

A piros vízszintes vonal a referencia tartomány alsó határát jelöli.

17. táblázat A pH módosítás hatása az eredeti reagensben az AT Budapest 3 (A), az AT Basel (B) és az AT Padua I (C) heterozigóta mintákon

Heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitás (%)		
	Eredeti reagens, pH 8.4	Eredeti reagens, pH 7.4
AT Bp3 heterozigóták	1	55
	2	63
	3	56
	4	57
AT Basel heterozigóták	1	62
	2	61
AT Padua I heterozigóták	1	38
	2	66
	3	65

## 6.2 Osler-Rendu-Weber kór

### 6.2.1 Osler-Rendu-Weber kóros betegek diagnosztizálása

Az HHT gyanús betegek az egri Markhot Ferenc Oktatókórház és Rendelőintézet közreműködésével kerültek beválogatásra. A diagnosztikus protokoll első lépéseként azon orrvérző betegek, akik TA-kal rendelkeznek, alapos általános és fül-orr-gégészeti kivizsgáláson estek át. A családi anamnézis felvétele során felderítettük, hogy van-e a családban más egyén, aki orrvérző, TA-kal és/vagy AVM-kel rendelkezik. Az AVM jelenlétét különböző képalkotó módszerek (az agy kontrasztanyag MR, a tüdő és a máj CT vizsgálata) segítségével határozták meg.

Az északkelet-magyarországi régióból származó 34 HHT gyanús egyén (5 proband és 29 veszélyeztetett rokon) esetében a genetikai háttér feltérképezésekor fluoreszcens direkt szekvenálással az *ENG* génben genetikai eltérést nem tudtunk kimutatni. Tovább folytatva a vizsgálatokat 19 személynél az *ACVRL1* génben egy ezidáig ismeretlen genetikai eltérést, a c.625+1 G>C splice site eltérés hordozását figyeltük meg heterozigóta formában. Fizikai vizsgálatra 18 esetben került sor a mutációhordozók közül, náluk 13 esetben orrvérzéseket ( $25 \pm 12,6$  évesek) és 14 esetben TA-kat ( $39,5 \pm 13,7$  évesek) figyeltek meg. Négy esetben volt szükség transzfúzióra a súlyos orrvérzések következtében. Az AVM jelenlétét 11 felnőtt esetében vizsgálták, 4 esetben a májban találtak AVM-kat. Szintén 4 esetben figyeltek meg nem-vérző gyomor- és nyombél TA-kat. Agyi és tüdő AVM-k nem fordultak elő ebben a betegcsoportban.

Az 5 probandból négy beteg Heves megye déli részéről, egy pedig a szomszédos Jász-Nagykun-Szolnok megyéből származott. Tudomásuk szerint rokonsági kapcsolatban nem álltak egymással, azonban a felmenőik családnevei között volt egyezés. Az egymáshoz közeli régióban élő családokban ugyanazon splice site mutáció (*ACVRL1* c.625+1 G>C) hordozása kapcsán felmerült a rokonsági kapcsolat, illetve az alapító hatás gyanúja. Ennek feltérképezésére az 5 proband egyén, 22 hozzátartozó és 50 kontroll személy (akik bizonyítottan nem hordozzák az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt) esetében további genetikai vizsgálatokra, a HHT-s rokonságnál családfatérképek generálására is sort került.

## 5.2.2 Alapító hatás kimutatása Osler-Rendu-Weber kóros betegekben

A haplotípus analízis elvégzésekor 3 introni polimorf marker genotipizálására került sor a 15 HHT-s beteg és az 50 fős kontroll csoportban.

Az allélfrekvencia értékek a kontroll csoportban mindhárom SNP esetében jó közelítést mutatnak a HapMap kaukázusi populációra vonatkoztatott értékeivel (2015-ös adat, 18. táblázat). Ezzel szemben a HHT-betegek allélfrekvencia értékei jelentősen eltérnek a HapMap, és így a kontroll csoport allélfrekvencia értékeitől. Statisztikai analízisre nem került sor az alacsony esetszám miatt.

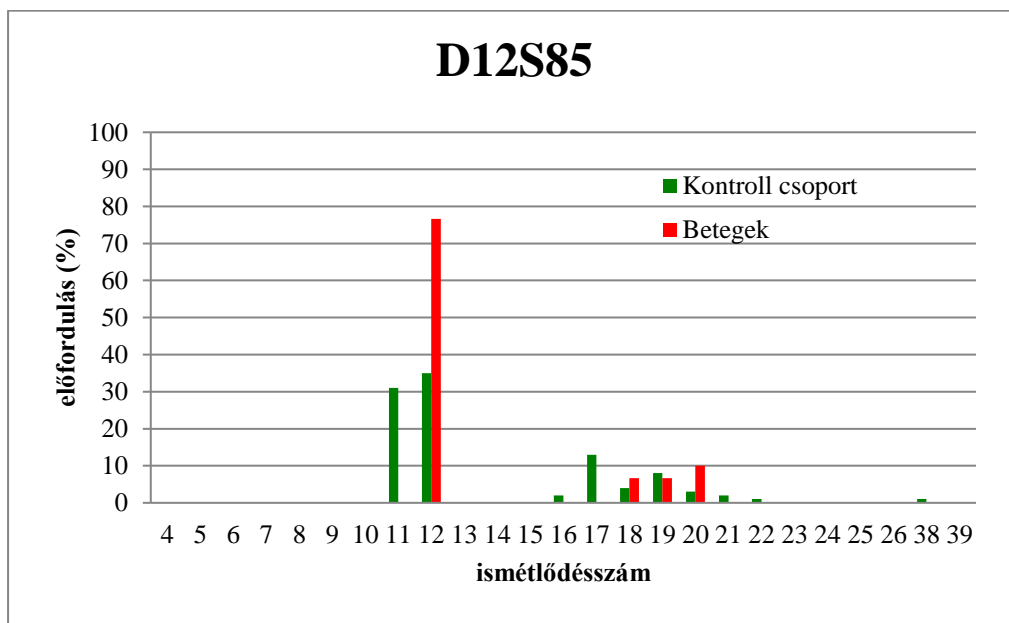
**18. táblázat** A vizsgált introni polimorf markerek MAF értékeinek összehasonlító táblázata a HHT-betegek, a populációs kontroll csoport és a HapMap adatok esetében.

<b>rs azonosító</b>	<b>HHT-betegek (n= 15) MAF</b>	<b>Kontroll csoport (n=50) MAF</b>	<b>HapMap CEU adat MAF</b>
rs2071219	0,32	0,54	0,56
rs706815	0,18	0,32	0,34
rs706816	0,18	0,32	0,34

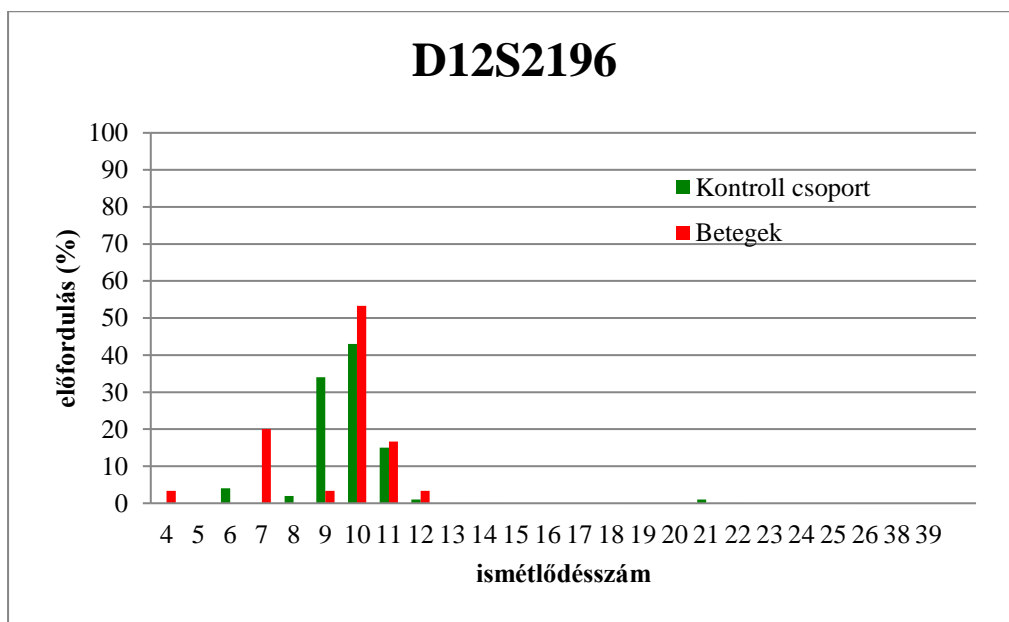
MAF= Minor Allél Frekvencia

A mikroszatellita markerek fluoreszcens fragmentanalízise során egy intragénikus (D12S1677), 2 proximálisan (D12S85, D12S196) és 2 disztálisan (D12S1712, D12S270) elhelyezkedő STR detektálását végeztük el. A D12S85 proximálisan távolabb elhelyezkedő marker a 12-es ismétlődésszámmal fordult elő a betegek 80%-ban, ezzel szemben a kontroll csoportban 11 és 38 közötti ismétlődésszámokat figyeltünk meg (16. ábra). A szintén proximálisan, de a génhez közelebb elhelyezkedő D12S196 marker a betegekben 10-es és 7-es ismétlődésszámmal, a kontroll csoportban szintén a 10-es, valamint a 9-es ismétlődésszám fordult elő leggyakrabban (17. ábra). A D12S1677 intragénikus marker esetében 60%-ban a 20-as, közel 25%-ban a 21-es ismétlődésszám jelent meg; míg a kontroll csoportban változatos ismétlődésszámokat regisztráltunk (18. ábra). Disztálisan, a génhez közelebb elhelyezkedő D12S1712 mikroszatellita esetében a betegek több mint 60%-nál, illetve a kontroll egyének többségénél is a 16-os ismétlődésszám volt a

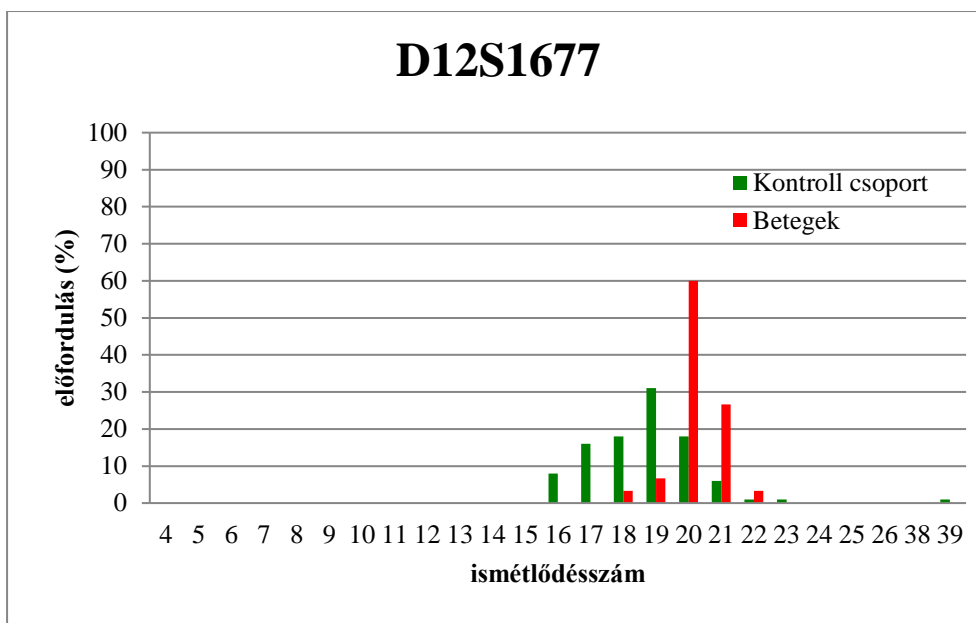
leggyakoribb (19. ábra). A disztálisan távolabb lévő D12S270 marker mind a betegek, mind a kontroll csoport vizsgálatakor változatos ismétlődésszámot mutatott (20. ábra).



