

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Gindele Réka

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudomány tudományágban

Írta: **Gindele Réka** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja keretében
Témavezető: **Dr. Bereczky Zsuzsanna**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Blaskó György, az MTA doktora
Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD

A doktori szigorlat időpontja, helye: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „C”
épület, Könyvtár, 2018. március 26., 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora
Dr. Németh Norbert, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Blaskó György, az MTA doktora
Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora
Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD
Dr. Németh Norbert, az MTA doktora

Az értekezés védésének helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2018. március 26. 13:00 óra

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.

A véralvadásban résztvevő prokoaguláns, antikoaguláns és fibrinolitikus faktorok különböző genetikai variánsai vérzésre vagy trombózisra hajlamosító tényezők lehetnek. Az antitrombin (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 mutatnak feltétlenül azonos klinikai megjelenést, 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 faktor (FXa), vagy trombin (FIIa) gátló hatását. Megfigyelték, hogy a jelenleg rendelkezésre álló funkcionális tesztek nem mutatnak azonos érzékenységet 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. 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 hemosztatikus 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. A hereditær hemorrhagias teleangiectasia (HHT; Osler-Rendu-Weber kór) egy multiszisztémás érfejlődési rendellenesség, melynek leggyakoribb tünetei a spontán visszatérő orrvérzések, a bőrön és nyálkahártyákon előforduló TA-k, valamint a tüdőben, az agyban és a gastrointestinális traktusban (GI) vérzéssel járó AVM-k. Az Osler-kór esetében jelenleg 3 gén mutációinak szerepét tartják hangsúlyosnak. A leggyakrabban érintett az *ENG* gén, mely az endoglin fehérjét, az érendotél egy fő glikoproteinjét kódolja. A másik gyakran érintett a legfőképpen az endotél 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 β) és a csont morfogén fehérje (BMP) útvonalon. Az Osler-Rendu-Weber kórkép autoszomális domináns öröklésmentet mutat és a különböző populációkban eltérő a mutációs spektrum, forrópontokat e génekben nem azonosítottak.

Jelen munkában 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. A propeptid lehasadása után az érett fehérje 432 aminosavból épül fel. Az AT két glikoformája van jelen a keringésben, túlnyomó többségben (90-95%) az α -glikoforma, míg <10%-ban a β -glikoforma.

A humán AT génje (*SERPINCI*) az 1q23-q25 pozícióban helyezkedik el, 1,4 kb mRNS-t eredményező 7 exont és 6 intront tartalmaz. 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. 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 inhibitornak nevezzük, mivel reakciókészsége az aktív alvadási faktorokkal alapvetően kismértékű, azonban heparin vagy heparán szulfát proteoglikán (HPSG) 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. 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. A FXa esetében azonban elegendő a pentaszacharid HBS régióhoz kötődése az RCL szabaddá válásához.

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

Az AT deficienciát először Egeberg és mtsai. írták le 1965-ben. Az első funkcionális defektusról (AT Budapest) 1974-ben Sas és mtsai. számoltak be. 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. Az I-es típusú AT deficienciában az AT aktivitás- és antigén szintje egyaránt csökkent, ami hibás fehérje szintézisre vagy szekréciónak 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.

Az AT deficiencia autoszomális domináns öröklésmentet követ. Az AT deficiens betegek többsége heterozigóta formában hordozza a genetikai eltérést, ehhez 50% körüli AT aktivitás társul. A betegség molekuláris genetikai háttere igen heterogén, mára már több mint 310 okozati mutációról számoltak be (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). A leggyakoribb 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.

Az I-es típusú eltérést okozó mutációk homozigóta formában az étellel 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. A II.HBS altípus feltehetően kisebb trombózis-kockázatot jelent a többi altípusnál. 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 felsővégtagokban, a mesenterialis, vese, portális, retinalis és agyi erekben. Néhány esetben artériás trombózisokról is beszámoltak. Terhes, AT deficiens nőknél fokozott a trombózis kockázata. Egy tanulmány szerint AT deficiens gyerekekben az iszkémiás stroke és az agyi vénás sinus trombózis esélye igen magas.

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.

