

**VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT PARAHAEMOPHILIA MOLEKULÁRIS  
GENETIKAI ÉS BIOKÉMIAI KARAKTERIZÁLÁSA**

**Dr. Ajzner Éva**

**Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László**

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM**

**KLINIKAI BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET**

**Debrecen, 2003**

# Tartalomjegyzék

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I. Irodalmi áttekintés                                                                       | 4. oldal  |
| I.1. A véralvadás                                                                            | 4. oldal  |
| I.2. A véralvadás V-ös faktora (FV)                                                          | 7. oldal  |
| I.2.1. A FV bioszintézise és szerkezete                                                      | 7. oldal  |
| I.2.2. A FV prokoaguláns aktiválódása és a FVa APC inaktiválása                              | 8. oldal  |
| I.2.3. Az FV prokoaguláns és antikoaguláns funkciói                                          | 9. oldal  |
| I.3. FV deficienciák                                                                         | 10. oldal |
| I.3.1. FV defektusok története és ajánlott klasszifikációja                                  | 10. oldal |
| I.3.2. A parahaemophiliák klasszifikációja                                                   | 10. oldal |
| I.3.3. Veleszületett parahaemophilia                                                         | 12. oldal |
| I.3.4. Szerzett parahaemophilia                                                              | 13. oldal |
| I.3.5. A parahaemophiliák klinikai tünetei                                                   | 14. oldal |
| I.4. A parahaemophiliák laboratóriumi diagnosztikája                                         | 15. oldal |
| II. Betegek és célkitűzés                                                                    | 18. oldal |
| III. Anyagok és módszerek                                                                    | 19. oldal |
| III.1. Thrombocyta és plazma minták előkészítése                                             | 19. oldal |
| III.2. Coagulopathiák diagnosztikájában használt alvadási tesztek                            | 19. oldal |
| III.3. FV aktivitás meghatározás                                                             | 19. oldal |
| III.4. FV antigén meghatározás ELISA módszerrel                                              | 19. oldal |
| III.5. Immunoprecipitáció, SDS-poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblotting | 20. oldal |
| III.6. PCR amplifikáció és DNS szekvenálás                                                   | 20. oldal |
| III.7. Immunglobulin G tisztítása plazmából                                                  | 21. oldal |
| III.8. Az IgG FV ill. FVa-hoz való kötődésének vizsgálata ELISA technikával                  | 21. oldal |
| III.9. Az anti-FV autoantitest epitópjának karakterizálása                                   | 21. oldal |

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.10. A beteg plazmából származó IgG FVa prokoaguláns aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata funkcionális tesztekkel | 22. oldal |
| III.11. ELISA teszt a FV-anti-faktor V immunkomplex kimutatására                                                           | 22. oldal |
| IV. Eredmények                                                                                                             | 23. oldal |
| IV.1. Öröklött súlyos FV deficiencia; egy fiú csecsemő coagulopathiájának karakterizálása (1.sz.saját közlemény)           | 23. oldal |
| IV.1.1. Coagulopathia szűrőtesztek                                                                                         | 23. oldal |
| IV.1.2. FV aktivitás                                                                                                       | 23. oldal |
| IV.1.3. FV gén szekvencia analízis                                                                                         | 23. oldal |
| IV.1.4. Mutáns FV fehérjék kimutatása                                                                                      | 24. oldal |
| IV.2. Szerzett FV deficiencia; egy idős nőbeteg coagulopathiájának karakterizálása (2.sz. saját közlemény)                 | 24. oldal |
| IV.2.1. Szerzett coagulopathia kimutatása                                                                                  | 24. oldal |
| IV.2.2. FV specifikus autoantitest kimutatása a beteg IgG-frakciójában                                                     | 25. oldal |
| IV.2.3. A beteg IgG frakciójának hatása a FVa prokoaguláns aktivitására                                                    | 26. oldal |
| V. Általános megbeszélés                                                                                                   | 27. oldal |
| VI.1. Összefoglalás                                                                                                        | 30. oldal |
| VI.2. Summary                                                                                                              | 31. oldal |
| Irodalomjegyzék                                                                                                            | 32. oldal |
| Az értekezés alapjául szolgáló közlemények                                                                                 | 36. oldal |
| A szerző egyéb nemzetközi folyóiratban megjelent közleményei                                                               | 36. oldal |
| A szerző hazai közleményei                                                                                                 | 37. oldal |
| Köszönetnyilvánítás                                                                                                        | 39. oldal |

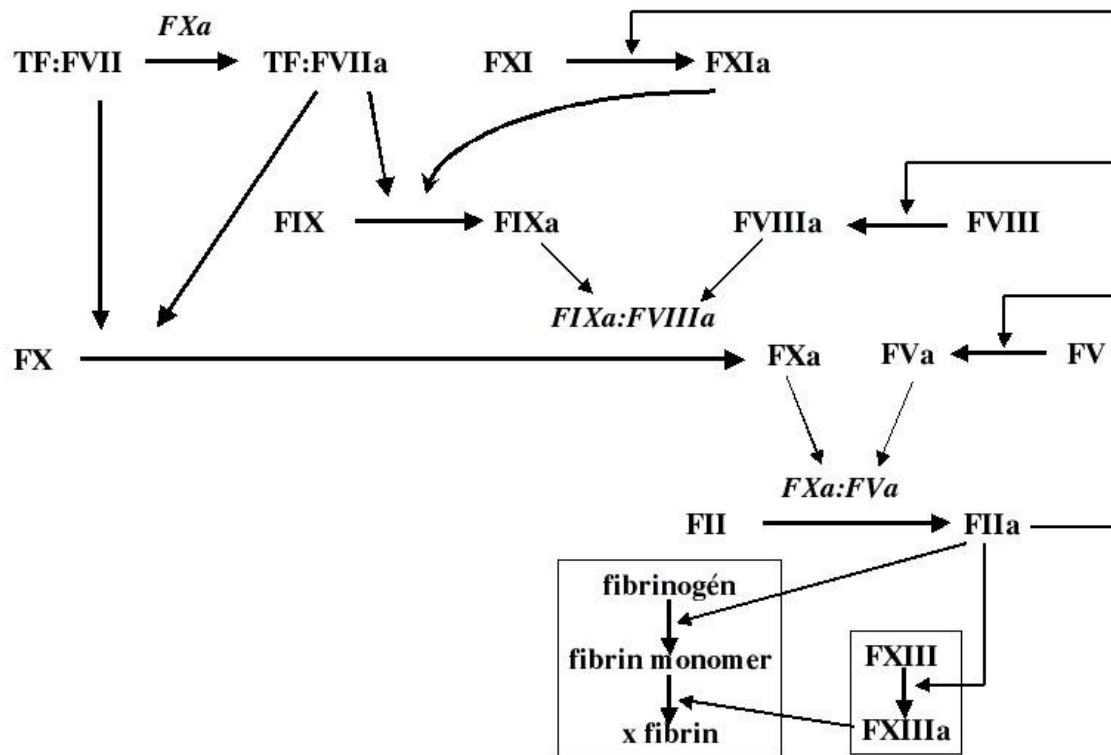
# I. Irodalmi áttekintés

## I.1. A véralvadás

A hemosztázis rendszer kettős feladatot lát el. Az intakt érpályán belül a vért folyékony állapotban tartja és ezzel biztosítja a szabad véráramlást. Érfal sérülés esetén viszont ugyanennek a rendszernek a funkciója a vérzés mielőbbi megszüntetése, ezáltal a vérvesztés minimalizálása. A hemosztázis rendszer ezt a komplex feladatot humorális, celluláris és vaszkuláris működések összehangolásával biztosítja.

A humorális rendszer, a véralvadás aktiválódását az érendothel sérülése vagy aktiválódása indítja be subendothelialis szöveti faktor (TF) véráram felé történő exponálásával vagy a TF endothel sejtekben történő expresszáásával. Ez előfordulhat az érfal sérülése miatt vagy az érendothel kémiai anyagok, citokinek vagy gyulladásos folyamatok által kiváltott aktiválódásakor.<sup>1-6</sup> A TF egyaránt kötődik a zimogén (FVII) valamint a keringésben már kis mennyiségben jelenlevő aktív VII-es faktorkhoz (FVIIa), TF-FVII ill. TF-FVIIa (extrinzik faktor tenáz) komplexet hozva létre.<sup>7</sup> A komplex mindkét formája elegendő katalitikus aktivitással bír kis mennyiségű X-es faktor (FX) aktív enzimmé (FXa) való hasításához, de a folyamat a zimogén FVII-et tartalmazó komplex esetén meglehetősen lassú. A FXa keletkezésével a TF:VII komplex is gyorsan konvertálódik TF:VIIa komplexé, aminek katalitikus aktivitása lényegesen nagyobb az TF:FVII komplexénél, és szubsztrát specificitása a FX mellett a FIX-re is kiterjed.<sup>8</sup> A komplex működése a véralvadás kezdeti fázisa során femto-pikomoláris mennyiségű FXa keletkezését eredményezi, ami pikomoláris mennyiségű trombin képződéséhez vezet. Ez a minimális mennyiségű trombin elegendő a trombocyták valamint az V-ös, VIII-as alvadási faktorok, prokofaktorok, részleges aktiválódásához, azaz FVa-vá és FVIIIa-vá alakulásához.<sup>9-11</sup> A FVIIIa az intrinzik tenáz komplex kofaktora, melyben az aktív IX-es faktor (FIXa) a szerin proteáz és a membrán felszín az aktivált trombocyták, mikropartikulumok, endothelialis és egyéb sejtek adják.<sup>12-14</sup> Az intrinzik tenáz komplex is a FX-et hasítja, de 50-100x nagyobb sebességgel, mint az extrinzik tenáz komplex.<sup>15-17</sup> Az immár jelentős mennyiségben képződő FXa a protrombináz komplex enzimeként nagy sebességgel hasítja a protrombint trombinná, ami a véralvadás propagációs vagy előrehaladott fázisának kulcsfeltétele. A protrombináz komplex kofaktora a FVa.<sup>7</sup> A nagy sebességgel keletkező szolubilis trombin tovább gyorsítja saját képződését a XI-es faktor

aktiválásával<sup>18</sup> és azáltal, hogy teljessé teszi a FV, FVIII és a thrombocyták aktivációját.<sup>11,19</sup> A trombin további működése során fibrinogén molekulákból fibrinopeptid A és B lehasításával szolubilis fibrin monomereket képez,<sup>20</sup> amelyek polimerizálódva a fibrinhálót alkotják. A háló stabilizálásához pedig aktiválja a XIII-as faktort<sup>21</sup> (FXIII), ami a fibrinháló kovalens keresztkötéseinek<sup>22</sup> kialakítását végzi.



## 1. ábra: A véralvadás humorális útjának vázlata

A véralvadás terminációs fázisában a trombin generáció megfékezését különböző antikoaguláns rendszerek végzik. A prokoaguláns folyamatok a véralvadási kaszkád valamennyi szintjén szabályozottak, enzimek gátlásával vagy a kofaktorok aktivitásának modulálásán keresztül.