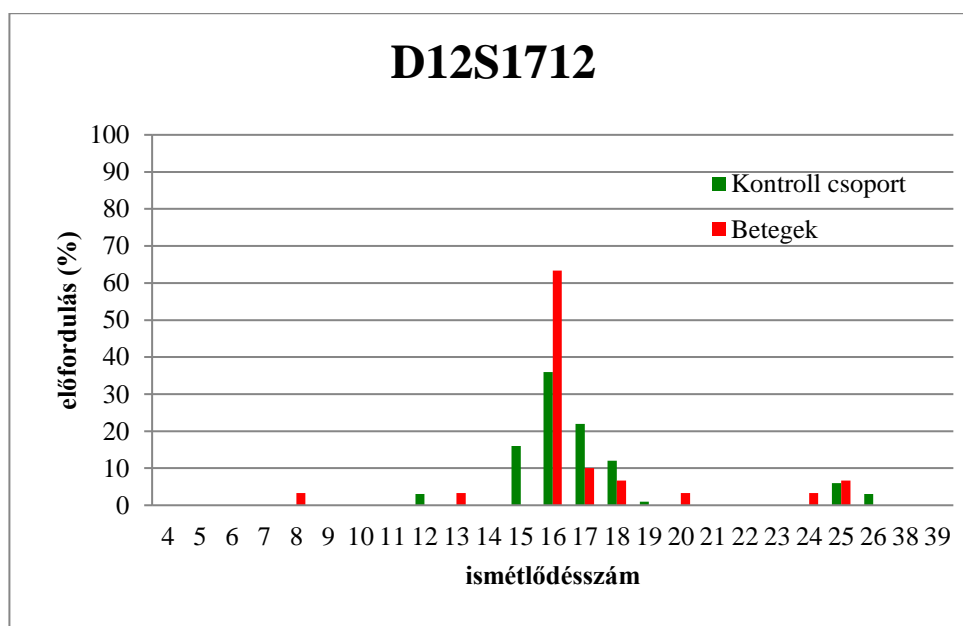
**16. ábra** A D12S85 mikroszatellita markerre jellemző ismétlődésszámok a HHT betegek és a populációs kontroll csoport esetében



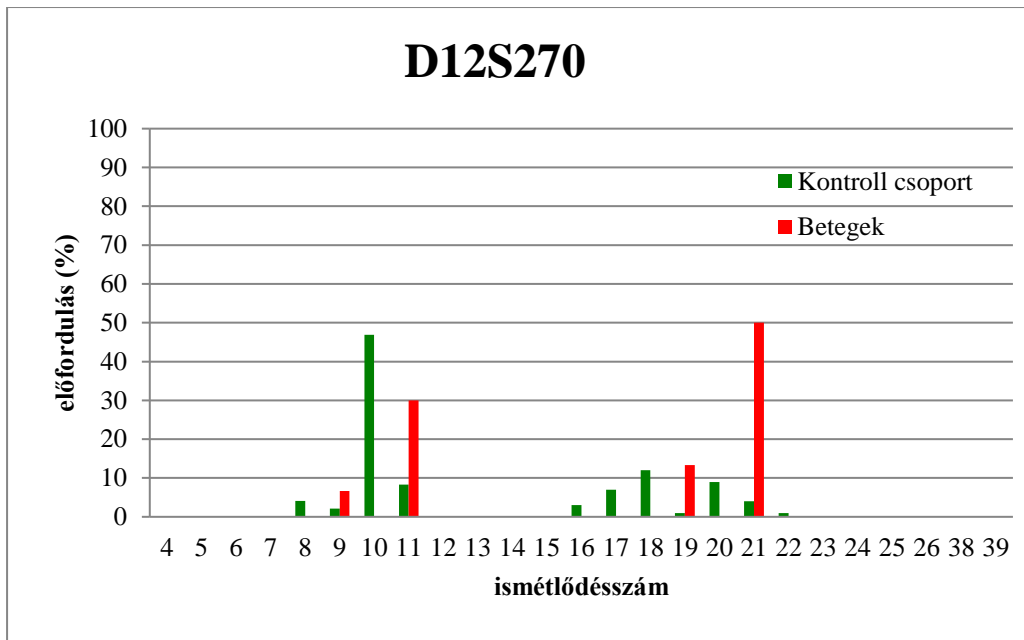
**17. ábra** A D12S2196 mikroszatellita markerre jellemző ismétlődésszámok a HHT-betegek és a populációs kontroll csoport esetében.



**18. ábra** A D12S1677 mikroszatellita markerre jellemző ismétlődésszámok a HHT-betegek és a populációs kontroll csoport esetében.

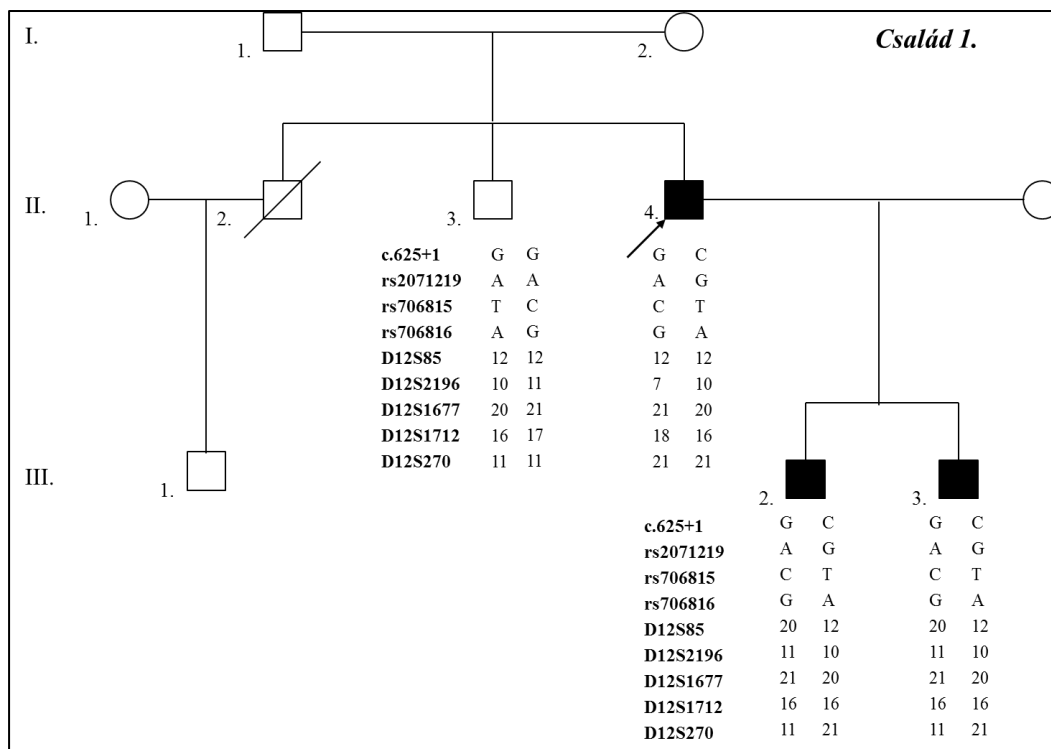


**19. ábra** A D12S1712 mikroszatellita markerre jellemző ismétlődésszámok a HHT-betegek és a populációs kontroll csoport esetében.



**20. ábra** A D12S270 mikroszatellita markerre jellemző ismétlődésszámok a HHT-betegek és a populációs kontroll csoport esetében.

A probandok családjait feltérképezve szemléletes családfákat készítettünk, melyeken feltüntettük a talált haplotípusokat (21-24. ábra). A mutációt hordozó egyéneknél ugyanazon haplotípust figyeltük meg a mutáns, „C” allélhez kapcsolódóan.

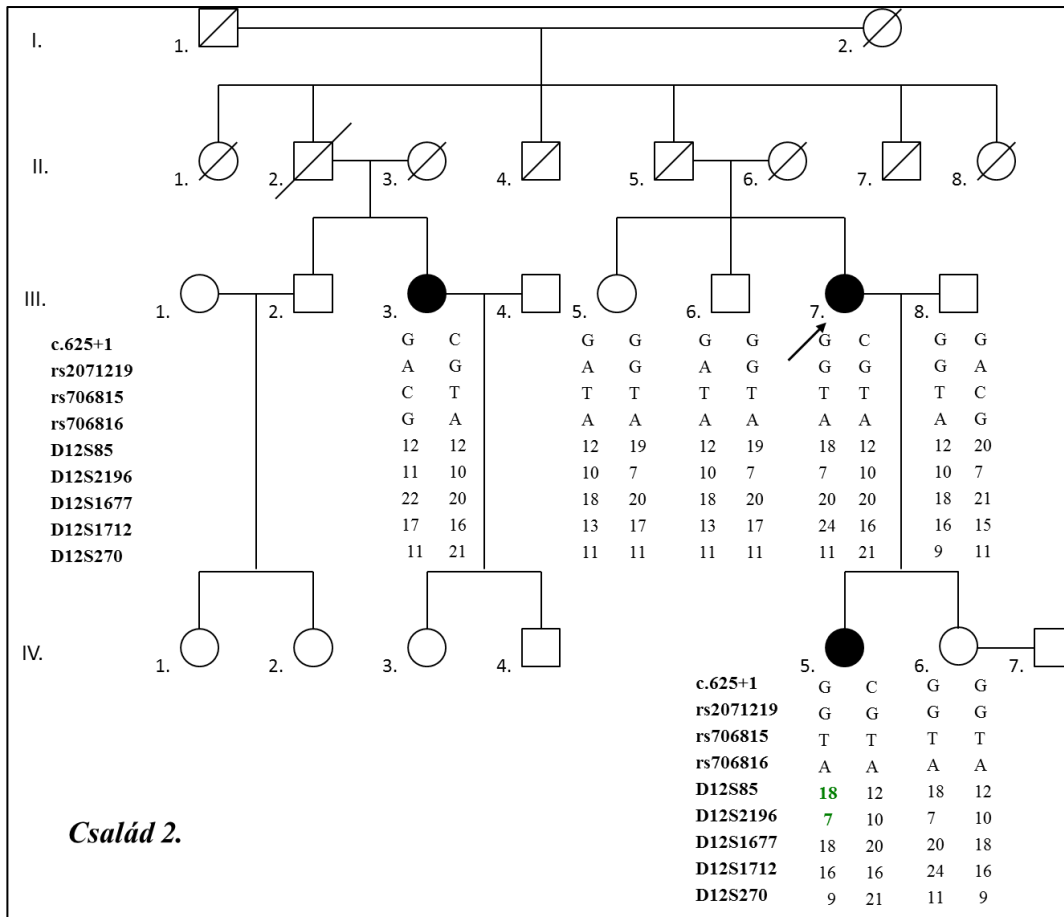


**21. ábra** Az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó 1. család családfatérképe haplotípusokkal kiegészítve

Jelmagyarázat:

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ egészséges nő (lány)</li> <li>□ egészséges férfi (fiú)</li> <li>● beteg nő</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ beteg férfi</li> <li>◊ elhunyt személyek</li> <li>●■ proband</li> </ul> |
|--|--|

Genetikai vizsgálat csak azon személyek esetében történt, akik szimbóluma alatt a genetikai markerek eredménye fel van tüntetve.

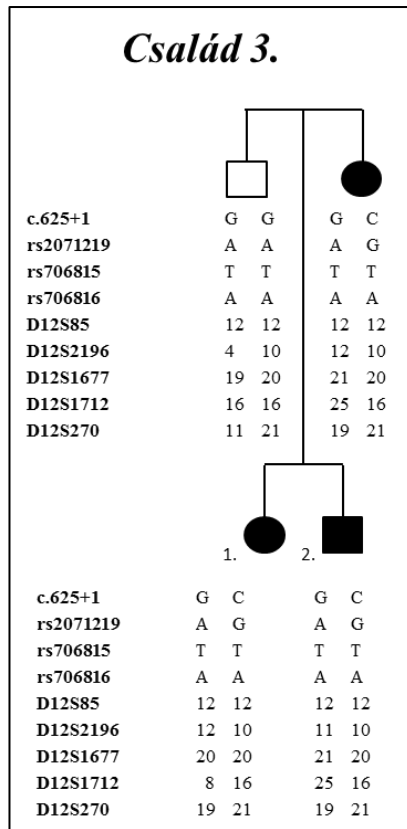


**22. ábra** Az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó 2. család családfatérképe haplotípusokkal kiegészítve.

Jelmagyarázat:

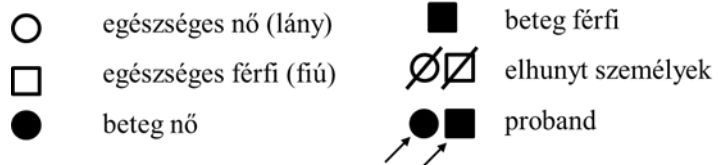
- egészséges nő (lány)
- egészséges férfi (fiú)
- beteg nő
- beteg férfi
- ⊘/⊚ elhunyt személyek
- /■ proband