Az AT deficiencia gyakorisága az általános populációban 1:2000 és 1:5000 közé tehető. Vénás tromboembólián (VTE) átesett betegekben ez az arány magasabb, 1:20 és 1:200 közötti lehet. 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 trombofilia tényezők közül az AT deficiencia tűnik a legsúlyosabbnak. Az AT deficiencia a tüdőembólia és az ismétlődő VTE tekintetében is jelentős rizikófaktor.

A VTE-n átesett AT deficiens betegek akutan általában heparin és heparin-AT koncentrátum terápiában részesülnek. Profilaktikus antikoagulálásra a K-vitamin antagonisták, vagy az új típusú orális antikoagulánsok (NOAC) a javalltak. 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.

2.1.4 Az antitrombin deficiencia laboratóriumi diagnosztikai módszerei

Elsővonalbeli szűrőtesztként egy funkcionális teszt, az AT aktivitás meghatározása történik. 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). Amennyiben csökkent AT aktivitást tapasztalunk, AT antigén meghatározás is történik. Mindhárom módszer elvégzése lehetőséget ad az AT deficiencia típusba sorolására.

Normál AT aktivitással rendelkező személyekben a ma használt trombin, vagy FXa alapú funkcionális tesztek azonos eredményt adnak a nemzetközi körkontroll vizsgálatok tanúságai szerint. 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. 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 érzékenynek bizonyultak. 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 immunfelometria a leggyakrabban alkalmazott módszer az AT koncentrációk meghatározására.

2.2 A hereditár hemorrhagias teleangiectasia

2.2.1 A hereditár hemorrhagias 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. 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 hereditár hemorrhagias teleangiectasia klinikai diagnózisa

A HHT klinikai diagnózisa az AVM-k és/vagy TA-k jelenlétén alapul. A megfelelő diagnózis felállítása a 2000-ben elfogadott és publikált Curaçao kritériumok alapján történik: (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 fenállása.

2.2.3 A hereditár hemorrhagiás teleangiectasia patogeneze

Három fő gént azonosítottak, melyek a HHT kialakulásáért felelősek. 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 β) és a csont morfogén fehérje (BMP) receptor komplex egyik alkotója, a TGF β 1-hez és TGF β 3-hoz nagy affinitással kötődik. 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. A betegséget összefüggésbe hozták még a *SMAD4* (Mothers against decapentaplegic homolog 4; 18q21.2) génnel. A kódolt fehérje egy intracelluláris szignál molekula a TGF β /BMP útvonalon.

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. A mutáció detektálási arány körülbelül 75%-ra tehető.

2.2.4 A hereditár hemorrhagiás 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. A *SMAD4* gén patogén variánsai a HHT-s betegekben leginkább juvenilis polyposis szindrómával kombináltan fordulnak elő. Az eddigi adatok alapján nincs egyértelmű genotípus-fenotípus összefüggés a klinikai fenotípus és az egyes patogén variánsok között.

2.3 Az alapító hatás

2.3.1 Az alapító hatás jelentősége, következménye, vizsgálati módszerei

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. 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. Számos tanulmány foglalkozik az askenázi zsidók között előforduló gyakori betegségekkel, melyek alapító hatás

eredményeképpen jöttek létre, illetve alapító hatás eredménye például az I-es típusú tirozinémia is a Quebec-ben élő francia kanadaiaknál.

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 terápia, vagy prevenció stratégiák megválasztását teszik egyszerűbbé az alapító mutációt hordozó populációban.

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. Lehetnek mono-, di-, tri-, tetra-, penta- vagy hexanukleotid hosszúságú régiók, melyek a különböző alléleket jellemzik. Az STR-ek meghatározását követően kapcsoltsági analízis révén következtetnek a mutáció korára, eredetére, valamint családfakutatás is történhet.