A TF-útvonal-inhibitor (TFPI) a FXa-t és FVIIa-TF-FXa komplexet gátolja.<sup>23-25</sup> A korábban antitrombin III, ma már egyszerűen antitrombin néven szereplő szerin proteáz inhibitor, képes szinte valamennyi a véralvadási kaszkádban aktiválódó szerin proteáz neutralizálására, fő fiziológias funkciója azonban a trombin és a FXa gátlása.<sup>26</sup> Az antitrombin elsősorban szabad enzimek gátlására képes, a komplexekben működők

(tenáz, protrombináz) kevésbé elérhető számára. Így az antitrombin fiziológiás szerepe, hogy az érsérülés helyére limitálja a koagulációs folyamatot, megakadályozva a koagulációs enzimek szisztémás keringésbe való felszabadulását.<sup>7</sup> Az antitrombin önmagában kis hatékonyságú inhibitor, működését az endothel sejtek felszínén levő heparin-szerű molekulák (heparán szulfát) stimulálják.

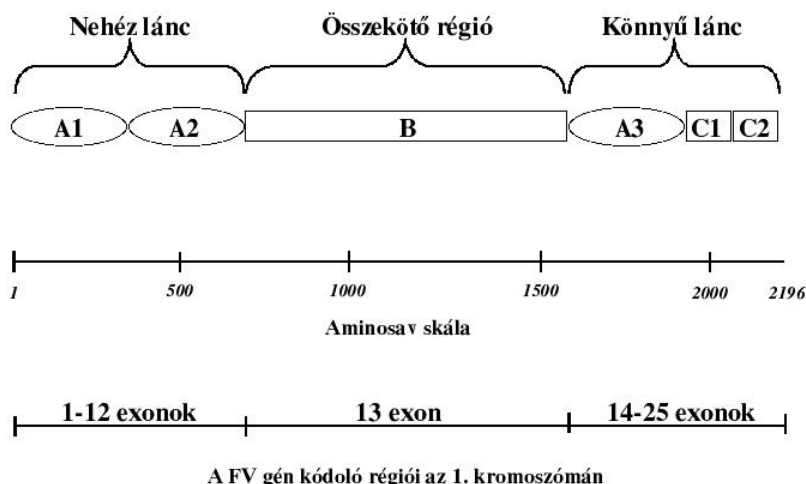
Az érfalon folyamatosan expresszált trombomodulin receptorhoz kikötődő trombin a protein C-t (PC) aktív szerin proteázzá hasítja és így aktiválja a PC antikoaguláns rendszert. Az aktivált PC (APC) limitált proteolízissel képes inaktiválni a foszfolipid membránhoz kötött FV/FVa-t és FVIIIa-t.<sup>7</sup> "In vivo" körülmények között a FVIII-at von Willebrand faktorhoz kötődése védi az APC hasításától.<sup>7</sup> A szabad protein S az APC kofaktora, membránhoz kötött komplexük a tenáz, protrombináz komplexben levő FVa és FVIIIa hasítására is képes.<sup>7</sup> A FVIIIa inaktiválása APC-től függetlenül is végbe mehet. A prokoaguláns FVIIIa molekulában az A2 domént és a A1/A3-C1-C2 heterodimert réz-ion-függő kapcsolat tartja össze. Fiziológiás pH mellett az A2 domén disszociál a heterodimer A1 doménjéről és a FVIIIa elveszti prokoaguláns aktivitását. Az intrinzik faktor tenáz komplex a FVIIIa molekula átmeneti stabilizálását biztosítja a pH-függő disszociációval szemben.<sup>27,28</sup>

A celluláris rendszer szerepe a TF-iniciálta véralvadásban az elsődleges thrombocyta thrombus létrehozásán túl, a humorális véralvadással való komplex együttműködés. A sérülés kapcsán szabaddá váló subendotheliális rostok illetve szolubilis aktiváló anyagok hatására a nyugvó állapotban keringő thrombocyták az adhezív felülethez tapadnak, aggregálódnak és szekretálják granulumaik tartalmát, ami további aggregációt eredményez és létrejön az elsődleges trombus. Ezen aktivációs folyamat során a thrombocyták egyrészt foszfolipid kettősrétegük átrendezésével prokoaguláns aktivitásúvá válnak, azaz alkalmassá válnak arra, hogy a humorális kaszkád alvadási komplexeinek foszfolipid felszínét biztosítsanak,<sup>12,29</sup> másrészt főként  $\alpha$ -granulumaikban tárolt prokoaguláns és véralvadást szabályozó fehérjéket szekretálnak a humorális alvadáshoz.

## I.2. A véralvadás V-ös faktora (FV)

### I.2.1. A FV bioszintézise és szerkezete

A FV egyláncú, 330 kD molekulatömegű glikoprotein. Plazma koncentrációja átlagosan 20 nmol/L, 7 µg/mL.<sup>30</sup> FV a plazmában szabadon keringő forma mellett a thrombocyták α-granulumaiban is megtalálható, amely mennyiség a teljes vérben levő FV körülbelül 25%-a.<sup>31,32</sup> Általánosan elfogadott, hogy a FV szintézisének elsődleges helye a máj, bár szintézisét néhány egyéb sejttípusban is kimutatták.<sup>32,33</sup> A thrombocyta FV eredete még vitatott. Nem eldöntött, hogy a thrombocyta FV "pool" képződésénél a döntő mechanizmus a plazma FV endocitózissal történő felvétele vagy a thrombocyták megakaryocita prekursoraiban történő szintézis.<sup>34-36</sup> A FV egyláncú molekulaként szintetizálódik, és sokszoros posztranszlációs módosítás után szekretálódik. A posztranszlációs módosítások közül a FV N-glikozilációja a legjelentősebb. A glikozilációs helyek döntő többsége a B-régióban van. A glikoziláció mellett szintézisét követően a FV foszforilálódik és szulfatálódik. A FV molekula "in vivo" féleletideje páviánokon végzett kísérletek szerint 16 óra. Az aktivált FV féleletideje azonban jóval rövidebb, ugyanezen rendszerben maximálisan 20 perc.<sup>37</sup>



2. ábra: A FV molekula doménszerkezete és kódoló régiói

A FV molekula génje 80 kb, az 1-es kromoszómán található (1q23), 25 exonból és 24 intronból áll.<sup>38</sup> Az izolált cDNS 6672 bp hosszú és 2224 aminosavból álló preproteint kódol, amely egy 28 aminosavat tartalmazó szignál peptidet is magában foglal. A FV molekula doménszerkezete a VIII-as faktoréhoz nagyon hasonló: A1-A2-B-A3-C1-C2 (2. ábra).<sup>37,39</sup> A FV A doménjei, a FVIII és a cöruoplazmin A doménjeivel azonos eredetűek. A két alvadási kofaktor az A és C doménjeiben 40%-os szekvencia azonosságot mutat.<sup>38,40</sup>

A FV molekula A doménjeinek molekulamodellje a cöruoplazmin 3 dimenziós strukturája alapján készült el, ami szerint a három A domén háromszög-alakban helyezkedik el a FV molekulában.<sup>41</sup> Elkészült a FV C2 doménjének röntgenkristallográfiás 3 dimenziós strukturája, valamint a teljes FVa előzetes molekulamodellje is.<sup>41</sup>

### **I.2.2. A FV prokoaguláns aktiválódása és a FVa APC inaktiválása**

Az FV FXa-kofaktor-aktivitásának kialakulása prokoaguláns enzimek (trombin, FXa) hatására történik.<sup>42-44</sup> Ennek során a FV B-összekötő régiója kihalad és disszociál a FVa nem kovalensen asszociált nehéz (A1-A2) és könnyű (A3-C1-C2) láncaitól. A FV trombin, ill FXa általi hasításakor a molekula először az Arg709 mellett hasad el, de ez még csak minimális prokoaguláns aktivitás kifejlődésével jár. A továbbiakban az Arg1018 majd az Arg1545 mellett történik meg a hasítás. Ez utóbbi szükséges a FVa molekula teljes prokoaguláns aktivitásának kifejeződéséhez. A FVa molekula kalciumhíddal összekapcsolt 105 kD molekulatömegű nehéz és 72/74 kD molekulatömegű könnyű láncból áll.<sup>45</sup> A könnyű lánc különböző mobilitási formái alapján a FVa molekulának két izoformája különíthető el, melyek a glikoziláció mértékében különböznek egymástól. A FVa1 az Asn 2181 pozícióban glikozilált, míg a FVa2 nem.<sup>46,47</sup> Ez a két izoforma eltérő membránaffinitásához<sup>48</sup> és eltérő prokoaguláns aktivitásához<sup>49</sup> vezet.

A FVa inaktiválása APC-mediált proteolízissel történik az Arg 306, Arg506, és Arg679 mellett.<sup>50</sup> Ezek a hasítások szigorú kinetikai szabályozás alatt állnak. Alacsony APC koncentrációnál az Arg506-nál van az elsődlegesen favorizált hasítási hely. Ugyanakkor az Arg506 mellett történő hasítás a FVa csak részleges (40% maradék prokoaguláns aktivitás) inaktivációjához vezet, a teljes FVa inaktiválódáshoz

elengedhetetlen az Arg306 hasítás.<sup>51</sup> A harmadik hasítási hely, az Arg679-nál kisebb jelentőséggel bír a FVa inaktiválása szempontjából. Az Arg306-nál történő hasítás sebességét 20x-ra fokozza a PS jelenléte, míg a FXa gátolja a FVa Arg506 mellett történő hasítását.<sup>52</sup>

### **I.2.3. A FV prokoaguláns és antikoaguláns funkciói**

A FV, a véralvadás enzim kofaktora, sajátos, kettős szerepet tölt be a normál hemosztázis egyensúlyának fenntartásában. A FVa a véralvadás protrombináz komplexében a protrombint trombinná alakító FXa kofaktora. A protrombináz komplex enzime tehát a FXa, kofaktora a FVa, szubsztrátja a protrombin, melyek részben kalcium hidakkal negatív töltésű foszfolipid membrán felszínhez kötődnek. Az egyláncú FV még inaktív prokofaktor, amelynek prokoaguláns FXa-kofaktor-aktivitása - ha egyáltalán ilyen van - kevesebb, mint a FVa kofaktor aktivitásának egy százaléka.<sup>53</sup> A FVa-t esszenciális FXa kofaktornak tartják, mivel ha jelen van a protrombináz komplexben, a FXa protrombin aktivációs képessége több ezerszeresre fokozódik.<sup>53,54</sup>

A FV APC kofaktor funkciójának felismerése a legújabb kutatások eredménye. A nem aktivált FV, vagy az APC által hasított FV<sup>55</sup> a PS-sel azonos jelentőségű kofaktorként működik az APC mellett a FVIIIa inaktiválásában.<sup>41</sup> A FV teljes prokoaguláns aktivációját követően antikoaguláns kofaktor képessége elvész.<sup>56,57</sup> Rekombináns FV variánsokkal végzett kísérletek alapján a B-domén C-terminális 70 aminosavának jelenlétéhez köthető a FV APC-kofaktor aktivitása.<sup>58</sup>

Az eddigi eredmények azt valószínűsítik, hogy a FV pro- és antikoaguláns működései között egy nagyon finomam szabályozott egyensúly létezik: a FV aktivációjával az antikoaguláns kofaktor funkció eltűnik, de az APC katalizálta FV proteolízis prokoaguláns hatással nem bíró antikoaguláns kofaktor funkciójú fehérjét eredményez. A FV aktivált formája tehát esszenciális prokoaguláns funkciót tölt be, aminek hiányában vérzékenység alakulhat ki. A nem-aktivált prekursor protein faktor viszont mint az APC antikoaguláns kofaktora működik a FVIIIa aktivitás szabályozásában. Ennek a funkciónak a sérülése (FV R506Q, FV Leiden) thrombosis-hajlamhoz vezethet. A FV molekula ezen kettős funkciójának pontos megismerése lényeges információkat adhat a FV deficiens betegek klinikai tüneteinek megértéséhez és majdani kezeléséhez.