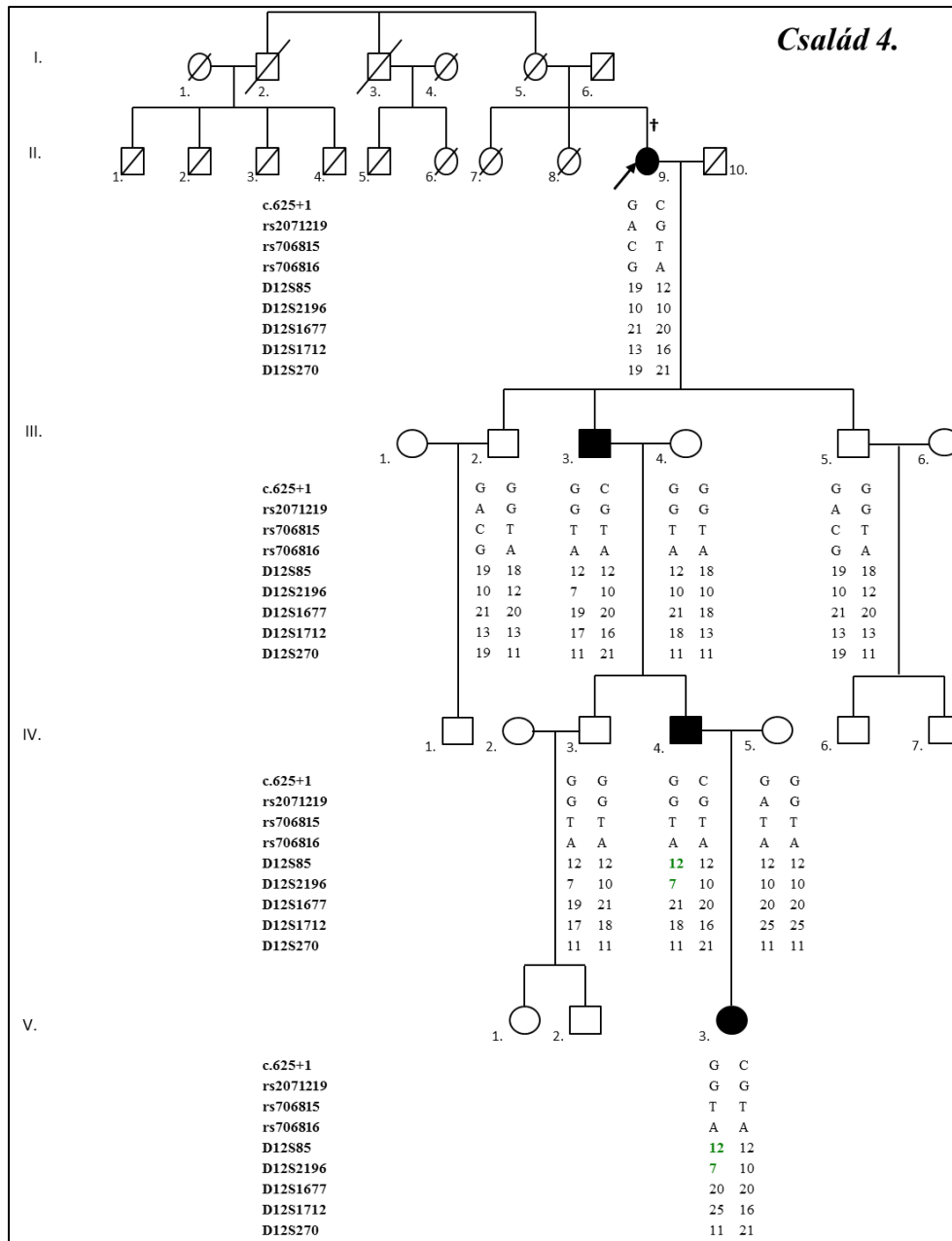
Genetikai vizsgálat csak azon személyek esetében történt, akik szimbóluma alatt a genetikai markerek eredménye fel van tüntetve. A zöld színnel jelölt ismétlődésszámok rekombinációra utalnak.



**23. ábra** Az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó 3. család családfatérképe haplotípusokkal kiegészítve

Jelmagyarázat:





**24. ábra** Az ACVRL1 c.625+1 G>C mutációt hordozó 4. család családfatérképe haplotípusokkal kiegészítve.

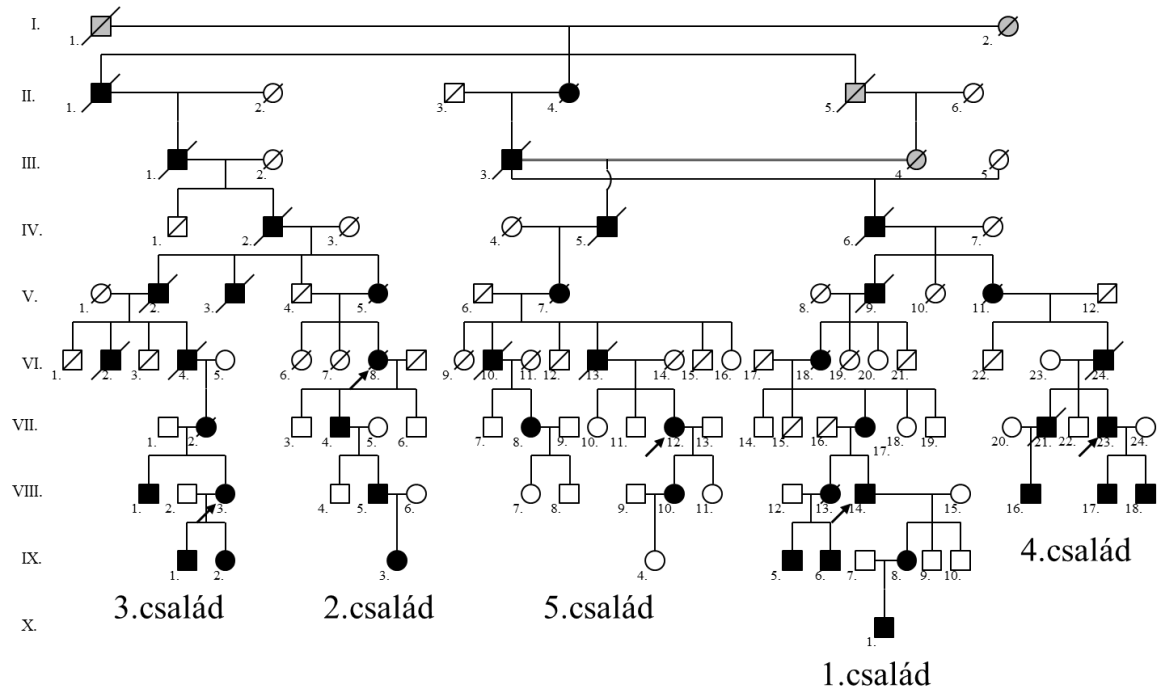
Jelmagyarázat:

- |   |                        |     |                   |
|---|------------------------|-----|-------------------|
| ○ | egészséges nő (lány)   | ■   | beteg férfi       |
| □ | egészséges férfi (fiú) | ∅/∅ | elhunyt személyek |
| ● | beteg nő               | ●/■ | proband           |

Genetikai vizsgálat csak azon személyek esetében történt, akik szimbóluma alatt a genetikai markerek eredménye fel van tüntetve. A zöld színnel jelölt ismétlődésszámok rekombinációra utalnak.

Az ötödik proband esetében nem volt lehetőségünk családfa analízisre.

Geneológus által felderítésre kerültek az 5 proband felmenői, valamint az esetleges közös ős, akitől az *ACVRL1* c.625+1 G>C eltérés eredeztethető. Ennek eredményeképpen egy olyan házaspárt találtak, kiknek házasságkötése 1779-ben volt a leszármazottak mai lakóhelyétől körülbelül 30 km-re (25. ábra).



**25. ábra** A 10 generációt felölelő családfa az 5 HHT proband lehetséges közös őseivel

*A 10 generációs családfa elkészítése és felkutatása Bárdossy Péter (családfakutató) munkája.*

## 7. Megbeszélés

### 7.1 Genetikai vizsgálatok antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban; alapító mutációk

Az értekezésben az egyik célunk a magyarországi és környező földrajzi régióból származó AT deficiens, valamint a magyarországi Osler-Rendu-Weber kóros betegek genetikai hátterének felderítése, valamint gyakori mutációk keresése volt.

Az AT a véralvadás kulcsfontosságú szabályozója. Az öröklött AT deficiencia egy heterogén betegség, az I-es típusú kvantitatív és a II-es típusú kvalitatív csoportokba sorolható. A vizsgált AT deficiens populációban fluoreszcens direkt szekvenálással és MLPA analízissel 31 különböző mutációt találtunk az AT génjében (*SERPINC1*), melyek közül 11 új genetikai eltérés. Saját AT deficiens betegcsoportunkban a II.HBS altípus volt a leggyakoribb.

Az Osler-Rendu-Weber kór (vagy örökletes hemorrhagiás telangiectasia; HHT) egy autoszomális domináns betegség, melyet orrvérzések, TA-k és AVM-k jellemeznek. A betegség diagnózisa az 1999-ben felállított Curaçao kritériumok alapján történik [47]. Két fő gén mutációi állnak a háttérben, ezek az *ENG* és az *ACVRL1*. Az északkelet-magyarországi régióból származó 5 HHT-gyanús proband fluoreszcens direkt szekvenálása során az *ENG* génben nem találtunk eltérést, azonban az *ACVRL1* génben mind az 5 betegnél egy azonos genetikai variánst (*ACVRL1* c.625+1 G>C) fedeztünk fel, melyről eddig nem számoltak be az irodalomban. E splicing eltérést az 5 proband olyan családtagjainál is regisztráltuk, akik eleget tettek legalább 2 Curaçao kritériumnak.

#### 7.1.1 Alapító mutációk jelentősége, megjelenése antitrombin deficienciában, egyéb trombofiliákban és Osler-Rendu-Weber kórban

Az alapító mutációk révén csökken a genetikai sokféleség egy kis létszámú populációban, a genetikai drift eredményeképpen változások következnek be az allélfrekvenciákban [87]. Az alapító mutációk előfordulásának igazolására kapcsoltsági analízist végeznek. A polimorf genetikai markerek (mikroszatelliták) teszik lehetővé a genetikai variancia alapos vizsgálatát. Amennyiben a betegség hátterében álló okozati mutáció szoros kapcsoltságot mutat a vizsgált polimorf markerekkel adott haplotípust kialakítva, az alapító hatás igazolható. Az alapító mutációk felderítése egy populációban több szempontból hasznos. Egyrészt az alapító

mutáció következtében az érintett betegcsoportokban sokkal hatékonyabb diagnosztikai stratégiát állíthatunk fel, másrészt az alapító mutációk jelenléte az adott genetikai betegség esetén növeli a mutációs találati arányokat is. A gyorsabb és pontosabb diagnózis mellett az is kiemelendő, hogy az azonos mutáció hordozáshoz társuló hasonló klinikai fenotípus a betegek prevenció, terápiás stratégiájának megtervezését is megkönnyíti.

A magyarországi AT deficiens betegek igen nagy arányban hordozták az AT Bp3 (p.Leu131Phe) mutációt. Minden, az irodalomban korábban leírt, AT Bp3 hordozó esetében kelet-európai származásról számoltak be [70, 88, 89]. A mutációt összefüggésbe hozták vénás, kisebb arányban artériás trombotikus eseményekkel, valamint terhességi komplikációkkal is. Olds és mtsai. 1994-ben 5 AT Bp3 hordozó családról számoltak be, ők 6 polimorf genetikai markert vizsgálva, beleértve az Alu5 és Alu8 STR markereket is, alapító hatás lehetőségére következtettek [70]. A vizsgált személyek és a polimorf markerek száma azonban esetükben igen alacsony volt ahhoz, hogy egyértelmű bizonyítékot szolgáltatassanak. Számunkra megadatott annak a lehetősége, hogy kiemelkedően nagy számú mutációhordozót toborozunk és több genetikai markert vizsgálhassunk. Összesen 102 AT Bp3 mutáció hordozó és 200 egészséges személy DNS mintáján 12 polimorf markert (7 SNP, egy 5'LP és 4 STR) vizsgálva sikerült igazolni az AT Bp3 mutáció alapító hatását. A haplotípus analízishez az 1-es kromoszóma 1q24.2-25.2 régiójában 7 SNP-t (rs5877, rs5878, rs1799876, rs941989, rs677, rs2227612 és rs2227596), egy 5'LP-t és 4 STR markert (az Alu5 és Alu8 markereket a *SERPINC1* gén 5 intronjában, a D1S218 markert a *SERPINC1* géntől disztálisan, a D1S196 markert a *SERPINC1* géntől proximálisan elhelyezkedő mikroszatellitát) vizsgáltuk. A haplotípus analízis során kimutattuk, hogy a „T allél” egyetlen haplotípussal társult (12. táblázat). A normál „C allél” különböző haplotípusokkal társult mind a heterozigóta AT Bp3 mutáció hordozókban, mint a kontroll csoportban. Rávilágítottunk arra az érdekességre is, hogy a finn AT deficiens populáció mutációs spektruma különbözik a magyartól, holott a két nemzet elvileg rokoni kapcsolatban áll egymással [71]. A finn populációban az AT Basel mutációról számoltak be, mint gyakori (alapító?) mutáció, azonban ezt genetikai markerekkel nem igazolták. Míg a finn AT deficiens populációban az AT Basel aránya a II-es típusú deficiencián belül 88%, addig a magyar betegekben ez mindössze 4%. Ezzel szemben míg nálunk az AT Bp3 aránya a II-es típuson belül 81%, addig a finn betegek között ez az eltérés egyáltalán nem fordul elő. Ezek alapján

felvetődik, hogy az AT Bp3 mutáció a két népcsoport szétválása után keletkezett, vagy került be Magyarországra. Az alapítás idejének becslésére történtek már vizsgálatok a munkacsoportunkban, ami alapján a XVII. század tűnik legvalószínűbbnek, de további, pontosító vizsgálatok szükségesek még közlés előtt. Az AT Cambridge II mutáció a brit populációban gyakori és alapító hatásának vizsgálatakor 31-ből 29-en azonos haplotípust mutattak egy (ATT)<sub>8</sub> STR kivételével, ahol 4 féle ismétlődésszámot tapasztaltak [3]. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy 4 független eredetű alapítója lehet az AT Cambridge II mutációnak. Az AT Cambridge II mind vénás, mind artériás trombotikus eseményekkel összefüggésbe hozható. E mutációt spanyol, német és francia betegekben is detektálták, azonban a magyarországi AT deficiens populációban nem volt kimutatható [90]. Olds és munkatársai az AT Bp 3 mutáció vizsgálata mellett ugyanazokat a markereket 5 p.Arg161\* *SERPINC1* mutáció hordozó családnál is tanulmányozták, mely esetben szintén felvetődött az alapító mutáció lehetősége [70]. Az AT Hamilton (p.Ala414Thr) és az AT Amiens (p.Arg79Cys) mutációk tekintetében is végeztek kapcsoltsági analízist [4]. Mindkét esetben az (ATT)<sub>8</sub> jellegzetes ismétlődését figyelték meg, az AT Hamilton esetében (ATT)<sub>17</sub>, míg az AT Amiens esetében (ATT)<sub>18</sub>. Az AT Hamilton és az AT Amiens fokozott rizikót jelentenek vénás trombozisz kialakulására. Összességében elmondható, hogy a legkiterjedtebb genetikai vizsgálatot a legnagyobb populáción munkacsoportunk végezte az AT deficienciával kapcsolatos alapító hatás igazolására [90].