2.3.2 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. Olds és mtsai. a *SERPINC1* génen belüli 2 (ATT)_n trinukleotid rövid tandem ismétlődő (STR) szekvenciát és 4 polimorfizmust vizsgáltak haplotípus térképet készítve a kaukázusi populációban. A mutáns AT-hoz kapcsolódó haplotípusokat öt AT Budapest 3 (p.Leu131Phe) és öt p.Arg161* *SERPINC1* mutációt hordozó családban hasonlították össze és alapító hatás jelenlétét vetették fel. Hasonló kapcsoltsági analízist végeztek el Ni és mtsai. az AT Hamilton (p.Ala414Thr) és az AT Amiens (p.Arg79Cys) mutációkat hordozó családok esetében. Az AT Basel (p.Pro73Leu) mutáció a finn AT deficiens populációban feltehetően alapító hatás eredménye, azonban itt genetikai alátámasztás nem történt. Nagyszámú beteget involváló kiterjedt genetikai vizsgálatot az alapító mutációk vonatkozásában eddig egyetlen AT deficiens populációban sem végeztek.

2.3.3 Alapító hatás hereditér hemorrhagias teleangiectasias populációkban

A HHT széles körben fordul elő minden etnikai csoportban és földrészén. 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. Néhány populációban, így a holland Antillákon két *ENG* mutációt, *ACVRL1* alapító mutációkat francia, olasz és norvég HHT-s betegekben, *ENG* és *ACVRL1* mutációkat a dán populációban fedeztek fel.

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 *SERPINC1* 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 *ACVRL1* 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. 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 adatbázist hoztunk létre az AT deficiens betegekről, melybe a klinikai, a laboratóriumi és a molekuláris genetikai adatokat rögzítettük.

4.1.2 Osler-Rendu-Weber kór

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 szívvizsgálaton 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. 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 trombózist követően. Az öröklött trombofilia tényezőket (Protein C és S, APC rezisztencia, diszfibrinogénia) 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 Intézetben..

Az AT deficiencia diagnosztizálásához a KLK Tanszéken kifejlesztett hc-anti-FXa és progresszív anti-FXa (Labexpert Antithrombin H+P, Labexpert Kft, Debrecen, Magyarország) tesztek alkalmaztak Siemens BCS-XP koagulométeren (Siemens). 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* és *SMAD4*) kódoló régióit, az exon-intron határokat, valamint a promóter régiót fluoreszcens direkt szekvenálással vizsgáltuk ABI3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készüléken; az elektroferogramok analízise a Sequencing Analysis 5.4 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific) történt.

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 alkalmazásával (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia), szintén az ABI3130 genetikai analízátoron. Az MLPA fragmentek analízise a GeneMapper szoftver 4.1 (Thermo Fisher Scientific) verziójával történt.

4.5 Alapító hatás vizsgálata polimorf genetikai markerekkel

Az AT Bp3 mutáció alapító hatásának jelenlétét 63 AT Bp3 mutációt hordozó proband egyén (családtaggal 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 családtaggal együtt) és 50, a HMAP-ból származó kontroll egyén mintáján valósult meg.

Az SNP-k és a mikroszatellita markerek vizsgálatához magunk terveztük az oligonukleotidokat. Minden esetben ellenőriztük, hogy az általunk tervezett oligonukleotidok a megfelelő DNS szekvencia régiót amplifikálják. Az SNP-k egy részét FRET alapú technikával, más részét fluoreszcens direkt szekvenálással detektáltuk; a mikroszatellita markereket fluoreszcens fragment analízissel mutattuk ki. A *SERPINCI* 5'-hossz polimorfizmus (ld. később) kimutatása PCR-t követő agaróz gél elektroforézissel történt.

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. Az AT Bp3 mutáció gyakoriságának és e variáns alapító hatásának vizsgálatához 5 SNP-t vizsgáltunk olvadáspont görbe analízissel. Az rs677, rs1799876 és rs2227596 polimorfizmusokat külön-külön reakcióban vizsgáltuk, azonban a LightCycler®480 készülékkel több fluoreszcens jel egyidejű detektálására is van lehetőség. Az emissziós spektrumok átfedése miatt színekompenzációval tudjuk kiküszöbölni a detektálási csatornák közötti „áthallást”. Az rs941989 és rs2227612 polimorfizmusok vizsgálatánál multiplex reakciókat állítottunk össze, majd az analízis során színekompenzációt alkalmaztunk.

A HHT háttérében álló *ACVRL1* 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.