## **I.3. FV deficienciák**

### **I.3.1. FV defektusok története és ajánlott klasszifikációja**

A FV felfedezése a norvég származású Paul Owren nevéhez kapcsolódik. Owren 1947-ben ismertetett egy súlyosan vérzékeny beteget, aki vérzékenységének (parahaemophilia, Owren betegség) hátterében egy addig nem ismert alvadási faktor hiánya állt.<sup>59</sup> Mivel ez volt a sorrendben ötödikként felfedezett alvadási faktor, ezért V-ös faktornak nevezték el. Az ezt követően közölt FV abnormalitások különböző súlyosságú vérzékenységgel jártak és a FV defektus egyértelműen haemorrhagias diathesist jelentett. Az APC-rezisztencia (APC-re adott csökkent antikoaguláns válasz) laboratóriumi fenotípus<sup>60</sup> és a FV Leiden mutáció<sup>61</sup> leírásával azonban a FV abnormalitások thrombosis hajlamot okozó nagy csoportja vált ismertté, melyek nem rendszerezhetők a haemorrhagiás FV defektusok klasszifikációjával.

A FV defektusok átdolgozott klasszifikációja,<sup>62</sup> ami még nem terjedt el a napi klinikai gyakorlatban, a FV defektusokat vérzékenységet okozó és thrombosis hajlamot okozó csoportra osztja. A vérzékenységet okozó FV defektusok közé tartoznak a parahaemophiliák - a klasszikus FV deficienciák, beleértve FV deficienciák kombinált formáit is- és a FV defektusok egyéb vérzékenységet okozó formái. A thrombosis hajlamot okozó FV defektusok közé tartoznak az izolált homo- és heterozigóta FV Leiden mutáció és a pszeudohomozigóta FV Leiden mutáció (FV Leiden mutáció, heterozigóta I-es típusú FV deficienciával történő társulása).

### **I.3.2. A parahaemophiliák klasszifikációja**

A parahaemophiliák - a vérzékenységet okozó FV defektusok legrégebben ismert csoportja - sokféle osztályozási módja használatos. A pathomechanizmus szerinti osztályozás öröklött és szerzett formákat különít el. Mindkét csoporton belül megkülönböztethető az izolált forma valamint a kombinált típus. Az első csoportban levő betegeknél kizárólag a FV aktivitása csökkent, míg a második csoportban a parahaemophilia öröklött vagy szerzett formája más faktor(ok) deficienciájával társul. Az örökletes kombinált FV, FVIII deficiencia legnagyobb esetszámú variánsa önálló entitás

lett. A betegség hátterében egy a mindkét fehérje poszttranszlációs módosításában résztvevő fehérje: az endoplazmás retikulum-Golgi intermediér kompartment fehérje (ERGIC-53) defektusa áll.<sup>63,64</sup>

A FV aktivitás alapján való osztályozás a haemophilia diagnosztikában általánosan használt rendszert követi. Eszerint enyhe, közép súlyos és súlyos parahaemophiliák különböztethetők meg. Az enyhe parahaemophilia 5-30%, a közép súlyos 1-5% a súlyos forma 1% alatt levő FV aktivitást feltételez. Ez a klasszifikáció azonban megtévesztő, mert a plazma FV aktivitás sokszor nem korrelál a tünetek súlyosságával.

A plazma és thrombocyta FV "pool" nem egyformán érintett a különböző parahaemophiliák esetében. Egy további klasszifikáció szerint megkülönböztetünk kombinált FV deficienciákat, melyben a plazma és a thrombocyta FV "pool" egyformán csökkent és thrombocyta típusú FV deficienciákat, ahol csak a vérlemezke "pool" FV érintett. Bár viszonylag kevés FV deficienciát leíró közlésben szerepel mindkét FV "pool" gondos követése, becsülhetően a kombinált forma a gyakoribb. Az  $\alpha$ -granulumokban található FV szelektív deficienciájának legismertebb példája a FV Quebec, egy autoszomális domináns módon öröklődő betegség. Thrombocytopenia, normál plazma FV aktivitás, súlyosan csökkent thrombocyta FV aktivitás és normál thrombocyta FV antigénszint jellemzi.<sup>65</sup> A betegség pontos pathomechanizmusa nem ismert. Bizonyított azonban, hogy a megbetegedésben szenvedők thrombocytaiban a FV mellett valamennyi vizsgált  $\alpha$ -granulum fehérje (multimerin, thrombospondin, von Willebrand faktor, P-szelektin) proteolízise is fokozott.<sup>66,67</sup>

A parahaemophiliás betegek többségénél a FV aktivitás csökkenése arányos a FV antigénszint csökkenésével. A betegek 17%-ban azonban a FV funkcionális aktivitásának csökkenése aránytalanul magas antigénszinttel jár.<sup>62,68</sup> Ezekben az esetekben kóros funkciójú FV molekula áll a parahaemophilia hátterében. A két csoport elkülönítésére használt klasszifikáció szerint I-es típusú FV deficiencia az, melyben a FV aktivitás és antigénszintek csökkenése proporcionális. A csökkent funkciójú FV molekula esetében észlelt deficiencia II-es típusúnak számít, ilyenkor az antigénszint a FV aktivitáshoz viszonyítva jóval magasabb.

A szakirodalomban még olvasható, de a laboratóriumi tesztek szenzitivitásának fokozódásával lassan elavuló klasszifikáció az ún. CRM negatív és pozitív deficiencia

fogalma. A CRM rövidítés jelentése "cross reacting material". A fehérje-antigén kimutatási eljárás során a teszt pozitivitása a vizsgált fehérje, esetünkben a FV jelenlétét, negativitása pedig hiányát jelentette. A később használt "CRM reduced" kifejezés a csökkent, de még kimutatható fehérje mennyiségekre utalt.

### **I.3.3 Veleszületett parahaemophilia**

A hereditár parahaemophilia ritka kórkép. Öröklésmenete autoszomális recesszív, prevalenciája  $1:10^6$ . Az irodalomban körülbelül 200 eset szerepel.<sup>62,68</sup> Ezen esetek döntő többségénél azonban a részletes biokémiai és molekuláris genetikai háttér ismeretlen. A FV gén teljes szekvenciájának ismertetésével azonban egyre nő a részletesen vizsgált esetek száma. 2002 augusztusáig huszonegy FV deficienciát okozó mutációt (1.táblázat) írtak le.<sup>69-72</sup> A felderített mutációkat hordozó betegek közül tizennégy esetben volt súlyos a FV deficiencia, s e betegek közül tizenkét esetben homozigóta formában levő mutáció okozta a deficienciát, kettőnél pedig (ebből egyik a tézisekben is elemzett beteg) kombinált heterozigóta mutációt bizonyítottak.<sup>69,70</sup> A mutációk véletlenszerűen érintik a FV gén valamennyi exonját, természetesen a legtöbb mutáció az igen nagy 13-as exonban van, de ún. mutációs forró pont nem detektálható (1.táblázat). A mutációk között "nonsense", "frameshift", "splicing" és "missense" mutációk egyaránt előfordulnak. A felderített mutációk döntő többsége egy-egy családban fordult elő, csupán öt mutációt találtak meg legalább két nem rokon családban.

| Nukleotid változás                         | Exon | Hatás      | Elnevezés        | Referencia                                 |
|--------------------------------------------|------|------------|------------------|--------------------------------------------|
| <b>I. Nem működő mRNS</b>                  |      |            |                  |                                            |
| <b>"Nonsense" mutánsok</b>                 |      |            |                  |                                            |
| 1. A1102T                                  | 7    | K310Term   | FV Amersfoort    | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 2. C1690T                                  | 10   | R506Term   |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 3. C2308T                                  | 13   | R712Term   |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 4. C2491T                                  | 13   | Q773Term   | FV Casablanca    | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 5. C3571T                                  | 13   | R1133Term  |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| <b>"Frameshift" mutánsok</b>               |      |            |                  |                                            |
| 1. 8 bp deléció nt 1130-1139 (TG)AAGGG(TG) | 7    | Frameshift | FV Seoul1        | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 2. 2bp deléció nt 2833-2834-AC             | 13   | Frameshift |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 3. 1bp deléció nt 2857-2859-C              | 13   | Frameshift |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 4. 1 bp deléció nt 2952-T                  | 13   | Frameshift |                  | Ajzner E et al, Blood, 2002 (70)           |
| 5. 2 bp inzerció nt 3706+TC                | 13   | Frameshift |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 6. 4 bp deléció nt 4014-4017-TCAG          | 13   | Frameshift |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 7. 1 bp deléció nt 4291-4294-C             | 13   | Frameshift | FV Utrecht       | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 8. 4 bp inzerció nt 4793+ATTG              | 13   | Frameshift | FV Stanford      | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 9. 1 bp inzerció nt 5493+G                 | 16   | Frameshift | FV Debrecen      | Ajzner E et al, Blood, 2002 (70)           |
| <b>II. RNS "processing"</b>                |      |            |                  |                                            |
| <b>Conszenzus változások</b>               |      |            |                  |                                            |
| 1. G5509A                                  | 16   | Splicing   |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 2. G1701T                                  | 10   | Splicing   |                  | Schrijver I et al, Blood, 2002 (71)        |
| <b>III. Kódoló régió változásai</b>        |      |            |                  |                                            |
| <b>"Missense" mutánsok</b>                 |      |            |                  |                                            |
| 1. C836T                                   | 6    | A221V      | FV New Brunswick | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 2. T1927C                                  | 12   | C585R      | FV Nijkerk       | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 3. A5279G                                  | 15   | Y1702C     | FV Seoul2        | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 4 G6395A                                   | 23   | R2074H     |                  | van Wijk R et al, Blood, 2001 (69)         |
| 4 G6394T                                   | 23   | R2074C     |                  | Bossone A et al, Thromb Haemost, 2002 (72) |

**1.táblázat: FV deficienciát okozó FV gén mutációk**

#### **I.3.4. Szerzett parahaemophilia**

Szerzetten izolált FV deficiencia, FV elleni gátlótest képződésének a következménye. A veleszületett parahaemophiliákhoz hasonlóan igen ritka betegségnek tartották: egy az 1955 és 1997 között megjelent FV inhibitorral kapcsolatos közléseket feldolgozó tanulmány 105 eset klinikai és laboratóriumi sajátosságait elemezte.<sup>73</sup> Az azóta megjelent esettanulmányok és összefoglaló<sup>74</sup> viszont már az inhibitorképződés relatíve gyakoribb formájának minősíti az anti-faktor V antitest képződést, különösképpen azon formáját,

amely lokálisan alkalmazott bovin trombint tartalmazó kezeléssel átesett betegeknél alakul ki.