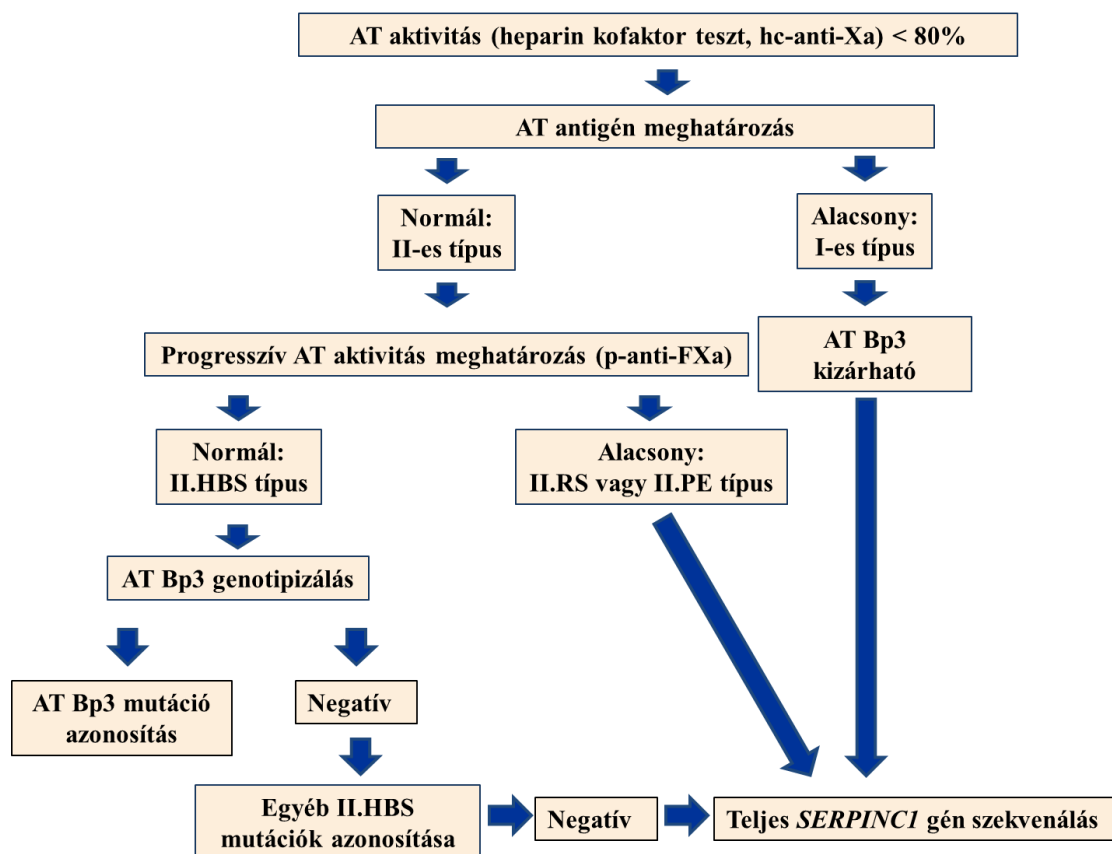
Egyéb trombofiliát eredményező megbetegedésekben is számoltak már be alapító mutációk jelenlétéről. Az I-es típusú Protein C hiányt eredményező c.3363insC mutáció esetében 117 heterozigóta hordozón 5 STR markert vizsgálva megállapították, hogy egy azonos haplotípussal jár. Észak-Amerikába pedig néhány francia telepes alapító vihette be [91]. A protrombin gén G20210A polimorfizmusának előfordulása a kaukázusi populációban 1-6%, mely 2-5-szörös rizikót jelent a VTE kialakulására. Összesen 4 dimorfizmust vizsgáltak 10 homozigóta, 123 heterozigóta G20210A hordozó és 110 kaukázusi kontroll egyén esetében. A beteg és kontroll csoport között szignifikáns különbségeket figyeltek meg, a dimorfizmusok erős kapcsoltságot mutattak alapító hatást jelezve [92]. A kaukázusi populációban a FVL polimorfizmus előfordulási gyakorisága 10% körül van, míg a polimorfizmus egyáltalán nem mutatható ki az egyes észak- és dél-amerikai natív populációkban, illetve a fekete afrikai, a japán és a kínai népességben.

A kaukázusi populációban e polimorfizmus hordozása alapító hatás következménye [69].

Az öt Osler-Rendu-Weber kóros proband egymáshoz közeli földrajzi térségből való származása, a felmenők közötti névazonosság, valamint ugyanazon eltérés (*ACVRL1* c.625+1 G>C) hordozása vetette fel, hogy alapító mutációra bukkantunk. Ennek igazolására 8 polimorf genetikai markert tanulmányoztunk a 12-es kromoszóma q13,11 - q13,13 régiójában. A haplotípus analízishez az *ACVRL1* génen belül 3 SNP-t (rs2071219, rs706815, rs706816) és egy mikroszatellita markert (D12S1677), továbbá a génhez képest proximálisan (D12S85, D12S2196), valamint disztálisan (D12S1712, D12S270) két-két STR-t választottunk. A haplotípus analízis során ugyanazon haplotípust tudtuk kimutatni a mutáns, "C" allélhez társultan. A vizsgált 8 polimorf marker ugyanazon kromoszómán, egymáshoz közel helyezkedik el és kapcsolt öröklődést mutat. A mutációhordozó allélon a vizsgált markerek között rekombinációt nem figyeltünk meg. Ez arra utal, hogy még nem zajlott le annyi meiózis, mely során crossing over jöhetett volna létre, vagyis a mutáció a nem túl távoli múltban keletkezhetett. A családfakutató segítségével megtalált házaspár, kiknek esküvője 1779-ben volt, nem feltétlenül jelenti azt, hogy ők voltak a mutáció alapítói. Az Osler-Rendu-Weber kór tekintetében a világ szinte minden táján, így a holland Antillákon, Franciaországban, Olaszországban, Dániában és Norvégiában is találtak HHT alapító mutációkat [72-75].

### **7.1.2 A mutáció detektálási arány antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban**

Antitrombin deficienciában a mutáció detektálási arány igen magas, 98% az általunk vizsgált populációban. Ez a magas arány valószínűleg az AT Bp3 mutáció gyakori előfordulásának, alapító hatásának következménye. Más populációkban ez az arány alacsonyabb, 69-83% körüli [93-96]. A csökkent AT aktivitással rendelkező betegekben az alacsonyabb mutáció detektálási ráta háttérben aberráns N-glikoziláció, vagy olyan eltérés feltételezhető, mely a *SERPINC1* ritkán vizsgált szabályozó régiójára esik [97-100]. A populációnkban talált kiemelkedően magas mutáció detektálási arány azt jelzi, hogy az általunk kidolgozott hemosztázis diagnosztikai algoritmus teljes mértékben szenzitív és specifikus [45] (26. ábra).



**26. ábra** Az általánunk használt diagnosztikai algoritmus antitrombin deficiencia esetén

Az északkelet-magyarországi régióból Tanszékünkre érkezett Osler-Rendu-Weber kóros betegek diagnosztizálásakor a mutáció detektálási ráta 81,3% volt (nem publikált saját adat). Amennyiben az egész országból kért HHT genetikai vizsgálatokat vesszük figyelembe ez az arány már csak 36,7% volt. Véleményünk szerint ennek oka, hogy míg az északkelet-magyarországi régióban a betegség feltérképezése szigorúan a Curaçao kritériumoknak megfelelően valósult meg, addig az ország többi területeiről érkezett betegek esetében nem minden esetben volt kellően megalapozott a HHT diagnózisa. Ebből kifolyólag hiánypótlónak tartanánk egy szakmai ajánlás elkészítését, mely iránymutatás lehetne a hazai klinikumban dolgozó kollégák számára. Az igen magas (81,3%) mutáció detektálási arány az adott régióban az alapító mutáció (*ACVRL1* c.625+1 G>C) következménye is. Általánosságban elmondható, hogy a 4 Curaçao kritérium figyelembevételével mellett a HHT esetek körülbelül 75%-ban sikerül kimutatni valamilyen *ENG* vagy *ACVRL1* mutációt [6]. Ez az arány tovább, 85%-nál magasabbra emelkedik, ha az adott betegnél a 4 kritérium egyszerre áll fenn. [101].

### 7.1.3 Új mutációk antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban

Mind az AT deficienciában, mind a HHT-ben gyakori az új mutációk detektálása, mivel nincsenek mutációs forrópontok, ráadásul a HHT-ben több gén is érintett.

Az általunk talált 11 új *SERPINC1* mutáció közül tíz a laboratóriumi fenotípus alapján I-es típusú deficienciát eredményez. A p.Pro461Thr eltérés a laboratóriumi értékek szerint a II-es típusba sorolható, valamint ebben a pozícióban leírtak korábban egy p.Pro461Leu eltérést, melyet II.PE deficienciának vélelményezték [100].

Az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutáció korábban nem szerepelt egyetlen mutációs adatbázisban, valamint közleményben sem, ezért szintén újnak tekintettük.

A közeljövőben az újgenerációs szekvenálás módszerének (NGS) elterjedésével egyszerűbb lesz a genetikai diagnózis, mint a funkcionális vizsgálatok, így ezzel számos (új) eltérést lehet majd azonosítani. Egy új mutáció detektálásakor kulcsfontosságú a mutáció patogenitásának megítélése. A ma közölt genetikai leletekben már megkövetelik, hogy a genetikai eltérés pontos leírása mellett az eltérés patogenitásáról is nyilatkozzunk [102]. A ma érvényes ajánlás értelmében a genetikai eltéréseket patogenitás szempontjából 5 csoportra osztják. Az 1. csoportba tartoznak a „nem patogén” eltérések, a 2.-ba a „valószínűleg nem patogének”, a 3.-ba a „bizonytalan következménnyel” járók (VUS, variance of uncertain clinical significance), a 4.-be a „valószínűleg patogén” és végül az 5. csoportba a „patogén” eltérések. A patogenitás igazolásának vannak indirekt és direkt bizonyítékai. Az indirekt bizonyítékok közé tartozik a konzerváltság megítélése; esetünkben a *SERPINC1* új misszensz mutációk mind konzervált régiókra esnek (12. ábra). További bizonyítékot szolgáltathatnak az *in silico* patogenitást jósló szoftverek, melyek ma igen elterjedtek. Ezen munka során mi is alkalmaztuk a *SERPINC1* misszensz mutációk vizsgálatára a PolyPhen2, MutPred és PhD\_SNP szoftvereket (14. táblázat), melyek alapján szintén patogénnek tekinthetjük a talált új mutációkat. Végezhetünk továbbá szegregációs analíziseket a nagykiterjedésű családok esetében, melyet alkalmazhatunk egy adott fenotípus öröklési módjának meghatározására, egyes génhatások tisztázására [103]. Míg előbbi módszerek döntően a misszensz eltéréseket tudják vizsgálni, a szegregációs analízis minden típusú mutáció esetében alkalmazható. Saját munkánkban mind AT deficienciában, mind HHT-ben alkalmunk nyílt nagy, több generációt magába foglaló családok tanulmányozására (p.Leu205Pro a *SERPINC1* génben és az *ACVRL1* c.625+1 G>C esetében). Indirekt bizonyítéknak

tekinthető az is, amennyiben legalább 100 egészséges allélon nem tudjuk kimutatni az új genetikai variánst. Utóbbi módszerrel jártunk el a *SERPINCI* mutációk és az *ACVRL1* c.625+1 G>C esetében.

Egy mutáció patogenitásának legfőbb bizonyítékát (direkt bizonyíték) az *in vitro* biokémiai analízisek szolgáltatják, amikor rekombináns rendszerekben az adott fehérjék mennyiségi és minőségi tulajdonságait vizsgáljuk. A munkacsoportunk által talált 11 új AT mutáció közül eddig egy mutáció molekuláris karakterizálását fejeztük be. A p.Leu205Pro mutációt egy kiterjedt család több tagja hordozza, akik több trombotikus eseményen estek át. A Pro205 mutáns fehérjét a WT-hoz hasonló mennyiségben mutattuk ki a sejtek lizátumában, ezek alapján a protein szintézis nem érintett. Ezzel szemben a sejtek felülúszójába csak csekély mennyiségű mutáns fehérje jut ki, ami szekréciós zavarra utal. A Pro205 fehérje specifikus aktivitása is csökkent a WT-hoz képest. Az eredmények összességében egy komplex (mennyiségi zavar a szekréció defektusa miatt és funkcionális zavar) defektusra utalnak.

## 7.2 Genotípus-klinikai fenotípus összefüggések antitrombin deficienciában és Osler-Rendu-Weber kórban

### 7.2.1 Az antitrombin deficiencia klinikai megjelenési formái

Míg korábban az AT deficienciát homogén betegségnek tartották, az utóbbi időben szórványos közlések jelentek meg azzal kapcsolatban, hogy az öröklött AT deficiencia heterogén klinikai képpel társul. Saját vizsgálatunkban nagy számú beteg bevonásával mi is ez utóbbi feltevést igazoltuk.

