

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Antithrombin deficienciát okozó *SERPINC1*
mutációk karakterizálása**

Kállai Judit

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Antithrombin deficienciát okozó *SERPINC1* mutációk karakterizálása

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Kállai Judit 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. Balla József, Akadémikus
tagok: Dr. Bodó Imre, PhD
Dr. Gombos Katalin, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, LMI, Klinikai Laboratóriumi Kutató
Tanszék Könyvtára 2024. december 3. (kedd) 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Alizadeh Hussain, PhD
Dr. Gaál Zsuzsanna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, Akadémikus
tagok: Dr. Bodó Imre, PhD
Dr. Gombos Katalin, PhD
Dr. Alizadeh Hussain, PhD
Dr. Gaál Zsuzsanna, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2024. december 3. (kedd) 13:00 óra

1. BEVEZETÉS

A hemosztázis lehetővé teszi, hogy a vér az érpályán belül megtartsa folyékony állapotát, abból kikerülve viszont megszilárduljon, ezzel megakadályozva, hogy egy érfal sérülés elvérzést okozzon. A hemosztázis kényes egyensúlyának felbomlása súlyos következményekkel jár, ezek egyik véglete a vérzékenység a másik a thrombosis.

Thrombus képződéshez három tényező megváltozása vezethet, melyet Rudolf Virchow, német patológus fogalmazott meg először a XIX. században. A három tényező a véráramlás (sztázis), az érfal (érfal rendellenessége) vagy a vér alvadékonyságának (hypercoagulabilitás) a megváltozása. A hypercoagulabilitáshoz vezető veleszületett tényezők közé tartoznak az antithrombin (AT), protein C és S (PC, PS) deficienciák, az aktivált protein C rezisztencia (APC rezisztencia, melynek fő oka a FV Leiden mutáció, p.Arg506Gln), a protrombin gén (F2) 20210A allél és egyes dysfibrinogenaemiák. Ezek az állapotok fokozott vénás thromboembolia (VTE) kockázatot okoznak. A VTE kockázatát növeli továbbá a hyperhomocysteinaemia, illetve az antifoszfolipid szindróma, melyben lupus anticoagulans és antifoszfolipid antitestek jelenléte mutatható ki a keringésben.

Az AT a szerin proteáz inhibitorok (SERPIN) családjába tartozó, a májban szintetizálódó glikoprotein, melynek fő feladata a thrombin és az aktivált X-es faktor gátlása. Ez önmagában lassú folyamat, melyet a heparán-szulfát proteoglikánok és a heparin akár 500-szorosára gyorsíthatják. A vérplazma antithrombin szintjének csökkenése növeli a thrombosis veszélyét. Az antithrombin deficiencia (ATD) a súlyos thrombophiliák közé tartozik, az első esetet Egeberg és munkatársai közölték 1965-ben. Ezt követte az első funkcionális AT deficiencia (AT Budapest) leírása, mely 1974-ben Sas és munkatársai nevéhez fűződik. Az ATD-t két csoportra oszthatjuk fel, az I-es típusú (kvantitatív) és a II-es típusú (kvalitatív) csoportra. A II-es típust tovább bonthatjuk 3 alcsoportra a defektus elhelyezkedése szerint, úgymint a reaktív helyet érintő (IIRS), a heparin kötő helyet érintő (IIHBS) vagy pleiotróp hatású (IIPE). A Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>, utolsó belépés 2023. november 11) alapján 529 különböző mutációt írtak le eddig a *SERPINC1* génben. A mutációk részletes klinikai és molekuláris karakterizálása értékes információkat szolgáltat a betegség patofiziológiájának megértéséhez, új mutációk esetén a patogenitás igazolása után hozzájárulhatunk az adatbázisok bővítéséhez.

Jelen tanulmány első része három ismert IIHBS típusú mutáció (ATBp3, AT Basel, AT Padua) részletes biokémiai, különös tekintettel a heparin kötés vizsgálatára, és magas szintű in

silico módszerekkel nyert eredményeit mutatja be. Korábbi tanulmányok már vizsgálták külön-külön a három IIHBS mutáció abnormalis AT-heparin kölcsönhatását. Az AT Basel mutációról leírták, hogy kapcsolatba hozható artériás thrombosisal, és heparin-Sepharose affinitás kromatográfiával egy rendellenes csúcsot mutat. Bebizonyították továbbá, hogy monoklonális antitest alapú heparin kötési affinitás vizsgálatban az AT Basel 40-szeres csökkenést mutat a normál AT-hoz képest. Az AT Padua mutáció egy tanulmány szerint 30-szoros csökkenést eredményez a heparin kötésben. Az ATBp3 esetében is több cikket találunk redukált heparin kötő képességéről. A három mutációt együtt vizsgáló, és a heparinnal való kapcsolatukat egységes módszerekkel összehasonlító tanulmány eddig még nem született.

Az értekezés második része kilenc új (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr), irodalomban eddig nem szereplő, AT mutáció klinikai és biokémiai jellemzését, patogenitásuk igazolását írja le. Ehhez hasonló, új AT mutációk részletes in vitro karakterizálását bemutató vizsgálatból csak kevés található az irodalomban.

1.1. A SERPINC1 gén és az antithrombin fehérje szerkezete

A humán AT génje a *SERPINC1* az egyes kromoszómán helyezkedik el az 1q23-q25.1 pozícióban, hét exont és hat intront tartalmaz, hossza 13,5 kilobázis. Az AT heparin kötő részét a második és a harmadik exon kódolja, a C-terminális részen elhelyezkedő reaktív helyet a hetedik exon. Kilenc teljes és egy részleges Alu ismétlődő szakaszt azonosítottak az 1, 2, 4, 5 és 6-os intron esetében. Az AT fehérje a szerin proteáz inhibitorok (SERPIN) családjába tartozó egyláncú glikoprotein, molekulatömege 58 kDa. A májban szintetizálódik, a vérkeringésben koncentrációja kb. 250 µg/ml, féléletideje 2-3 nap. A 32 aminosav hosszúságú szignálpeptid lehasadása után az érett fehérje 432 aminosavból áll és három belső diszulfid hidat tartalmaz (Cys40-160, Cys53-127 és Cys279-462). A fehérje érése során az endoplazmatikus retikulumban (ER) N-glikoziláció megy keresztül és négy aszparagin reziduumon (Asn128, 167, 187 és 224) N-glikozilált lesz. A keringésben 2 glikoforma van jelen, 90-95%-ban az α-glikoforma és kevesebb, mint 10% -ban a β-glikoforma. A β-AT Asn167-es reziduómán a glikoziláció hiányzik, ennek következtében erősebben kötődik a heparinhoz és hasonló molekulákhoz. Például a heparán-szulfáthoz, mely az endothel sejtek felszínén és a legtöbb sejtben is jelen van. Az AT jellegzetes másodlagos és harmadlagos szerkezettel rendelkező szerin proteáz inhibitor, mely 9 α hélixet (A – I) és 3 β redőt (A – C) tartalmaz. A reaktív központi hurok (reactive center loop RCL) a molekula tetején helyezkedik el, ez a rész tartalmazza a szerin proteázok aktív helyével komplementer

szekvenciákat. A SERPIN-ek jelentős strukturális flexibilitással rendelkeznek, a szerkezetükben bekövetkező változások hozzájárulnak a szerin proteázok gátlásához. Hasítatlan állapotban két fő konformációs állapotot különböztetünk meg, a natív és a látens formát. A natív forma esetében a reaktív központi hurok az AT molekula felszínén helyezkedik el, a látens konfigurációnál a RCL a β redők közé kerül be. A látens forma termodinamikailag stabilabb, mégis a keringésben a natív, magasabb energiaszinten csapdába esett forma van jelen. A pentaszacharid vagy pentaszacharid egységet tartalmazó heparin kötése konformációs változásokat okoz az RCL-ben és annak közelében. A pentaszacharid egység és az AT közötti kölcsönhatás két lépésben játszódik le, egy kezdeti gyengén kötött intermedier alakul át erősen kötött formává.

1.2. Az antithrombin fehérje szerepe a véralvadásban és egyéb funkciói

A véralvadás fiziológias szabályozása szükségessé teszi a thrombin keletkezésének és hatásának időbeli és térbeli korlátozását. A fiziológias inhibitorok örökletes hiánya vagy diszfunkciója fokozott thrombosis kockázattal járhat. A véralvadás inhibitorrendszerét különböző proteáz inhibitorok (antithrombin, α 1-antitripszin, α 2-makroglobulin, szöveti faktor út inhibitor és a heparin kofaktor II) alkotják, melyek megtalálhatóak a vérkeringésben, a vérplazmafehérjék több mint 10 %-át teszik ki. Hatásmechanizmusuk kétféle lehet: az egyik mechanizmus esetében az enzim kötődik az inhibitorhoz, de az enzim aktív centruma működőképes marad (például α 2-makroglobulin), a másik mechanizmus során kovalens kötés jön létre az enzim aktív centruma és az inhibitor között. Így működik az AT, α 1-antitripszin és a heparin kofaktor II. Mindhárom inhibitor a véralvadási szerin-proteázok szubsztrátjaként fogható fel. A gátolandó enzim ekvimoláris komplexet hoz létre az inhibitorral, így további funkciót kifejtteni nem lesz képes. Az AT gátló hatása legkifejezettebb a thrombin és az aktív X-es faktor (FXa) irányába, de egyéb szerin proteáz alvadási faktorokat is gátol. Az AT molekula nagy affinitással kötődik heparinhoz vagy heparán-szulfát proteoglikánokhoz. Ez a kötődés az AT gátló hatását az aktivált koagulációs faktorokra (pl. thrombin, FXa) nagymértékben felerősíti.

A thrombin gátlása során az AT és a thrombin is nagy affinitással kötődik a heparinhoz, majd azon az enzim aktív centruma és az inhibitor között kovalens kötés jön létre (a thrombin gátlódik). E kölcsönhatás heparin nélkül is bekövetkezik, de heparin jelenlétében sokkal nagyobb reakciósebességgel. Mivel a már kialakult thrombin-antithrombin komplex affinitása a heparinhoz kicsi, a heparin szabadabbá válik és beléphet újra egy következő reakcióba. A FXa gátlásának mechanizmusa kissé eltér a thrombin gátló mechanizmustól, itt nincs szükség arra,

hogy a FXa heparinhoz kötődjön, így ennek gátlása rövidebb szacharidos egységek jelenlétében is hatékonyan bekövetkezik (LMWH, vagy pentaszacharid jelenléte elég). A thrombin gátlásához – mivel annak heparinhoz kötődnie kell – legalább 18 szacharidos egységből álló heparin jelenlétére van szükség.

Az AT elsődleges funkciója tehát a thrombin mediált fibrin alvadék kialakulásának megakadályozása és a FXa által létrehozott thrombin generáció megfékezése, illetve az ún. intrinzik és extrinzik útvonalon szereplő egyéb aktivált alvadási faktorok (FIXa, FXIa, FXIIa, FVIIa-szöveti faktor komplex) gátlása.

Az AT hatást jelentősen gyorsító tulajdonsága miatt a heparin már több évtizede az egyik leggyakrabban használt gyógyszer a thromboemboliás betegségek megelőzésében, kezelésében. A nem frakcionált heparin (pl. Heparibene) mukopoliszacharid-polikénsav-észter, glükózamin-N-kénsavból és glükuronsav-kénsav-észterekből áll, amelyek egymással glikozidikus úton kapcsolódnak (polimer). Erős negatív töltése miatt bizonyos proteinekkel komplexet alkot (pl. AT). A kis molekulású heparinok (LMWH) csoportba tartozik az enoxaparin (Clexane), mely alacsony, hozzávetőlegesen 4500 dalton molekulatömegű heparin. A készítmény hatóanyaga egy nátriumsó, amely erős anti-FXa aktivitással és gyenge anti-FIIa aktivitással rendelkezik. A heparin hatás legkisebb egysége a fondaparinux-nátrium (pl. Arixtra), amely egy szintetikus pentaszacharid. Az aktivált FX-nek a szelektív inhibitora, ez a hatás AT által mediált. Nem inaktíválja a thrombint. (Forrás: Heparibene, Clexane, fondaparinux gyógyszerek alkalmazási előírásai).

Az AT fehérjének antikoaguláns funkciója mellett számos más funkciója is ismert az emberi szervezetben. Az AT az endothel sejtek felszínén levő specifikus heparán szulfát proteoglikán receptorokhoz (szindekán 4) tud kötődni a D-helixen keresztül, a terápiás célból adott heparin kötéshez hasonlóan. Ez a szignalizációs aktivitása az AT-nak prosztaciklin szintézist indukál az endothel sejtekben, ezzel gátolva a nukleáris faktor – kappaB útvonalat illetve proinflammatorikus citokinek és adhézions fehérjék szintézisét. Az AT erős anti-angiogenetikus aktivitással is rendelkezik, azonban ez csak a hasított és/vagy látens konformációjára (az RCL a β redők közé kerül be) jellemző. Mind a hasított és a látens forma is nagyon kicsi heparin affinitással rendelkezik. Ezek az alacsony affinitású AT formák nem mutatnak anti-inflammatorikus funkciókat sem, de erős proapoptotikus szignalizációs aktivitással rendelkeznek az endothel sejteken. Leírták, hogy mind az anti-inflammatorikus és anti-angiogenetikus/proapoptotikus tulajdonsága az AT-nak a D-hélixen keresztüli kölcsönhatással valósul meg. Az AT antibakteriális hatásának egy tanulmány azt tulajdonította, hogy a β -AT kötődik a Gram negatív baktériumokhoz, beleértve az E. colit is

és a baktériumok tisztított sejtfal komponenséhez is. A β -AT kötődése a baktérium sejtfalához növelheti a makrofágok fagocita aktivitását és ezáltal a baktérium eliminálódását a szervezetből. Ezt a hipotézist a következő kísérlettel támasztották alá a közlemény szerzői: β -AT-t overexpresszáló egerek vérére *E. coli*-val inkubálva a baktériumok lízisét figyelték meg és ennek következtében alacsony baktérium számot mértek. Az antibakteriális hatásnál is a D-hélix szerepét feltételezik.

Az AT anti-inflammatorikus szignalizációs funkcióját endothel sejtekben vizsgálták és kimutatták a D hélix függő kölcsönhatás szükségességét a szindekán 4 receptorral. Többet bizonyították a jelenséget, például egy kísérletben a szindekán receptor kiütését érték el siRNS technikával, és megfigyelték az AT szignalizációs funkciójának a gátlását. Monocitákon is vizsgálták a szignalizációt és kimutatták, hogy esetükben a szindekán 4 receptor specifikus a β -AT-ra.

Mindezek alátámasztják az AT nélkülözhetetlen szerepét a szervezetben, mely nemcsak az antithromboticus hatásán keresztül, hanem anti-inflammatorikus, valamint anti-angiogenetikus/proapoptotikus hatásain keresztül is megvalósul.

1.3. Az antithrombin deficiencia

Az antithrombin deficiencia (ATD) lehet szerzett vagy öröklött. A szerzett formáról csak röviden pár okot megemlítve: kialakulhat májelégtelenség miatti csökkent AT szintézis következtében, nephrosis szindrómában a megnövekedett AT veszteség miatt, szepszisben vagy akut disszeminált intravasculáris koagulációban a fokozott AT felhasználás és inaktiváció miatt. Leírtak gyógyszer indukálta eseteket is, például L-aszparagináz terápia, hosszú távú, nagy dózisu heparin terápia esetén.