Anti-FV antitest kialakulhat alloimmunizáció kapcsán, öröklött FV deficienciában szenvedő betegek friss fagyasztott plazmával történő kezelésekor. Auto-antitestképződéssel anti-FV antitest leggyakrabban olyan betegeknél fordult elő akik előzetesen sebészeti kezelést, vértranszfúziót vagy antibiotikum kezelést kaptak, de nem ritka az idiopathiás esetek száma sem.<sup>73,74</sup> A már említett bovin FV-t tartalmazó készítmények alkalmazásakor kialakuló anti-FV antitest, a készítmény bovin FV-je ellen képződő anti-bovin FV antitest, amely a human FV-el keresztreakciót ad.<sup>73,74</sup>

Jellemző, hogy a FV inhibitoros betegek döntő többsége felnőttkorban diagnosztizált, nem ritka a 70 év feletti beteg. A FV inhibitorra jellemző, hogy spontán vagy kezelés hatására gyakran 4-22 hét alatt szanálódik. A betegség prognózisa, ha az inhibitor megjelenéséhez gyakran kapcsolódó nagy akut vérzést sikerül uralni, kifejezetten jó.<sup>73,74</sup>

### **I.3.5. A parahaemophiliák klinikai tünetei**

A parahaemophiliák klinikai tünetei változó súlyosságú vérzékenységtől a tünetmentességig különbözőek lehetnek. Mindösszesen négy FV elleni gátlótest okozta, thrombosis-hajlammal járó parahaemophiliás eset ismert.<sup>74,75</sup> Ezek közül két esetben az antitest lupus antikoaguláns (LA) aktivitást is mutatott, harmadik esetben pedig emelkedett antikardiolipin antitest szint is detektálható volt. A negyedik eset részletes biokémiai elemzése során igazolható volt, hogy a gátlótest a FVa APC általi inaktivációját akadályozta meg.<sup>75</sup> A parahaemophiliák függetlenül attól, hogy öröklött vagy szerzett formáról van szó, gyakran mucocutan típusú vérzéssel járnak.<sup>73,74,76</sup> Így a leggyakoribb tünetek az epistaxis, a szájüregi vérzések, a menorrhagia. Gyakori tünetnek számít a posztoperatív vérzés és az ízületi vagy izomközi vérzés. Ritka, de gyakran fatális tünet a központi idegrendszeri vérzés. Érdekes, hogy míg a gastrointestinalis vérzés és a haematuria ritka vérzéstípus a veleszületett parahaemophiliákban, addig a gátlótestes formáknál a vérzékenységet mutató betegek harmadánál jelentkeznek.<sup>73,76</sup>

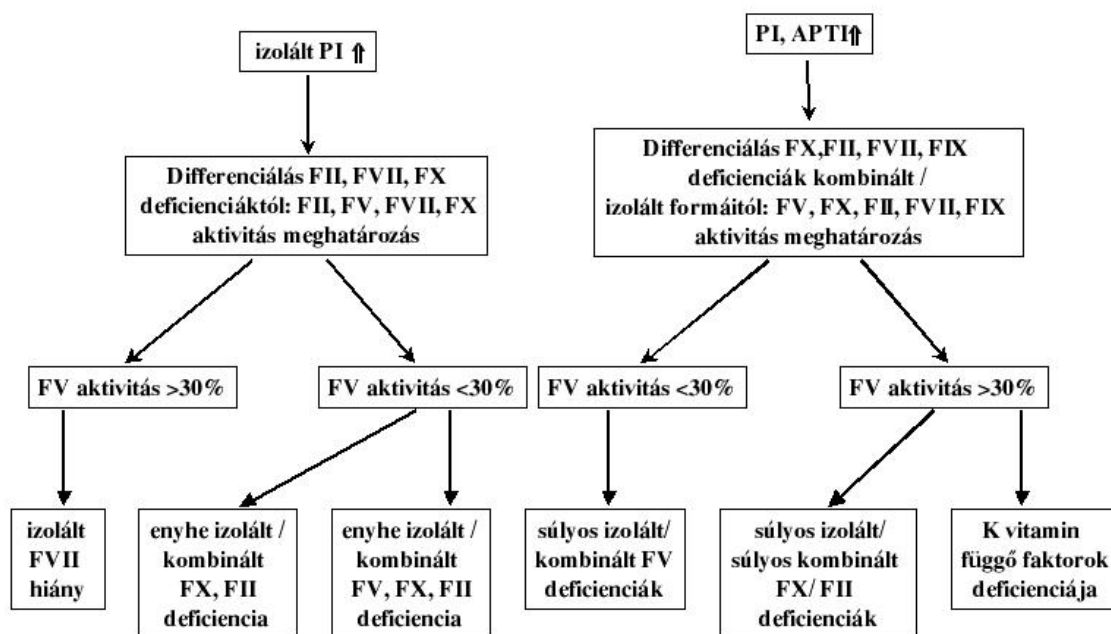
Egyelőre még nem tudjuk mi annak a magyarázata, hogy míg a humán szervezetben látszólag teljes FV hiány sem letális, addig a FV knock-out egerek esetében

az embriók kb fele már az embrionális fejlődés 9-10 napjáig elpusztul, a többiek pedig a születést követő 2 órán belül elvéreznek.<sup>77</sup>

## **I.4. A parahaemophiliák laboratóriumi diagnosztikája**

A FV deficiencia a coagulopathiák szűrőtesztjeiben leggyakrabban a protrombin idő (PI) és aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) megnyúlását okozza.<sup>73,82</sup> A lokálisan alkalmazott bovin trombin tartalmú készítmények hatására kialakuló FV alloantitestek esetében gyakran a fenti eltérésekhez a trombin idő (TI) megnyúlása is társul, ilyenkor ugyanis az alloantitest FV mellett trombinnal is reagál.

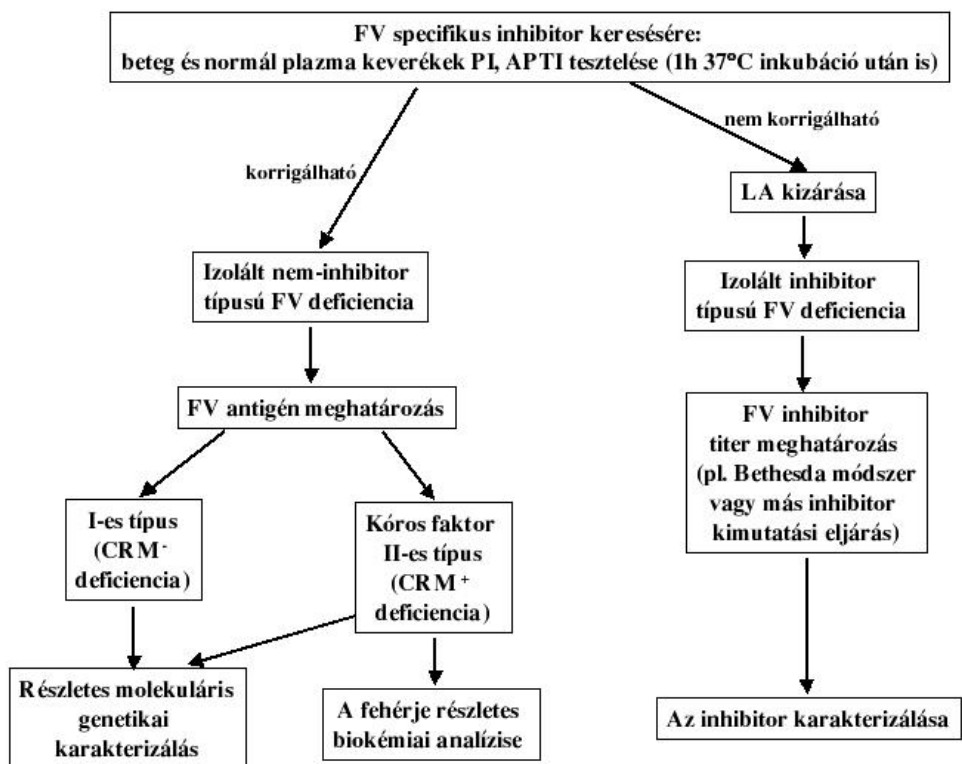
Az FV deficienciák általános kivizsgálási algoritmusa a 3. ábrán szerepel (Az ábra nem tartalmazza a TI megnyúlást okozó forma differenciál diagnosztikáját és a koagulációs laborok kötelező ellenőrző vizsgálatait amelyeket a hasonló laboreltéréseket előidézô citráttúlsúly, antikoaguláns illetve fibrinolitikus terápia tisztázása irányában végeznek el). Az enyhe parahaemophilia általában csak PI megnyúlással jár, a közép súlyos parahaemophiliák a PI megnyúlás mellett, az alkalmazott APTI reagens érzékenységtől függően okozhatnak APTI megnyúlást is. Az alacsony FV aktivitással járó esetekben pedig majdnem bizonyosan PI és APTI együttes megnyúlását találjuk. A hasonló alvadási szűrőteszt eredményekkel járó izolált vagy kombinált coagulopathiáktól való elkülönítésre egyfázisú PI, APTI alapú faktoraktivitás meghatározások szükségesek. A FV aktivitásának 30% alá csökkenése esetén a FV deficiencia igazolható. Mivel a nem specifikus gátlótest, a LA, interferálhat a foszfolipid függő tesztekkel végzett faktormeghatározásokkal (a PI alapú meghatározásokkal csak extrém nagy titer mellett), ezért LA jelenlétének kizárására is szükség lehet.



### 3. ábra: FV deficienciák kivizsgálásának algoritmus

Az öröklött FV hiányos esetek egyharmadánál, ismeretlen ok miatt, a celluláris funkció szűrôtesztje, a vérzési idő is megnyúlt.<sup>78</sup>

A parahaemophilia diagnózisának felállítását követően a betegség további karakterizálására is szükség lehet. A kezeléshez elengedhetetlen annak eldöntése, hogy inhibitor vagy faktor hiány okozza a faktoraktivitás csökkenését (4. ábra). A parahaemophilia okozta vérzékenység súlyossága igen rossz korrelációt mutat a plazmában mért FV aktivitásával. Mivel egyes szerzők szerint a thrombocyta FV aktivitás megtartottságától függ a tünetek megléte vagy hiánya,<sup>65,79,80</sup> ezért ennek meghatározása lényeges további információ lehet a klinikum számára. A 4. ábrán látható algoritmus segítségével lehetséges a FV deficiencia tudományos igényű karakterizálása.



**4. ábra: FV deficienciák osztályozásának algoritmus**

## **II. Betegek és célkitűzés**

Egy fiú csecsemő születésekor subduralis haematoma, majd védőoltásai kapcsán intramuscularis haematomák miatt került kivizsgálásra. Családi anamnézisében vérékenység, rokonházasság nem volt felderíthető.

A 78 éves nőbeteg súlyos anaemia és melena miatt került kórházi felvételre. Felvételét megelőzően három évvel a betegnél uterectomia és kétoldali ovariectomia történt. Az intraoperatív és posztoperatív vérzések kezelése során többször alkalmaztak friss fagyasztott plazma és vvt. massa készítményeket. A beteg családi anamnézisében vérékenység nem fordult elő. A gastrointestinalis kivizsgálások során vérzést okozó anatómiai eltérést nem találtak, atrofias antrum gastritis, cholelithiasis és reflux cholecystitis igazolódott. A beteg kezelése során friss fagyasztott plazma, thrombocyta és vvt. koncentrátumok, nagy dózisú immunglobulin adása mellett, plazmaferézis és immunszuppresszív terápia (ciklosporin A és ciklofoszfamid) alkalmazása is szerepelt. A követés 3 éve alatt a beteg néhány relapsuson esett át, négy különböző időpontban volt szükség kórházi kezelésére.