Az I-es típusú deficiencia súlyos trombotikus eseménnyel jár és kizárólag heterozigóta genotípus figyelhető meg. A trombotikus események közül leginkább vénás trombózisokkal hozták kapcsolatba, azonban nem kizárható artériás esemény sem. Saját vizsgálatunkban az I-es típusú deficienciát eredményező mutációk súlyos vénás trombotikus fenotípussal társultak, kivéve az AT Wobble, mely esetében nem vénás, hanem artériás trombózist (MI) regisztráltak. Az AT Truro variánst *in silico* tanulmányokban II.HBS altípusba sorolták [104], azonban a laboratóriumi fenotípus alapján mennyiségi zavarnak ítéltük. Az ellentmondás miatt érdekes lenne e mutációval kapcsolatban funkcionális vizsgálatokat végezni a későbbiekben.

A II-es típusú RS és PE altípusok általában az I-es típushoz hasonló klinikai fenotípussal fordulnak elő. Esetünkben kicsi a II.RS és II.PE esetszám, ezért messzemenő következtetéseket nem tudunk levonni.

A II.HBS egy kivételes klinikai megjelenésű csoportot képvisel; az I-es típustól abban különbözik, hogy a II.HBS heterozigótáknál vannak ATE, terhességi komplikációk is, és a VTE idején általában idősebbek, mint I-es típusú betegek. A II.HBS egy igen érdekes és heterogén alcsoport az AT deficienciákon belül, mivel a betegek klinikai és laboratóriumi fenotípusa különböző attól függően, hogy konkrétan milyen mutáció áll a háttérben. Az AT Bp3, AT Padua I és AT Basel mutációkat nem csak vénás, hanem artériás eseményekkel, valamint terhességi komplikációkkal is összefüggésbe hozták [105-107]. Amennyiben az első vénás trombózis kialakulásáig eltelt időt tekintjük a klinikai súlyosság fokmérőjének, az I-es típusú AT deficiencia sokkal súlyosabb, mint a II.HBS heterozigótaság, azonban az AT Bp3 homozigótaság az I-es típusnál súlyosabb. A II.HBS altípuson belül az AT Bp3 homozigótaság a legsúlyosabb (az első VTE kialakulásának idején az AT BP3 homozigóták életkorának mediánja 14 év, az AT Bp3 heterozigóták esetében 33 év), de az AT Bp3 heterozigótaság szignifikánsan súlyosabb az AT Padua I-nél. Az AT Basel és az AT

Padua I nem különbözik szignifikánsan az első VTE kialakulásának idejében. Abban az esetben, ha nemcsak az első VTE kialakulásának idejét, hanem a VTE mellett az ATE, valamint a terhességi komplikációk bekövetkeztének időpontját is együttesen vesszük figyelembe, az I-es és II.HBS heterozigóta típus súlyossága nem különbözik szignifikánsan. Az AT Bp3 homozigótaság sokkal súlyosabb, mint az I-es típus és a II.HBS heterozigótaság. Az AT Bp3 homozigótákban gyakoriak az újszülött- és korai gyermekkori trombózisok. E homozigóta betegeknél ATE nem volt megfigyelhető. Összességében megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált csoportban az AT Bp3 leginkább VTE-vel, az AT Basel inkább ATE-vel, az AT Padua I pedig magasabb arányú terhességi komplikációval társult. Az AT Bp3 heterozigótaság sem tekinthető azonban enyhének, hiszen a heterozigóta hordozók kb. fele esett át VTE-n vagy ATE-n a genetikai diagnózis időpontjáig, valamint a tünettel rendelkezőkben egyéb trombózis rizikófaktorokat nem lehetett azonosítani. Érdekes kérdés, hogy a II.HBS altípuson belül miért csak az AT Bp3 mutáció esetén találkozunk homozigóta személyekkel és miért nincsenek homozigóták pl. az AT Basel, vagy AT Padua I esetében, melyek szintén gyakoriak bizonyos populációkban. A saját beteganyagunkban a viszonylag alacsony AT Padua I és AT Basel frekvencia miatt eleve nem várhattunk homozigóta személyeket, azonban homozigóta formában ezek az eltérések más populációkban sem voltak kimutathatók. Feltételezzük, hogy mindkét eltérés homozigóta megjelenése az élettel összeegyeztethetetlenül súlyos fenotípussal járna, hasonlóan az I-es típusú deficienciákhoz. Az AT Bp3 mutációt kivéve eddig csupán néhány, II-es típust eredményező mutációt detektáltak homozigóta formában, ezek az AT Dublin (p.Val30Glu), AT Toyama (p.Arg79Cys), AT Cambridge II (p. Ala416Ser), AT Alger, AT Budapest 4, AT Fontainebleau, AT Kumamoto, a p.Phe261Leu és p.Pro469Leu. A felsorolt eltérések közül az általunk vizsgált hazai betegpopulációban egyik sem fordult elő.

### **7.2.2 Az antitrombin deficiencia megnyilvánulása gyermekkorban**

Tudomásunk szerint a mi munkacsoportunk regisztrálta a legtöbb AT deficiens gyermeket, akik között a II.HBS altípus volt a leggyakoribb. Ez azt igazolja, hogy szükség van az AT deficiencia szűrésére a gyermekkori trombózisos esetekben, kiváltképp azon populációkban, ahol magas az AT deficiencia II.HBS típusának gyakorisága.

### **7.2.3 Az antitrombin deficiencia terápiais vonatkozásai**

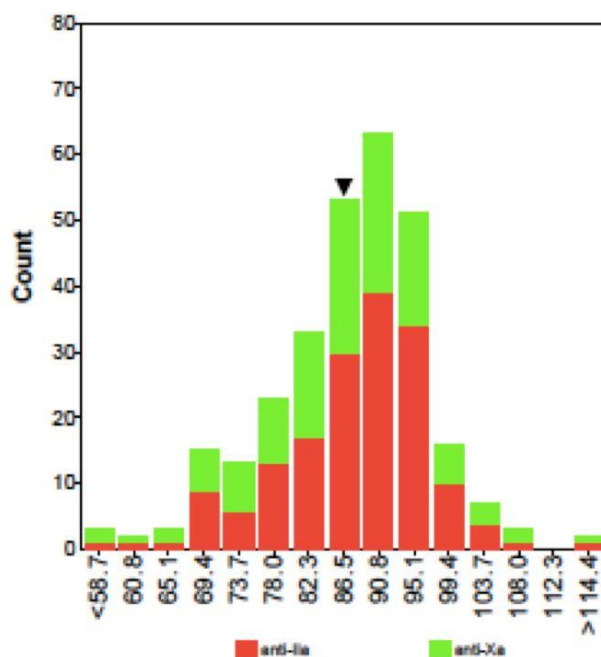
A mi kohorszunkban a gyerekek terápiája szempontjából a hosszútávú antikoagulálás a gyakorlat, valamint többnyire a felnőttek kezelésekor is így járnak el. A trombózis elszívédése után az antikoagulálás időtartamára vonatkozóan, a szekunder prevenció stratégiája tekintetében nincs egységes álláspont. Különbözö irodalmi adatok küönbözö időtartamú antikoagulálást ajánlanak. Az AT deficiencia egy súlyos trombofília és az AT deficiensek prevenciósi stratégiája adott esetben eltérhet az egyéb trombofiliákban alkalmazott stratégiától. Szükség lenne egy nemzetküzi prospektív adatbázis kialakítására, hogy küöllen megalapozott ajánlást lehessen tenni a terápiával kapcsolatban. További fontos szempont a tünetmentes mutációhordozók prevenciósi stratégiájának kérdése, azaz mikor és milyen formában van szükség prevenciósi intézkedésekre [34]. Vizsgálataink során 64 ötven év alatti (ebből 29-en húsz év alattiak) tünetmentes családtagot regisztráltunk. Amennyiben a probandok családjának célzott genetikai szűrése során tünetmentes de mutációhordozó családtagot regisztrálunk, lehetőségünk van a magas trombózis rizikóval járó esetekben a primer prevencióra. Egyes ajánlások értelmében esetükben az orális fogamzásgátló felírása kerülendő [108].

### **7.2.4 Az Osler-Rendu-Weber kór klinikai megjelenési formái**

Saját vizsgálataink során az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó családokban a HHT változatos fenotípussal járt. Két, a diagnózis időpontjában 34 éves beteg esetében még orrvérzések sem fordultak elő. A mutációt hordozók esetében a TA-k megjelenése az arcon, az ajkakon, a nyelven és a kezeken viszonylag késői életkorban, a 40-es éveik végén jelentek meg. Tüdő és agyi AVM-k egyetlen esetben sem voltak kimutathatóak. Négy beteg vizsgálatakor a májban előforduló AVM-ket regisztráltunk. A családészűrés jelentősége HHT-ben is kiemelendő, hiszen a genetikai eltéréssel rendelkező, de a diagnóziskor még tünetmentes családtagok szoros követeése szükséges a nagy vérzések megelőzése, illetve korai ellátásának biztosítása érdekében.

### 7.3 Laboratóriumi szempontok antitrombin deficienciában

Az AT hiány kimutatására szolgáló elsővonalbeli teszt egy kromogén funkcionális vizsgálaton alapul, amelyben a FIIa vagy a FXa AT által heparin jelenlétében történő gátlását mérjük kromogén szubsztrát alkalmazásával, ahol a feleslegben alkalmazott enzim (FIIa vagy FXa) aktivitását mutatjuk ki. Ha normál, egészséges egyének AT szintjeit vizsgáljuk, identikus eredményt kapunk anti-FIIa vagy anti-FXa teszttel, amint az a nemzetközi körkontroll programokba a különböző laboratóriumok által beküldött eredményekből jól látható (27. ábra).



**27. ábra** AT aktivitás meghatározása az ECAT külső minőségbiztosítási programban, az ECAT által rendelkezésre bocsátott statisztika

287 laboratórium által végzett mérési eredmény. Ahol a piros a FIIa (mediánja: 88%) és a zöld a FXa (87%) tesztek által végzett mérési eredményeket ábrázolják.

Munkacsoportunk korábban megállapította, hogy az enzim típusa befolyásolja a teszt érzékenységét bizonyos AT deficiencia típusok iránt. Az AT Bp3 mutációra például az anti-FIIa módszerek nem mutattak kellő érzékenységet [46]. Ahogy azonban néhány tanulmányban utaltak rá [45, 71, 77, 90, 109, 110], a funkcionális AT tesztek érzékenysége szempontjából nem feltétlenül kizárólag az enzim típusa (anti-FIIa vagy anti-FXa esszé) az egyetlen befolyásoló tényező. A hc-anti-FXa laboratóriumi tesztek szempontjából kiemelő, hogy különböző érzékenységgel

rendelkeznek a II.HBS altípusokban. Ebből kifolyólag a II.HBS altípus aluldiagnosztizált lehet néhány, a kereskedelemben kapható funkcionális esszé alkalmazásakor. Az általunk használt diagnosztikus esszé (Labexpert H+P) az összes AT deficiencia kiszűrésére alkalmas. A kereskedelmi forgalomban kapható anti-FXa tesztek főbb jellemzőit a 19. táblázat foglalja össze [45].

**19. táblázat** A heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitás mérésére szolgáló tesztek tulajdonságai

	A szubsztrát eredete	Inkubációs idő (másodperc)	Heparin koncentráció	Kromogén szubsztrát típusa	Minta előhígítása	Hígító puffer	A minta végső hígulása
<b>Siemens Innovance® Antithrombin</b>	Humán FXa	180-190	1500 U/L	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-methylamide-acetate	1:4	Tris/HCl pH 8.0	1:20
<b>HemosIL® Liquid Antithrombin</b>	Szarvasmarha FXa	100-140	3000 U/L	S-2765 (N- $\alpha$ -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl)	1:40	0,15 M Nátrium Klorid	1:120
<b>Chromogenix Coamatic® Antithrombin</b>	Szarvasmarha FXa	100-140	5000 U/L	S-2765 (N- $\alpha$ -Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl)	1:121	0,15 M Nátrium Klorid	1:484
<b>Hyphen Biophen Antithrombin</b>	Szarvasmarha FXa	60	(használatra kész)	SXa-11 (Suc-Ile-Glu-( $\gamma$ Pip)Gly-Arg-pNA, HCl)	1:20	0,15 M Nátrium Klorid	1:170
<b>Labexpert Antithrombin H+P</b>	Szarvasmarha FXa	60	1 USP units/mL	BIOPHEN CS-11 [Suc-Ile-Gly-( $\gamma$ Pip)Gly-Arg-pNA, HCl]	1:50	0,05 M pH 8.4 Tris-HCl	1:150

Az összehasonlításakor alkalmazott anti-FXa alapú Siemens AT esszé érzékenysége is 100%, azonban a szintén anti-FXa alapú HemosIL AT teszt érzékenysége igen alacsony az AT Bp3 mutánsokra nézve és teljesen érzéketlen az AT Basel és AT Padua I mutánsokra, hasonlóan Orlando és mtsai. tapasztalataihoz [109]. A “pilot” kísérletünk eredményei alapján arra következtettünk, hogy a hc-anti-FXa tesztek érzékenységében a heparin koncentráció és az ionerő a fő befolyásoló tényezők. Eredményeink azt is mutatják, hogy a II.HBS igen heterogén a csoport a mutációk típusától függően laboratóriumi viselkedés szempontjából is. A funkcionális tesztek egyes altípusok iránt mutatott eltérő szenzitivitásának hátterében állhat az AT-heparin kötés erősségének különbsége is az egyes mutánsok esetében. A vizsgált paraméterek

(heparin koncentráció, pH) módosítása érdekes módon kevésbé befolyásolták az AT Bp3 mintákban mért AT aktivitás értékeit, ami azzal együtt, hogy a Bp3 homozigóták AT koncentráció értékei gyakran alacsonynak mutatkoztak, azt sugallja, hogy e mutáció nem csupán az AT-heparin kölcsönhatást befolyásolja, hanem komplexebb következménnyel jár.