Az öröklött ATD-t két csoportra oszthatjuk fel, az I-es típusú (kvantitatív) és a II-es típusú (kvalitatív) csoportra. Többnyire autoszomális domináns módon öröklődik, férfiakat és nőket egyaránt érint. Az öröklött ATD általában heterozigóta formában fordul elő, mivel a homozigóta esetek kevés kivételtől eltekintve intrauterin halálos kimenetelűek. A kvantitatív defektusra jellemző, hogy az AT antigén szint és az aktivitás arányosan csökkent (1. táblázat). A II-es típust tovább bonthatjuk 3 alcsoportra a defektus elhelyezkedése szerint, úgymint a reaktív helyet érintő (IIRS), a heparin kötő helyet érintő (IIHBS) vagy pleiotróp hatású (IIPE). A kvalitatív defektusra általában referencia tartományon belüli AT antigén szint mellett az AT molekula aktivitásának csökkenése látható, melyet a defektív AT fehérje okoz. A kevésbé súlyos IIHBS altípusban homozigóta betegek is előfordulhatnak. Az ATD prevalenciáját körülbelül 1:2000-re becsülik. Azonban ez a szám nagyobb a thrombosisos betegek között,

esetükben feltehetően 1:20 és 1:200 között van, de pontos adataink erre vonatkozóan nem lehetnek, főként populációs sajátosságok, módszertani különbségek és a betegség ritka volta miatt. Öröklött AT deficiens egyének megnövekedett kockázattal rendelkeznek a thromboembóliás eseményekre, elsősorban vénás, de artériás thrombosisokat is leírnak. Ma már ismert (részben saját kutatócsoportunk korábbi eredményeiből), hogy az ATD alcsoportok nem szükségszerűen mutatnak azonos klinikai fenotípust. Továbbá még az azonos alcsoporton belül is lehetnek fenotípusbeli különbségek, amelyek egyes mutációkra jellemzőek. Egy japán tanulmány szerint az I-es típus sokkal gyakoribb és sokkal súlyosabb volt, mint a II-es típusú ATD. Az I-es típusú ATD-ben a funkcióvesztéses mutációk következménye járt sokkal súlyosabb tünetekkel (fiatalabb életkorban bekövetkező vagy ismétlődő VTE), összehasonlítva más mutáció típusokkal. A legnagyobb számú beteget bevonó francia tanulmányban a vénás thromboembolia (VTE) kockázata alacsonyabb volt a IIHBS típusban az I-es típushoz hasonlítva. A IIHBS típusú ATD gyakrabban hozható összefüggésbe artériás thromboembóliával (ATE) mint az I-es típus és más II-es típusú deficienciák. Egy Dániából származó kisebb esetszámú tanulmány megfigyelése szerint az I-es típusú és a IIRS típusok sokkal súlyosabbak voltak (gyakrabban okoztak VTE-t), mint a IIHBS Basel. Érdekes módon a IIHBS AT deficienciák között a klinikai tünetek szignifikáns heterogenitást mutatnak, ezt 246 AT deficiens beteg bevonásával készült klinikai tanulmányunkban meg is figyelhettük, ugyanis a betegek 75 %-a IIHBS típusú beteg volt változatos klinikai fenotípussal. Egy Finnországból származó tanulmányban, ahol az AT Basel (p.Pro73Leu) prevalenciája viszonylag magas, ez a típus magasabb thrombosis kockázattal járt, sőt az ATE és a terhességi komplikációk szintén gyakoriak voltak. Egy másik tanulmány 82 IIHBS ATD beteget vizsgált 6 különböző mutációval, köztük AT Basel és AT Padua (p.Arg79His) mutációval. Megállapították, hogy a vizsgálati csoportjukban a VTE gyakori volt, és ATE is gyakrabban kapcsolódott az AT Basel és a Padua mutációkhoz, az I-es típushoz hasonlítva. Mivel az AT Budapest 3 (p.Leu131Phe) alapító mutáció Magyarországon, adott volt a lehetőség nagy számú, ilyen beteg vizsgálatára és klinikai fenotípusuk összehasonlítására más IIHBS típusokkal. Míg az AT Budapest 3 (ATBp3) homozigótáság képviseli kiemelkedően a legsúlyosabb thrombophiliát (I-es típusnál is súlyosabb) és döntően VTE-vel társul, az AT Basel inkább ATE-vel társul és az AT Padua több terhességi komplikációt mutat. Válogatott ATE betegeknél az ATBp3 heterozigóta állapot is megfigyelhető volt. Figyelembe kell vennünk azonban azt, hogy az azonos öröklött ATD esetén az ahhoz társuló, thrombosisra hajlamosító szerzett rizikótényezők előfordulási gyakorisága jelentősen eltérhet a különböző vizsgálati populációk esetén.

Az ATD laboratóriumi diagnosztikája egy funkcionális teszten alapszik, ahol az AT aktív faktor X-re (FXa) vagy thrombinra (FIIa) kifejtett gátló hatását mérjük heparin jelenlétében. Megfigyelték, hogy a jelenleg elérhető funkcionális tesztek bizonyos ATD alcsoportokat különböző érzékenységgel mutatják ki, ami megnehezíti a laboratóriumi diagnózist. Az Egyesült Királyság AT deficiens populációjában viszonylag gyakori az AT Cambridge II (p.Ala416Ser) IIRS típusú mutáció, amelyről kimutatták, hogy esetükben a FXa alapú tesztek nem eléggé szenzitívek. Ezzel ellentétben általánosságban elmondható, hogy a FXa alapú tesztek heparin jelenlétében (hc-anti-FXa) sokkal érzékenyebbek a IIHBS ATD-re összehasonlítva a FIIa alapú tesztekkel [64]. A tesztet heparin nélkül végrehajtva a progresszív AT aktivitás (p-anti-FXa) eredményét kapjuk. A progresszív AT aktivitás a heparin kofaktor AT aktivitás arányában határozottan fokozott IIHBS ATD-ben. Kimutatták, hogy a IIHBS betegek körében a hc-anti-FXa AT aktivitás a specifikus mutáció függvényében változik. Mivel a különböző, kereskedelemben elérhető tesztek különböző szenzitivitással detektálták az ATBp3 homozigóta, ATBp3 heterozigóta, AT Basel és AT Padua heterozigóta mutánsokat, feltételezhető, hogy nem csak az enzim (FIIa vagy FXa), de még más reakció körülmény, például a heparin koncentráció vagy az ionerősség volt felelős a heterogén eredményekért. A magas heparin koncentrációjú tesztek alacsonyabb érzékenységet mutattak az AT Basel és AT Padua esetekben, mint ATBp3 esetén rámutatva ezáltal az AT-heparin kötés erősségében és az AT aktivációban lévő különbségekre ezen mutánsok között.

Az ATD laboratóriumi diagnosztikája során, ha csökkent heparin kofaktor AT aktivitást kapunk (hc-anti-FXa), következő lépésként AT antigén meghatározást végzünk, amely alapján I-es vagy II-es típusba sorolhatjuk a beteget. Normál AT antigén szint II-es típusra utal és ilyenkor elvégzésre kerül a progresszív AT aktivitás. Alacsony progresszív AT aktivitás a IIRS és IIPE típusra jellemző, míg a normál progresszív aktivitás IIHBS mutáció jelenlétét veti fel. IIHBS gyanú esetén laboratóriumunkban először az ATBp3 mutáció kimutatása történik meg egy ATBp3-ra kidolgozott specifikus genotipizálási módszerrel (ez azért van így, mert hazánkban az ATBp3 az alapító hatás miatt kiemelkedően gyakori). Ha ez negatívnak bizonyul, akkor még néhány gyakori IIHBS mutációra specifikus genotipizálás történik. Ha ezek sem fedik fel az okozati mutációt, akkor történik meg a teljes *SERPINC1* gén szekvenálása. Új mutáció detektálása esetén megtörténhet azok biokémiai és in silico vizsgálata, patogenitásuk megállapítása. A mutáció mutagenizáló primerekkel történő létrehozása után lehetőségünk van HEK-293 sejtek tranziens és stabil transzfekciójára és a mutáns AT fehérje expressziójára. A sejtek stabil transzfekciója optimális nagyobb

mennyiségű rekombináns fehérje termeltetésére, melyet tisztítás után a funkcionális vizsgálatokban felhasználunk.

Az új mutációk patogenitása csak direkt és indirekt bizonyítékok alapján állapítható meg, a mutáció besorolásában guideline-ok segítenek.

Az új mutációkat – a különböző genetikai/genomikai ajánlások alapján - a következő csoportokba sorolhatjuk be: benignus, valószínűleg benignus, ismeretlen jelentőségű variáns, valószínűleg patogén és patogén. Egy mutációnak a beteg fenotípusára gyakorolt hatása sokféle lehet. Az adott mutáció lehet jóindulatú vagy patogén. Egy adott mutáció patogenitása mellett szólhatnak erős bizonyítékok (pl. a mutáció következménye null variáns) vagy kevésbé erősek (pl. a fehérje hosszúságát megváltoztató mutáció).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken diagnosztizált ATD betegeknél gyakran előforduló három, ismert, kifejezetten az AT heparin-kötő helyet érintő mutáció (ATBp3, AT Basel és AT Padua) összehasonlító biokémiai és in silico vizsgálatát terveztük, részletesen a heparin kötés mechanizmusát jellemezve.

A DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken diagnosztizált ATD betegeknél talált kilenc új SERPINC1 mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr és p.Pro461Thr) biokémiai és in silico karakterizálását terveztük. Ezáltal patogenitásuk igazolását tűztük ki célul.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Antithrombin deficiens betegek klinikai és rutin laboratóriumi jellemzése

A DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken 2007 január és 2021 december között ATD-val diagnosztizált betegek (n=478) mutációit vizsgáltuk. A betegektől származó vért 3,2% Na-citrát tartalmú vacutainer vérvételi csőbe (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) gyűjtötték. Centrifugálás után a plazma mintákat -80 °C-on tároltuk a felhasználásig. Az öröklött trombofília (protein C és S deficiencia, APC rezisztencia, FII20210A allél, diszfibrinogénémia) vizsgálatai rutin hemosztázis laboratóriumi módszerekkel történtek BCS-XP koagulométeren (Siemens, Marburg, Germany), illetve a FV Leiden mutáció és a FII20210A allél esetében rutin genetikai módszerekkel LightCycler 480

készülékben (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Az ATD diagnosztizálására heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitást és progresszív anti-FXa AT aktivitást (Labexpert Antithrombin H + P, Labexpert Ltd., Debrecen, Hungary) mértünk BCS-XP koagulométeren. Az AT antigén immunonefelometriás módszerrel lett meghatározva BN-Prospec nefelométerben (Siemens, N Antiserum to Human Antithrombin III). A klinikai adatok retrospektív módon lettek összegyűjtve a betegektől. Az első thromboticus esemény ideje és típusa az orvosi dokumentációból ismert. Etikai engedély: 3166/2012/HER.

3.2. Antithrombin deficiens betegek SERPINC1 génmutáció analízise

A genomi DNS-t perifériás vérmintából izoláltuk a QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével. A *SERPINC1* gén kódoló régiója, az exon-intron határok és a promoter régió Sanger szekvenálása ABI3130 készüléken Sequencing Analysis 5.4 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) történt. Ha a Sanger szekvenálás nem talált okozati mutációt, akkor multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MLPA) vizsgálatot végeztünk SALSA MLPA KIT P227 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) felhasználásával. Az MLPA termékeket GeneMapper szoftver 4.1 verziójával elemeztük (Thermo Fisher Scientific).

3.3. Keresztezett Immuno elektroforézis (Crossed Immuno electrophoresis CIE)

A keresztezett immuno elektroforézis (crossed immuno electrophoresis CIE) Sas és munkatársai cikke alapján volt kivitelezve. Az első elektroforézis 16,3 U/ml frakcionálatlan nátrium heparin tartalmú 1%-os agaróz gélen 150 V-on 60 percig futott. Az elektroforézis második dimenziója 1% nyúl anti-humán AT antiszérumot (Sigma, Saint Louis, MO, USA) tartalmazó 1%-os agaróz gélen futott 100 V-on 180 percig. A kísérletet az ATBp3 heterozigóta és homozigóta, AT Basel és AT Padua betegek Na-citráttal antikoagulált plazma mintáin végeztük el. Kontrollként egészséges személyekből nyert poolozott plazma szolgált.

3.4. Nano DSF

A fehérje feltekeredés és stabilitás pontos mérésére a Nano DSF (Differential Scanning Fluorimetry) módszert alkalmaztuk. A NanoDSF mérés a belső triptofán vagy tirozin fluoreszenciájának mérésén alapszik. A fehérjék letekeredése (unfolding) közben a fehérjét alkotó triptofán hidratált lesz és a fluoreszencia intenzitásának maximuma eltolódik 330 nm-ről 350 nm-re. A fehérjék hőstabilitása leírható a thermal unfolding transition midpoint (T_m) értékkel, melynél a fehérje populáció fele letekeredett (unfolded) állapotú. A hőstabilitást

jellemezhetjük még a denaturáció kezdeti hőmérsékletével (T_{kezdeti}). A T_m meghatározása a denaturációs görbe meredekségének kezdeti pontjából, ami a 330 és 350 nm-en mért triptofán fluoreszencia a hőmérséklet függvényében ábrázolva vagy az első deriváltjának maximuma. A Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany) kettős hullámhosszú rendszere lehetővé tette az AT fehérje vad típusú és ATBp3 mutáns formáinak hő hatására lejátszódó letekeredési (unfolding) folyamatának vizsgálatát. A minták 8 μM koncentrációban triplikátumban voltak indítva standard üveg kapillárisokban. A minta térfogata 10 μl volt kapillárisonként. Az analízis során a mintákat felmelegítettük 20 °C-ról 95 °C-ra fokozatosan percenként 1 °C-ot emelve a hőmérsékleten. A T_m és a T_{kezdeti} értékek a PR.ThermControl szoftver 2.1.2 verziójával (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany) lettek kiszámítva a hőmérséklet függvényében ábrázolt 350 nm/330 nm fluoreszencia arányok első deriváltja alapján. A T_m értékeket 3 független kísérletből határoztuk meg. A kísérletet egészséges (azaz nem ATD személyek) és ATBp3 homozigóta betegek Na-citráttal antikoagulált plazma mintáiból végeztük el.

3.5. A vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék in vitro expressziója

A vad típusú plazmidot (ORF-NM_000488_pcDNA3.1(+)) vad típusú AT) az ImaGenes GmbH (Berlin, Germany) cégtől rendeltük meg. A 12 mutáns plazmidot (p.Leu131Phe, p.Pro73Leu, p.Arg79His, p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) a Stratagene Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) segítségével hoztuk létre. Mutagenizáló primerek (BioScience, Integrated DNA Technologies, BVBA, München, Germany):

p.Leu131Phe (ATBp3) mutáció esetében:

primer 1: 5' – GCCTGTAATGACACCTTCCAGCAACTGATG – 3'

primer2: 5' – CATCAGTTGCTGGAAGGTGTCATTACAGGC – 3'

p.Pro73Leu (AT Basel) mutáció esetében:

primer 1: 5' – GGCTCAGAACAGAAGATCCTGGAGGCCACCAAC – 3'

primer 2: 5' – GTTGGTGGCCTCCAGGATCTTCTGTTCTGAGCC – 3'

p.Arg79His (AT Padua) mutáció esetében:

primer 1: 5' – GCCACCAACCGGCATGTCTGGGAACTGTC – 3'

primer 2: 5' – GACAGTTCCCAGACATGCCGGTTGGTGGC – 3'

p.Arg14Lys mutáció esetében:

primer 1: 5' – TAACCTCTGGAAAAAAGAAGGTTTATCTTTTGCCT – 3'

primer 2: 5' – AGGACAAAAGATAAACCTTCTTTTTTCCAGAGGTTA – 3'

p.Cys32Tyr mutáció esetében:

primer 1: 5' – GGACTGCGTGACCTATCACGGGAGCCCTGTGGAC – 3'

primer 2: 5' – GTCCACAGGGCTCCCGTGATAGGTCACGCAGTCC – 3'

p.Arg78Gly mutáció esetében:

primer 1: 5' – AGGCCACCAACGGGCGTGTCTGGGAACTG – 3'

primer 2: 5' – CAGTTCCCAGACACGCCCGTTGGTGGCCT – 3'

p.Met121Arg mutáció esetében:

primer 1: 5' – CGGCTTTTGCTAGGACCAAGCTGGGTGCC – 3'

primer 2: 5' – GGCACCCAGCTTGGTCCTAGCAAAAGCCG – 3'

p.Leu245Pro mutáció esetében:

primer 1: 5' – CAATGAGCTCACTGTTCCGGTGCTGGTTAACACC – 3'

primer 2: 5' – GGTGTTAACCAGCACCGGAACAGTGAGCTCATTG – 3'

p.Leu270Argfs*14 mutáció esetében:

primer 1: 5' – CACAAGGAAGGAACGTTCTACAAGGCTGAT – 3'

primer 2: 5' – ATCAGCCTTGTAGAACGTTTCCTTCTTG – 3'

p.Asn450Ile mutáció esetében:

primer 1: 5' – GAGAAGTTCCTCTGATCACTATTATCTTCATGGGC – 3'

primer 2: 5' – GCCCATGAAGATAATAGTGATCAGAGGAACTTCTC – 3'

p.Gly456delins_Ala_Thr mutáció esetében:

primer 1: 5' - CTATTATCTTCATGGCTACAAGAGTAGCCAACCC – 3'

primer 2: 5' - GGGTTGGCTACTCTTGTAGCCATGAAGATAATAG – 3'

p.Pro461Thr mutáció esetében:

primer 1: 5' – GGGCAGAGTAGCCAACCCTTGTGTTAAGTAA – 3'

primer 2: 5' – TTACTIONAACACAAGGGTTGGCTACTCTGCCC – 3'