4.5.2 Egy nukleotidot érintő eltérések kimutatása fluoreszcens direkt szekvenálással

A *SERPINCI* gén ötödik exonjában található két, aminosavcserevel 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* 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.

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

Az 5'LP a *SERPINC1* gén kezdőkodonja előtt 345 bázispárra helyezkedik el, egy 32 és/vagy 108 bázispárból álló nem homológ szekvencia. 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.

A genotipizáló 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.

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.

4.5.4 Mikroszatellita markerek fluoreszcens fragmentanalízise

Első lépésben multiplex PCR reakciókat állítottunk össze, melyben saját tervezésű, 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 vizsgálatokor alkalmazott mikroszatellita markerek kimutatása során 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.

Az *ACVRL1* c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának vizsgálatokor alkalmazott mikroszatellita markerek vizsgálata során pedig 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, melyeket multiplex PCR reakcióban alkalmaztunk.

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 a 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 β -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 sejt felülúszókban 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 értékeit Labsystems iEMS Reader MF (Thermo Scientific) készüléken.

A sejtlyátumokat és sejtfeülúszókat SDS-PAGE analízisnek is alávetettük, valamint 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 alkalmazásával (Vector Laboratories, Burlingame, CA) váltottuk ki és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Invitrogen) reagenssel vizualizáltuk. Belső kontrollként a β -aktint (8H10D10, CellSignaling Technology, Leiden, Hollandia) alkalmaztuk.

Az AT aktivitásának meghatározása koncentrált feülúszóban az LX Antithrombin Hc+P (FXa) (Labexpert Kft), kit segítségével történt módosításokkal (kisebb mintahígítás és alacsonyabb heparin koncentráció). 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 patogénitását 3 predikciós módszer, a PolyPhen2, (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), a MutPred, (<http://mutpred.mutdb.org>) és a PhD-SNP (<http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>) segítségével vizsgáltuk. Az alkalmazott predikciós módszerek mindegyike 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 eltéréstől 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. χ^2 statisztikát használtunk a kategórikus változók összehasonlítására. Az AT Bp3 homozigóta hordozásának a trombólis 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. 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 olyan esetben nem találtunk genetikai eltérést sem fluoreszcens direkt szekvenálással, sem MLPA analízissel, amely betegeknél mérsékelten csökkent hc-anti FXa AT aktivitást mértek (79, 75 és 76%). E betegeknél az AT antigén szintek minden esetben a referencia tartományba estek (0,22, 0,21 és 0,22 g/L).

Az I-es típusú mutációt hordozók (heterozigóták) között szignifikánsan gyakrabban fordult elő VTE, mint a II-es típusú heterozigóta egyének között (66% vs. 49%, 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.

Összehasonlítottuk a VTE, illetve minden trombotikus esemény (vénás, artériás történet, terhességi komplikáció) bekövetkezésének idejét az I-es típusú, a II.HBS heterozigóták és az AT Bp3 homozigóták között. 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 formájában (medián életkor I-es típus: 34 év, 95%CI: 30-38 év vs. medián életkor II.HBS heterozigóta: 46 év, 95%CI: 33-59

év, $p=0,002$), azonban az I-es típusú deficienciában szignifikánsan magasabb életkorban következett be a VTE, mint az AT Bp3 homozigóta hordozóknál (medián életkor AT Bp3 homozigóta: 15 év, 95%CI: 12-18 év $p<0,001$). 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 (medián életkor I-es típus: 34 év, 95%CI: 30-38 év vs. medián életkor II.HBS heterozigóta: 40 év, 95%CI: 38-42 év $p=0,064$). Az AT Bp3 mutáció homozigóta formában történő hordozása ebből a nézőpontból is súlyosabb volt, mint az I-es típusú AT deficiencia (medián életkor AT Bp3 homozigóta: 15 év, 95%CI: 12-18 év $p<0,001$). 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 (átlagosan 5%) minden csoportban.