## 7. A jelölt saját eredményei, új megállapításai

- Az AT deficiens betegek és családtagjaik genetikai vizsgálata során az irodalomban legmagasabb mutációs detektálási arányról számoltunk be; a *SERPINC1* génben 31 különböző, ezek között 11 új mutációt azonosítottunk.
- Felismertük, hogy a II.HBS altípusba tartozó AT Bp3 mutáció (p.Leu131Phe) a magyarországi AT deficiens populációban kiemelkedően gyakori és polimorf genetikai markerek vizsgálatával igazoltuk, hogy ennek háttérében alapító hatás áll.
- Megállapítottuk, hogy az AT deficiencia a klinikai megjelenés szempontjából heterogén csoport; sőt a II.HBS altípus önmagában is heterogén. Míg az I-es típusú deficiencia súlyos vénás trombózissal jár, a II.HBS altípus heterozigóta formában enyhébb megjelenésű és nem kizárólag vénás trombózis fordul elő. Az AT Basel gyakran jár együtt ATE-val, az AT Padua I-ben a terhességi komplikációk gyakoribbak. Az AT Bp3 homozigóta hordozása jelenti a legsúlyosabb klinikai formát, ahol a vénás trombózis gyakorta már kisgyermekkorban manifesztálódik. A nem provokált trombózisok esetében gyermekkorban különösen érdemes AT deficiencia irányában vizsgálni.
- Megállapítottuk, hogy az AT deficiencia laboratóriumi szempontból is heterogén és nemcsak az enzim típusa (trombin vagy FXa) szabja meg a teszt érzékenységét. A II.HBS típuson belül a HemosIL AT 44%-os szenzitivitást mutatott az AT Bp 3-ra és az AT Basel-lel és AT Padua I-el szemben teljesen inszenzitív volt. Megállapítottuk, hogy a FXa-alapú tesztek esetében a heparin koncentráció és a pH fontos tényezők a tesztek szenzitivitását tekintve.
- A munkacsoportunk által talált 11 új AT mutáció közül eddig egy mutáció molekuláris karakterizálását fejeztük be. A p.Pro205 mutáns fehérjét a WT-hoz hasonló mennyiségben mutattuk ki a sejtek lizátumában, ezek alapján a protein szintézis nem érintett. Ezzel szemben a sejtek felülúszójába csak csekély mennyiségű mutáns fehérje jut ki, ami szekréciós zavarra utal. A Pro205 fehérje specifikus aktivitása is csökkent a WT-hoz képest. Az eredmények összességében egy komplex (a csökkent szekréció miatt mennyiségi és funkcionális zavar) defektusra utalnak.
- Az öt Osler-Rendu-Weber kóros proband egymáshoz közeli földrajzi térségből való származása, a felmenőik közötti névazonosság, valamint ugyanazon eltérés (*ACVRL1* c.625+1 G>C) hordozása vetette fel, hogy alapító mutációra bukkantunk. Ezt 8 polimorf genetikai marker detektálásával igazoltuk és genealógiai elemzéssel erősítettük meg.

## 8. Összefoglalás

Az antitrombin (AT) a véralvadás egyik kulcsfontosságú szabályozója. Az AT deficiencia egy ritka, de jelentős trombózis kockázati tényező. Megkülönböztetünk I-es típusú (mennyiségi) és II-es típusú (minőségi) deficienciákat. Az AT deficiencia molekuláris genetikai háttere igen heterogén, eddig több mint 310 mutációt írtak le az AT génjében (*SERPINC1*).

A vizsgált AT deficiens populációban (n=156, családtagokkal együtt n=246) magas mutációs detektálási aránnyal (98%) 31 különböző mutációt azonosítottunk a *SERPINC1*-ben, melyek közül 11 új genetikai eltérés. A heparin kötés zavarával járó II.HBS típus bizonyult a leggyakoribbnak (75,6%), e típuson belül az AT Budapest 3 (AT Bp3, 86,4%) kiemelkedően gyakran fordult elő, az AT Basel gyakorisága 4%, az AT Padua I előfordulása 9% volt. Az AT Bp3 mutáció alapító hatását 12 polimorf genetikai marker vizsgálatával igazoltuk. Megállapítottuk, hogy a II.HBS AT deficiencia mind klinikai, mind laboratóriumi megjelenését tekintve heterogén csoport. Az artériás események az AT Basel-ben, a terhességi komplikációk az AT Padua I-ben fordultak elő leggyakrabban. Az AT Bp3 homozigóták szenvedték el az első trombotikus eseményt a legfiatalabb korban. Három anti-FXa alapú funkcionális teszt vizsgálatokor felvetettük, hogy nemcsak az enzim típusa (trombin, vagy FXa), hanem egyéb esszé körülmények is befolyásolják a teszt érzékenységét a II.HBS deficienciák iránt. Azon funkcionális tesztben, ahol magas heparin koncentrációt alkalmaznak és a pH 7,4 az AT Bp3 iránt alacsony (44%) szenzitivitást észleltünk; a teszt teljesen inszenzitív volt AT Basel-re és AT Padua I-re. A heparin koncentráció és a pH fontos befolyásoló tényezői a funkcionális tesztek II.HBS iránti érzékenységének. Az új, patogén p.Leu205Pro eltérés komplex fenotípust mutatott az in vitro expressziós vizsgálatokban; nemcsak a szekréció, hanem a specifikus aktivitás is csökkent.

Az Osler-Rendu-Weber betegség (herediter hemorrhagias teleangiectasia, HHT) egy ritka, autoszomális domináns érfejlődési rendellenesség, melyet mucocutan teleangiectasiák és visceralis arteriovenosus malformációk jellemeznek. A klinikai diagnózis a 4 Curaçao kritérium alapján történik.

Az új *ACVRL1* c.625+1 G>C splicing mutációt 5 Északkelet-Magyarországon élő családban regisztráltuk és 8 polimorf marker vizsgálatával alapító hatást igazoltunk, melyet a genealógiai vizsgálatok eredményei is megerősítettek.

## 8. Summary

Antithrombin (AT) is a key regulator of the coagulation. AT deficiency is a rare but major risk factor in venous thrombosis. It is classified as type I (quantitative) and type II (qualitative) deficiency. The molecular genetic background of AT deficiency is heterogeneous, more than 310 mutations have been described in the gene encoding AT (*SERPINC1*).

Thirty-one *SERPINC1* mutations including 11 novel ones and high mutation detection rate (98%) were detected in 156 non-related AT deficient patients (n=246 with family members). Heparin binding site deficiency (type II.HBS) was the most frequent (75.6%) including AT Budapest3 (AT Bp3, 86,4% of II.HBS), AT Padua I (9%) and AT Basel (4%). The presence of a founder effect concerning AT Bp3 was confirmed by the investigation of 12 polymorphic markers. Type II.HBS deficiencies behave differently in clinical and laboratory phenotypes from each other and from other AT deficiencies. Arterial thrombosis and pregnancy complications were the most frequent in AT Basel and AT Padua I, respectively. Median age at the time of thrombosis was the lowest in AT Bp3 homozygotes. By investigating three different functional anti-FXa based assays, it was suggested that not only the source of the enzyme but also other assay conditions seem to be crucial factors in assay sensitivity. The functional assay with high heparin concentration and pH 7.4 as assay conditions had low (44%) sensitivity for AT Bp3 and it was absolutely insensitive for AT Basel and Padua I. Heparin concentration and pH seem to be the key factors influencing the sensitivity of AT functional assays to II.HBS. The novel pathogenic p.Leu205Pro mutation showed a complex phenotype in the in vitro expression studies, as not only the secretion but also the specific activity of the mutant AT was altered.

The Osler-Rendu-Weber disease (or hereditary hemorrhagic telangiectasia; HHT) is a rare autosomal dominant vascular abnormality characterized by mucocutaneous telangiectases and visceral arteriovenous malformations. The clinical diagnosis of the disease is based on the four Curaçao criteria.

A novel splicing mutation (*ACVRL1* c.625+1 G>C) was identified in 5 families living in North-East of Hungary. Haplotype analysis was performed to ascertain the possibility of a founder effect in the case of *ACVRL1* c.625+1 G>C. Mutation carriers, their spouses and 50 healthy people were genotyped for 8 polymorphic markers within and outside of *ACVRL1* gene on chromosome 12. Founder effect was also demonstrated by genealogical methods.

## 9. Irodalomjegyzék és publikációs lista

### 9.1 Irodalomjegyzék

- [1] I. Gilbert C. White, Victor J. Marder, Sam Schulman, William C. Aird, and Joel S. Bennett, Overview of Basic Coagulation and Fibrinolysis, in: V.J. Marder (Ed.), Hemostasis and Thrombosis, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, 2013, pp. 103-8.
- [2] W.X. Dominic W. Chung, and Earl W. Davie, The Blood Coagulation Factors and Inhibitors: Their Primary Structure, Complementary DNAs, Genes, and Expression, in: V.J. Marder (Ed.), Hemostasis and Thrombosis 2013, pp. 139-45.
- [3] D.J. Perry, M.E. Daly, R.C. Tait, I.D. Walker, K. Brown, N.J. Beauchamp, et al. Antithrombin cambridge II (Ala384Ser): clinical, functional and haplotype analysis of 18 families. *Thromb Haemost.* 1998; **79**: 249-53.
- [4] H. Ni, J.S. Waye, W.P. Sheffield, B. Eng, M.A. Blajchman. Genetic linkage studies in antithrombin-deficient kindreds using a highly polymorphic trinucleotide short tandem repeat (STR) within the human antithrombin gene. *Am J Hematol.* 1994; **46**: 107-11.
- [5] W.C. Aird, Overview of Primary Disorders of Blood Vessels, in: V.J. Marder (Ed.), Hemostasis and Thrombosis 2013, p. 841.
- [6] J. McDonald, P. Bayrak-Toydemir, R.E. Pyeritz. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an overview of diagnosis, management, and pathogenesis. *Genet Med.* 2011; **13**: 607-16.
- [7] L. Muszbek, Z. Berezky, B. Kovacs, I. Komaromi. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. *Clin Chem Lab Med.* 2010; **48 Suppl 1**: S67-78.
- [8] S.C. Bock, Antithrombin and the Serpin Family, in: V.J. Marder, W.C. Aird, J.S. Bennett, S. Schulman, I. Gilbert C. White (Eds.), Hemostasis and Thrombosis, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, 2013, pp. 286-99.
- [9] A. Dementiev, M. Petitou, J.M. Herbert, P.G. Gettins. The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; **11**: 863-7.

- [10] D.J. Johnson, W. Li, T.E. Adams, J.A. Huntington. Antithrombin-S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. *EMBO J.* 2006; **25**: 2029-37.
- [11] O. Egeberg. Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965; **13**: 516-30.
- [12] G. Sas, G. Blasko, D. Banhegyi, J. Jako, L.A. Palos. Abnormal antithrombin III (antithrombin III "Budapest") as a cause of a familial thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1974; **32**: 105-15.
- [13] D.A. Lane, T. Bayston, R.J. Olds, A.C. Fitches, D.N. Cooper, D.S. Millar, et al. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1997; **77**: 197-211.
- [14] D.A. Lane, R.J. Olds, J. Conard, M. Boisclair, S.C. Bock, M. Hultin, et al. Pleiotropic effects of antithrombin strand 1C substitution mutations. *J Clin Invest.* 1992; **90**: 2422-33.
- [15] J. Corral, D. Hernandez-Espinosa, J.M. Soria, R. Gonzalez-Conejero, A. Ordonez, J.R. Gonzalez-Porrás, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 2007; **109**: 4258-63.
- [16] G. Finazzi, R. Caccia, T. Barbui. Different prevalence of thromboembolism in the subtypes of congenital antithrombin III deficiency: review of 404 cases. *Thromb Haemost.* 1987; **58**: 1094.
- [17] A. Girolami, A.R. Lazzaro, P. Simioni. The relationship between defective heparin cofactor activities and thrombotic phenomena in AT III abnormalities. *Thromb Haemost.* 1988; **59**: 121.
- [18] O. Harmanci, O. Ersoy, A. Gurgey, Y. Buyukasik, G. Gedikoglu, F. Balkanci, et al. The etiologic distribution of thrombophilic factors in chronic portal vein thrombosis. *J Clin Gastroenterol.* 2007; **41**: 521-7.
- [19] O. Ates. The deficiencies of protein C, protein S and antithrombin III in patients with retinal vein occlusion: a Turkish sample. *Clin Lab Haematol.* 2006; **28**: 391-2.