A mutagenizáló PCR reakciók összetétele minden esetben 25 µl végtérfogatban a következők szerint történt: 10x koncentrációjú PCR puffer, 50 ng dsDNS vektor a vad típusú AT inzerttel, 125 ng primer 1, 125 ng primer 2, dNTP mix, steril desztillált víz és 2,5 U/µl PfuTurbo DNS polimeráz. A mutagenizáló PCR reakció protokollja: denaturálás 95°C-on fél percre, amit 16 ciklus követ az alábbiak szerint 95°C fél perc, 55°C 1 perc, 68°C 7 perc. Utolsó lépésként 10 U/µl DpnI restriktív enzimmel a mutációt nem tartalmazó templát szál emésztése történik meg. A transzformáláshoz OneShot® TOP10 kompetens E. coli sejteket használtunk, a plazmidok izolálása QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segítségével a gyártó utasításai szerint. A helyspecifikus mutagenézis sikerességét szekvenálással ellenőriztük. A human

embryonic kidney (HEK-293) sejtek 10% FBS-el (Gibco), 2 mM L-glutaminnal és 25 µg/ml antibiotikummal (gentamicin, Chinoín, Budapest, Hungary) kiegészített Dulbecco's Modified Eagle's médiumban (DMEM, High glucose, Biosera) 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban T25-ös flaskában nőttek. A kísérletekben felhasznált sejtek 60-80% konfluencia elérése esetén 2 naponta voltak passzálva standard tripszines módszer szerint maximum 20 alkalommal. A vad típusú és a kilenc mutáns AT plazmid tranziens transzfekciója a gyártó útmutatása szerint X-tremeGENE HP DNA transzfekciós reagenssel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) és a LacZ gén kotranszfekciója pCMV Sport β-GAL plasmiddal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) történt. 48 órás inkubáció után a sejtfelülűsöt összegyűjtöttük, a sejteket lízis puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0,5% nátrium-dezoxikolat és proteáz inhibitor tabletta, Roche Diagnostics GmbH) hozzáadásával lizáltuk. A mintákat centrifugálás után eppendorf csövekbe mértük, aliquotokra osztva -80 °C-on tároltuk felhasználásig. A transzfekció hatékonyságának vizsgálatára a FluoReporterlacZ/Galactosidase Quantitation Kitet (Molecular Probes, Life Technologies) alkalmaztuk és az eredményeinket ennek megfelelően korrigáltuk.

3.6. A vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék stabil transzfekciója

Stabil transzfekció esetén a bejuttatott plazmidban található rezisztencia génre a megfelelő antibiotikum jelenlétében kell szelektálni több héten/hónapon keresztül. A transzgén integrálódik a genomban.

Az eljárás első lépéseként a szelekciós antibiotikum optimális koncentrációját határoztuk meg. Szelekciós antibiotikumnak a Geneticin® Selective Antibiotic-ot (Gibco, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) használtuk. A megfelelő koncentrációt dózis-hatás vizsgálattal választottuk ki, melynek során a human embryonic kidney (HEK-293) sejteket geneticinnel kezeltünk növekvő (0-1000 µg/ml) koncentrációban. A vizsgálat során azt a minimális koncentrációt kerestük meg, amely 10 nap alatt az összes sejtet elpusztította. Ez a koncentráció 400 µg/ml-nek adódott. A geneticin rezisztenciát a pcDNA3.1(+) konstrukt neomycin rezisztencia génje biztosította. A második lépés a megfelelő számú HEK-293 sejt transzfekciója. A következő plazmidokat a Lipofectamine®3000 Transfection Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével jutattuk be a sejtekbe: huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _WT, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _ATBp3, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _AT Basel, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _AT Padua, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Arg14Lys, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Cys32Tyr, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Arg78Gly, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Met121Arg, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Leu245Pro,

huSERPINC1_pcDNA3.1(+)_p.Pro461Thr. A vad és a mutáns plazmidok koncentrációját Nanodrop 2000 spektrofotométerrel határoztuk meg, az eredmények alapján állítottuk össze a transzfekciós elegyet a reagenshez mellékelt protokoll szerint.

A harmadik lépés a sikeresen transzfektált sejtek szelekciója. A sejteket 400 µg/ml geneticin tartalmú szelekciós médiumban tenyésztve több hét elteltével csak a plazmidot felvett sejtek fognak túlélni. A túlélő sejteket 200 µg/ml geneticin tartalmú médiummal tenyésztettük tovább.

A sejtek egy részét poliklonális sejtvonalként fagyasztottuk, majd folyékony nitrogénbe helyeztük hosszú-távú tárolás céljából. A sejtek másik részét tovább tenyésztettük további kísérletekhez.

3.7. In vitro expresszált rekombináns antithrombin fehérjék és plazmából származó (normál és ATBp3 homozigóta) antithrombin tisztítása affinitás kromatográfiával

Az öt mutáns (ATBp3, AT Basel, AT Padua, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr) és a vad típus esetében a sejteket passzáltuk, míg 12-12 db T75-ös flaska állt rendelkezésünkre. A felülúszó begyűjtése előtt 24 órával a tápfolyadékot FBS-mentes tápfolyadéokra cseréltük (13 ml/T75-ös flaska). Mintánként 156 ml felülúszó volt, amit Amicon® Ultra-30K (Merck Millipore, Burlington, VT, USA) oszlop segítségével bekoncentráltunk. A koncentrálás után 25-30 ml minta állt rendelkezésünkre, melyet affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottunk. Sepharose 4B gél oszlopon kovalensen kötött kecske anti-humán antithrombin IgG (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canada) felhasználásával történt a tisztítás. A plazmából származó normál és ATBp3 homozigóta AT minták tisztítása is a fenti protokoll szerint történt.

3.8. Felületi Plazmon Rezonancia (SPR-Surface Plasmon Resonance)

A felületi plazmon rezonancia vizsgálatok Biacore 3000 készüléken történtek (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). A különböző AT mutánsok heparin kötő képességét heparin SPR szenzor chip (Heparin Approx. 50 nm hidrogél chip, Xantec bioanalytics GmbH, Dusseldorf, Germany) segítségével mértük. A vad típusú és a mutáns AT fehérjék futtató pufferben (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3mM, felületaktív anyag 0,005% (v/v), pH 8,4) voltak hígítva és különböző koncentrációkban injektáltuk a heparinnal fedett szenzor chip felületére 10 µl/min áramlási sebességgel 7 percen keresztül. Két mérés között a szenzor chip felületét 30 µl regeneráló pufferrel (10 mM glicin-HCl, pH 2,5, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) regeneráltuk. A kölcsönhatás optimális pH értéke előzőleg már meghatározásra került, ennek értelmében a mérést pH 8,4-en végeztük. A Langmuir 1:1 kötési modellt

alkalmaztuk a kötődési görbe illesztésre. Az asszociációs és a disszociációs sebesség állandókat (k_a és k_d) és az asszociációs és disszociációs egyensúlyi állandókat (K_A és K_D) a szenzorgramokból határoztuk meg. BIAevaluation szoftver 3.2-es verzióját (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) használtuk a kölcsönhatás vizsgálat kiértékelésére.

3.9. A rekombináns antithrombin fehérjék AT antigén és aktivitás mérései

A vad típusú és a mutáns AT plazmiddal transzfektált HEK-293 sejtek felülűszójából és sejtlyúzátumából került meghatározásra az AT antigén enzimhez kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA) módszerrel Abcam Human-Antithrombin-III-ELISA-Kit (Abcam, Cambridge, UK) segítségével a gyártó útmutatását követve. Az AT specifikus kötő antitestet a 96-lyukú lemez alján a gyártó által előkészítve találjuk, a lyukakba a standard sor tagjait és a vizsgálandó mintákat hozzámérjük és inkubáljuk szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. Mosási lépés után hozzáadjuk a biotinált AT specifikus antitestet és 1 órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten. Mosási lépést követően hozzáadjuk a Streptavidin-peroxidáz konjugátumot, ami kapcsolódik az előzetesen megkötött antigén-antitest komplexhez. 30 perc várakozás után, mosási lépést követően hozzámérjük a TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin) kromogén szubsztrátot. 12 perc elteltével kialakul a kék szín, mivel a szubsztrátot a peroxidáz hidrolizálja. A leállító oldat hozzáadása után a kék szín sárgára változik. A sárga szín intenzitása arányos a mintában lévő AT mennyiségével. A színintenzitást Infinite 200 mikrolemez fotométerrel (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Ausztria) mértük 450 nm-en, az eredmények értékelése Excel program segítségével a standard sor ismert koncentrációjú tagjaihoz tartozó abszorbancia értékek alapján történt.

A heparin kofaktor és a progresszív AT aktivitás méréseket a transzfektált sejtek felülűszójából végeztük LX Antithrombin Hc + P, FXa reagens (Labexpert Ltd., Debrecen, Hungary) felhasználásával. A heparin kofaktor aktivitás meghatározása során a felülűszó mintákat heparin tartalmú pufferrel hígítjuk, majd feleslegben FXa-t adunk hozzá. A nem kötődött FXa aktivitását egy specifikus kromogén szubsztráttal BIOPHEN CS-11(32) [Suc-Ile-Gly-(γ Pip)Gly-Arg-pNA, HCl] (HYPHEN Biomed., Neuville, France) mérjük. A FXa lehasítja a para-nitro-anilin-t (pNA) a szubsztrátról, amely 405 nm-en mérhető színes termék. Minél több AT van a felülűszóban, annál kevesebb szabad FXa marad a rendszerben és kevesebb színes termék keletkezik. A mérés során 1:1 arányban mértük össze a mintát és a FXa reagenst 96-lyukú lemezen, duplikátumban. 60 másodpercig inkubáltuk 37 °C-on, majd a kromogén szubsztrát hozzáadása után 405 nm-en 300 másodpercig követtük az abszorbancia változást. Progresszív aktivitás mérésekor a mintákat polibrén tartalmú pufferrel hígítottuk az

estleges heparin szennyeződés és a heparin hatás teljes kizárása céljából. A mérés során 1:1 arányban mértük össze a mintát és a FXa reagenst 96-lyukú lemezen, duplikátumban. 5 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd a kromogén szubsztrát hozzáadása után 405 nm-en 300 másodpercig követtük az abszorbancia változást. Ismert AT tartalmú kalibrációs plazma segítségével egy kalibrációs egyenest készítünk, Excel program segítségével a minták abszorbancia értéke alapján számoltuk az antithrombin aktivitást.

3.10. N-glikozidáz F emésztés

Az N-glikozidáz F az aszparagin kötött N-glikánokat hasítja le a glikoproteinekről. Az N-glikánokat a vad típusú és a p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr mutáns antithrombin fehérjék esetében távolítottuk el az N-Glycosidase F (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) enzim segítségével. A PNGase F emésztés előtt a mintákat 150 mM Na-foszfáttal denaturáltuk 95 °C-on 5 percig. Ezután adtuk hozzá a 6 µl 100 U/ml PNGase F enzimet és inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 15 órán keresztül. Az emésztett mintákat a kontroll párjaikkal együtt Western blot technikával vizualizáltuk.

3.11. Western blot

A transzfektált (transziens és stabil transzfekció) HEK-293 sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, majd a sejteket lizáltuk 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% nátrium-dezoxikolat és proteáz inhibitor koktél (Roche) tartalmú lízis pufferben. A felülúszó és a sejtízátum mintákat centrifugáltuk 4 °C-on 15 percig 12000 g-n, majd aliqvotokba osztottuk a mintákat és – 20 °C-on tároltuk felhasználásig. A minták fehérje koncentrációját Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértük meg és az eredmény alapján egységes mennyiségű fehérjét futtattunk 10%-os SDS-PAGE gélen majd nitrocellulóz membránra blottoltuk át a fehérjéket nedves blot technikával. A membránt 5%-os zsírszegény tejpor TTBS pufferban (Tween 20-Tris buffered saline) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd az elsődleges antitesttel egy éjszakán át hidegszobában inkubáltuk. Az AT detektálása kecske anti-humán AT antitesttel (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canada) történt, a sejtízátum minták esetében loading kontrollnak beta tubulin poliklonális antitestet (Invitrogen) alkalmaztunk. Az elsődleges antitestek a blokkoló oldatban 1:10000 hígításban voltak. Inkubációt követően a membránokat mostuk háromszor 7 percig TTBS pufferban, majd a megfelelő másodlagos antitesttel inkubáltuk 45 percig szobahőmérsékleten. Torma-peroxidáz kapcsolt anti-kecske IgG (Abcam) és anti-nyúl IgG

(GE Healthcare) blokkoló oldatban 1:10000 hígításban voltak alkalmazva. Az immunreakciót ECL technikával váltottuk ki a gyártó utasításait követve (Thermo Fisher Scientific). A kemilumineszcens detektálás C300 Azure készülékkel történt (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA).

3.12. RT-qPCR

Real-time quantitative RT-PCR technikát használtunk a vad típusú és a kilenc mutáns AT forma mRNS expressziós szintjének meghatározására tranziens transzfekciót követően. Az RNS izolálás QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) segítségével történt a tranziensen transzfektált HEK-293 sejtekből. A genomi DNS eltávolítása RapidOut DNA Removal Kittel (Thermo Scientific) történt, majd a reverz transzkripció (qPCRBIO cDNA Synthesis Kit) után következett a RT-qPCR LightCycler480 (Roche) készüléken a következő primerekkel:

AT RNA forward primer 5' –GCTAAACCCCAACAGGGTGA-3';

AT RNA reverse primer 5' –TACTTAACACAAGGGTTGGCTAC-3';

OAZ RNA forward primer 5' –CACCATGCCGCTCCTAAG-3';

OAZ RNA reverse primer 5' –GAGGGAGACCCTGGA ACTCT-3';

β-GAL RNA forward primer 5' –GCGTACATCGGGCAAATAAT-3';

β-GAL RNA reverse primer 5' –TAATCACGACGCGCTGTATC-3'.

Előinkubáció 10 perc 95° C 1 ciklus; amplifikáció 10 sec 95° C, 10 sec 51° C, 10 sec 72° C, 50 ciklus; olvadási görbe felvétele 1 perc 95° C, 1 perc 45° C, folyamatos 75° C, 1 ciklus; majd hűtés 30 sec 40° C 1 ciklus.

3.13. In silico módszerek

3.13.1. ATD II heparin-kötőhely (IIHBS) mutációk (ATBp3, AT Basel, AT Padua) vizsgálata in silico módszerekkel

Az in silico módszerekkel nyert eredmények Dr. Balogh Gábor munkái, a módszerek részletes bemutatását mégis szükségesnek érezzük itt, az eredmények interpretációjának könnyebb érthetősége érdekében.

