

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Kovács Kitti Bernadett

**RITKA ÖRÖKLÖTT HEMOSZTÁZIS RENDELLENESSÉGEK MOLEKULÁRIS
GENETIKAI ÉS FEHÉRJE BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA**

**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2015.**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**RITKA ÖRÖKLÖTT HEMOSZTÁZIS RENDELLENESSÉGEK MOLEKULÁRIS
GENETIKAI ÉS FEHÉRJE BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA**

Írta: Dr. Kovács Kitti Bernadett

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2015.**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke (a szövegben való megjelenés sorrendjében)	6
1. Bevezetés	9
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. A dolgozatban szereplő alvadási faktorok és deficienciáik bemutatása	11
2.1.1. A véralvadás V-ös faktorának tulajdonságai, jellemzői.....	11
2.1.2. Az V-ös faktor deficiencia	13
2.1.3. A véralvadás XIII-as faktorának tulajdonságai, jellemzői.....	13
2.1.4. A XIII-as faktor deficiencia	15
2.2. A protein C-protein S rendszer szerepe a véralvadás szabályozásában	17
2.2.1. A protein C fehérje és kódoló génjének struktúrája	18
2.2.2. Protein C deficiencia: epidemiológiai vonatkozások és klinikai tünetek	19
2.2.3. A Protein C deficiencia molekuláris genetikai háttere, genotípus-fenotípus összefüggések.....	20
2.2.4. A Protein C deficiencia laboratóriumi diagnosztikája.....	24
Célkitűzések.....	26
3. Metodikák.....	27
3.1. V-ös faktor deficiencia	27
3.1.1. Betegek.....	27
3.1.2. Anyagok és módszerek.....	27
3.1.2.1. Hemosztázis laboratóriumi vizsgálatok	27
3.1.2.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok.....	29
3.1.2.3. Molekulamodell.....	30
3.2. XIII-as faktor deficiencia	31
3.2.1. Betegek.....	31
3.2.2. Anyagok és módszerek.....	32

3.2.2.1. Hemosztázis laboratóriumi vizsgálatok	32
3.2.2.2. F13A1 gén mutáció analízis.....	33
3.2.2.3. FXIII-A mRNS analízis	34
3.3. Protein C deficiencia.....	35
3.3.1. Betegek.....	35
3.3.2. Anyagok és módszerek.....	35
3.3.2.1. Rutin laboratóriumi módszerek	35
3.3.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR) és a PROC gén szekvenálása	36
3.3.2.3. A vad típusú, p.Asp77Gly, p.Ala163Glu, és p.Ala163Val mutáns PC fehérjék tranzien expressziója HEK293 sejtekben	37
3.3.2.4. Western Blotting	38
3.3.2.5. A poliubikvitinált protein C detektálása	38
3.3.2.6. Immunfestés, konfokális lézer szkennig mikroszkópia és kolokalizáció analízis	39
3.3.2.7. Molekulamodellzés	40
4. Eredmények	42
4.1. FV deficiencia	42
4.1.1. Laboratóriumi eredmények.....	42
4.1.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei.....	42
4.1.3. A mutáció lehetséges következményének vizsgálata molekulamodellzéssel...	43
4.2. XIII-as faktor deficiencia	44
4.2.1. Proband1.....	44
4.2.1.1. Laboratóriumi eredmények.....	44
4.2.1.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok.....	46
4.2.2. Proband2.....	48
4.2.2.1. Laboratóriumi eredmények.....	48
4.2.2.2 Molekuláris genetikai vizsgálatok.....	49
4.3. Protein C deficiencia.....	49

4.3.1. <i>A protein C deficiens betegek laboratóriumi fenotípusa és genotípusa</i>	49
4.3.2. <i>A HEK 293 sejtekben expresszált vad típusú és mutáns protein C detektálása, koncentrációjának és aktivitásának meghatározása</i>	50
4.3.3. <i>A vad típusú és mutáns protein C intracelluláris lokalizációja</i>	52
4.3.4. <i>A vad típusú és mutáns protein C poliubikvitináltságának vizsgálata</i>	57
4.3.5. <i>A p.Asp77Gly, p.Ala163Val és p.Ala163Glu mutációk szerkezeti következményei</i>	57
5. Megbeszélés	61
5.1. V-ös faktor deficiencia	61
5.2. XIII-as faktor deficiencia	63
5.3. Protein C deficiencia	65
V-ös faktor deficiencia	71
XIII-as faktor deficiencia	71
Protein C deficiencia	72
6. Összefoglalás	73
6. Summary	74
7. Irodalomjegyzék és publikációs lista	75
7.1. Irodalomjegyzék	75
7.2 Publikációs lista	89
8. Tárgyszavak	91
9. Köszönetnyilvánítás	91
10. Függelék	91

Rövidítések jegyzéke (a szövegben való megjelenés sorrendjében)