### **Célkitűzéseink**

- 1. A betegek haemorrhagias diathesisének karakterizálása.**
- 2. Az első pontban megfogalmazott vizsgálatok mindkét betegnél súlyos FV deficienciát igazoltak. A továbbiakban a betegek parahaemophiliájának részletes molekuláris genetikai hátterét és biokémiai mechanizmusát kívántuk felderíteni.**

### **III. Anyagok és módszerek**

#### **III.1. Thrombocyta és plazma minták előkészítése**

A vizsgált betegektől és a fiú csecsemő elérhető rokonaitól 0.105 mol/L nátrium citráttal 1:10 arányban alvadásgátolt vért vettünk. A Western blotting és az immunoprecipitációs vizsgálatok mintáihoz azonnal proteáz inhibitorok keverékét adtuk. A plazmát 22 °C-on, 2,000 g-vel, 20 percig történő centrifugálással nyertük. A thrombocyta szuszpenzió izolálása thrombocyta aktivációt gátló anyagok jelenlétében végzett differenciál centrifugálással történt.<sup>81</sup>

#### **III.2. Coagulopathiák diagnosztikájában használt alvadási tesztek**

A coagulopathiák szűrésére PI, APTI és TI vizsgálatokat végeztünk. A gátlótest kereséshez a beteg és normál plazma különböző arányú keverékeit is teszteltük azonnal, vagy 1 órással 37 °C-on történő inkubációt követően. A FV elleni gátlótest kimutatására Bethesda módszert használtunk.<sup>82</sup> LA jelenlétét funkcionális tesztekkel zártuk ki. A módszerek részletesebb ismertetését a 2.sz. saját közlemény tartalmazza.

#### **III.3. FV aktivitás meghatározás**

FV aktivitás meghatározása a betegek plazmájából és thrombocyta lizátumából egyfázisú PI alapú teszttel történt. A plazma FV aktivitás meghatározás kalibrációját gyári standard humán plazma segítségével végeztük, míg a thrombocyta FV aktivitás kalibrációja normál thrombocyta lizátum felhasználásával történt.

#### **III.4. FV antigén meghatározás ELISA módszerrel**

Sandwich ELISA rendszereket állítottunk be totál FV, FV nehéz lánc (FVNL) és FV könnyű lánc (FVKL) antigén (Ag) meghatározására. Az egyes rendszerek specificitását a "coating" során alkalmazott antitest biztosította, amely a totál FV ELISA-ban egy

poliklonális FV ellenes antitest volt, a FVNL ELISA esetén egy FV B domén epitóp ellenes monoklonális antitest (a FV nehéz láncát és B doménjet tartalmazó molekulát ismeri fel), míg a FVKL ELISA esetén FVKL ellenes monoklonális antitest volt. A sandwich másik oldalán FV ellenes antiszérum használatával biztosítottuk, hogy a potenciálisan jelenlevő valamennyi normál és kóros szerkezetű bekötődött FV felismerhető legyen. A módszer részletes ismertetése az 1.sz. saját közleményben található. A plazma FV Ag tesztek kalibrációját gyári standard humán plazma segítségével végeztük, míg a thrombocyta lizátumból történő FV meghatározás esetében egészséges donorok thrombocyta lizátumának felhasználásával történt a kalibráció. A FV antigén szinteket a normál átlag százalékában fejeztük ki.

### **III.5. Immunoprecipitáció, SDS-poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblotting**

A plazma FV-t immunprecipitációval izoláltuk. A módszer részletes ismertetését az 1. sz. saját közlemény tartalmazza. Az immunprecipitátumok és a teljes plazma minták SDS-PAGE elektroforézisét<sup>83</sup> követően, Western blotting analízist végeztük. Első antitestként általában az immunprecipitációhoz is használt poliklonális FV elleni antitestet használtuk. Az első saját közleményben ismertetett beteg esetében az eredmények megerősítésére további első antitesteket (FV ellenes antiszérum, FV B-domén ellenes monoklonális antitest) is alkalmaztunk. A fenti módszer részletes ismertetését szintén az 1.sz. saját közlemény tartalmazza.

### **III.6. PCR amplifikáció és DNS szekvenálás**

A genomiális DNS izolálását leukocytákból végeztük QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) felhasználásával. A FV gén teljes kódoló szakaszát, a "splicing" régiókkal és a promoterral együtt PCR amplifikációt követően szekvenáltuk. Ennek során részben saját tervezésű, az 1 sz. saját közleményben részletezett, illetve az irodalomban közölt<sup>69,84</sup> oligonukleotid primereket használtunk. Az ultrafiltrációval tisztított PCR termékek szekvenálása ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével történt.

### **III.7. Immunglobulin G tisztítása plazmából**

A FV inhibitor gyanús beteg plazmájából és a kontroll plazmákból a teljes IgG frakciót Protein G Sepharose oszlopon (Amersham Pharmacia Biotech) MabTrap Kit (Amersham Pharmacia Biotech) felhasználásával izoláltuk. Az IgG frakciót mikrokonzentrátoron töményítettük. Az izolált IgG koncentrációját BCA Protein Assay kittel (Pierce, Rockford, IL) határoztuk meg.

### **III.8. Az IgG FV ill. FVa-hoz való kötődésének vizsgálata ELISA technikával**

Saját fejlesztésű szolid-fázisú ELISA teszttel detektáltuk az anti-FV antitestek tisztított humán FV-höz és a FV trombin aktivált formájához való kötődését. Tisztított FV-t vagy FVa-t rögzítettünk ELISA lemezre, majd plazma vagy tisztított IgG különböző hígításaival inkubáltuk. A FV ill. FVa-hoz bekötődött IgG típusú anti FV antitest jelenlétét peroxidáz jelzett anti humán IgG és TMB szubsztrát felhasználásával detektáltuk.

### **III.9. Az anti-FV autoantitest epitópjának karakterizálása**

Az anti-FV autoantitest epitópjának karakterizálására blokkoló ELISA rendszert állítottunk be. A FV molekulán ismert epitóppal rendelkező monoklonális antitestekkel (részletes ismertetésüket lsd. 2.sz saját közleményben) blokkoltuk az ELISA-lemezhez rögzített FV molekula kötőhelyeit. Mosást követően a beteg IgG preparátumának különböző hígításait adtuk és peroxidázzal jelzett anti-humán IgG-vel mértük a bekötődött beteg IgG mennyiségét.

### **III.10. A beteg plazmából származó IgG FVa prokoaguláns aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata funkcionális tesztekkel**

A beteg IgG növekvő koncentrációit normál plazma "pool"-hoz adtuk és mértük a keverék PI, APTI és TI idejét. Kontroll kísérletekben a beteg IgG helyett egészséges donor IgG-jét használtuk a keverékekben. Az eredményeket végül beteg és normál plazma különböző arányú keverékeiben mért PI, APTI, TI időkhöz hasonlítottuk. A beteg IgG hatását a FVa prokoaguláns aktivitására minimálisan módosított kromogén protrombináz tesztben is vizsgáltuk. Rekombináns, trombin aktivált FVa-t inkubáltunk együtt a beteg IgG növekvő koncentrációival. A FVa maradék prokoaguláns aktivitását a kromogén trombin szubsztrát segítségével kinetikus tesztben mértük.

Mindkét módszer részletes ismertetését a 2.sz. saját közlemény tartalmazza.

### **III.11. ELISA teszt a FV-anti-faktor V immunkomplex kimutatására**

ELISA rendszert dolgoztunk ki FV-specifikus immunkomplexek detektálására. A tesztben "capture" antitestként poliklonális anti-human FV antitestet, detektálásra pedig peroxidáz jelölt anti-humán IgG-t használtunk. A beteg és kontroll plazmákat valamint thrombocyta lizátumokat különböző hígításokban teszteltük (lásd. 2.sz. saját közlemény).

## **IV. Eredmények**

### **IV.1. Öröklött súlyos FV deficiencia; egy fiú csecsemő coagulopathiájának karakterizálása (1.sz.saját közlemény)**

#### **IV.1.1. Coagulopathia szűrőtesztek**

A klinikailag vérzékeny csecsemő coagulopathiájának vizsgálatánál súlyosan megnyúlt PI-t (58.1 sec; kontroll: 8.7-11.5 sec) és APTI-t (198.8 sec; kontroll: 29.5-42.7 sec) észleltünk, míg a TI a normál tartományban volt.

#### **IV.1.2. FV aktivitás**

Az alvadási faktorok aktivitásának meghatározásakor a beteg plazmájában és thrombocyta lizátumában a FV aktivitást mérhetetlenül alacsonynak találtuk (mindkét esetben <0.4%). A családtagok közül a beteg édesanyjánál, édesapjánál és apai nagyanyjánál 50% körüli FV aktivitást mértünk, míg a többi vizsgált családtag normál FV fenotípust mutatott (1.sz. saját közlemény 1A ábra).

#### **IV.1.3. FV gén szekvencia analízis**

A DNS szekvencia analízis során a probandnál két kauzatív mutációt találtunk, mindkettőt heterozigóta formában: a 13-as exonban a 2952-es nukleotid pozícióban egy bázis (timin) delécióját, a 16-os exonban az 5493-as nukleotid pozícióban egy bázis (guanin) inzercióját. A proband édesanyjánál a 5493insG mutáció heterozigóta formája, édesapjánál a 2952delT mutáció heterozigóta formája volt igazolható (1.sz. saját közlemény 1B ábra). A proband DNS szekvenciájában két további, nem kauzatív mutációt találtunk: A327→G szubsztitúciót a 2-es exonban (csendes mutáció) és egy ismert polimorfizmust a 22-es exonban (heterozigóta A6250→T).<sup>84</sup>

#### **IV.1.4. Mutáns FV fehérjék kimutatása**

A proband genetikai eltéréseinek fehérjeszintű következményeként, elméletileg két különböző molekulásúlyú trunkált FV molekula képződhetne. A különböző FV epitópokra specifikus ELISA tesztek alkalmazásával FVKL:Ag egyáltalán nem volt a beteg plazmájában kimutatható (<0.5%). Ugyanakkor a másik két ELISA tesztben bár súlyosan csökkent mennyiségben, de mérhető volt a beteg plazmájában FVAg (FVNL:Ag 1.7%, total FVAg: 1.03%). A szülőknél és az érintett nagymamánál valamennyi ELISA tesztrel 50% körüli FVAg szint volt detektálható. (1.sz. saját közlemény, 2A ábra)

A beteg plazmájából végzett Western blotting vizsgálattal nem volt FV-specifikus sáv detektálható. Ha a beteg plazmájából immunprecipitációval izoláltuk a FV-öt és lényegesen nagyobb mennyiséget vittünk fel az SDS PAGE-ra, a megnövelt szenzitivitású Western blotting során három különböző első antitesttel (poliklonális FV elleni, FV antiszérum és FV B-domén elleni monoklonális) sikerült egy nagyon halvány, 236 kD mobilitású, FV-specifikus sáv jelenlétét kimutatni. Intakt, egyláncú FV nem volt kimutatható (1.sz. saját közlemény, 2B ábra).

### **IV.2 Szerzett FV deficiencia; egy idős nôbeteg coagulopathiájának karakterizálása (2.sz. saját közlemény)**

#### **IV.2.1. Szerzett coagulopathia kimutatása**

A beteg 3 éves követése során mindvégig megnyúlt PI (első felvételnél 81.3 sec; kontroll: 8.7-11.5 sec) és APTI (147.2 sec; kontroll: 29.5-42.7 sec) mellett normál TI-t detektáltunk. A beteg és normál plazma 1:1 arányú keverékeiből végzett PI, APTI idők nem mutattak teljes korrekciót. Az 1 órás 37°C-on történő inkubációt követően elvégzett tesztek eredményei hasonlóan alakultak. A beteg plazmájában izolált FV aktivitás (0.48%) csökkenés volt mérhető. A beteg thrombocyta lizátumában is súlyosan csökkent FV aktivitást (1.12%) detektáltunk.