A mutációk AT - heparin (pentaszacharid) kötésére gyakorolt hatásának vizsgálatára és a fehérje stabilitásának vizsgálatára kétféle modell rendszert hoztunk létre. Elsőként a 1T1F röntgen-diffrakciós szerkezetet használtuk a pentaszacharidokat nem tartalmazó rendszer modellezéséhez, ezzel a nem aktivált állapotot mutattuk be. Másodjára a pentaszacharidot kötött, aktivált AT-t modelleztük az 1NQ9 röntgen-diffrakciós szerkezetből kiindulva. E modelleket megszerkesztettük mindkét aktivációs státusznak megfelelően a vad típusú AT és

mind a három (ATBp3, AT Basel, AT Padua) mutáns esetében. Az utóbbi variánst mind semleges és protonált His79 (His47 az érett fehérjében) formában szimuláltuk. Az összes rendszer szolvatálva volt a TIP3P víz modell CHARMM változatát használva. A szimulációs dobozok kocka alakúak voltak és a minimum távolság a fehérje (vagy a ligand) és a doboz falai között 12 Å volt. Na⁺ és Cl⁻ ionok hozzáadásával az ionerősséget 0,15 M-re állítottuk be, és a munkacsoport korábbi tanulmányához hasonlóan a CHARMM36m erőteret választottuk az AT fehérje, valamint a CHARMM szénhidrát FF erőteret a pentaszacharid esetében. A β-AT szerkezetnek megfelelően, a fehérje glikozilálva volt három aszparagin reziduumon: Asn-96, -155, és a -192 (a számozás itt az érett fehérjének felel meg, a molekulamodellzés követelményei szerint). A nagy méretük miatt az oligoszacharid láncok csonkítva voltak hasonlóan, mint az előbb említett tanulmányban. A CHARMM-GUI web szerveret használtuk a topológiai file-ok generálására mind a három rendszer esetében. Ennek következtében a megfelelő mintavételezés ilyen konformációs átmeneteknél gyakran megköveteli a „javított” mintavételezési technikákat. A Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (GAMD) módszert választottuk ki, mert ez jelentősen kiterjesztett mintavételezést biztosított, és nem függött előre definiált reakció koordinátáktól. Az AMBER 16 pmemd.cuda szoftvert alkalmaztuk a molekula dinamikai (MD) és a GAMD szimulációkhoz, (ambermd.org). Az összes modell rendszer először két egymást követő energiaminimálásnak volt alávetve, mindegyik 2000 lépésből állt. Az első energiaminimálás magában foglalt egy 500 lépést, amely a „steepest descent” módszert használta, és 1500 lépés konjugát gradiens módszert, úgy, hogy a fehérje és a ligand pozíciója korlátozott volt. A következő 2000 lépésben a reziduumok nem voltak korlátozva és a konjugát gradiens módszert alkalmaztuk. A rendszert ezután felfűtöttük 0 K-ról 310K-ig 2 ns MD szimulációban, úgy, hogy az összes nem-oldószer és nem-ion atomok korlátozva voltak. A fűtést 2 ns nyomás kiegyenlítés követett. Kettős gyorsítás (dual boost) sémát alkalmaztunk a GAMD szimulációkban. A sigma0P és a sigma0D paraméterek az alapértelmezett értékükre (6,0) voltak beállítva a GAMD szimulációban. Az összes GAMD szimuláció tartalmazott egy 60 ns-os ekvilibrációs fázist a „produkciós” szimuláció előtt. Az első 10 ns-ben, nem alkalmaztunk GAMD potenciált a rendszeren és a 4-10 ns rész alatt gyűjtöttük az adatokat. A következő 50 ns-ben használtuk a GAMD potenciált a rendszeren. A GAMD paraméterek rendszeres időközönként frissítve voltak, kivéve az 50 ns-os fázis első 5 ns szakaszában. A „produkciós” GAMD szimulációk 310 K-n játszódtak le NVT körülmények alatt. A Langevin hőmérsékletszabályozót alkalmaztuk a szimulációban 2,0 gamma konstanssal. A „produkciós” szimulációkban a Monte Carlo nyomás-szabályozót használtuk a nyomás kapcsolására. A nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások a

PME módszerrel voltak kiszámolva. 12 Å Coulomb „cut-off” távolságot alkalmaztunk a szimulációkban. A CHARMM erőter estében ajánlott az energia kapcsoló használata 10 Å és 12 Å között a Lennard-Jones kölcsönhatások miatt. Az összes „produkciós” szimuláció 600 ns hosszúságú volt. Mindegyik mutáns esetében két párhuzamos szimuláció volt futtatva az 1T1F alapú és három az 1NQ9 alapú rendszerek esetében. Ez megfelel 1,2 μs és 1,8 μs kombinált szimulációs időnek mindegyik AT mutánsra. Az összes „produkciós” szimulációs idő 15 μs volt. A CPPTRA szoftvert használtuk a legtöbb trajektória analíziséhez, amely tartalmazott RMSD és RMSF számításokat, valamint csoportosításokat. Az „általánosított korreláció” számításokat az Ichiye és Karplus korábbi munkája alapján Lange és Grubmüller által kifejlesztett módszer alkalmazásával végeztük el.

3.13.2. SERPINC1 gén misszensz mutációk következményeinek in silico predikciója

A 7 misszensz mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Pro461Thr) következményének predikciójára 5 különböző, webes felületen elérhető eszközt használtunk. A PolyPhen2 eszköz a humán fehérjékben bekövetkező aminosav cserék következményeit jelzi előre. Több forrásból származó információt vesz tekintetbe, úgymint homológ szekvenciákat, szerkezeti sajátosságokat, és 3D struktúrákat. A PolyPhen2 két különböző - HumDiv és HumVar - modellt alkalmaz, melyek különböző adatkészleten lettek betanítva. A HumVar jobban megfelel drasztikus, betegséget okozó hatással bíró mutációk detektálására, míg a HumDiv alkalmas sokkal összetettebb fenotípusban megjelenő hatás és enyhébb hatású variánsok jóslására. A MutPred2 gépi tanulási modellt használ, hogy csoportosítsa az emberekben található mutációkat aszerint, hogy patogének vagy jóindulatúak. Mindemellett megjósolja a mutáció hatását a fehérje számos szerkezeti és funkcionális tulajdonságára. A PhD-SNP egy Support Vector Machine (SVM)-alapú csoportosító a misszensz mutációk számára, amely figyelembe veszi a mutációt, a szekvencia környezetét és a szekvencia profilját. A SIFT egy szekvencia homológia alapú módszer, amely különbséget tesz a fehérjékben létrejött aminosav cserék hatásai között, úgy mint potenciálisan fenotípusos következménnyel járó vagy nem járó. Azok a mutációk, melyek 0,05 ponttal megegyezők vagy annál kisebbek, a károsító mutációk csoportját képezik. A MutationTaster program a DNS szekvencia alapján jóslja meg a variánsok és a mutációk következményét. Ebben az esetben a kapott pont a korrekt előrejelzés valószínűségét adja meg és nem egy érték, amely különbséget tesz patogén és nem patogén mutáció között. A PolyPhen2, MutPred2, és a PhD-SNP módszerek esetében, a mutáció patogénnek tekintendő 0,5 pont alatt. A szignál peptidben található két misszensz mutáció

(p.Arg14Lys és p.Cys32Tyr) esetében a SignalP 6.0 (csak eukarióta szignál peptid) program segítségével a szignál peptid hasításának predikcióját végeztük el.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Antithrombin Budapest 3, Basel, és Padua mutációk vizsgálatának eredményei

4.1.1 A heparin kötőhelyet érintő mutációt hordozó betegek klinikai és laboratóriumi jellemzőségei

A vizsgált időszakban 19 beteget diagnosztizáltunk AT Basel, 31 beteget AT Padua, és 291 beteget ATBp3 (52 homozigóta és 239 heterozigóta formában) mutációval. Az AT Basel és az AT Padua mutációt hordozó betegek mind heterozigóták, mivel a homozigóta formájuk feltehetően letális. Vénás thrombosiszt regisztráltak az ATBp3 homozigóták esetében a betegek többségénél (88,8%) és a heterozigótáknál (42,1%) is relatíve gyakori volt, míg az AT Basel betegek nagy hányadánál nem fordult elő VTE klinikai tünet az adatgyűjtés idejében. Néhány beteg az ATBp3 és AT Padua csoportokból tüdőembóliát szenvedett el, melynek nyilvánvaló forrását a képalkotó eljárások nem tudták megállapítani. Az artériás thrombosis az AT Basel csoportban volt a leggyakoribb (44,4%). A stroke-os betegeket szívultrahanggal is vizsgálták, hogy kizárják a nyitott foramen ovale jelenlétét. A szívultrahang nem igazolt nyitott foramen ovale-t a vizsgálatba bevont betegeknél. A terhességi komplikációk gyakorisága, úgymint a koraszülés vagy spontán abortusz, kissé emelkedett volt az AT Padua betegek körében (42,9%), de ez a különbség a másik két mutációt hordozó betegekkel összehasonlításban statisztikailag nem volt szignifikáns. Az ATBp3 homozigóták hc-anti-FXa AT aktivitás eredményeinek mediánja volt a legalacsonyabb, az összes AT aktivitás eredmény a határérték alatt volt az Innovance AT módszerrel (Siemens). Négy ATBp3 heterozigóta beteg hc-anti-FXa AT aktivitás eredménye volt a 80%-os határérték feletti. A p-anti-FXa AT aktivitás (a mérés heparin hiányában történik) szignifikánsan alacsonyabb volt az ATBp3 homozigóta és heterozigóta betegekben összehasonlítva az AT Basel és AT Padua betegekkel. A p-anti-FXa AT aktivitás és a hc-anti-FXa AT aktivitás aránya az ATBp3 homozigótáknál a legmagasabb érték, ami azt bizonyítja, hogy ennek a genotípusnak van a legnagyobb hatása az AT heparin kölcsönhatásra. Az AT antigén eredmények az ATBp3 csoportban szignifikánsan alacsonyabbak voltak a másik két mutánséhoz képest.

A különböző mutációkat hordozó betegek plazmájának keresztezett immunoelektroforézis (CIE) vizsgálat eredményeként jól látható volt egy alacsony heparin affinitású és egy magas heparin affinitású frakció az összes heterozigóta plazma esetében. Az ATBp3 homozigóta

plazma esetében csak az alacsony heparin affinitású AT volt detektálható. A heterozigóta AT Padua plazma estében a kisebb, anód felőli szabálytalan csúcs (azaz a csökkent heparin affinitásnak megfelelő frakció) nagyobb volt a normál csúcsnál.

4.1.2 A vad típusú és a Budapest 3 homozigóta antithrombin hőstabilitása

A nano DSF (Differential Scanning Fluorimetry) kísérletek során szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a humán plazmából szeparált ATBp3 homozigóta mutáns és vad típusú AT összehasonlításakor ($n = 3$ független mérés). A vad típusú és az ATBp3 mutáns AT fehérjék hőstabilitásának jellemzésére a triptofán fluoreszcencia 350 nm/330 nm arány változását használtuk a hőmérséklet emelkedésnek megfelelően. A fehérjék olvadási görbéjének felhasználásával két paramétert, a denaturáció kezdetét jelentő (T_{kezdeti}) és az átmenet felezőpontot (T_m), határoztunk meg. A vad típus esetében a T_{kezdeti} értéke $46.2 \pm 1.3^\circ\text{C}$ és a T_m értéke $57.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$ volt, míg a mutáns AT esetében a T_{kezdeti} értéke $42.7 \pm 1.47^\circ\text{C}$ és a T_m értéke $57.1 \pm 0.03^\circ\text{C}$ volt. Mind a T_m értéke ($p=0.0031$) és a T_{kezdeti} értéke ($p=0.0371$) szignifikánsan alacsonyabb volt az ATBp3 mutáns estében a vad típushoz hasonlítva, ezzel a mutáns fehérje alacsonyabb hőstabilitását sugallva.

4.1.3. Heparin kötő képesség vizsgálatának eredményei

Az AT Basel és az AT Padua mutációt hordozó betegek mind heterozigóták, mivel a homozigóta formájuk feltehetően letális. Ezért a heparin kötő képesség részletesebb vizsgálata betegekből származó plazma mintákon nem lehetséges a normál allélról átíródó normál AT zavaró jelenléte miatt. Vizsgálatainkhoz ezért létrehoztuk a különböző II HBS típusú mutációk és a vad típus AT in vitro előállított, tisztított rekombináns változatát, majd SPR vizsgálatnak vetettük alá. A hatféle különböző AT koncentrációnál kapott szenzorgramokból számolt paramétereket átlagoltuk az egyes antithrombinoknál. Ahogy vártuk, a legerősebb AT-heparin kötés a vad típus estében volt megfigyelhető ($K_D = 6.4 \times 10^{-10}$ M, $K_A = 2.2 \times 10^9$ 1/M). Az asszociációs állandó (k_a) a legmagasabbnak ($k_a = 1.37 \times 10^7$ 1/Ms) a vad típusnál adódott a vizsgált tisztított rekombináns AT fehérjék közül. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az AT-heparin komplex a leggyorsabban a vad típusú AT esetében alakul ki. A disszociációs állandó az összes mutáns esetében hasonló nagyságrendű volt (10^{-3}). (A vad típusú AT tekintetében $k_d = 6.75 \times 10^{-3}$ 1/s).

A mutáns AT fehérjék közül az ATBp3 alakította ki a legstabilabb komplexet a heparinnal ($K_D = 2.15 \times 10^{-8}$ M, $K_A = 1.62 \times 10^8$ 1/M) és a komplex kialakulása is itt volt leggyorsabb ($k_a = 3.25 \times 10^5$ 1/Ms). A disszociációs állandó az ATBp3 mutánsra vonatkozólag $k_d = 2.47 \times 10^{-3}$ 1/s).

³ 1/s. A vad típusú fehérje eredményeivel összehasonlítva az ATBp3 szignifikánsan gyengébb kölcsönhatásba lép a heparinnal, lassabb asszociációs állandóval. Humán plazmából izolált WT és ATBp3 homozigóta mutáns fehérjékkel végzett SPR vizsgálatok is körülbelül két nagyságrendű különbséget mutattak a K_D értékekben (az eredményt itt nem mutatjuk be). Az AT Basel mutáns vonatkozásában az asszociációs/disszociációs kinetika és az egyensúlyi paraméterek a következők: $k_a = 1.03 \times 10^4$ 1/Ms és $k_d = 4.45 \times 10^{-3}$ 1/s; $K_D = 7.64 \times 10^{-7}$ M és, $K_A = 2.40 \times 10^6$ 1/M. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az AT Basel sokkal lassabban kötődik a heparinhoz, mint a WT AT és az ATBp3, és az asszociációs konstansa is majdnem egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az ATBp3 mutánsnak. Az összes mutáns közül az AT Padua rendelkezik a leggyengébb kölcsönhatással a heparinnal ($K_D = 1.08 \times 10^{-6}$ M, $K_A = 2.37 \times 10^6$ 1/M) és a leglassabb komplex kialakulással ($k_a = 1.01 \times 10^4$ 1/Ms). Azonban a disszociációs állandója (4.51×10^{-3} 1/s) majdnem megegyező a többi mutáns esetében mért k_d értékkel.

4.1.4. A vad típusú és a három IIHBS típusú mutáns AT fehérje in silico modellezése

A 22-46 hurok konformációja

A heparin kötő hely közelében lévő 22-46. aminosavak által határolt hurokról feltételezzük, hogy szerepet játszik az AT-pentaszacharid kötés szabályozásában. Ez a hurok nagyon hajlékony és sok aminosavának pozíciója nem tisztázott a röntgen-diffrakciós szerkezetekben. Ezen kísérleti adatok hiányának ellenére a „javított” mintavételezésű MD szimulációk segítségével tanulmányozni tudjuk a hurok konformációját. Mivel a molekula modellezés során az érett fehérje szerkezetét használtuk, ezért az egyes részek számozása az in silico kísérletekben a klasszikus számozást követi, vagyis az érett fehérje első aminosava a +1. (ATBp3 megfelelője így a Leu99Phe, AT Basel megfelelője a Pro41Leu és az AT Padua megfelelője a Arg47His.) A vizsgált mutációk által érintett aminosavak közül a Pro41 (AT Basel pozíciója) helyezkedik el a 22-46 hurokban, így a hurok konformációja fontos faktor lehet ezen variáns csökkent heparin affinitásában. A nem aktivált AT Basel variáns (Pro41Leu) két szimulációjában a konformációk két fő típusát figyeltük meg. Az első típusban a hurok a heparin kötő helyhez nagyon közeli pozíciót foglal el, só hidakat és hidrogén kötésekkel alakítva ki ezen rész aminosavaival. A második típusban, leginkább a másik 600 ns trajektóriában megfigyelve, a távolság a heparin kötő helytől nagy volt. Ez a jelenség a hurok jelentősen fokozott konformációs változékonyságára utal összehasonlítva a vad típusúval, emiatt néhány konformáció potenciálisan akadályozó lehet a heparin pentaszacharid kötésében.

Azonban a pentaszacharid kötött (aktivált) AT szimulációban nem volt megfigyelhető a szoros kapcsolat a hurok és a heparin kötő régió között. Ez azt sugallja, hogy a hurok megváltozott konformációjának valószínűleg nincs vagy csak kicsi a destabilizáló hatása a pentaszacharid kötésre, miután egy „erős” komplex már létrejött. A pentaszacharid erősen töltött természete és a megváltozott elektrosztatikus hatások meg tudják gátolni, hogy a hurok átmenjen az alternatív konformációba.