A betegeink 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 fordultak elő legmagasabb arányban (92,3%) a trombotikus tünetek; ez szignifikánsan magasabb arány, mint az AT Bp3 heterozigótákban, ahol a trombotikus tünetek aránya 56,6% ($p=0,001$) és az AT Padua I hordozókban, ahol a trombotikus tünetek aránya 53,3% ($p=0,006$). 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 20% vs. 48,7%, $p=0,041$; AT Padua I vs. AT Bp3 homozigóták 20% vs. 92,3%, $p<0,001$; AT Basel vs. AT Bp3 homozigóták 14,3% vs. 92,3%, $p<0,001$). 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 42,9% vs. 10,5%, $p=0,046$; AT Basel vs. AT Bp3 homozigóták 42,9% vs. 0%, $p=0,006$). Terhességi komplikációt leggyakrabban az AT Padua I hordozókban regisztráltunk (26,7%), bár ez statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak a többi II.HBS alcsoporttal történő összehasonlításban. Az AT Bp3 homozigóták esetében szignifikánsan gyakrabban regisztráltak proximálisan elhelyezkedő trombózist az AT Bp3 heterozigótákhoz

viszonyítva ($p=0.001$). Nincs szignifikáns különbség a trombózis rizikófaktorok tekintetében a II.HBS alcsoportok között.

Az AT Basel és AT Padua I hordozókban nincs különbség az első VTE megjelenésének idejében (medián életkor AT Basel: 51 év, 95%CI: 41-62 év vs. medián életkor AT Padua I: 62 év, 95%CI: 53-71 év $p=0,982$), valamint az AT Basel és AT Bp3 heterozigóták között (medián életkor AT Bp3 heterozigóta: 40 év, 95%CI: 35-45 év $p=0,095$). Az AT Bp3 heterozigótákban szignifikánsan korábban fordult elő VTE, mint az AT Padua I hordozókban ($p=0,010$). Az AT Bp3 homozigóták, ahol a medián életkor 15 év volt (95%CI: 12-18 év), 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 (medián életkor AT Basel: 49 év, 95%CI: 18-80 év vs. medián életkor AT Padua I: 43 év, 95%CI: 33-53 év $p=0,459$), az AT Bp3 heterozigóták és az AT Basel (medián életkor AT Bp3 heterozigóta: 40 év, 95%CI: 38-42 év, $p=0,997$), 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. Az AT Bp3 homozigóták között 13-an súlyos vagy szokatlan lokalizációjú MVT-n estek át. Hét beteg iliofemorális, 2 beteg pedig vena cava inferior trombózist szenvedett. Egy betegnél vena cava inferior és vesevéna trombózis fordult elő. Mesenterialis trombózist egy, tricuspidalis billentyű trombózist 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%CI: 3,10-63,74) nagyobbak tűnik az esélyük a TE kialakulására, mint a heterozigótáknak.

5.1.2 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.

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 az AT Bp3 mutációval.

A haplotípus analízis során kimutattuk, hogy a patogén „T allél” egyetlen haplotípussal társult. 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 és Alu8 mikroszatellita markerek analízisekor, a (ATT)₆ és (ATT)₁₅ 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)₂₄ és (AC)₂₅ formában fordult elő az AT Bp3 homozigótákban, míg a kontroll csoportban heterogén az ismétlődésszámok megjelenése, (AC)₁₉-tól (AC)₃₃-ig. A *SERPINC1* génhez távolabb, proximálisan elhelyezkedő D1S196 marker változatos ismétlődésszámokat mutatott mind az AT Bp3 homozigóta, mind a kontroll személyekben. A negatív kontrollként alkalmazott F13A1-STR ismétlődésszámai hasonló eloszlást mutatnak mind a beteg, mind a kontroll csoportban.

Ahol lehetőségünk volt, informatív családfákat is generáltunk, feltüntetve a megfigyelt haplotípusokkal.

5.1.3 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. E mutációk közül tíz I-es típusú, egy II-es típusú AT deficienciát eredményez.

Tízből 5 mutáció korai STOP kodont eredményez (p.Arg79ProfsTer34, p.Lys171ValfsTer16, p.Ser183SerfsTer100, p.Leu270ArgfsTer14 és p.Leu340LeufsTer5), mely eltéréseket összesen 7 egyén hordozza. Egy tünetmentes hordozó kivételével (aki 37 éves a diagnózis idején), mindegyikük fiatal korban (<40 év) esett át TE-n. További

rizikófaktort egy esetben sem tudtunk kimutatni. Egy-egy p.Lys171ValfsTer16, p.Arg79ProfsTer34 és p.Leu270ArgfsTer14 mutációt hordozó egyén két vagy több TE-t szenvedett el.