A 3 éves követés alatt mért Bethesda titer eredmények végig alacsonyok voltak (1.25-2.0 BU). Tisztított FV beteg plazmához való adagolásakor a PI és APTI idők 7.5-10

$\mu\text{g/mL}$  szuplementált FV koncentrációnál normalizálódtak. A LA kimutatására elvégzett vizsgálatok eredménye negatív volt.

A beteg plazmájában és thrombocyta lizátumában normál totál FV:Ag (106 és 80%) szint mellett erősen csökkent FVKL:Ag (7.9, és 4.8%) volt detektálható. A FVKL:Ag szint csökkenése nem trunkált fehérje következménye volt, mivel a beteg plazmájából immunprecipitációval izolált FV Western blottinggal történő analízise során egyetlen, ~330kD molekulásúlyú, intakt FV molekulának megfelelő FV specifikus sáv volt detektálható.

A beteg FV génjének szekvenálásakor nem találtunk betegség okozó mutációt, csupán néhány ismert polimorfizmust és egy eddig nem közölt mutáció heterozigóta formáját a 13-as exonban. E mellett a beteg a Leiden mutációt heterozigóta formájában hordozta. (2.sz. saját közlemény, 3. táblázat)

#### **IV.2.2. FV specifikus autoantitest kimutatása a beteg IgG-frakciójában**

A FV ill. FVa -hoz való kötődést kimutató ELISA tesztekkel a beteg plazmájában és IgG frakciójában szignifikáns mennyiségben detektáltunk FV-ill. FVa- specifikus antitestet. (2.sz. saját közlemény, 1. ábra) A FV tartalmú immunkomplexek kimutatására szolgáló ELISA tesztekben a beteg plazmájában és thrombocyta lizátumában egyaránt FV-anti FV immunkomplexek voltak kimutathatók. (2.sz. saját közlemény, 2. ábra)

A blokkoló ELISA tesztben, négy FV specifikus monoklonális antitest hatását teszteltük. Mindegyik antitest kötődött a FV molekulához, de csak a FVKL C2 doménre specifikus HV1 antitest gátolta a beteg IgG FV molekulához való bekötődését. (2.sz. saját közlemény, 3. ábra)

### **IV.2.3. A beteg IgG frakciójának hatása a FVa prokoaguláns aktivitására**

A beteg IgG-je a normál plazma PI-jét és APTI-jét hasonló mértékben nyújtotta meg, mint az azonos IgG koncentrációt tartalmazó beteg plazma normál plazmához történő adása. A kontroll IgG-nek nem volt ilyen hatása. Az inhibitor nem befolyásolta a normál plazma TI idejét. A beteg IgG inhibitor hatása relatíve gyengének bizonyult, az effektív gátláshoz legalább 8 mg/mL beteg IgG koncentrációra volt szükség. (2.sz. saját közlemény, 4. ábra)

A beteg IgG növekvő koncentrációival történő inkubáció a rekombináns FVa prokoaguláns kofaktor aktivitását jelentősen gátolta a protrombináz tesztben, míg a kontroll IgG-nek nem volt ilyen hatása. 1 mg/mL beteg IgG esetén a gátlás mértéke meghaladta a 70%-ot és fiziológiás IgG koncentráció esetén (~10 mg/mL) csupán 2.5% maradék FV aktivitás volt detektálható. (2.sz. saját közlemény, 5. ábra)

## V. Általános megbeszélés

Mindkét beteg szűrőtesztjei és faktor aktivitás eredményei egyértelműen a FV deficiencia súlyos formája mellett szóltak. A betegek kora, anamnézise típusos volt, a gyermeknél FV deficiencia veleszületett, az idős nőnél szerzett formáira utaltak. Az idős nőbetegnél a FV inhibitor szűrésére végzett keveréses vizsgálatok és a Bethesda titrálás eredményei alapján kóros FV molekula és a plazma pótlások hatására kialakuló allo-antitest képződés kombinált lehetősége is felmerült.

A FV antigén különböző specificitású ELISA tesztekkel történő vizsgálata során a gyermeknél csak a teszt érzékenyítésével volt 1% körüli totál ill FVNL:Ag mérhető, FVKL:Ag szintje viszont detektálhatatlan volt, ami I-es típusú FV deficiencia fenotípusának felelt meg. A FV gén teljes kódoló, splicing és promoter régióinak szekvenálásával két kauzatív mutációt mutattunk ki. Mindkét mutáció olvasási keret eltolódásán keresztül korai stop kodont eredményezett a 930 ill. 1776 aminosav pozíciókban. Eredményük trunkált FV molekula szintézise lehet: a mutáns 13-as exont tartalmazó allélról elméletileg a B domén egy részét és a teljes könnyű láncot nélkülöző FV protein képződhet, a mutáns 16-os exont tartalmazó allélról íródó fehérjéről pedig hiányozna a könnyű lánc jelentős része. Ez utóbbi 1775 aminosav hosszú polipeptid számított molekulásúlya ~200 kD. Figyelembe véve, hogy ez a mutáns tartalmazza az erősen glikozilált B domént, nagyon valószínű, hogy az a kis mennyiségben jelenlevő 236 kD fehérje, amit az immunoprecipitációt követő Western blotting során detektáltunk, ezen nagyobb trunkált fehérjének felel meg. A fehérjét FV<sub>Debrecen</sub>-nek neveztük el. A kisebb trunkált fehérje hiánya és a FV<sub>Debrecen</sub> erősen csökkent mennyisége, a mutáns mRNS<sup>85</sup> csökkent szintézisével, vagy a mutáns protein csökkent stabilitásával, intracelluláris degradációjával és gyorsult plazma clearance-vel magyarázható.<sup>86</sup>

A veleszületett FV hiányos gyermek mindkét FV kompartmentjében a FV aktivitása a detektálási határ alatti volt (<0.4%), és a FV deficiencia súlyos vérzékenységet idézett elő. Ismert, hogy a FV "knock out" egerek intrauterin vagy postnatalis első két nap során elvéreznek<sup>77</sup>, de túlélésükhöz már minimális <0.1% FV expreszió is elég<sup>87</sup>. Betegünkönél nem tudtunk intakt FV-t kimutatni. Azt azonban, hogy a teszt szenitivitásától kisebb mennyiségű minimális FV "riboszomális slippage" vagy szomatikus reverzió miatt jelen legyen, nem kizárható. Elképzelhető továbbá, hogy az

általunk kimutatott trunkált FV fehérjének (FV<sub>Debrecen</sub>) is van némi prokoaguláns aktivitása.<sup>88</sup>

Az idős nő plazmájában és thrombocytaiban, trunkált vagy kóros szerkezetű FV molekulára jellemző FV:Ag fenotípust mutattunk ki: total FV és FVNL specifikus ELISA rendszerekben normál, míg FVKL-specifikus ELISA-ban 10% alatti súlyosan csökkent antigénszint volt detektálható. Az immunoprecipitációt követő Western blotting analízis azonban normál mobilitású FV specifikus sáv jelenlétét igazolta, és a DNS szekvenálás során sem találtunk kóros FV molekula szintézisét magyarázó genetikai eltérést. A FVKL:Ag szint csökkenésének legvalószínűbb magyarázata, hogy az ELISA teszt "capture" antitestjének FV molekulán lévő target epitópja az autoantitest által részben lefedett. Ezen hipotézis megerősítésére blokkoló ELISA tesztekben a FV molekulán ismert epitóppal rendelkező monoklonális antitestekkel próbáltuk a beteg autoantitestjének bekötődését meggátolni. Az alkalmazott antitestek közül kettő epitópja a FVKL-n, harmadiké a NL-n a negyediké pedig a B doménen található. Csak a HV1 antitest, melynek epitópja a FVKL C2 doménjén, a 2060-2069 aminosav régióban van, interferált a beteg auto-antitestjének FV molekulához való kötődésével. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a HV1 antitest és a beteg autoantitestjének FV molekulán levő epitópjai azonosak vagy legalább részben átfednek. A C2 domén N-terminális vége a FVa foszfolipidfelszínhez való kötődésében játszik szerepet. Ennek gátlása jól magyarázza az alvadási tesztek és a protrombináz teszt eredményeit.

Az idős nőbeteg szerzett parahaemophiliájának hátterében álló anti-FV antitest kimutatható volt a beteg plazmájából és IgG frakciójából és reagált mind a FV mind a FVa-val. Funkcionális tesztekben a beteg IgG-je gátolta a FVa prokoaguláns aktivitását. FV-anti FV IgG immunkomplex a beteg plazmájában detektálható volt. Az antitest relatív alacsony titerű volt, de a funkcionális tesztek bizonyították, hogy ez a titer elegendő volt a FVa funkciójának plazmában történő gátlásához, s a vérzékenységi tünetek az "in vivo" hatékonyság mellett szóltak.

Tudomásunk szerint FV inhibitor thrombocytaiban való jelenlétét még nem vizsgálták. A betegünk mosott thrombocyta szuszpenziójában talált eredmények - erősen csökkent FV aktivitás, normál total FV:Ag és csökkent FVLC:Ag szint, FV-anti-FV immunkomplexek jelenléte - az inhibitor thrombocytaiban való jelenlétére utalnak. Az IgG típusú FV inhibitorok a thrombocyta normál "in vivo" IgG transzport mechanizmusával

bejuthatnak a thrombocyta alfa granulumokba.<sup>89-91</sup> Egy másik elképzelhető alternatív mechanizmus a FV-anti-FV immunkomplexek thrombocyták vagy megakaryocyták általi felvétele és  $\alpha$ -granulumba történő transzportja.

A FV inhibitor okozta parahaemophiliás nőbeteg gastrointestinális vérzése jól kezelhetőnek bizonyult, de a megnyúlt alvadási tesztek és az alacsony FV aktivitás a követés 3 éve alatt végig megmaradt. A tünetek szempontjából a thrombocyta FV aktivitását tartják meghatározónak. Az idős nőbeteg thrombocytáiban is kimutatható FV inhibitor, ami feltehetőleg hatékonyan képes gátolni a thrombocyta FV prokoaguláns aktivitását. A klinikai képet befolyásoló tényezők komplexitásához a beteg heterozigóta Leiden mutációja is hozzájárulhat. Ebben az esetben ugyanis a csekély mennyiségű autoantitest által nem gátolt plazma FV 50%-a a hosszabb ideig tartó prokoaguláns hatással bíró FV Leiden molekula, ami csökkentheti a vérzékenység súlyosságát.

## VI.1. Összefoglalás

Az örökletes és szerzett haemorrhagiás V-ös faktor (FV) hiány (parahaemophilia) ritkán előforduló haemorrhagiás diathesisek. A tézisekben két beteg, különböző típusú súlyos FV deficienciája kerül ismertetésre. Célunk a két különböző FV deficiencia pathomechanizmusának felderítése, és a klinikai tünetekért felelős molekuláris genetikai és biokémiai eltérések kimutatása volt.