Az antithrombin fehérje N-terminális részének DSSP (Define Secondary Structure of Proteins) analízise

Elemeztük az N-terminális rész másodlagos szerkezetének változásait (az elemzésben az 1-145 aminosavak szerepeltek, ez a szakasz tartalmazza az egész heparin kötő helyet, de nem tartalmazza az „A” béta redőt) DSSP módszer alkalmazásával [81], a CPPTRAJ szoftver segítségével. Ezt az elemzést elvégeztük mind a „nem aktivált AT” (1T1F) és a „AT-pentaszacharid komplex” (1NQ9) rendszerekben. Az 1T1F alapú rendszert illetően a konformációs változások nyilvánvalóak voltak az AT Basel szimulációk esetében az előző részben ismertetett területen a vad típusú AT-al összehasonlítva. Azonban nem volt látható szignifikáns konformáció változás a heparin kötő régiókban, beleértve a P hélixet (112-120 aminosavak). A „komplex” szimulációk közül az AT Padua (Arg47His) variáns (és főleg a semleges formája) mutatott konformációs változásokat a 30-35 régióban. Hasonlóan az 1T1F alapú szimulációkhoz, itt sem volt szignifikáns konformáció változás a heparin kötő területen. Egy kis mértékű D hélix meghosszabbodás volt látható az ATBp3 (Leu99Phe) trajektóriák esetében összehasonlítva a vad típussal.

Root Mean Square Fluctuations (RMSF) analízis

A Root Mean Square Fluctuations (RMSF) egy általános vizsgálati módszer egy fehérjét felépítő aminosavak flexibilitásának leírására. Használhatjuk misszensz mutációk által okozott fluktuáció növekedés mérésére. Továbbá konformációs változások okozhatnak növekedést vagy csökkenést a fluktuációban a molekula specifikus részein. A „nem aktivált” AT szimulációk közül az ATBp3 variáns mutatott mérsékelt növekedést a fluktuációban a vad típusú fehérjéhez és az AT Basel variánshoz képest. Fluktuáció növekedést figyeltünk meg a fehérjében mind az érintett aminosavhoz (99. aminosav) közeli részeken (aminosavak 50-100), mind távolabbi régiókban (aminosavak: 320-330, 360-380, és 420-430). A fluktuáció növekedések kis mértékűek voltak viszont a harmadlagos szerkezet más részein. Ezek az eredmények összhangban megfelelnek egy variánsnak, melyben a natív konformáció

stabilitása mérsékelten csökkent, de még számottevő mennyiségben szekrécióra tud kerülni. Az AT Basel variáns esetében a fluktuáció növekedések főleg a 110-130 és a 300-320 aminosav régiókban voltak megfigyelhetőek. A legérdekesebb eredményt az AT Padua variáns esetében kaptuk, ahol jelentősen megnövekedett fluktuáció volt megfigyelhető (8. ábra C) a 47-es reziduum mindkét féle protonált állapotában. A növekedések különösen nagyok voltak az F hélixhez közeli régióban (180-210) és a 290-310 régió héliceiben. Ez arra enged következtetni, hogy ez a variáns hatással van a molekula távoli részeinek konformációjára és még az allosztériát is befolyásolja a molekula távoli részein. A heparin aktivált státuszra vonatkozólag az RMSF értékektől azt vártuk, hogy tükrözzék a harmadlagos szerkezet stabilitásában bekövetkező változást, hasonlóan a nem aktivált státuszhoz. Azonban azt tudjuk, hogy az átlagosnál nagyobb fluktuációkkal rendelkező területek konformációs változásai, melyről ismert, hogy részt vesznek az allosztérikus mechanizmusban, szintén ki tudja váltani az RMSF növekedést. Ebben a folyamatban résztvevő régiókhoz tartozik a D hélix C-terminális vége, a reaktív hely hurok (RCL) és a FXa-val és a FIXa-val kölcsönható exosite. Az ATBp3 variáns növekedést mutatott a fluktuációban a vad típusúhoz képest, hasonlóan a „nem kötött” státuszhoz. A D hélix C-terminális vége (125-135 aminosavak) játszik fontos szerepet az allosztérikus aktivációban. A vad típusú rendszer esetében szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a „kötött” állapotban, amikor összehasonlítottuk a nem aktivált WT AT-al. Azonban nem ez volt a helyzet az ATBp3 és az AT Basel variánsoknál, az RMSF értékek magasak maradtak a „kötött” állapotban is. Az AT Padua variáns tekintetében az eleve jelentősen megnövekedett fluktuációk, amelyeket az 1T1F alapú, vagyis a nem kötött AT-t reprezentáló rendszerekben megfigyeltünk, szintén megfigyelhető volt ennek a variánsnak a heparin kötött szimulációiban is. A legnagyobb növekedést mutató régiók megközelítőleg azonosak voltak a két típusú rendszerben az AT Padua mutációra vonatkozólag.

Az allosztérikus útvonalak vizsgálata

Az AT konformációs aktiválása alapvetően egy allosztérikus folyamat, amelyben a heparin kötő hely, a reaktív hely hurok, és a koagulációs faktorokat kötő exosite helyek vesznek részt. Az előző munkánkhöz hasonlóan az allosztérikus útvonalak vizsgálata Lange és Grubmüller által kifejlesztett módszerrel történt, amely összefüggő (korrelált) mozgásokat is képes detektálni a molekuladinamikai trajektóriákban. Ezt az analízist az 1T1F és a 1NQ9 alapú rendszerekben is végrehajtottuk. Általában elmondhatjuk, hogy az AT Basel variáns hasonló mintázatot mutatott, mint a vad típusú AT, jelezvén ezen mutáció valószínűleg kicsi hatását az

allosztériára. Ezzel ellentétben a mintázat különböző volt az ATBp3 és különösen az AT Padua mutációknál. Ez valószínűleg azt jelenti, hogy e két variáns esetében az allosztérikus folyamatokban érdemi változások következtek be.

A pentaszacharid kötés vizsgálata Root Mean Square Deviations meghatározással

A röntgen-diffrakciós struktúrájának megfelelő pentaszacharid gyűrű és a glikozidos kötésben részt vevő atomok Root Mean Square Deviations (RMSDs) értékeit alkalmaztuk a ligand konformációjának a leírására. Nem volt szignifikáns különbség a pentaszacharid RMSD értékei között a WT, AT Basel és ATBp3 szimulációk esetében. Ellenben az AT Padua protonált variánsa emelkedést mutatott a pentaszacharid RMSD értékeiben az összes többi szimulációhoz viszonyítva. Teljes vagy közel teljes disszociációja a ligandnak nem volt megfigyelhető egyik szimulációban sem a szimulációs időn belül. Meg kell jegyezzük, hogy az erősebb AT – heparin kölcsönhatás valószínűleg annak a következménye, hogy az összes vizsgált variáns glikozilációs mintázata a β -AT-nak megfelelő. A szimulációkban a β -AT használatának az oka az, hogy az α -AT-ban a kötő helyhez közel lévő nagy oligoszacharid megnehezíti a megfelelő konformációs mintavételt. Nagyon terjedelmes molekuladinamikai szimulációra lenne szükség ahhoz, hogy pontosabb „átlagot” kapjunk a glikán és a pentaszacharid közötti kölcsönhatásra.

4.2. A kilenc új antithrombin mutáns vizsgálatának eredményei

4.2.1. Az antithrombin deficiens betegek klinikai és laboratóriumi jellegzetességei

2016 -2021 között a DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken diagnosztizált AT deficiens betegek többsége az alapító hatású AT Budapest 3 (p.Leu131Phe) mutációt hordozta. Azonban találtunk kilenc új *SERPINCI* mutációt is, melyek az irodalomban eddig nem szerepeltek vagy a mi munkacsoportunk által voltak először közölve. Ezek a mutációk a különböző adatbázisokban nem szerepelnek (Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.cf.ac.uk>; és a ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>, utolsó belépés 2023. November 11). Ellenőriztük a 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org>, utolsó belépés 2023. November 11) adatbázist is, ahol polimorfizmusként sem találhatóak meg. Az általunk vizsgált összes beteg heterozigóta volt ezekre az új mutációkra nézve. Két beteg (apa és fia) hordozta a c.41G>A (p.Arg14Lys) mutációt. A plazma mintájukban csökkent heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitás és csökkent progresszív anti-FXa AT aktivitás volt mérhető. Az AT antigén koncentráció is csökkent volt, ami inkább kvantitatív ATD-re utalt. A férfi beteg 16 éves korában szenvedett el mélyvénás thrombosiszt, azóta nem

történt thromboticus klinikai esemény. Az apa is hordozza a kimutatott eltérést, de még nem következett be nála thrombosis. Az index beteg hosszú távú K-vitamin antagonistá kezelésben részesül, az apja nem kap antikoaguláns terápiát. A második mutációt (c.95G>A, p.Cys32Tyr) egy nőbeteg hordozza, aki első thromboticus klinikai eseményét 20 évesen terhesség alatt szenvedte el (mélyvénás thrombosis tüdőembóliával). Két visszatérő thromboticus klinikai eseményt regisztráltak: 41 évesen mesenterialis véna thrombosis és évekkel később tüdőembóliát. Az első és a második thrombosis után 1-1 évig K-vitamin antagonistá (VKA) terápián volt, azonban a harmadik thromboticus klinikai esemény után élethosszig tartó antikoaguláns kezelésre állították, kezdetben VKA-t alkalmaztak, majd váltottak rivaroxaban kezelésre (20 mg napi egyszer). A beteg családi anamnézise is pozitív thrombosis tekintetében: három fivére is szenvedett el mélyvénás thrombosis, kettő közülük tüdőembóliában hunyt el. Azonban ők nem voltak akkor thrombophilia irányában kivizsgálva. A beteg lánytestvére szülés után szenvedett el mélyvénás thrombosis. A beteg heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitása és a progresszív anti-FXa AT aktivitása alacsony volt és az AT antigén szintje is arányosan csökkent volt. A harmadik mutáció (c.232C>G, p.Arg78Gly) az AT heparin kötő helyét érinti. A hordozó egy fiatal nőbeteg endometriózissal. Meddőség miatt vizsgálták, nem volt thromboticus klinikai tünete. A családi anamnézis is negatív volt thrombosisra. Az in vitro fertilizációs (IVF) kezelés előtt diagnosztizálták ATD-vel. Az IVF terápia alatt és a terhessége folyamán LMWH-t kapott, de hosszútávú antikoaguláns kezelés nem indult. A beteg heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitása alacsony volt, míg a progresszív anti-FXa AT aktivitása és az AT antigén szintje normál tartományba esett, ami II-es típusú HBS ATD-át véleményez. A negyedik mutáció (c.362T>G, p.Met121Arg) érintette egy fiatal nőbeteg, aki 34 évesen szenvedett el MVT-t. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A beteg hosszútávú VKA antikoagulációban részesül. Az ötödik mutáció (c.734T>C, p.Leu245Pro) hordozója egy férfi beteg, aki 42 évesen kapott proximális MVT-t. A kórtörténetében nem szerepelt provokáló tényező. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A diagnózis után hosszútávú warfarin antikoaguláns terápia lett beállítva a betegnél. A továbbiakban nem történt visszatérő thromboticus klinikai esemény. A hatodik mutációt (c.807delT, p.Leu270Argfs*14) egy férfi betegnél diagnosztizáltuk, aki ötször szenvedett el MVT-t. Az elsőt 16 évesen. Klinikai nézőpontból tekintve ez az eset mutatta a legsúlyosabb thromboticus fenotípust. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa

AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyok voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A beteg élethosszig tartó antikoaguláns kezelést kap, jelenleg rivaroxabant szed (20 mg napi egyszer). A hetedik mutáció (c.1349A>T, p.Asn450Ile) hordozója egy négytagú család, akik közül ketten szenvedtek el MVT-t 23 és 40 éves életkorban. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén eredményeik arányosan alacsonyok voltak, I-es típusú ATD-t jeleztek. A 7_1 jelzésű beteg még nem szenvedett thrombosiszt, mindamelllett volt négy terhessége, melyből az első spontán vetéléssel végződött. A következő három terhessége alatt a beteg LMWH kezelést és AT koncentrátumot kapott, azok a terhességei sikeresen végződtek. Hosszútávú antikoaguláns kezelést nem vezettek be nála. Az index beteg lánytestvére (7_2) a terhessége alatt LMWH és AT koncentrátum terápiát kapott. Mivel az ő anamnézisében szerepelt MVT, ezért hosszútávú VKA típusú antikoagulációra lett beállítva. A 7_3 jelű beteg is VKA antikoagulációban részesül, míg a 7_4 jelű beteg nem (ő még nem szenvedett el thrombosiszt). A nyolcadik mutációt (c.1367-1368del,c.1367-1371ins, p.Gly456delins_Ala-Thr) egy nőbetegben azonosítottuk, aki 27 évesen terhessége alatt szenvedett el MVT-t, amit egy második (kiváltó ok nélküli) követett 5 év múlva. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyok voltak, az I-es típusú ATD-nek megfelelően. A beteg egész életen át tartó antikoaguláns terápiában részesül apixaban alkalmazásával (5 mg naponta kétszer). Végül a kilencedik mutáció (c.1384C>A, p.Pro461Thr), melyet három nem rokon betegnél is kimutattunk. Az egyikük kiváltó ok nélkül szenvedett el thrombosiszt, melyet tüdőembólia követett viszonylag idős életkorban (62 évesen), ő jelenleg VKA kezelést kap. A másik két beteg sokkal fiatalabb volt a thromboticus klinikai eseményüknél, azonban mindkettő MVT provokált volt. Mindkét beteg direkt oralis antikoaguláns kezelésben részesül (apixaban 5 mg napi kétszer, illetve rivaroxaban 20 mg napi egyszer). A heparin-kofaktor-anti-FXa és a progresszív anti-FXa AT aktivitás értékek aránytalanul alacsonyok voltak az AT antigén értékekhez képest, ezzel inkább funkcionális ATD-re utalva. A laboratóriumi kivizsgálást illetően az alap koagulációs tesztek a normál tartományban voltak az összes beteg esetében, vagy csak az adott antikoaguláns kezelésnek megfelelően tértek el. A thrombophilia irányú vizsgálatok két betegnél APC rezisztenciát és FV Leiden heterozigotázást mutattak ki, egyéb thrombofiliát nem igazoltunk.

4.2.2. Antithrombin szekvencia homológia vizsgálatának eredménye

A patogenitás indirekt bizonyítékának tekinthető, amint az jól tudott, hogy a betegséget okozó mutációk a fehérje erősen konzervált pozícióiban találhatóak.

Ezért elvégeztük a kilenc új mutáció szekvencia homológia azonosítását hét különböző fajban az UniProt fehérjeszekvencia adatbázis segítségével. A vizsgált aminosav pozíciókban, mind a hét faj esetében, azonos aminosavakat találtunk (kivéve a 270-es pozíciót, ahol három faj esetében leucin helyett prolin van, ezek azonban hasonlóak egymáshoz, nem poláros aminosavak hidrofób oldalláncokkal). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy minden mutáció esetében erősen konzervált pozícióról van szó. A Közönséges csimpánz (*Pan troglodytes*) esetében megfigyeltük az aminosavak egyezését nemcsak a vizsgált összes pozícióban, hanem az azokat körülvevő régiókban is. Megfigyeltük továbbá, hogy a 78-as és a 121-es pozíciók és környezetük is mind a hét faj esetében azonos. A szignál peptid szekvenciája heterogén a hét faj esetében, de elkülöníthetünk három konzervált részt: az N terminális részen egy hidrofób részt, egy hidrofób középső részt és a poláris C terminális régiót. A 32-es pozíció a konzervált poláris C terminális részen van, ahol a szignál peptid lehasító helye található.