- [20] D. Calcaterra, J.T. Martin, A.M. Ferneini, R.W. De Natale. Acute mesenteric and aortic thrombosis associated with antithrombin deficiency: a rare occurrence. *Ann Vasc Surg.* 2010; **24**: 415 e5-7.
- [21] K. Shibahara, K. Tatsuta, H. Orita, T. Yonemura, H. Kohno. Superior mesenteric and portal vein thrombosis caused by congenital antithrombin III deficiency: report of a case. *Surg Today.* 2007; **37**: 308-10.
- [22] P. Santangeli, A. Sestito. Acute left atrial thrombosis during anticoagulant therapy in a patient with antithrombin deficiency. *Acta Cardiol.* 2008; **63**: 635-7.
- [23] C.M. Tu, C.H. Hsueg, K.M. Chu, S.M. Cheng, T.P. Tsao. Simultaneous thromboses of double coronary arteries in a young male with antithrombin III deficiency. *Am J Emerg Med.* 2009; **27**: 1169 e3-6.
- [24] I. Peovska, J. Maksimovic, O. Kalpak, H. Pejkov, M. Bosevski. Recurrent myocardial infarction in a young football player with antithrombin III deficiency. *Cardiol J.* 2008; **15**: 463-6.
- [25] V. Roldan, A. Ordonez, F. Marin, E. Zorio, J.M. Soria, A. Minano, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S) supports a role for antithrombin deficiency in arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2009; **101**: 483-6.
- [26] M.D. McColl, J.E. Ramsay, R.C. Tait, I.D. Walker, F. McCall, J.A. Conkie, et al. Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1997; **78**: 1183-8.
- [27] J. Sabadell, M. Casellas, J. Alijotas-Reig, E. Arellano-Rodrigo, L. Cabero. Inherited antithrombin deficiency and pregnancy: maternal and fetal outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; **149**: 47-51.
- [28] C.C. Trenor, 3rd, A.D. Michelson. Thrombophilia and pediatric stroke. *Circulation.* 2010; **121**: 1795-7.
- [29] P.S. Maclean, R.C. Tait. Hereditary and acquired antithrombin deficiency: epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs.* 2007; **67**: 1429-40.
- [30] J.E. Bushman, D. Palmieri, H.C. Whinna, F.C. Church. Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2000; **24**: 559-65.
- [31] D. Hernandez-Espinosa, A. Minano, C. Martinez, E. Perez-Ceballos, I. Heras, J.L. Fuster, et al. L-asparaginase-induced antithrombin type I deficiency: implications for conformational diseases. *Am J Pathol.* 2006; **169**: 142-53.

- [32] R.C. Tait, I.D. Walker, D.J. Perry, S.I. Islam, M.E. Daly, F. McCall, et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol.* 1994; **87**: 106-12.
- [33] J. Mateo, A. Oliver, M. Borrell, N. Sala, J. Fontcuberta. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost.* 1997; **77**: 444-51.
- [34] C.Y. Vossen, J. Conard, J. Fontcuberta, M. Makris, V.D.M. FJ, I. Pabinger, et al. Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *J Thromb Haemost.* 2005; **3**: 459-64.
- [35] F.R. Rosendaal. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 1999; **82**: 610-9.
- [36] T. Sakata, A. Okamoto, T. Mannami, H. Matsuo, T. Miyata. Protein C and antithrombin deficiency are important risk factors for deep vein thrombosis in Japanese. *J Thromb Haemost.* 2004; **2**: 528-30.
- [37] W.M. Lijfering, J.L. Brouwer, N.J. Veeger, I. Bank, M. Coppens, S. Middeldorp, et al. Selective testing for thrombophilia in patients with first venous thrombosis: results from a retrospective family cohort study on absolute thrombotic risk for currently known thrombophilic defects in 2479 relatives. *Blood.* 2009; **113**: 5314-22.
- [38] J.L. Brouwer, N.J. Veeger, H.C. Kluin-Nelemans, J. van der Meer. The pathogenesis of venous thromboembolism: evidence for multiple interrelated causes. *Ann Intern Med.* 2006; **145**: 807-15.
- [39] E. Persson, M. Kjalke, O.H. Olsen. Rational design of coagulation factor VIIa variants with substantially increased intrinsic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; **98**: 13583-8.
- [40] K. Soejima, M. Yuguchi, J. Mizuguchi, K. Tomokiyo, T. Nakashima, T. Nakagaki, S. Iwanaga. The 99 and 170 loop-modified factor VIIa mutants show enhanced catalytic activity without tissue factor. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 49027-35.
- [41] S.T. Freer, J. Kraut, J.D. Robertus, H.T. Wright, N.H. Xuong. Chymotrypsinogen: 2.5-angstrom crystal structure, comparison with alpha-

- chymotrypsin, and implications for zymogen activation. *Biochemistry*. 1970; **9**: 1997-2009.
- [42] C. Kearon, W. Ageno, S.C. Cannegieter, B. Cosmi, G.J. Geersing, P.A. Kyrle, et al. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost*. 2016; **14**: 1480-3.
- [43] C. Demers, P. Henderson, M.A. Blajchman, M.J. Wells, L. Mitchell, M. Johnston, et al. An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. *Thromb Haemost*. 1993; **69**: 231-5.
- [44] J. Conard, L. Bara, M.H. Horellou, M.M. Samama. Bovine or human thrombin in amidolytic at III assays. Influence of heparin cofactor II. *Thromb Res*. 1986; **41**: 873-8.
- [45] Z. Berezky, R. Gindele, M. Speker, J. Kallai. Deficiencies of the Natural Anticoagulants - Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing. *EJIFCC*. 2016; **27**: 130-46.
- [46] B. Kovacs, Z. Berezky, Z. Olah, R. Gindele, A. Kerenyi, A. Selmeczi, et al. The superiority of anti-FXa assay over anti-FIIa assay in detecting heparin-binding site antithrombin deficiency. *American journal of clinical pathology*. 2013; **140**: 675-9.
- [47] C.L. Shovlin, A.E. Guttmacher, E. Buscarini, M.E. Faughnan, R.H. Hyland, C.J. Westermann, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet*. 2000; **91**: 66-7.
- [48] J. McDonald, R.E. Pyeritz, Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, in: M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, H.C. Mefford, K. Stephens, A. Amemiya, N. Ledbetter (Eds.), GeneReviews(R) [Internet], Seattle (WA), 2000 Jun 26 [Updated 2017 Feb 2].
- [49] S.A. Abdalla, M. Letarte. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*. 2006; **43**: 97-110.
- [50] C. Gallione, A.S. Aylsworth, J. Beis, T. Berk, B. Bernhardt, R.D. Clark, et al. Overlapping spectra of SMAD4 mutations in juvenile polyposis (JP) and JP-HHT syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010; **152A**: 333-9.

- [51] N.L. Prigoda, S. Savas, S.A. Abdalla, B. Piovesan, D. Rushlow, K. Vandezande, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *J Med Genet.* 2006; **43**: 722-8.
- [52] A.D. Bossler, J. Richards, C. George, L. Godmilow, A. Ganguly. Novel mutations in ENG and ACVRL1 identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): correlation of genotype with phenotype. *Hum Mutat.* 2006; **27**: 667-75.
- [53] F. Gedge, J. McDonald, A. Phansalkar, L.S. Chou, F. Calderon, R. Mao, et al. Clinical and analytical sensitivities in hereditary hemorrhagic telangiectasia testing and a report of de novo mutations. *J Mol Diagn.* 2007; **9**: 258-65.
- [54] T.G. Letteboer, J.J. Mager, R.J. Snijder, B.P. Koeleman, D. Lindhout, J.K. Ploos van Amstel, C.J. Westermann. Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet.* 2006; **43**: 371-7.
- [55] C.J. Gallione, G.M. Repetto, E. Legius, A.K. Rustgi, S.L. Schelley, S. Tejpar, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet.* 2004; **363**: 852-9.
- [56] E.A. Thompson, J.V. Neel. Private polymorphisms: how many? How old? How useful for genetic taxonomies? *Mol Phylogenet Evol.* 1996; **5**: 220-31.
- [57] N. Risch, D. de Leon, L. Ozelius, P. Kramer, L. Almasy, B. Singer, et al. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet.* 1995; **9**: 152-9.
- [58] N. Risch, H. Tang, H. Katzenstein, J. Ekstein. Geographic distribution of disease mutations in the Ashkenazi Jewish population supports genetic drift over selection. *Am J Hum Genet.* 2003; **72**: 812-22.
- [59] B.L. Niell, J.C. Long, G. Rennert, S.B. Gruber. Genetic anthropology of the colorectal cancer-susceptibility allele APC I1307K: evidence of genetic drift within the Ashkenazim. *Am J Hum Genet.* 2003; **73**: 1250-60.
- [60] M. Slatkin. A population-genetic test of founder effects and implications for Ashkenazi Jewish diseases. *Am J Hum Genet.* 2004; **75**: 282-93.
- [61] A.M. Laberge, J. Michaud, A. Richter, E. Lemyre, M. Lambert, B. Brais, G.A. Mitchell. Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin Genet.* 2005; **68**: 287-301.

- [62] T.A. Brown., Mapping Genomes, in: B. TA (Ed.), Genomes, 3rd edition, Garland Science, Oxford, 2007, pp. 65-9.
- [63] S.A. Tishkoff, B.C. Verrelli. Patterns of human genetic diversity: implications for human evolutionary history and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003; **4**: 293-340.
- [64] B. L, Linkage analysis, in: F.M. Buckingham L (Ed.), Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications, F.A. Davis Company, Philadelphia, 2007, pp. 249-51.
- [65] N. Lannoy, C. Lambert, M. Vikkula, C. Hermans. Overrepresentation of missense mutations in mild hemophilia A patients from Belgium: founder effect or independent occurrence? *Thromb Res.* 2015; **135**: 1057-63.
- [66] I. Garagiola, S. Seregni, M. Mortarino, M.E. Mancuso, M.R. Fasulo, L.D. Notarangelo, F. Peyvandi. A recurrent F8 mutation (c.6046C>T) causing hemophilia A in 8% of northern Italian patients: evidence for a founder effect. *Mol Genet Genomic Med.* 2016; **4**: 152-9.
- [67] G. Castaman, J.C. Eikenboom, E. Missiaglia, F. Rodeghiero. Autosomal dominant type 1 von willebrand disease due to G3639T mutation (C1130F) in exon 26 of von Willebrand factor gene: description of five Italian families and evidence for a founder effect. *Br J Haematol.* 2000; **108**: 876-9.
- [68] H. Peretz, A. Mulai, S. Usher, A. Zivelin, A. Segal, Z. Weisman, et al. The two common mutations causing factor XI deficiency in Jews stem from distinct founders: one of ancient Middle Eastern origin and another of more recent European origin. *Blood.* 1997; **90**: 2654-9.
- [69] A. Zivelin, J.H. Griffin, X. Xu, I. Pabinger, M. Samama, J. Conard, et al. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 1997; **89**: 397-402.
- [70] R.J. Olds, D.A. Lane, V. Chowdhury, G. Sas, I. Pabinger, K. Auberger, S.L. Thein. (ATT) trinucleotide repeats in the antithrombin gene and their use in determining the origin of repeated mutations. *Hum Mutat.* 1994; **4**: 31-41.
- [71] M. Puurunen, P. Salo, S. Engelbarth, K. Javela, M. Perola. Type II antithrombin deficiency caused by a founder mutation Pro73Leu in the Finnish population: clinical picture. *J Thromb Haemost.* 2013; **11**: 1844-9.
- [72] G. Lesca, E. Genin, C. Blachier, C. Olivieri, F. Coulet, G. Brunet, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: evidence for regional founder effects

- of ACVRL1 mutations in French and Italian patients. *Eur J Hum Genet.* 2008; **16**: 742-9.
- [73] C.J. Gallione, E.A. Scheessele, D. Reinhardt, A.J. Duits, J.N. Berg, C.J. Westermann, D.A. Marchuk. Two common endoglin mutations in families with hereditary hemorrhagic telangiectasia in the Netherlands Antilles: evidence for a founder effect. *Hum Genet.* 2000; **107**: 40-4.
- [74] K. Brusgaard, A.D. Kjeldsen, L. Poulsen, H. Moss, P. Vase, K. Rasmussen, et al. Mutations in endoglin and in activin receptor-like kinase 1 among Danish patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet.* 2004; **66**: 556-61.
- [75] K. Heimdal, B. Dalhus, O.K. Rodningen, M. Kroken, K. Eiklid, S. Dheyauldeen, et al. Mutation analysis in Norwegian families with hereditary hemorrhagic telangiectasia: founder mutations in ACVRL1. *Clin Genet.* 2016; **89**: 182-6.
- [76] G. Szeles, Z. Voko, T. Jenei, L. Kardos, Z. Pocsai, A. Bajtay, et al. A preliminary evaluation of a health monitoring programme in Hungary. *Eur J Public Health.* 2005; **15**: 26-32.
- [77] B. Kovacs, Z. Bereczky, A. Selmeczi, R. Gindele, Z. Olah, A. Kerenyi, et al. Progressive chromogenic anti-factor Xa assay and its use in the classification of antithrombin deficiencies. *Clin Chem Lab Med.* 2014; **52**: 1797-806.
- [78] K. Maruyama, E. Morishita, M. Karato, T. Kadono, A. Sekiya, Y. Goto, et al. Antithrombin deficiency in three Japanese families: one novel and two reported point mutations in the antithrombin gene. *Thromb Res.* 2013; **132**: e118-23.
- [79] S.C. Bock, D.J. Levitan. Characterization of an unusual DNA length polymorphism 5' to the human antithrombin III gene. *Nucleic Acids Res.* 1983; **11**: 8569-82.
- [80] P.C. Winter, D.A. Scopes, L.P. Berg, D.S. Millar, V.V. Kakkar, E.E. Mayne, et al. Functional analysis of an unusual length polymorphism in the human antithrombin III (AT3) gene promoter. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1995; **6**: 659-64.
- [81] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M.J. Daly. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005; **21**: 263-5.