A fiú gyermek súlyos vérzékenységének hátterében detektálhatatlan FV aktivitás állt. A proband DNS szekvenálása során a 13-as exonban egy bázis deléciója (2952delT) a 16-os exonban egy bázis inzerciója (5493insG) volt detektálható heterozigóta formában. Mindkét mutáció következménye olvasási keret eltolódás és korai stop kodon megjelenése a 930-as ill. 1776-os pozíciókban. A proband édesanyja heterozigóta a 5493insG mutációra míg édesapja a 2952delT mutációra. Mindkét mutáció olyan trunkált FV fehérjét eredményez, melyből részben vagy egészében hiányzik a FV könnyű lánc. ELISA módszerrel a FV N-terminális része, amely a nehéz láncot és a B-domént is tartalmazza, erősen csökkent de detektálható volt (1.7%). Immunoprecipitációt követő Western blotting analízissel pedig egy csekély mennyiségű FV specifikus, 236 kD molekulásúlyú trunkált fehérjét tudtunk kimutatni. Ez a fehérje, a FV<sub>Debrecen</sub>, nagy valószínűséggel a mutáns 16-os exont tartalmazó allél terméke.

78 éves nőbeteg ismétlődő gastrointestinális vérzéseinek hátterében megnyúlt prothrombin idő (PI) és aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) állt. Plazmájában (0.48%) és thrombocytaiban (1.12%) súlyosan csökkent FV aktivitás volt mérhető. A keveréses vizsgálatok inhibitor jelenlétére utaltak, az anti-FV antitest plazmatitere 1.25-2.0 BU volt. A FV antigén koncentráció poliklinális elfogó antitestet használó ELISA-val normális volt, ha azonban elfogó antitestként a könnyű láncsal reagáló HV1 antitestet használtuk a FV antigén szintet mind a beteg plazmájában (7.9 %) mind a thrombocytaiban (4.8%) erősen csökkentnek mértük. A FV molekula lehetséges strukturális rendellenességeit az immunprecipitált FV Western blotting analízisével és a FV gén szekvenálásával zártuk ki. A beteg plazmájában és IgG frakciójában a FV -tel és az aktivált FV-tel is reagáló antitest volt kimutatható. Mind a plazmában, mind a thrombocytaiban FV-tartalmú immunkomplexekeket észleltünk. A beteg IgG frakciója a normál plazma PI-jét és APTI-jét megnyújtotta és protrombináz tesztben gátolta a FV prokoaguláns kofaktor funkcióját. Kimutattuk, hogy az autoantitest a FV könnyű láncának C2 doménjén levő epitóppal reagál és neutralizálja a FVa prokoaguláns funkciót.

Az ismertetett fiúgyermek esetében a parahaemophilia örökletes, míg az idős asszonynál annak szerzett formája volt igazolható. Ezen ritka coagulopathia molekuláris hátterének megismerése segíthet abban, hogy megértsük azokat a mechanizmusokat, melyek a parahaemophiliás betegek változatos klinikai tüneteinek kialakulásához vezetnek, és lehetővé teszik a FV struktúra-funkció egyes összefüggéseinek jobb megértését.

## VI.2. Summary

Parahaemophilia (haemorrhagic factor V deficiency) is an uncommon genetic or acquired haemorrhagic diathesis. Here we describe two patients with different forms of severe FV-deficiency. We aimed to establish the pathomechanisms of both types of FV deficiency and characterize the molecular genetical and biochemical background responsible for the clinical symptoms.

A male infant with severe bleeding tendency had undetectable factor V (FV) activity. Sequence analysis of the proband's DNA revealed one base deletion in exon 13 (2952delT) and one base insertion in exon 16 (5493insG) in heterozygous form. Both mutations introduced a frameshift and a premature stop at codons 930 and 1776, respectively. The proband's father and mother were heterozygous for 2952delT and for 5493insG, respectively. Both mutations would result in the synthesis of truncated proteins lacking the complete light chain or its C-terminal part. In the patient's plasma no FV light chain was detected by ELISA. The N-terminal portion of FV containing the heavy chain and the connecting B domain was severely reduced but detectable (1.7%). A small amount of truncated FV specific protein with  $M_r$  236 kD could be immunoprecipitated from the plasma and detected by Western blotting. This protein, FV<sub>Debrecen</sub>, corresponds to the translated product of exon 16 mutant allele.

A 78-year-old female with repeated gastrointestinal bleeding presented highly prolonged prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT). Severely suppressed factor V (FV) activity was measured both in her plasma (0.48%) and platelets (1.12%). Mixing studies suggested the presence of an inhibitor titers of 1.25-2.0 BU in her plasma. FV antigen levels were normal both in the patient's plasma and platelet lysate by ELISA using polyclonal anti-FV capture antibody, but depressed when HV1 monoclonal antibody against the C2 domain in the FV light-chain was used as capture antibody. The FV molecule was found intact by Western blotting and by sequencing the FV gene. In the patient's plasma and IgG fraction an antibody reacting with both FV and FVa was detected by ELISA. The binding of the patient's IgG to FV could be inhibited by the HV1 antibody. The isolated IgG fraction of the patient induced PT and APTT prolongation, when added to normal plasma, and inhibited FV cofactor function in a prothrombinase assay. FV-containing immune-complexes were detected in the patient's plasma and platelet lysate. An anti-FV IgG was demonstrated in the patient's plasma and platelets. The autoantibody reacted with an epitope in the C2 domain of FV light chain and neutralized the procoagulant function of FVa.

The described cases represent an inherited and an acquired form of parahaemophilia. Identifying the molecular basis of cases with this rare coagulation disorder will provide more insight into the mechanisms resulting in variable clinical phenotype of patients with FV deficiency and also provide some pieces of information on the structural-functional relationship of FV molecule.

## Irodalomjegyzék

1. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2839-2843.
2. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR et al. Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium. *Blood*. 1989;73:968-975.
3. Carlsen E, Flatmark A, Prydz H. Cytokine-induced procoagulant activity in monocytes and endothelial cells. Further enhancement by cyclosporine. *Transplantation*. 1988;46:575-580.
4. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR et al. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:4533-4537.
5. Yang HL, Lu FJ, Wung SL, et al. Humic acid induces expression of tissue factor by cultured endothelial cells: regulation by cytosolic calcium and protein kinase C. *Thromb Haemost*. 1994;71:325-330.
6. Camera M, Giesen PL, Fallon J et al. Cooperation between VEGF and TNF-alpha is necessary for exposure of active tissue factor on the surface of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:531-537.
7. Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet*. 2000;355:1627-1632.
8. Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, Marder V. Overview of hemostasis. In: *Hemostasis and Thrombosis* (Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds), 4th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. 2001; 3-16.
9. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, et al. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem*. 1994;269:23357-23366.
10. Rand MD, Lock JB, van't Veer C et al. Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood*. 1996;88:3432-3445.
11. Butenas S, van't Veer C, Mann KG. Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J Biol Chem*. 1997;272:21527-21533.
12. Rosing J, van Rijn JLML, Bevers EM et al. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. *Blood*. 1985;65:319-332.
13. Tans G, Rosing J, Thomassen MC et al. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood*. 1991;77:2641-2648.
14. Stern D, Nawroth P, Handley D et al. An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:2523-2527.
15. Lawson JH, Mann KG. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem*. 1991;266:11317-11327.
16. Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH. Surface-dependent hemostasis. *Sem Hematol*. 1992;29:213-226.
17. Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Walsh PN. Components and assembly of the factor X activating complex. *Sem Thromb Hemost*. 1992;18:311-323.
18. Gailani D, Broze G J. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*. 1991;253:909-912.
19. Pieters J, Lindhout T, Hemker HC. In situ-generated thrombin is the only enzyme that effectively activates factor VIII and factor V in thromboplastin-activated plasma. *Blood*. 1989;74:1021-1024.
20. Mosesson MW. The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Sem Hematol*. 1992;29:177-188.
21. Naski MC, Lorand L, Shafer JA. Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII. *Biochemistry*. 1991;30:934-941.
22. Shen L, Lorand L. Contribution of fibrin stabilization to clot strength. Supplementation of factor XIII-deficient plasma with the purified zymogen. *J Clin Invest*. 1983;71:1336-1341.
23. Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, et al. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature*. 1989;338:518-520.
24. Rapaport SI. The extrinsic pathway inhibitor: a regulator of tissue factor-dependent blood coagulation. *Thromb Haemost*. 1991;66:6-15.
25. Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, et al. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood*. 1988;71:335-343.

26. Olson ST, Bjork I, Shore JD. Kinetic characterization of heparin-catalyzed and uncatalyzed inhibition of blood coagulation proteinases by antithrombin. *Methods Enzymol.* 1993;222:525-559.
27. Fay PJ, Smudzin TM. Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIII. *J Biol Chem.* 1992;267:13246-13250.
28. Pipe SW, Saenko EL, Eickhorst AN et al. Hemophilia A mutations associated with 1-stage/2-stage activity discrepancy disrupt protein-protein interactions within the triplicated A domains of thrombin-activated factor VIIIa. *Blood.* 2001;97:685-691.
29. Walsh PN. Platelet coagulant activities and hemostasis: a hypothesis. *Blood.* 1974;43:594-605.
30. Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood* 1982;60:59-63.
31. Chesney CM, Pifer D, Colman RW. Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:5180-84.
32. Owren CA Jr, Bowie EJ. Generation of coagulation factors V, XI, and XII by the isolated rat liver. *Hemostasis.* 1977;6:205-12.
33. Wilson DB, Salem HH, Mruk JS et al. Biosynthesis of coagulation factor V by human hepatocellular carcinoma cell line. *J Clin Invest.* 1984;73:654-8.
34. Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K et al. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood* 1998;92:3035-41.
35. Chui HC, Schick PK, Colman RW. Biosynthesis of factor V in isolated guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1985;75:339-46.
36. Gewirtz AM, Keefer M, Doshi K et al. Biology of human megakaryocyte factor V. *Blood.* 1986;67:1639-48.
37. Kane WH. Factor V. In: *Hemostasis and Thrombosis* (Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds), 4th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. 2001; 157-69.
38. Jenny R, Pittman D, Toole J et al. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human FV. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:4846-50.
39. Rosing J, Tans G. Factor V. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:1123-6.
40. Church WR, Jernigan RL, Toole JT et al. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structural related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81:6934-6937.
41. Nicolaes GAF, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease. Description of a Janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:530-538.
42. Monkovic D, Tracy P. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry.* 1990;29:1118-1128.
43. Suzuki K, Dahlbäck B, Stenflo J. Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem.* 1982;257:6556-6564.
44. Trans G, Nicolaes GA, Thomassen MC et al. Activation of human factor V by meizothrombin. *J Biol Chem.* 1994;269:15969-15972.
45. Dahlbäck B. Human coagulation factor V purification and thrombin-catalyzed activation. *J Clin Invest.* 1980;66:583-91.
46. Kim SW, Ortel TL, Quinn-Allen MA et al. Partial Glycosylation at asparagine-2181 of the second C-type domain of human factor V modulates assembly of the prothrombinase complex. *Biochemistry.* 1999;38:11448-11454.
47. Nicolaes GAF, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Partial glycosylation of Asn2181 in human factor V as a cause of molecular and functional heterogeneity: modulation of glycosylation efficiency by mutagenesis of the consensus sequence for N-linked glycosylation. *Biochemistry.* 1999;38:13584-13591.
48. Rosing J, Bakker HM, Thomassen MCLGD et al. Characterization of two forms of human factor Va with different cofactor activities. *J Biol Chem.* 1993;268:21130-21136.
49. Hoekema L, Nicolaes GAF, Hemker HC et al. Human factor Va1 and factor Va2: properties in the procoagulant and anticoagulant pathways. *Biochemistry.* 1997;36:3331-3335.
50. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem.* 1994;269:31869-31880.
51. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC et al. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor Va R506Q by activated protein. *J Biol Chem.* 1995;270:21158-21166.

52. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA et al. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor Va<sup>R506Q</sup> by activated protein C. *J Biol Chem.* 1995;270:27852-27858.
53. Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine factor V and factor Va to the activity of the prothrombinase. *J Biol Chem.* 1979;254:10952-10962.
54. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JWP et al. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem.* 1980;255:274-283.
55. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood.* 1999;93:2552-2558.
56. Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem.* 1994;269:18735-18738.
57. Váradi K, Rosing J, Tans G et al. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost.* 1996;76:208-214.
58. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B. The C-terminal region of the factor V B-domain is crucial for the anticoagulant activity of factor V. *J Biol Chem.* 1998;273:16140-16145.
59. Owren P. Parahemophilia: haemorrhagic diathesis due to absence of a previously unknown clotting factor. *Lancet.* 1947;1:446-448.
60. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:1004-1008.
61. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-67.
62. Girolami A, Simioni P, Scarano L et al. Hemorrhagic and thrombotic disorders due to factor V deficiencies and abnormalities: an updated classification. *Blood Rev.* 1998;12:45-51.
63. Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A et al. Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell.* 1998;93:61-70.
64. Nichols WC, Terry VH, Wheatley MA et al. ERGIC-53 gene structure and mutation analysis in 19 combined factors V and VIII deficiency families. *Blood.* 1999;93:2261-2266.
65. Tracy PB, Giles AR, Mann KG et al. Factor V (Quebec): a bleeding diathesis associated with a qualitative platelet factor V deficiency. *J Clin Invest* 1984;74:1221-8.
66. Janeway CM, Rivard GE, Tracy PB et al. Factor V Quebec revisited. *Blood.* 1996;87:3571-3578.
67. Hayward CPM, Cramer EM, Kane WH et al. Studies of a second family with the Quebec platelet disorder: evidence that the degradation of the  $\alpha$ -granule membrane and its soluble contents are not secondary to a defect in targeting to the  $\alpha$ -granules. *Blood.* 1997;89:1243-1253.
68. Tracy PB, Mann KG. Abnormal formation of the prothrombinase complex: factor V deficiency and related disorders. *Hum Pathol.* 1987;18:162-169.
69. van Wijk R, Nieuwenhuis K, van den Berg M, et al. Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency. *Blood.* 2001;98:358-367.
70. Ajzner E, Balogh I, Szabó T et al. Severe coagulation factor V deficiency caused by two novel frameshift mutations: 2952delT in exon 13 and 5493insG in exon 16 of factor 5 gene. *Blood.* 2002;99:702-5.
71. Schrijver I, Koerper MA, Jones CD, Zehnder JL. Homozygous factor V splice site mutation associated with severe factor V deficiency. *Blood.* 2002;99:3063-3065.
72. Bossone A, D'Angelo F, Santacroce R et al. Factor V Arg2074Cys: a novel missense mutation in the C2 domain of factor V. *Thromb Haemost.* 2002;87:923-924.
73. Knobl P, Lechner K. Acquired factor V inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11:305-18.
74. Ortel TL. Clinical and laboratory manifestations of anti-factorV antibodies. *J Lab Clin Med* 1999;133:326-34.
75. Kalafatis M, Simioni P, Tormene D et al. Isolation and characterization of an antifactor V antibody causing activated protein C resistance from a patient with severe thrombotic manifestations. *Blood.* 2002;99:3985-92.
76. Peyvandi F, Mannucci PM. Rare coagulation disorders. *Thromb Haemost.* 1999;82:1207-14.
77. Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A et al. Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. *Nature.* 1996;384:66-68.
78. Chiu HC, Whitaker E, Colman RW. Heterogeneity of human factor V deficiency. Evidence for the existence of an antigen-positive variant. *J Clin Invest.* 1983;72:493-503.

79. Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW. Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J Biol Chem.* 1978;253:6908-16.
80. Miletich JP, Majerus DW, Majerus PW. Patients with congenital factor V deficiency have decreased factor Xa binding sites on their platelets. *J Clin Invest.* 1978;62:824-31.
81. Muszbek L, Polgár J, Boda Z. Platelet Factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thromb Haemost.* 1993;69:282-5.
82. Kasper CK, Aledort LM, Counts RB et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh.* 1975;34:612.
83. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
84. Guasch JF, Cannegieter S, Reitsma PH et al. Severe coagulation factor V deficiency caused by a 4bp deletion in the factor V gene. *Br J Haematol.* 1998;101:32-39.
85. Montefusco MC, Duga S, Asselta R, et al. A novel two base pair deletion in the factor V gene associated with severe factor V deficiency. *Br J Haematol.* 2000;111:1240-1246.
86. Rand MD, Hanson SR, Mann KG. Factor V turnover in a primate model. *Blood.* 1995;86:2616-2623.
87. Yang TL, Cui J, Taylor JM, et al. Rescue of fatal neonatal hemorrhage in factor V deficient mice by low level transgene expression. *Thromb Haemost.* 2000;83:70-77.
88. Ortel TL, Devore-Carter D, Quinn-Allen MA et al. Deletion analysis of recombinant human factor V. *J Biol Chem.* 1992;267:4189-4198.
89. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7:52-62.
90. George JN. Platelet IgG: measurement, interpretation, and clinical significance. *Prog Hemost Thromb.* 1991;10:97-126.
91. George JN. Platelet IgG: Its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of  $\alpha$ -granule proteins. *Blood.* 1990;76:859-70.

## **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

I. É. Ajzner, I Balogh, T Szabó, A Marosi, L Muszbek. Severe coagulation factor V deficiency caused by two novel frameshift mutations: 2952delT in exon 13 and 5493insG in exon 16 of factor 5 gene.

Blood. 2002;99:702-705

IF: 8.977

II. É. Ajzner, I Balogh, G Haramura, Z Boda, K Kalmár, Gy Pfliegler, B Dahlbäck, L Muszbek. Anti-Factor V Auto-antibody in the Plasma and Platelets of a Patient with Repeated Gastrointestinal Bleeding

Accepted in J Thromb Haemost, December 2002

IF\*: 4.372

\* Thromb Haemost impakt faktora

## **A szerző egyéb nemzetközi folyóiratban megjelent közleményei:**

1. Szondy Z, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Toth R, Ancian P, Ajzner E, Fesus L. Induction of apoptosis by retinoids and retinoic acid receptor gamma-selective compounds in mouse thymocytes through a novel apoptosis pathway. Mol Pharmacol. 1997;51:972-82.

IF: 5.678

2. Kappelmayer J, Ajzner E, Muszbek L. Incompatibility of a recombinant thromboplastin and an APTT reagent on a fully automated coagulation analyzer. Blood Coagul Fibrinolysis. 1997;8:251-2.

IF: 1.938

3. R. Póka, É. Ajzner, I. Balogh. Public health approach to activated protein C resistance assay. Am J Obstet Gynecol 1997; 177: 1271-2.

IF: 2.519

4. Kerenyi A, Schlamadinger A, Ajzner E, Szegedi I, Kiss C, Pap Z, Boda Z, Muszbek L. Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. Thromb Res. 1999;96:487-92.

IF: 1.323

5. N. Regéczy, G. Lakos, I. Balogh, É. Ajzner, E. Kiss, G. Szegedi. The Leiden mutation of coagulation Factor V in hungarian SLE patients. Clin Appl Thromb Hemost 2000; 6: 41-5. IF: 0.567

6. S.N. Baré, R. Póka, I. Balogh, É. Ajzner. Factor V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. Aust NZ J Obstet and Gynaecol 2000;40:186-90. IF: 0.523

7. Katona E, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. J Immunol Methods. 2001 Dec 1;258(1-2):127-35 IF: 1.995

8. Olah L, Mész M, Kappelmayer J, Ajzner E, Csepány T, Fekete I, Bereczki D, Blaskó G, Csiba L. Natural coagulation inhibitor proteins in young patients with cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis. 2001;12(4):291-7 IF: 2.950

(A közlemények impakt faktora a 2000-es SCI Journal Rankings alapján)

### **A szerző hazai közleményei:**

1. Z Pap, É Ajzner, C Kiss, J Emödy, I Závodszy, A Horváth, L Muszbek. Thrombocytafunkció-zavar albínó gyermekekben. Orvosi Hetilap 1997;138:467-71
2. G Szűcs, I Mikó, É Ajzner, L Póti, K Szepesi, I Furka. Efficiency of prevention of thromboembolic complications with LMW-heparin in experiment. (in Hungarian, English abstract) Acta Chirurgica Hungarica 1997;36:356-8.
3. Póka R, Balogh I, Ajzner É, Nagy I.G. Orális fogamzásgátlás thromboemboliás szövődményeinek megelőzése: Módszertani javaslat. Orvosi Hetilap 1998; 139: 815-8.

4. Póka R, Ajzner É, Balogh I. A családi anamnézis és a Leiden-mutáció vizsgálatának összehasonlítása fogamzásgátlót szedni kívánók körében. Magyar Nőorvosok Lapja 1999; 162: 11-5
5. M Misz, L Oláh, J Kappelmayer, G Blaskó, M Udvardy, J Fekete, T Csépany, É Ajzner, L Csiba. Haemostatic abnormalities in ischemic stroke. (in Hungarian, English abstract) Medical Weekly 1998;139:2503-7.
6. N Regéczy, I Balogh, G Lakos, M Zeher, E Bodolay, G Szucs, E Kiss, E Ajzner, G Szegedi. Hypercoagulability in various autoimmune diseases: no association with factor V Leiden mutation. Haematologia (Budap) 2000;1: 41-5.

## Köszönetnyilvánítás

A lényeglátás, a kiolthatatlan vágy és képesség új ismeretek megszerzésére, módszerek elsajátítására, a humán nagyvonalúság és a "nem tudom" kimondásának képessége kevés tudós sajátja. Köszönöm témavezetőmnek - Muszbek professzornak - azt az élményt, hogy mindezt személyében megtapasztalhattam. Köszönöm, hogy megtanított arra, hogyan kell kérdéseket egyszerűen megfogalmazni és megmutatta, hogyan lehet azokra logikus válaszokat adni.

Haramura Gizustól tanulni, vele együtt dolgozni, apró trükköket ellesni nagy ajándék. Hálás vagyok kritikáiért is és egyszerűen azért, hogy ismerhetem.

A lucky student is one who has a talented, friendly supervisor. But to have two of them is something very special. Thank you professor Dahlbäck for being so open to scientific discussions, providing me with ideas both in labwork and in interpretation of results. I will never forget the understanding, friendship and sympathy you expressed during a hard period in my life.

Köszönet illeti a munkában szereplő cikkek valamennyi kollaborátorát.

Nem felejtetem ki a sokat túlórázó, mosolygós néha dühös, de mindig nagyon csinos és ügyeskezű kolleganőimet, akik működésem alatt a KBMPI-ben titkárnői teendőket láttak el, vagy a hemostasis illetve molekuláris genetikai labor dolgozói voltak. Köszönöm Lányok a segítségeteket.

A legnehezebb barátaimnak és családomnak köszönetet mondani. Olga, Gézu, Joli, Ágota, Gabiza, Gizus valamint kicsi és nagyobb családom, nektek ajánlom a dolgozatot. Nehéz, hogy édesapám nem olvashatja.