4.2.3. A misszensz mutációk következményeinek *in silico* predikciója

A hét misszensz mutációt vizsgáltuk hat különböző webes felületen elérhető alkalmazás segítségével, amelyekkel megjósoltuk az egyes mutációk következményét. A PolyPhen2 eszköz a humán fehérjékben bekövetkező aminosav cserék következményeit jelzi előre. Több forrásból származó információt vesz tekintetbe, úgymint homológ szekvenciákat, szerkezeti sajátosságokat, és 3D struktúrákat. A MutPred2 gépi tanulási modellt használ, a PhD-SNP egy Support Vector Machine (SVM)-alapú csoportosító a misszensz mutációk számára, amely figyelembe veszi a mutációt, a szekvencia környezetét és a szekvencia profilját. A SIFT egy szekvencia homológia alapú módszer, a MutationTaster program a DNS szekvencia alapján jósolja meg a variánsok és a mutációk következményét. A következő mutációk esetében mind a hat módszer patogénnek vagy betegséget okozónak jósolta az eltérést: p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, és p.Pro461Thr. A p.Arg78Gly mutációval kapcsolatban, ami egy, a heparin kötő hely közelében lévő aminosavat érint, nem voltak egységesek az eredmények. Egyes alkalmazások patogénnek, mások benignusnak jósolták a következők szerint: a PolyPhen 2 program (mindkét érték) és a PhD-SNP jóindulatúnak értékelte, de az összes többi patogénnek. Két misszensz mutáció, a p.Arg14Lys és a p.Cys32Tyr, az AT szignál szekvenciáján helyezkedik el. A PolyPhen 2 és a SIFT programok ártalmasnak jósolták ezeket

a mutációkat, míg a MutPred2 és a MutationTaster nem patogénnek ítélte őket. A PhD-SNP az első mutációt jóindulatúnak a másodikat betegséget okozónak sorolta be. Végrehajtottunk egy in silico vizsgálatot a szignál peptid hasítására a SignalP 6.0. program segítségével az ezen a szekvencián elhelyezkedő mutációk esetében. A SignalP 6.0. program a szignál peptid hasító helyet a 32-es és a 33-as aminosav közé jósolta a vad típusú és a p.Arg14Lys mutáns esetében nagy megbízhatósággal (>0,999). A p.Cys32Tyr vonatkozásában a program a hasító helyet szintén a 32-es pozíció után helyezte, de a predikció megbízhatósága nagyon alacsony volt, csak kicsivel volt 0,5 felett (0,542).

4.2.4. A vad típusú és a kilenc mutáns AT kimutatása a transzfektált sejtek sejtizátumából és a felülúszóból Western blot technikával

A HEK-293 sejtek felülúszójából és sejtizátumából Western blot technikával a vad típusú AT 58 kDa-nál erős sávként detektálható. Pozitív kontrollnak 5 egészséges egyén poolozott plazmáját használtuk és erős sávként detektáltuk az AT fehérjét. Negatív kontrollként a mock transzfekció mintáját alkalmaztuk, és ahogy vártuk, nem kaptunk szignált. A tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából a következő mutációk esetében detektáltunk erős sávot 58 kDa-nál: p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, és p.Pro461Thr. Halvány sávot vagy még annyit se a következő esetekben detektáltunk: p.Cys32Tyr, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, és a p.Gly456delins_Ala_Thr. A tranziensen transzfektált sejtek sejtizátumában a következő esetekben tudtunk AT-t kimutatni: p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Gly456delins_Ala_Thr és a p.Pro461Thr. A p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile esetében az AT hiányzik vagy csak nagyon halvány sávként jelenik meg.

A Western blot analízis alapján a mutációkat három csoportba soroltuk. Az első csoport magában foglalta a p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile mutánsokat, melyeknél alacsony AT fehérje expressziót detektáltunk mind a felülúszóban mind a sejtizátumban, ami alacsony szintű fehérjeszintézisre vagy akár az mRNS hiányára is utalhat. A p.Asn450Ile mutáns esetében a Western blot egy csökkent (körülbelül 56 kDa) molekula tömegű AT fehérjét mutat. A második csoport (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, és a p.Gly456delins_Ala_Thr) magas AT fehérje expressziót mutat a sejtizátumban de alacsony AT fehérje expressziót a felülúszóban, ezzel szekréciós zavarra utalva. A harmadik csoport (p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr) azokat foglalja magába, ahol az AT fehérje erős sávként jelenik meg mind a sejtizátumban mind a felülúszóban. Ezek a mutánsok lehet, hogy funkcionális variánsok vagy az AT szerkezetére és funkciójára csak csekélyebb hatással

bírnak. Hat mutáció esetében (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, és a p.Pro461Thr) stabil transzfekciót is végeztünk annak érdekében, hogy nagyobb fehérje hozamot érjünk el a további vizsgálatokhoz. A stabil transzfekció minőségének ellenőrzésére Western blot technikát alkalmaztunk és detektáltuk a vad típusú és a hat mutáns AT fehérjét a sejtek felülúszójából. A vad típusú AT és a hat mutáns AT fehérje sávja a tranziens transzfekció eredményével megegyező módon jelent meg.

4.2.5. Valós idejű kvantitatív PCR analízis eredménye

RT-qPCR vizsgálatot végeztünk a tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek AT mRNS expressziójának meghatározására három független transzfekcióból. A transzfekció hatékonyságának ellenőrzésére a béta-galaktozidáz mRNS expresszióját mértük. Az RNS mennyiségének meghatározására a „comparative threshold cycle” (CT) módszert alkalmaztuk, a vizsgált gén CT értékeit az OAZ housekeeping génre normalizáltuk. A variánsok mRNS tartalmát a vad típus értékének arányában adtuk meg a következőképpen: p.Arg14Lys $1,09 \pm 0,03$ p.Cys32Tyr $1,03 \pm 0,04$ p.Arg78Gly $1,03 \pm 0,04$ p.Met121Arg $1,00 \pm 0,03$ p.Leu245Pro $1,01 \pm 0,01$ p.Leu270Argfs*13 $0,99 \pm 0,07$ p.Asn450Ile $0,94 \pm 0,04$ p.Gly456delins_Ala_Thr $0,96 \pm 0,05$ and p.Pro461Thr $0,98 \pm 0,03$. (Az értékek relative quantification (RQ) \pm SEM-ben vannak megadva az egyes transzkriptumokra az OAZ génre normalizálva. Az RT-qPCR alapján az AT mRNS expressziós szintje a kilenc mutáns esetén nem volt szignifikánsan különböző a vad típuséhoz képest. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a csökkent AT fehérje mennyiség háttérében, még akkor is ha az a sejt-lizátumban is csökkent, nem a mRNS csökkent mennyisége áll. Így a p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile mutációk esetében, melyeknél nagyon kevés AT fehérjét detektáltunk a sejt-lizátumokban, vagy egyáltalán nem detektáltunk a lizátumban AT-t, inkább a fehérje szintézis rendellenessége valószínű.

4.2.6. Antithrombin antigén szintek a HEK-293 sejtekben expresszáltatott vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék esetében

A vad típusú és a mutáns AT antigén szintek ELISA módszerrel voltak meghatározva duplikátumban a különböző transzfekciós kísérletekből. Az egyes AT antigén értékeket normalizáltuk a transzfekció hatékonyságára, mely utóbbit β -GAL méréssel számszerűsítettünk. Az AT antigén koncentráció a sejtek felülúszójában a következőképpen alakult (zárójelben a különböző transzfekciós kísérletek száma):

p.Met121Arg $210,00 \pm 92,11$ % (n=4); p.Pro461Thr $147,00 \pm 30,09$ % (n=4); p.Arg78Gly $141,75 \pm 29,77$ % (n=4); p.Arg14Lys $131,00 \pm 16,39$ % (n=4); p.Leu245Pro $100,75 \pm 45,55$ % (n=4); p.Gly456delins_Ala_Thr $43,66 \pm 17,42$ % (n=3); p.Leu270Argfs*14 $28,33 \pm 9,56$ % (n=3); p.Asn450Ile $27,00 \pm 8,50$ % (n=3); és p.Cys32Tyr $26,25 \pm 5,72$ % (n=4).

Az AT antigén koncentráció értékek a sejtlizátumokban a következők voltak (zárójelben a különböző transzfekciós kísérletek száma):

p.Met121Arg $1706,25 \pm 585,45$ % (n=4); p.Leu245Pro $1555,75 \pm 568,72$ % (n=4); p.Pro461Thr $262,50 \pm 67,22$ % (n=4); p.Arg14Lys $188,25 \pm 11,69$ % (n=4); p.Arg78Gly $134,25 \pm 13,14$ % (n=4); p.Gly456delins_Ala_Thr $64,66 \pm 18,67$ % (n=3); p.Cys32Tyr $31,33 \pm 0,88$ % (n=3); p.Asn450Ile $20,00 \pm 6,55$ % (n=3); és p.Leu270Argfs*14 $0,00 \pm 0,00$ % (n=3).

Láthatjuk, hogy az AT antigén koncentráció alacsony a p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile mutánsok esetében mind a sejtlizátumban, mind a felülúszóban, a Western blot analízissel kapott eredményeinkkel összhangban. A másik hat mutáns sejtlizátumában számottevő AT fehérje mennyiség volt kimutatható. Közülük az AT antigén szint nagyon magas volt a p.Met121Arg és a p.Leu245Pro mutánsok tekintetében. Az AT antigén koncentráció a felülúszókban a p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr csoportban a vad típushoz volt hasonló, a p.Gly456delins_Ala_Thr esetében alacsony volt. A p.Met121Arg és p.Leu245Pro vonatkozásában a felülúszó AT antigén koncentrációja a sejtlizátumban talált mennyiséghez viszonyítva aránytalanul volt alacsony.

4.2.7. A HEK-293 sejtekben expresszáltatott vad típusú és mutáns AT fehérjék AT aktivitása

Az alacsony AT antigén koncentrációjú mutánsok kivételével heparin kofaktor aktivitást (hc-antiFXa) és progresszív aktivitást (p-antiFXa) határoztunk meg a transzfektált sejtek felülúszójából legalább két független transzfekcióból spektrofotometriás mérési módszerrel. A mutánsok heparin kofaktor aktivitás (hc-antiFXa) és progresszív aktivitás (p-antiFXa) eredményeit a vad típus AT aktivitásának függvényében adtuk meg. E kísérletekben is a vad típus AT aktivitás értékeit vettük 100%-nak. A heparin kofaktor aktivitás (hc-antiFXa) értékek a következők voltak:

p.Leu245Pro $110,00 \pm 25,07$ %; p.Met121Arg $106,5 \pm 26,67$ %; p.Pro461Thr $93,75 \pm 44,67$ %; p.Arg14Lys $85,16 \pm 18,99$ %; és p.Arg78Gly $61,50 \pm 8,50$ %.

A progresszív aktivitás (p-antiFXa) értékek pedig a következőképpen alakultak:

p.Pro461Thr $160,27 \pm 67,06$ %; p.Met121Arg $133,46 \pm 46,10$ %; p.Leu245Pro $120,14 \pm 43,47$ % ; p.Arg14Lys $99,56 \pm 30,07$ %; és p.Arg78Gly $67,54 \pm 59,85$ %.

A p.Arg14Lys, p.Met121Arg, és p.Leu245Pro mutánsok esetében az AT aktivitás nem mutatott csökkenést a heparin kofaktor és a progresszív mérésekben, és a két mérés arányos eredményeket adott. A p.Arg78Gly mutánszt illetően az AT heparin kofaktor aktivitás csak a 60%-a volt a vad típusénak, és a progresszív AT aktivitás eredmények nagy szórást mutattak, csökkent és normál értékeket is mértünk a különböző kísérletekben. A p.Pro461Thr vonatkozásában nagy különbséget mutattunk ki a hc-antiFXa és a p-antiFXa között.

4.2.8. A p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr mutáns antithrombin fehérjék heparin-kötő képességének jellemzése

A funkcionális mérések eredményei alapján megváltozott heparin kötést feltételeztünk a p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr AT esetében. Ezért ezen két mutáció heparin kötő tulajdonságát, és kontrollként a vad típust, vizsgáltuk tisztított rekombináns fehérjék felhasználásával.

A kölcsönhatás kinetikus és affinitási paramétereit különböző AT koncentrációnál mért szenzorgramokból számoltuk és átlagoltuk az egyes antithrombinoknál. Ahogy vártuk, a legerősebb AT-heparin kötés a vad típus esetében volt megfigyelhető ($K_D = 8.49 \times 10^{-7}$ M). Az asszociációs állandó $k_a = 2.66 \times 10^6$ 1/Ms. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az AT-heparin komplex a leggyorsabban a vad típusú AT esetében alakult ki. A p.Arg78Gly AT mutánsnál a következő eredményeket kaptuk: $K_D = 1.69 \times 10^{-6}$ M és az asszociációs konstans $k_a = 1.15 \times 10^3$ 1/Ms. A p.Pro461Thr AT mutáns vonatkozásában a következő eredményeket kaptuk: $K_D = 1.61 \times 10^{-6}$ M és az asszociációs konstans $k_a = 1.38 \times 10^4$ 1/Ms.

Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az AT-heparin komplex kialakulása a mutáns fehérjék esetében a vad típusú AT-hoz képest lassabbnak látszik. Mindkét mutáns gyengébb kölcsönhatást mutatott a heparinnal, a K_a és a K_d értékeik hasonlóak voltak.

4.2.9. A mutáns AT fehérjék N-glikozidáz F emésztése

Az N-glikoziláció a fehérjék egyik döntő poszttranszlációs módosító folyamata. Az N-glikozidáz F az aszparagin kötött N-glikánokat hasítja le a glikoproteinekről. Az AT négy N-glikozilációs hellyel rendelkezik (Asn128, Asn167, Asn187 és Asn224), az ezeket a helyeket érintő misszensz variánsokról és még másokról is leírták a glikoziláció gátlását. Azokat a mutánsokat (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr) választottuk ki az N-glikozidáz F emésztésre, melyeknél kevés AT fehérjét mutattunk ki a felülúszóban,

ami utalhatott szekréción problémára, esetleg az N-glikoziláció megváltozása miatt. A sejtek felülúszójának PNGase kezelése megváltoztatta az elektroforetikus vándorlás mintázatát a vad típus és mind a négy AT fehérje variáns esetében. Ez azt bizonyítja számunkra, hogy ezek a mutáns fehérjék N-glikozilálva voltak az endoplazmatikus retikulumban. A vad típus és a négy variáns AT fehérje megegyező elektroforetikus vándorlási mintázatot mutatott. A nem emésztett AT 58 kDa molekulatömegnél volt detektálható egyetlen sávként, a PNGase emésztett AT 50 kDa molekulatömegnél volt detektálható.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Antithrombin Budapest3, Basel és Padua mutációk vizsgálatával kapott eredmények összefoglalása

A IIHBS ATD felismerése időben visszanyúlik a 80-as évekbe, amikor az irodalomban számos abnormális AT-heparin kölcsönhatásról szóló közlemény született. Az AT Basel mutációról Brennan és munkatársai leírták, hogy kapcsolatba hozható artériás thrombosisal, és heparin-Sepharose affinitás kromatográfiával egy rendellenes csúcsot mutat. Bebizonyították továbbá, hogy monoklonális antitest alapú heparin kötési affinitás vizsgálatban az AT Basel 40-szeres csökkenést mutat a heparin kötés affinitásában a normál AT-hoz képest. Az AT Padua mutáció egy másik tanulmány szerint 30-szoros csökkenést eredményez a heparin kötésben másféle módszereket felhasználva a vizsgálatban. Az ATBp3 variáns csökkent heparin affinitást mutatott heparin-Sepharose kromatográfiával és nem frakcionált heparin jelenlétében vagy pentaszacharid kötött AT esetében az antiproteináz aktivitása csökkent volt a normál AT-hoz hasonlítva. Martinez-Martinez és munkatársainak egy elegáns vizsgálat során kapott eredményei szerint az ATBp3 homozigóta betegek plazma mintáiban emelkedett volt az alacsony heparin affinitású AT frakció. A legfontosabb megállapítása a tanulmányuknak a β -AT kompenzáló hatásának bemutatása volt az ATBp3 és AT Basel IIHBS típusú mutációk esetében. Ők ugyan nem vizsgálták az AT Padua mutánst, de az azonos pozícióban kialakuló, egy arginin cisztein cserével járó mutáció esetében azt tapasztalták, hogy a rekombináns β -izoforma tudta kompenzálni ennek a mutációnak a heparin kölcsönhatásra gyakorolt markáns hatását. Az összes mutánsra egységes módszereket alkalmazó direkt összehasonlító vizsgálat az ATBp3, AT Basel, és AT Padua mutációk heparin kötő tulajdonságainak tanulmányozására azonban előttünk még nem született. Mivel AT Basel és AT Padua homozigóta betegek nem léteznek, csak rekombináns tisztított rendszerből volt nyerhető nagy mennyiségű homozigóta mutáns AT variáns, ami a biokémiai vizsgálatok alapjául tudott szolgálni. Összetett *in silico* tanulmányokat sem végeztek

korábban ezen IIHBS típusú mutánsok viselkedésének összehasonlítására. Hazánkban, viszonylag nagy AT deficiens beteg csoportunkban (n=449 beteg) a IIHBS típusú alcsoport a leggyakoribb. Bebizonyítottuk, hogy az ATBp3 mutáció gyakori előfordulása ebben az AT deficiens populációban alapító hatás eredménye. Számos klinikai tanulmány sugall különbségeket a klinikai és laboratóriumi fenotípusokban, főként az AT-heparin kötés erősségében a IIHBS AT deficienciát okozó különböző mutációk körében. A IIHBS típusú ATBp3, AT Padua, és AT Basel mutációk összefüggésbe hozhatók MVT-vel, ATE-vel és terhességi komplikációkkal is. Heterogenitás volt megfigyelhető a IIHBS AT deficiens betegek laboratóriumi eredményeiben is. A heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitás csökkent volt. A progresszív anti-FXa AT aktivitás alacsony normál volt vagy a normál tartományban esett. Az AT antigén szintek normál tartományban voltak az AT Basel és az AT Padua betegek esetében. Azonban az ATBp3 homozigóta és heterozigóta egyének esetében az AT antigén koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt összehasonlítva azokat az AT Basel és AT Padua esetekkel. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy az ATBp3 mutáció nemcsak a heparinhoz való affinitást befolyásolja, de enyhe kvantitatív defektust is eredményez. A nanoDSF kísérleteink eredményei alapján a plazmából tisztított homozigóta ATBp3 csökkent termostabilitást mutatott a WT AT-al összehasonlításban. (Mivel homozigóta AT Basel és AT Padua plazma nem volt elérhető, ezért ez a kísérlet ezen mutánsok esetében nem volt elvégezve.) Az ATBp3 instabilitását az *in silico* vizsgálataink is megerősítették, ahol a D hélix meghosszabbodását figyeltük meg a natív formában és megnövekedett RMSF-t találtunk a nem aktivált állapotában. Ezek a változások nem látszanak ugyan végzetesnek, de vezethetnek enyhe szekréción defektushoz, vagy az ATBp3 gyorsabb eliminációját okozhatják annak instabilitása miatt. Tudomásunk szerint pulse-chase kísérleteket nem végeztek eddig a feltételezések igazolására, azonban két tanulmányban az AT génben az ATBp3 pozícióhoz közel eső mutációk csökkent szekréciónhoz vezettek.