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 új 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.

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

Új mutáció patogenitásának vizsgálata biokémiai módszerekkel

A dolgozat megírásának időpontjáig a p.Leu205Pro mutáció következményeinek *in vitro* módszerekkel történő vizsgálata fejeződött be. Transziens transzfekciót 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. 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. A sejtlyázumban 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 transzfekcióból, ELISA módszerrel határoztuk meg (duplikátumban, 48 órával a transzfekciót követően). A β -galaktozidáz aktivitásra korrigáltuk a transzfekciós hatékonyságot. Az AT koncentráció a WT plazmida transzfektált sejtek felülúszójában $2,33 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$, míg a Pro205 mutánssal transzfektált sejtekében csak $0,56 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$ volt. 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 $3,94 \pm 0,95 \text{ U/mg}$.

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

A 246 AT deficiens beteg közül 32-en gyermek- és fiatal felnőttkorban (≤ 18 éves kor) estek át trombotikus eseményen. 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 mutáció hordozó. Egyikük egy II.PE (AT Budapest 5) eltérést és 3 gyermek I-es típusú (p.Ile218del, p.Leu270ArgfsTer14 és teljes *SERPINC1* gén deléción) 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 született. A trombózist közvetlenül kiváltó provokáló tényezőt egyiküknél sem regisztráltunk. Az AT Truro mutációt hordozó újszülött sinus sagittalis trombózison esett át és agyi véna 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.

5.1.5 Antitrombin deficiens betegek laboratóriumi fenotípusa

A hc-anti-FXa AT aktivitás és a p-anti-FXa aktivitás értékek alacsonyok és jól korrelálnak az I-es típusú AT deficiens betegekben. 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 alacsonyok a II.RS és II.PE betegekben és az AT antigén szintek a referencia tartományba esnek. 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.

Az általunk használt hc-anti-FXa diagnosztikus teszt minden esetben alacsony, azaz referencia tartomány alsó határa alatti AT aktivitás értéket mutatott a II.HBS egyéneknél (100% szenzitivitás). 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). 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. 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 tesztünk 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. 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 aktivitása 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.

5.2 Osler-Rendu-Weber kór

5.2.1 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-vel 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 tudunk kimutatni. Tovább folytatva a vizsgálatokat 19 személynél az *ACVRLI* 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) figyelték meg. Négy esetben volt szükség transfúzióra a súlyos orrvérzések következtében. Az AVM jelenlétét 11 felnőtt esetében vizsgálták, 4 esetben a májban találtak AVM-kat. Szintén 4 esetben figyelték 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 (*ACVRLI* 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 *ACVRLI* 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). 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.

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

csoporthoz 11 és 38 közötti ismétlődésszámokat figyeltünk meg. 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. 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. 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. A disztálisan távolabb lévő D12S270 marker mind a betegek, mind a kontroll csoport vizsgálatokor változatos ismétlődésszámot mutatott.

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

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.

6. Megbeszélés

6.1 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. 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.

6.1.1 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. 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 prevenciós, 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. 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. 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 nagyszámú mutációhordozót toborozzunk 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 *SERPINCI* gén 5 intronjában, a D1S218 markert a *SERPINCI* géntől disztálisan, a D1S196 markert a *SERPINCI* géntől proximálisan elhelyezkedő mikroszatellitát) vizsgáltunk. A haplotípus analízis során kimutattuk, hogy a „T allél” egyetlen haplotípussal társult. 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. 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 vizsgálatokor 31-ből 29-en azonos haplotípust mutattak egy (ATT)₈ STR kivételével, ahol 4 féle ismétlődésszámot tapasztaltak. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy 4 független eredetű alapítója lehet az AT Cambridge II

mutációnak. A magyarországi AT deficiens populációban ez az eltérés nem volt kimutatható. Összességében elmondható, hogy a legkiterjedtebb genetikai vizsgálatot a legnagyobb populáción munkacsoportunk végezte az AT deficienciával kapcsolatos alapító hatás igazolására.