- [82] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; **7**: 248-9.
- [83] B. Li, V.G. Krishnan, M.E. Mort, F. Xin, K.K. Kamati, D.N. Cooper, et al. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics*. 2009; **25**: 2744-50.
- [84] P.C. Ng, S. Henikoff. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003; **31**: 3812-4.
- [85] E. Capriotti, R. Calabrese, R. Casadio. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics*. 2006; **22**: 2729-34.
- [86] B. Luxembourg, M. D'Souza, S. Korber, E. Seifried. Prediction of the pathogenicity of antithrombin sequence variations by in silico methods. *Thromb Res*. 2015; **135**: 404-9.
- [87] M.U. Böhme. Small edge populations at risk: genetic diversity of the green lizard (*Lacerta viridis viridis*) in Germany and implications for conservation management. *Conserv Genet*. 2007; **8**: 555-63.
- [88] S. Kuhle, D.A. Lane, K. Jochmanns, C. Male, P. Quehenberger, K. Lechner, I. Pabinger. Homozygous antithrombin deficiency type II (99 Leu to Phe mutation) and childhood thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2001; **86**: 1007-11.
- [89] R.J. Olds, D.A. Lane, M. Boisclair, G. Sas, S.C. Bock, S.L. Thein. Antithrombin Budapest 3. An antithrombin variant with reduced heparin affinity resulting from the substitution L99F. *FEBS letters*. 1992; **300**: 241-6.
- [90] R. Gindele, Z. Olah, P. Ilonczai, M. Speker, A. Udvari, A. Selmeczi, et al. Founder effect is responsible for the p.Leu131Phe heparin-binding-site antithrombin mutation common in Hungary: phenotype analysis in a large cohort. *J Thromb Haemost*. 2016; **14**: 704-15.
- [91] P. Couture, E.G. Bovill, C. Demers, J. Simard, R. Delage, B.T. Scott, et al. Evidence of a founder effect for the protein C gene 3363 inserted C mutation in thrombophilic pedigrees of French origin. *Thromb Haemost*. 2001; **86**: 1000-6.

- [92] A. Zivelin, N. Rosenberg, S. Faier, N. Kornbrot, H. Peretz, C. Mannhalter, et al. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood*. 1998; **92**: 1119-24.
- [93] M. Caspers, A. Pavlova, J. Driesen, U. Harbrecht, R. Klamroth, J. Kadar, et al. Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S - practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. *Thromb Haemost*. 2012; **108**: 247-57.
- [94] R. Kumar, A.K. Chan, J.E. Dawson, J.D. Forman-Kay, W.H. Kahr, S. Williams. Clinical presentation and molecular basis of congenital antithrombin deficiency in children: a cohort study. *Br J Haematol*. 2014; **166**: 130-9.
- [95] B. Luxembourg, D. Delev, C. Geisen, M. Spannagl, M. Krause, W. Miesbach, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost*. 2011; **105**: 635-46.
- [96] G. Castaldo, A.M. Cerbone, A. Guida, I. Tandurella, R. Ingino, A. Tufano, et al. Molecular analysis and genotype-phenotype correlation in patients with antithrombin deficiency from Southern Italy. *Thromb Haemost*. 2012; **107**: 673-80.
- [97] M.E. de la Morena-Barrio, I. Martinez-Martinez, C. de Cos, E. Wypasek, V. Roldan, A. Undas, et al. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J Thromb Haemost*. 2016; **14**: 1549-60.
- [98] M.E. de la Morena-Barrio, A.I. Anton, I. Martinez-Martinez, J. Padilla, A. Minano, J. Navarro-Fernandez, et al. Regulatory regions of SERPINC1 gene: identification of the first mutation associated with antithrombin deficiency. *Thromb Haemost*. 2012; **107**: 430-7.
- [99] M. Toderici, M.E. de la Morena-Barrio, J. Padilla, A. Minano, A.I. Anton, J.A. Iniesta, et al. Identification of Regulatory Mutations in SERPINC1 Affecting Vitamin D Response Elements Associated with Antithrombin Deficiency. *PloS one*. 2016; **11**: e0152159.
- [100] S. Aguila, J. Navarro-Fernandez, N. Bohdan, R. Gutierrez-Gallego, M.E. de la Morena-Barrio, V. Vicente, et al. Role of the C-sheet in the maturation of N-glycans on antithrombin: functional relevance of pleiotropic mutations. *J Thromb Haemost*. 2014; **12**: 1131-40.

- [101] J. Richards-Yutz, K. Grant, E.C. Chao, S.E. Walther, A. Ganguly. Update on molecular diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genet.* 2010; **128**: 61-77.
- [102] S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; **17**: 405-24.
- [103] R.C. Elston, Segregation Analysis, Advances in Human Genetics, Springer, Boston, MA, 1981.
- [104] J.A. Graham, H.M. Daly, P.J. Carson. Antithrombin III deficiency and cerebrovascular accidents in young adults. *J Clin Pathol.* 1992; **45**: 921-2.
- [105] M. Alhenc-Gelas, G. Plu-Bureau, J. Hugon-Rodin, V. Picard, M.H. Horellou, G.s.g.o.G. Thrombophilia. Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost.* 2017; **117**: 1040-51.
- [106] P. Ilonczai, Z. Olah, A. Selmeczi, A. Kerenyi, Z. Bereczky, R. Poka, et al. Management and outcome of pregnancies in women with antithrombin deficiency: a single-center experience and review of literature. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015; **26**: 798-804.
- [107] J. Kraft, R. Sunder-Plassmann, C. Mannhalter, P. Quehenberger, G. Tews, M. Langer, I. Pabinger. Women with homozygous AT deficiency type II heparin-binding site (HBS) are at high risk of pregnancy loss and pregnancy complications. *Ann Hematol.* 2017; **96**: 1023-31.
- [108] B.K. Mahmoodi, J.L. Brouwer, M.K. Ten Kate, W.M. Lijfering, N.J. Veeger, A.B. Mulder, et al. A prospective cohort study on the absolute risks of venous thromboembolism and predictive value of screening asymptomatic relatives of patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *J Thromb Haemost.* 2010; **8**: 1193-200.
- [109] C. Orlando, O. Heylen, W. Lissens, K. Jochmans. Antithrombin heparin binding site deficiency: A challenging diagnosis of a not so benign thrombophilia. *Thromb Res.* 2015; **135**: 1179-85.

- [110] K. Javela, S. Engelbarth, L. Hiltunen, P. Mustonen, M. Puurunen. Great discrepancy in antithrombin activity measured using five commercially available functional assays. *Thromb Res.* 2013; **132**: 132-7.

## 9.2 Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/399/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gindele Réka  
Neptun kód: EPJ3TD  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Selmeczi, A.\*, Gindele, R.\*, Ilonczai, P., Fekete, A., Komáromi, I., Schlammadinger, Á., Rázsó, K., Kovács, K. B., Bárdos, H., Ádány, R., Muszbek, L., Bereczky, Z., Boda, Z., Oláh, Z.:  
Antithrombin Debrecen (p.Leu205Pro) - Clinical and molecular characterization of a novel mutation associated with severe thrombotic tendency.  
Thromb. Res. 158, 1-7, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.023>  
  
\*Megosztott első szerzős közlemény  
IF: 2.65 (2016)
2. Gindele, R., Selmeczi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovacs, M., Balogh, G., Komáromi, I., Schlammadinger, Á., Rázsó, K., Boda, Z., Muszbek, L., Bereczky, Z.:  
Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: a large cohort study from a single diagnostic center.  
Thromb. Res. [Epub ahead of print], 2017.  
IF: 2.65 (2016)
3. Major, T., Gindele, R., Szabó, Z., Alef, T., Thiele, B., Bora, L., Kis, Z., Bárdossy, P., Rácz, T., Havacs, I., Bereczky, Z.:  
Evidence for the founder effect of a novel ACVRL1 splice-site mutation in Hungarian hereditary hemorrhagic telangiectasia families.  
Clin. Genet. 90 (5), 466-467, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cge.12806>  
IF: 3.326

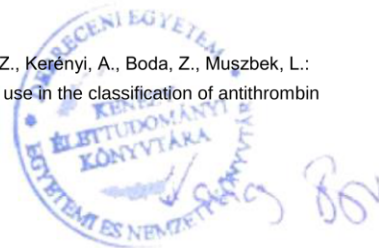




4. Gindele, R., Oláh, Z., Ilonczai, P., Speker, M., Udvari, Á., Selmeczi, A., Pfliegler, G., Marján, E., Kovács, B., Boda, Z., Muszbek, L., Bereczky, Z.: Founder effect is responsible for the p.Leu131Phe heparin-binding-site antithrombin mutation common in Hungary: phenotype analysis in a large cohort.  
J. Thromb. Haemost. 14 (4), 704-715, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.13252>  
IF: 5.287

#### További közlemények

5. Bereczky, Z., Gindele, R., Speker, M., Kállai, J.: Deficiencies of the natural anticoagulants: novel clinical laboratory aspects of thrombophilia testing.  
EJIFCC. 27 (2), 130-146, 2016.
6. Mezei, Z. A., Bereczky, Z., Katona, É., Gindele, R., Balogh, E., Fiatal, S., Balogh, L., Czuriga, I., Ádány, R., Édes, I., Muszbek, L.: Factor XIII B Subunit Polymorphisms and the Risk of Coronary Artery Disease.  
Int. J. Mol. Sci. 16 (1), 1143-1159, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16011143>  
IF: 3.257
7. Kovács, K. B., Pataki, I., Bárdos, H., Fekete, A., Pfliegler, G., Haramura, G., Gindele, R., Komáromi, I., Balla, G., Ádány, R., Muszbek, L., Bereczky, Z.: Molecular characterization of p.Asp77Gly and the novel p.Ala163Val and p.Ala163Glu mutations causing protein C deficiency.  
Thromb. Res. 135 (4), 718-726, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2015.01.011>  
IF: 2.32
8. Kovács, B., Bereczky, Z., Selmeczi, A., Gindele, R., Oláh, Z., Kerényi, A., Boda, Z., Muszbek, L.: Progressive chromogenic anti-factor Xa assay and its use in the classification of antithrombin deficiencies.  
Clin. Chem. Lab. Med. 52 (12), 1797-1806, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2014-0246>  
IF: 2.707





9. Kovács, B., Bereczky, Z., Oláh, Z., Gindele, R., Kerényi, A., Selmeczi, A., Boda, Z., Muszbek, L.:  
The Superiority of Anti-FXa Assay Over Anti-FIIa Assay in Detecting Heparin-Binding Site  
Antithrombin Deficiency.  
Am. J. Clin. Pathol. 140 (5), 675-679, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1309/AJCPVY4Z9XZMFOTH>  
IF: 3.005

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,202**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
13,913**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.11.16.



## 10. Tárgyszavak

ritka thrombophilia

antitrombin deficiencia

molekuláris genetikai vizsgálat

alapító mutáció

mutáció analízis

*in vitro* expressziós tanulmányok

Osler-Rendu-Weber betegség

antitrombin funkcionális teszt

trombózis

genotípus-fenotípus összefüggések

rare thrombophilia

antithrombin deficiency

molecular genetic examination

founder mutation

mutation analysis

*in vitro* expression studies

Osler-Rendu-Weber disease

antithrombin functional assay

thrombosis

genotype-phenotype associations

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Bereczky Zsuzsannának** az elmúlt 8 éves segítségéért, támogatásáért, bizalmáért, illetve a PhD értekezésem elkészültéhez nyújtott nélkülözhetetlen hozzájárulásáért.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Muszbek Lászlónak**, a Klinikai Kutató Központ alapítójának, hogy 2009-ben lehetőséget biztosított számomra a kutató munkába való bekapcsolódásba, valamint a közös társszerzős közleményeink kritikus áttekintéséért és építő jellegű kritikáiért.

Köszönet illeti a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék, a Laboratóriumi Medicina Intézet és a Megelőző Orvostani Intézet dolgozóit. **Dr. Balogh Gábor** és **Dr. Komáromi István** az *in silico* munkákban nyújtott segítséget. Köszönöm **Speker Mariannának**, **Szabó Zsuzsannának**, **Bogáti Rékának**, **Udvari Ágnesnek** és **Lajos Anikónak** a kísérletes munkákban nyújtott segítségüket, valamint baráti támogatásukat. Köszönettel tartozom **Haramura Gizellának** és **Molnár Évának** a laboratóriumi munkákban nyújtott segítségükért.

Hálás köszönettel tartozom a debreceni, budapesti, pécsi, egri és szerb **klinikus kollégáknak** a betegek mintáinak rendelkezésre bocsátásáért és a pontos dokumentációért, valamint támogató, áldozatkész munkájukért.

Köszönöm **Bárdossy Péter** családfakutatónak az 5 Osler-Rendu-Weber kóros család felmenőinek felkutatását, áldozatkész munkáját.

Végül köszönettel tartozom **Családomnak** és **Barátaimnak** - legfőképpen Zsuzsának, Vikinek, Margitkának és Szandinak - a szüntelen lelki támogatásukért, türelmükért, biztatásukért és gondoskodó szeretetükért, melyek nélkül ez a sokszor végeláthatatlannak tűnő mű nem valósulhatott volna meg.

"A szépet csodálni,  
Az igazat óvni,  
A nemeset tisztelni,  
A jót körülölelni,  
Ez vezeti az embert  
Az életben célokhoz."

*Rudolf Steiner*

E PhD értekezés megvalósítását az OTKA PD101120, K116228 és K106294, a TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, az MTA11003 és TKI227, a GINOP-2.3.2-15-2016-00039 pályázati támogatások tették lehetővé, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

## **12. Függelék**

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különnyomata.