Ebben a tanulmányunkban az ATBp3, AT Basel és AT Padua mutánsok AT-heparin kötő tulajdonságaira fókuszáltunk és a heparin kötő affinitásuk különbségeinek hátterét szándékoztunk felderíteni. Poolozott normál humán plazmát és ATBp3 heterozigóta, ATBp3 homozigóta, AT Basel heterozigóta és AT Padua heterozigóta betegektől származó AT deficiens plazmát vizsgáltunk meg keresztezett immunoelektroforézis módszerével. Megállapítottuk, hogy a heparin affinitásban az ATBp3 heterozigóta és az AT Basel heterozigóta plazmák nem különböztek. Az AT Padua heterozigóta plazmát vizsgálva egy erősebb alacsony heparin affinitású frakciót figyeltünk meg, míg az ATBp3 homozigóta plazmában csak ez az alacsony heparin affinitású frakció jelent meg. Ezek a megfigyelések

azt sugallják, hogy az AT Padua a legsúlyosabban érintett AT mutáns a heparin affinitás szempontjából. Amennyiben különböző IIHBS ATD betegek progresszív és heparin kofaktor aktivitását összehasonlítottuk a különböző heterozigóta IIHBS mutációkat összehasonlítva a p-anti-FXa és a hc-anti-FXa AT aktivitás aránya az AT Padua esetében volt a legmagasabb. Az AT Basel és AT Padua homozigóta betegek hiánya miatt ezen mutációk biokémiai következményeinek direkt összehasonlítása plazma mintákban problémás. Ezért a további vizsgálatokhoz létrehoztunk rekombináns modelleket. A rekombináns WT AT és ATBp3, AT Basel, AT Padua fehérjéket HEK-293 sejtekben expresszáltuk. A stabilan expresszált fehérjéket összegyűjtöttük, koncentráltuk és affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Ezeket a tisztított fehérjéket SPR módszerrel vizsgáltuk. A vad típusú és a mutáns AT-ok heparin affinitását vizsgáltuk immobilizált heparin felszínen. Az SPR módszer számos előnnyel rendelkezik a molekuláris kölcsönhatásokat vizsgáló módszerek között. Jelölésmentes, valós idejű, közepes áteresztőképességű tesztet biztosít és csak kis mennyiségű anyagot és reagenst igényel. Optikai módszert használ az arany felszínhez közeli közeg törésmutató változásának a detektálására, amikor az analit molekulák a fém felszínhez kötött ligand molekulákhoz kötődnek. A mai napig csak nagyon kevés számú tanulmány jelent meg, amely az AT – heparin kölcsönhatást SPR technikával vizsgálja. Azonkívül nem volt olyan irodalom, amely a IIHBS mutánsok direkt összehasonlítását mutatja be. Zhao és munkatársai egy új módszert fejlesztettek ki a heparinok antikoaguláns aktivitásának egyszerű mérésére SPR módszerrel. A vizsgált heparin antikoaguláns aktivitásának meghatározására kompetitív módszert alkalmaznak, melyben az oldott fázisban lévő vizsgálandó heparin és a chip felszínén immobilizált heparin verseng az AT kötésért. Különböző állati forrásokból kinyert heparinokat és alacsony molekulásúlyú heparinokat analizáltak e módszerrel és az eredmények reprodukálhatónak bizonyultak, továbbá jól korreláltak a rutin hemosztázis laboratóriumban használt kromogén meghatározásból származó eredményekkel (korrelációs együttható $r = 0,98$ az anti-Xa és $r = 0,94$ az anti-IIa esetében). Ezt a jól kidolgozott kompetitív SPR módszert számos tanulmány alkalmazta a heparin – fehérje kölcsönhatás jellemzésére. Korábban SPR mérést alkalmaztak már a prothrombin, thrombin, AT, és fibrinogén heparin kötő tulajdonságának vizsgálatára is. Biotinált heparin, heparin-albumin konjugátum, és albumin volt kikötve a sztreptavidin-fedett szenzorra, mint ligandok. Az AT kötődési mintázata heparinhoz és heparin-albumin konjugáthoz, bár specifikus volt, de bifázisos, valószínűleg a kötési folyamat alatt lejátszódó konformációváltozás miatt. Az egyensúlyi állapot kinetikájának vizsgálata során K_D érték $281 \pm 24 \times 10^{-9}$ M volt a heparin felületre. A konjugát felületre a K_D értéke $53 \pm 5 \times 10^{-9}$ M-nak adódott, ami nagyobb affinitást

jelent a heparin-albumin konjugát irányába. Ezen értékeket összehasonlítva a mi eredményeinkkel, megállapíthatjuk, hogy ezek a K_D értékek a mi vad típusú rekombináns AT fehérjénk K_D értékéhez közel vannak ($K_D = 6,4 \times 10^{-10}$ M). Kísérleteinkben az AT Paduának volt a legkisebb heparin affinitása ($K_D = 1,08 \times 10^{-6}$ M) és az ATBp3 mutáns K_D értéke ($K_D = 2,15 \times 10^{-8}$ M) volt a legközelebb a vad típusú AT-hoz, azonban még így is két nagyságrend különbség van köztük. Az AT Basel heparin affinitása a kettő között volt ($K_D = 7,64 \times 10^{-7}$ M). A WT AT és a mutáns AT fehérjék biokémiai vizsgálataiban kapott különbségeket az *in silico* analízis eszközével szándékoztuk megmagyarázni. Az AT Basel variáns ligandum nélküli szimulációjában a 22-46 hurok új konformációját figyeltük meg, amely valószínűleg interferál a pentaszacharid kötéssel. A vizsgált variánsok közül az AT Basel mutáció érintette a legkevésbé a fluktuációkat és az allosztérikus útvonalakat a vad típussal összehasonlítva, ezért nem valószínű, hogy ennek a mutációnak erős destabilizáló hatása lenne a másodlagos és harmadlagos szerkezetre. Az ATBp3 variáns vonatkozásában növekedett fluktuációt figyeltünk meg a fehérjében a heparin kötő helyhez közel és még távolabbi régiókban is. A „generalizált korreláció” számításokból, azt a következtetést tudtuk levonni, hogy ez a variáns valószínűleg azokat az allosztérikus útvonalakat érinti, melyek az AT konformációs aktivációjában játszanak szerepet. A szimulációink alapján az AT Padua variánsnak van a legsúlyosabb következménye. Az RMSF módszerrel mért α -szén atomok fluktuációja szignifikánsan emelkedett volt a normál AT-hoz hasonlítva mind nem-aktivált és aktivált állapotban. A „generalizált korreláció” számítások alapján az allosztérikus útvonalak is érintettek. Úgy tűnik, hogy ennek a variánsnak a heparin kötési defektusán kívül még destabilizáló hatásai is vannak. Szignifikáns disszociációja a pentaszacharidnak egyik AT-pentaszacharid komplex szimulációban sem volt megfigyelhető. A szimulációs trajektóriákból csak minőségi következtetéseket tudunk levonni a WT és a mutáns AT pentaszacharid kötésével kapcsolatban, hiszen a részben, vagy teljesen disszociált konformációkból elégtelen mintavételezést tudunk csak kivitelezni, így szabad energiákat sem tudunk számítani. Ezen számítások elvégzéséhez más, „javított” mintavételezési technika szükséges, például a nemrég publikált LiGaMD módszer.

Több okból is nehéz lefordítani a tisztított rendszer biokémiai vizsgálatainak eredményét és az *in silico* analízis megfigyeléseit direkt módon a klinikai következményekre. Először azért mert az *in vitro* tanulmányok rekombináns tisztított homozigóta AT variánsokat használtak, míg a betegek a különböző mutációval (kivéve az ATBp3 homozigótákat) heterozigóták voltak, így a klinikai fenotípusukat egyértelműen befolyásolta a normál alléljukról expresszáldó AT. Az α -AT és β -AT arányok is változóak betegről betegre befolyásolva ezzel

a heparin kötő affinitást. Másodsor, mivel a thrombosis egy általános komplex betegség az AT deficienciából adódó kockázat módosulhat más genetikai vagy környezeti faktorok miatt, ami szintén eltérő a betegek között. Ráadásul lehetnek védő faktorok is (nem teljesen tisztázott még most, melyek ezek), amik módosítják a klinikai kép súlyosságát AT deficienciában gén – gén vagy gén-környezet kölcsönhatásokon keresztül.

5.2. A kilenc új antithrombin mutáció biokémiai következményeinek összefoglalása

Kilenc új AT mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) klinikai és molekuláris karakterizálását végeztük el. Indirekt és direkt bizonyítékokat gyűjtöttünk, hogy meghatározzuk patogenitásuk mértékét, és hogy ATD alcsoportokba csoportosítsuk őket. A misszensz variánsok közül a p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, és a p.Pro461Thr mutációkat mind a hat (PolyPhen2 HumDiv, PolyPhen2 HumVar, MutPred2, PhD-SNP, SIFT és MutationTaster) in silico módszerrel vizsgálva patogénnek találtuk, és az AT szekvencia homológia vizsgálata is alátámasztotta az ártalmas hatásukat. Két misszensz mutáció, a p.Arg14Lys és a p.Cys32Tyr, az AT szekvencia szignál peptid részén van. Két in silico módszer patogénnek jósolta ezeket a mutációkat, míg két másik módszer semlegesnek. A szekvencia homológia vizsgálat is összhangban volt ezzel, mivel az AT szignál peptid szekvencia heterogén volt a vizsgált hét fajban. A p.Arg78Gly mutáns in silico predikciója eléggé ellentmondásos volt (három módszer sorolta nem patogén mutációnak), azonban a homológia vizsgálat erősen konzervált pozíciót jelzett a mutációra. A p.Arg14Lys mutációt hordozó beteg plazma mintájában csökkent heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitás és csökkent progresszív anti-FXa AT aktivitás volt mérhető. Az AT antigén koncentráció is csökkent volt, ami inkább kvantitatív ATD-re utal. Azonban a rekombináns p.Arg14Lys AT mennyisége nem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a WT AT fehérje (a Western blot, az AT antigén és aktivitás eredmények alapján). Ezek és a variáns pozíciója (a szignál peptid N-terminális régiójának pozitívan töltött bázikus részét érinti, amely nagyon semleges rész) nem erősítik meg kétségtelenül a mutáció patogén voltát, és azt sugallják, hogy az index beteg MVT-jének és alacsony AT szintjének hátterében egyéb okozati tényező is állhatott. Corral és munkatársai azt javasolják, hogy abban az esetben, ha a *SERPINC1* génben nem találunk okozati mutációt, akkor a következő gének befolyásolhatják a plazma AT szintjét: az AT gén transzkripció kontrolljában vagy poszttranszlációs módosításában részt vevő gének mutációi, vagy az AT eltávolításában részt vevő fehérjék génjei. Az is elképzelhető, hogy a p.Arg14Lys mutációhoz kapcsolódik egy másik mutáció a *SERPINC1* gén távoli promoter vagy introni

régiójában, amit nem detektáltunk a Sanger szekvenálással, és együtt okozzák az alacsony AT szintet. Sajnos nem tudtuk kiterjesztett családvizsgálatot végrehajtani a variáns és az okozott betegség kapcsolatának további elemzésére. A p.Cys32Tyr mutáció a betegben alacsony heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitást és alacsony progresszív anti-FXa AT aktivitást okozott és az AT antigén szintje is arányosan csökkent volt. A rekombináns p.Cys32Tyr fehérje Western blot analízise nagyon alacsony AT expressziót mutatott ki mind a felülúszóban és a sejtlizátumban, melyet az AT antigén mérés is megerősített. Normál mRNS szintet mutattunk ki RT-qPCR módszerrel, mely translációs vagy poszttranszlációs defektet valószínűsít. A p.Cys32Tyr mutáció a szignál peptid konzervált poláris C-terminális régiójában van, mely a hasító helyet tartalmazza. Az in silico analízis felvetette egy abnormális hasító hely létrejöttét a 32-es pozíció után. A szignál peptid fontos szerepet játszik a riboszómák általi transláció folyamatában, a keletkező fehérje a szignál peptiden keresztül köt a szignál felismerő részecskéhez, amely a komplexet az endoplazmatikus retikulumba irányítja. Ezért bizonyos pozíciók a szignál peptidben kiemelkedően fontosak a szignál peptid funkció szempontjából. Jochmans és munkatársai leírtak egy variánst I-es típusú ATD betegben, ahol a cisztein argininre változott ebben a pozícióban, és patogénnek találták. Az in silico és biokémiai vizsgálataink alapján a p.Cys32Tyr mutációt káros variánsnak tudtuk minősíteni, amely I-es típusú ATD-hez vezet. A p.Arg78Gly mutáció az AT heparin kötő helyét érinti. A beteg heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitása alacsony volt, míg a progresszív anti-FXa AT aktivitása és az AT antigén szintje normál tartományba esett, ami II-es típusú HBS ATD-át véleményez. A rekombináns p.Arg78Gly mutáns Western blot analízise és az AT antigén mérés nem mutatott eltérést, azonban a heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitás aránytalanul alacsony volt. Az SPR mérések megerősítették a megváltozott heparin – AT kölcsönhatást. Bravo-Pérez és munkatársai leírtak egy variánst azonos pozícióban, a p.Arg78Gln mutációt, amely az alacsony heparin affinitású AT forma mennyiségének a megnövekedéséhez vezetett a plazmában. Ők ezt a variánst II-es típusú HBS deficienciának sorolták be, ami egyező a mi eredményeinkkel. A p.Met121Arg mutáció hatására a betegben a heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A rekombináns p.Met121Arg AT fehérje Western blot vizsgálata szekréción zavarra utalt, mivel a sejtlizátumban magas AT fehérje expressziót de a felülúszóban alacsonyat detektáltunk. Ezzel megegyezően az AT antigén szint nagyon magas volt a sejtlizátumban és alacsony volt a médiumban a sejtlizátum AT szintjéhez hasonlítva. Megvizsgáltuk az N-kapcsolt glikozilációt N-glikozidáz F emésztéssel, ami megegyező volt a vad típussal normál glikozilációt jelezve