Az öt Osler-Rendu-Weber kóros proband egymáshoz közeli földrajzi térségből való származása, a felmenőik közötti névazonosság, valamint ugyanazon eltérés (*ACVRLI* 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 *ACVRLI* 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.

6.1.2 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. 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. A populációnkban talált kiemelkedően magas mutáció detektálási arány azt jelzi, hogy az általunk kidolgozott hemosztázis diagnosztikai algoritmus teljes mértékben szenzitív és specifikus.

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 az irodalmi adatok alapján, hogy a 4 Curaçao kritérium figyelembevételével a HHT-s esetekben körülbelül 75%-ban sikerül kimutatni valamilyen *ENG* vagy *ACVRL1* mutációt. Ez az arány tovább, 85%-nál magasabbra emelkedik, ha az adott betegnél a 4 kritérium egyszerre áll fenn.

6.1.3 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 vélelmezték.

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 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. További bizonyítékot szolgáltathatnak az *in silico* patogenitást jósoló szoftverek, melyek ma igen elterjedtek. Ezen munka során mi is alkalmaztuk a *SERPINC1* misszensz mutációk vizsgálatára a PolyPhen2, MutPred és PhD_SNP szoftvereket, 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. 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 *SERPINCI* 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 az új *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 szekréción 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.

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

6.2.1 Antitrombin deficiencia

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 nagyszámú 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.

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. Amennyiben az első vénás trombozisz 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 trombozisosok. 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 trombozisz 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 mutációk. A felsorolt eltérések közül az általunk vizsgált hazai betegpopulációban egyik sem fordult elő.

6.2.2 Osler-Rendu-Weber kór

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 vizsgálatkor a májban előforduló AVM-eket regisztráltunk. A családszűrés jelentősége HHT-ben is kiemelendő, hiszen a genetikai eltéréssel rendelkező, de a diagnózisukkor még tünetmentes családtagok szoros követése szükséges a nagy vérzések megelőzése, illetve korai ellátásának biztosítása érdekében.

6.3 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, azonos eredményt kapunk anti-FIIa vagy anti-FXa teszttel, amint az a nemzetközi körkontroll programokba a különböző laboratóriumok által beküldött eredményekből jól látható.

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. Ahogy azonban néhány tanulmányban utaltak rá, 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 kiemelendő, 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.

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. 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 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 “pilot study” keretén belül bizonyítottuk, hogy a heparin koncentráció és a pH változás is jelentős hatással bír az esszé érzékenységére, ami szintén az előbbi feltételezést erősíti. A vizsgált paraméterek (heparin koncentráció, pH) módosítása érdekes módon kevésbé befolyásolták az AT Bp3 mintákban mért AT aktivitás értékeket, 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. 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.

A jelölt saját eredményei, új megállapításai

- Az AT deficiens betegek és családtagjaik genetikai vizsgálata során az irodalomban a 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 trombólózissal jár, a II.HBS altípus heterozigóta formában enyhébb megjelenésű és nem kizárólag vénás trombólózis 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 trombólózis gyakorta már kisgyermekkorban manifesztálódik. A nem provokált trombólózisok 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 érzékenységet. A II.HBS típuson belül a HemosIL AT 44%-os szenzitivitást mutatott az AT Bp 3-ra, 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 felmenők 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. 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., Kovac, 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

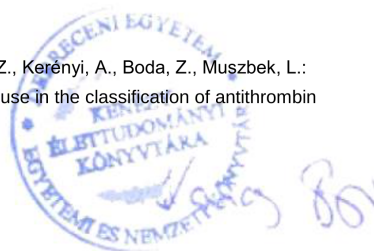




4. Gindele, R., Oláh, Z., Ilonczai, P., Speker, M., Udvari, Á., Selmeczi, A., Pfliegler, G., Marján, E., Kovács, B., Boda, Z., Muszbek, L., Bereczky, Z.: Founder effect is responsible for the p.Leu131Phe heparin-binding-site antithrombin mutation common in Hungary: phenotype analysis in a large cohort.
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., Fialat, 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 alapjául szolgáló közleményekre):
13,913**

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

Debrecen, 2017.11.16.