az ER-ban. Egy feltételezett magyarázat a sejt-lizátumok nagyon magas AT antigén szintjére az unfolded protein response (UPR) jelensége. Az abnormális fehérjék felhalmozódnak az ER-ban és az ER stressz csökkentésére aktiválódik ez a mechanizmus. Amikor az UPR kapacitása a fehérje-egyensúly fenntartására kimerül, a sejtek belépnek az általános apoptózis útvonalra. Az irodalomban két másik mutációt is találtunk ebben a pozícióban, p.Met121Ile, és a p.Met121Lys, azonban ezekben az esetekben expressziós tanulmányok nem születtek. A kísérletes eredményeink alátámasztják a p.Met121Arg mutáció patogén természetét. A p.Leu245Pro mutáció hordozója egy férfi beteg, aki proximális MVT-t szenvedett el. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyok voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A rekombináns p.Leu245Pro fehérje Western blot analízise szekréciós zavarra engedett következtetni, mivel magas AT fehérje expressziót detektáltunk a sejt-lizátumokban de alacsonyat a médiumban. Ezzel megegyezően az AT antigén szint nagyon magas volt a sejt-lizátumban és alacsony volt a médiumban a sejt-lizátum AT szintjéhez hasonlítva. Megvizsgáltuk az N-kapcsolt glikozilációt N-glikozidáz F emésztéssel, ami megegyező volt a vad típusú normál glikozilációt jelezve az ER-ban. Az irodalomban megtaláltuk az AT Murcia (p.Lys241Glu) mutációt, mint egy szomszédos variánst. Bizonyos misszensz mutációk I-es típusú ATD-t tudnak okozni a protein foldingot érintő hatásukkal, azáltal, hogy a rosszul feltekeredett fehérjék lebomlanak a lizoszómákban vagy felgyülemlekednek az ER belsejében. Ezen mutáció esetében, a p.Met121Arg mutációhoz való hasonlósága miatt, feltételezzük az UPR mechanizmust, amely a ATD I-es típusú fenotípus oka. A p.Leu270Argfs*14 mutációt egy férfi betegnél diagnosztizáltuk, aki ötször szenvedett el MVT-t. Klinikai nézőpontból tekintve ez az eset mutatta a legsúlyosabb thromboticus fenotípust. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyok voltak, így I-es típusú ATD-re utaltak. A rekombináns p.Leu270Argfs*14 fehérje Western blot vizsgálata és az AT antigen mérés alacsony AT szinteket tárt fel mind a felülcsúzó és a sejt-lizátum mintákban. Az RT-qPCR mérés normál RNS szintet mutatott, amely translációs problémára hívta fel a figyelmet. A 270-es pozíció után egy stop szekvencia jön létre, ami a transláció korai terminálását okozza. A p.Asn450Ile mutáció hordozója egy család. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitásuk és az AT antigén eredményeik arányosan alacsonyok voltak, I-es típusú ATD-t jeleztek. A rekombináns p.Asn450Ile fehérje Western blot analízise alacsony AT expressziót mutatott ki mind a médiumban mind a sejt-lizátumban. Kimutattunk egy abnormális AT fehérjét gyorsabb elektroforetikus mobilitással az SDS-PAGE gélen, ami sérült poszttranszlációs módosítást sugall. Ezért megvizsgáltuk az N-kapcsolt glikozilációt N-

glikozidáz F emésztéssel, ami megegyező volt a vad típussal, normál glikozilációt jelezve az ER-ban. Azonban más poszttranszlációs mechanizmusok defektusai is felelősek lehetnek a kifejlődött I-es típusú ATD-ért. A p.Gly456delins_Ala-Thr mutáció (egy aminosavval hosszabb fehérje képződik) a betegben arányosan alacsony heparin-kofaktor-anti-FXa, progresszív anti-FXa AT aktivitás és AT antigén értékekben nyilvánult meg, az I-es típusú ATD-nek megfelelően. A rekombináns p.Gly456delins_Ala-Thr fehérje Western blot vizsgálata magas AT expressziót mutatott a sejtlyátumban de alacsonyat a felülúszóban. Ezek az eredmények szekréción zavarra utalnak, de nem a sérült N-kapcsolt glikoziláció miatt. Jochmans és munkatársai leírtak egy glicin arginin cserével járó szekvencia változást a 456-os pozícióban (p.Gly456Arg), amit patogénnek találtak. A p.Pro461Thr mutációt három nem rokon betegnél is kimutattunk. A heparin-kofaktor-anti-FXa és a progresszív anti-FXa AT aktivitás értékek aránytalanul alacsonyak voltak az AT antigén értékekhez képest, ezzel inkább funkcionális ATD-re utalva. A rekombináns p.Pro461Thr fehérje Western blot analízise és az AT antigén meghatározás magas AT fehérje szinteket mutatott a médiumban és a sejtlyátumban is. A heparin kofaktor aktivitás csökkent volt a progresszív aktivitáshoz képest. Az SPR mérések alátámasztották a módosult heparin – AT kölcsönhatást, ami IIPE variánsra utal. Az eredményeinket megerősíti az irodalomban talált p.Pro461Leu mutáció, amit IIPE típusúnak csoportosítottak a szerzők, és a p.Pro461Ser mutáció, amit szintén IIPE típusba soroltak. Új mutációk esetében azok patogenitásának igazolása vagy megcáfolása nagyon fontos a beteg további gondozása szempontjából. Továbbá a mutációk és következményeik összegyűjtése adatbázisokba, segíti a további betegek diagnosztikáját is. Mivel az ATD laboratóriumi kivizsgálásának vannak limitáló tényezői, és a beteg plazma mintájában mért AT aktivitás gyakran nem felel meg a klinikai fenotípusnak, fontos felmérni az új mutációk hatását az AT szerkezetére és funkciójára *in vitro* kísérletekkel. Tanulmányunkban súlyos I-es típusú ATD-t igazoltunk a következő mutációkban: p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és p.Asn450Ile (megváltozott szintézis) és a p.Met121Arg, p.Leu245Pro és a p.Gly456delins_Ala_Thr (megváltozott szekréción). Ezek a betegek legalább egy thrombosit elszenvedtek, sőt a legtöbb esetben több thrombosit is regisztráltunk. A IIHBS ATD típusú (p.Arg78Gly) esetében, ami kevésbé súlyosnak tűnt, a beteg nem szenvedett el thrombosit és az ATD diagnózisa egy alapos laboratóriumi kivizsgálás részeként lett megállapítva *in vitro* fertilizáció előtti vizsgálatok részeként. E beteg a diagnózist követően LMWH kezelést kapott a terhessége alatt, de hosszútávú antikoagulációt nem vezettek be nála szülés után, jelenleg is tünetmentes. A p.Pro461Thr mutációnak pleiotrop hatása van az AT-ra, klinikai súlyossága számottevő, az összes ezt a mutációt

hordozó beteg szenvedett el thrombosiszt. Azonban vagy provokáló tényezőt fedeztünk fel a háttérben vagy a beteg idősebb volt a thrombosis idején. Végül a p.Arg14Lys patogenitásának szerepe kérdéses a vizsgálataink alapján. Az egyik ezt a variánst hordozó beteg tünetmentes, a másik egy thrombosiszt szenvedett el. Nem tudjuk kizárni egy fő (nem regisztrált) provokáló faktor jelenlétét a thrombosisának háttérében vagy hogy az alacsony AT szintet egy másik, a családjában eddig még nem azonosított genetikai defektus okozza. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy különböző *SERPINC1* mutációk patogenitásának természetét tártuk fel *in vitro* expressziós vizsgálatokkal és *in silico* analízissel, melyek különféle mechanizmusokat vetnek fel a patogenitás okaként.

6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Munkánk során három már ismert AT mutáció (ATBp3, AT Basel, AT Padua) karakterizálását és kilenc új AT mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) részletes biokémiai és *in silico* elemzését, patogenitásuk igazolását végeztük el. Az eredményeink alapján a IIHBS típusú mutációk módosult AT-heparin kölcsönhatásának háttérében különböző molekuláris mechanizmusok állhatnak. A p-anti-FXa és a hc-anti-FXa AT aktivitás aránya az AT Bp3 homozigótáknál a legmagasabb, ami azt bizonyítja, hogy ennek a genotípusnak van legnagyobb hatása az AT-heparin kölcsönhatásra. A heterozigóták összehasonlításakor azonban az AT Padua esetében észleljük a legmagasabb p-anti-FXa és a hc-anti-FXa AT aktivitás arányát, ami összhangban van azzal, hogy e mutációnak van a legerősebb hatása az antithrombinon. Ez esetben figyeltük meg a leglassabb AT-heparin komplex kialakulást és a leggyengébb kölcsönhatást a heparinnal. A keresztezett immunoelektroforézis vizsgálatban az AT Padua mutatott a normál frakcióhoz képest nagyobb alacsony-affinitású frakciót. A molekula modellező tanulmányok megerősítik ezeket az eredményeket, mivel az AT Padua konformációs változásokat mutatott az AT N-terminális 30 – 35 régiójában és nagyon megnövekedett fluktuációkat az RMSF analízisben, sugallván, hogy a mutáció érinti mind a konformációt és az allosztériát távoli részein az AT Padua molekulának. Az AT Basel sokkal lassabban köt a heparinhoz, mint más mutánsok feltehetően a 22 – 46 hurokban bekövetkezett konformációs változás miatt. Amint az AT-heparin komplex kialakult, az allosztérikus aktivitása e mutánsnak, valamint az AT Basel – heparin komplex stabilitása valószínűleg csak kis mértékben érintett. Az ATBp3 mutatta a leggyorsabb és legerősebb AT-heparin komplex kialakulást az SPR vizsgálatokban. Azonban az allosztérikus aktiválása az ATBp3-nak érintett, azonfelül a molekula több régiójának a

megnövekedett fluktuációja felveti ennek a variánsnak a destabilizáló hatását. Ezek együttlvéve a humán plazmából izolált homozigóta ATBp3 csökkent termostabilitásával, felvetik ennek a mutációnak a pathogenitásban egy mennyiségi komponens jelenlétét is.

A kilenc új mutáns (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) esetében in vitro expressziós kísérletekkel és in silico analízissel bizonyítottunk különböző mechanizmusokat a pathogenitás háttérében. Három mutáns esetében (p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile) a protein szintézis zavara, másik három esetben (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Gly456delins_Ala_Thr) szekréciós zavar okoz I-es típusú ATD-t. A p.Arg78Gly mutáció IIHBS, míg a p.Pro461Thr IIPE típusba sorolható, a szignálpeptidet érintő p.Arg14Lys mutáció patogén szerepe nem igazolódott.

7. PUBLIKÁCIÓK



**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/147/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kállai Judit
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kállai, J.**, Gindele, R., Péntzes-Daku, K., Balogh, G., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Katona, É., Oláh, Z., Ilonczai, P., Boda, Z., Róna-Tas, Á., Nemes, L., Marton, I., Bereczky, Z.: Clinical and Molecular Characterization of Nine Novel Antithrombin Mutations.
Int. J. Mol. Sci. 25 (5), 1-19, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25052893>
IF: 5.6 (2022)
2. Gindele, R., Péntzes-Daku, K., Balogh, G., **Kállai, J.**, Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, F., Katona, É., Bereczky, Z.: Investigation of the Differences in Antithrombin to Heparin Binding among Antithrombin Budapest 3, Basel, and Padua Mutations by Biochemical and In Silico Methods.
Biomolecules. 11 (4), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11040544>
IF: 6.064

További közlemények

3. Szántó, G. T., Fehér, Á., Korpos, É., Gyöngyösi, A., **Kállai, J.**, Mészáros, B., Óvári, K., Lányi, Á., Panyi, G., Varga, Z.: 5-Chloro-2-Guanidinobenzimidazole (CIGBI) Is a Non-Selective Inhibitor of the Human HV1 Channel.
Pharmaceuticals (Basel). 16 (5), 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16050656>
IF: 4.6 (2022)
4. Szegedi, K., Szabó, Z., **Kállai, J.**, Király, J., Szabó, E., Bereczky, Z., Juhász, É., Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors.
J Clin Med. 12 (13), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12134538>
IF: 3.9 (2022)





5. Cozzolino, M., Gyöngyösi, A., Korpos, É., Gogolák, P., Naseem, M. U., **Kállai, J.**, Lányi, Á., Panyi, G.: The Voltage-Gated Hv1 H⁺ Channel Is Expressed in Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells.
Int. J. Mol. Sci. 24 (7), 1-24, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076216>
IF: 5.6 (2022)
6. Erdős, M., Mironska, K., Kareva, L., Stavrik, K., Hasani, A., Lányi, Á., **Kállai, J.**, Maródi, L.: A novel mutation in identified in a patient with autosomal recessive agammaglobulinemia: the impact of the J-Project.
Pediatr. Allergy Immunol. 33 (6), 1-7, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/pai.13805>
IF: 4.4
7. Baráth, B., Kissné Bogáti, R., Miklós, T., **Kállai, J.**, Mezei, Z. A., Bereczky, Z., Muszbek, L., Katona, É.: Effect of [alfa]2-plasmin inhibitor heterogeneity on the risk of venous thromboembolism.
Thromb. Res. 203, 110-116, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2021.05.003>
IF: 10.407
8. Erdős, M., Tsumura, M., **Kállai, J.**, Lányi, Á., Nyúl, Z., Balázs, G., Okada, S., Maródi, L.: Novel STAT-3 gain-of-function variant with hypogammaglobulinemia and recurrent infection phenotype.
Clin. Exp. Immunol. 205 (3), 354-362, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cei.13625>
IF: 5.732
9. Gindele, R., Kerényi, A., **Kállai, J.**, Pfliegler, G., Schlamadinger, Á., Szegedi, I., Major, T., Szabó, Z., Bagoly, Z., Kiss, C., Kappelmayer, J., Bereczky, Z.: Resolving Differential Diagnostic Problems in von Willebrand Disease, in Fibrinogen Disorders, in Prekallikrein Deficiency and in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia by Next-Generation Sequencing.
Life (Basel). 11 (3), 1-23, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life11030202>
IF: 3.251
10. Balogh, L., Katona, É., Mezei, Z. A., **Kállai, J.**, Gindele, R., Édes, I., Muszbek, L., **Papp, Z.**, Bereczky, Z.: Effect of factor XIII levels and polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young patients.
Mol. Cell. Biochem. 448 (1-2), 199-209, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-018-3326-8>
IF: 2.884





11. Mezei, Z. A., Katona, É., **Kállai, J.**, Bereczky, Z., Somodi, L., Molnár, É., Kovács, B., Miklós, T., Ajzner, É., Muszbek, L.: Factor XIII levels and factor XIII B subunit polymorphisms in patients with venous thromboembolism.
Thromb. Res. 158, 93-97, 2017.
IF: 2.779
12. 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.
13. Mezei, Z. A., Katona, É., **Kállai, J.**, Bereczky, Z., Molnár, É., Kovács, B., Ajzner, É., Bagoly, Z., Miklós, T., Muszbek, L.: Regulation of plasma factor XIII levels in healthy individuals; a major impact by subunit B intron K c.1952+144 C>G polymorphism.
Thromb. Res. 148, 101-106, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2016.10.025>
IF: 2.65

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 57,867

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
11,664**

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, 2024.04.18.



8. KULCSSZAVAK

Antithrombin, antithrombin deficiencia, mutáció analízis, trombózis, genotípus-fenotípus összefüggések, expressziós vizsgálat, in silico módszerek, molekula modellezés, heparin-kötő hely, SPR mérés

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először témavezetőmnek, Dr. Bereczky Zsuzsannának szeretnék köszönetet mondani támogatásáért, szakmai segítségéért, amivel a tudományos publikációk és az értekezés elkészültét támogatta. Hálával tartozom előző témavezetőmnek, Dr. Hársfalvi Jolánnak, aki a tudományos pályán elindított. Köszönettel tartozom jelenlegi munkatársaimnak is, Dr. Lányi Árpádnak, Dr. Gyöngyösi Adriennek és Dr. Korpos Évának, folyamatos biztatásukkal hozzájárultak az értekezés elkészültéhez.

Köszönetet szeretnék mondani a DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék összes jelenlegi és volt munkatársának, a kísérletes munkában nyújtott segítségért Sándor Ágnesnek, Tóthné Fedoriska Viktóriának, Haramura Gizellának, Szabó Zsuzsannának és Molnár Évának. Köszönöm közleményeim társszerzőinek alapos munkájukat és segítő javaslataikat. Különösen köszönöm Gindele Rékának, Bogáti Rékának és Pénzes-Daku Krisztinának szakmai és baráti támogatásukat a PhD képzés közös éve alatt és jelenleg is.

Köszönetet mondok családomnak tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért, különösen Férjemnek és három gyermekemnek, akik végig mellettem voltak.

„Orando et Laborando – Imádkozva és dolgozva”