ISTH	-	Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság
RBD	-	„Ritka Vérzékenységek” adatbázis
PI	-	protrombin idő
APTI	-	aktivált parciális tromboplastin idő
TI	-	trombin idő
FXIII	-	a véralvadás XIII-as faktora
VTE	-	vénás thromboembolia
MVT	-	mélyvénás thrombosis
TE	-	tüdőembólia
AT	-	antitrombin
PC	-	protein C
PS	-	protein S
FV	-	a véralvadás V-ös faktora
FII	-	protrombin
FVIII	-	a véralvadás VIII-as faktora
FXa	-	a véralvadás aktivált X-es faktora
FVa	-	a véralvadás aktivált V-ös faktora
APC	-	aktivált protein C
FVIII	-	a véralvadás aktivált VIII-as faktora
F5	-	a véralvadás V-ös faktorát kódoló gén (humán)
bp	-	bázispár
UTR	-	nem transzlálódó régió
HGVS	-	Human Genom Variation Society
OMIM	-	Online Mendelian Inheritance in Man
FXIII	-	a véralvadás XIII-as faktora
pFXIII	-	a plazmában található XIII-as faktor
FXIII-A	-	a XIII-as faktor A (katalitikus) alegysége
FXIII-B	-	a XIII-as faktor B (gátló/hordozó) alegysége
cFXIII	-	a sejtekben található (celluláris) XIII-as faktor
F13A1	-	a véralvadás XIII-as faktorának A alegységét kódoló gén (humán)

F13B	-	a véralvadás XIII-as faktorának B alegységét kódoló gén (humán)
FXIII _A ₂ B ₂	-	a véralvadás XIII-as faktorának az A és B alegységekből álló heterotetramerje
FXIIIa	-	a véralvadás aktivált XIII-as faktora
TM	-	trombomodulin
EPCR	-	endotheliális protein C receptor
FVIIIa	-	a véralvadás aktivált VIII-as faktora
C4bBP	-	komplement 4b kötő fehérje
TFPI	-	szöveti faktor útvonal inhibitor
Gla-domén	-	gamma-karboxi-glutamát domén
EGF	-	epidermális növekedési faktor
SP	-	szerin proteáz
PROC	-	a protein C-t kódoló gén (humán)
mRNS	-	messenger RNS
Alu repeat	-	az <i>Arthrobacter luteus</i> nevű restrikciós endonukleáz hasítási helyéhez köthető ismétlődő DNS szekvencia
HNF-1	-	hepatocita nukleáris faktor-1
HNF-3	-	hepatocita nukleáris faktor-3
Sp1	-	promoter-specifikus transzkripció faktor
LEVT	-	alsó végtagi vénás thrombosis
EPCOT	-	European Prospective Cohort on Thrombophilia
HGMD	-	Human Genom Mutation Database
GAIT	-	Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia
RVMI	-	Russel vipera mérge idő
MLPA	-	multiplex ligáció függő próba amplifikáció
vWF	-	von Willebrand faktor
PBS	-	foszfát-puffer sóoldat
BSA	-	marha szérumalbumin
HBS	-	HEPES-BSA-Tween-20 mintahígító puffer
PRP	-	thrombocytá dús plazma
PGE1	-	prostaglandin E1
F primer	-	forward primer
R primer	-	reverz primer
PCR	-	polimeráz láncreakció

dNTP	-	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
PME	-	Particle Mesh Ewald módszer
GroMaCS	-	Groningen Machine for Chemical Simulations
VMD	-	Visual Molecular Dynamics
HEK	-	humán embrionális vese sejtvonala
FCS	-	fötális borjú széruma
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
CLSM	-	konfokális lézer szkennelési mikroszkóp
SDS-PAGE	-	nátrium dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézis
PVDF	-	polivinilidén difluorid
DAB	-	3,3'-diaminobenzidin
TMB	-	tetrametilbenzidin
ER	-	endoplazmatikus retikulum
CG	-	cisz-Golgi
TG	-	transz-Golgi
VSD	-	változtatható szekunder dikroikus sugárnyaláboztó (variable secondary dichroic beamsplitter)
PPA	-	Protein Proximity Analyser szoftver
PPI	-	protein proximity index
M1	-	Manders féle kolokalizációs koefficiens 1
M2	-	Manders féle kolokalizációs koefficiens 2
IXa	-	a véralvadás aktivált IX-es faktora
des-Gla APC	-	aktivált protein C, melyben nincs gamma-karboxi-glutamát domén
FVII	-	a véralvadás FVII-es faktora
c.	-	a kódoló nukleotid sorszáma a mutáció megnevezésekor
p.	-	az aminosav sorszáma a mutáció megnevezésekor
PGK-1	-	foszfoglicerát kináz-1 gén
MT	-	molekulatömeg standard
PC st.	-	tisztított humán protein C
VT	-	vad típus
RMSD	-	root mean square deviation (a referenciától való eltérés)
CRM ^{Red}	-	cross reactive material in reduced amount

1. Bevezetés

A „ritka betegség” fogalmát az Egyesült Államokban vezették be elsőként, szorosan kapcsolódva az „orphan”, azaz árva gyógyszer fogalmához. Az említett fogalmak kialakulásának alapja az volt, hogy a növekvő gyógyszerfejlesztési költségek miatt a gyártóknak nem volt kifizetődő a kis betegszámot érintő készítmények kifejlesztése, gyártása. Eleinte azokat a termékeket tekintették „orphan”-nek, amelyek eladási ára nem fedezte az előállítás költségeit, egy év múlva azonban már úgy módosították a fogalmat, hogy „árva” az a gyógyszer, amely esetén kevesebb, mint 200 000 fős (USA) piaccal kell számolni. A jelenleg érvényben levő meghatározás mindkét elemet tartalmazza. Az „árva” gyógyszerek és „ritka betegségek” fogalmának európai meghatározása később született meg (1295/1999/EC), eszerint ritka betegségről akkor beszélhetünk, ha az adott kórkép az egyénre nézve életveszélyes, vagy az életminőséget jelentősen rontó, alacsony prevalenciájú (<2-5:10 000 fő), diagnózisa/kezelése többnyire jelentős (mind anyagi, mind szellemi téren) erőfeszítést igényel. Ebből adódóan a „ritka” minősítéshez nem elég pusztán a gyér előfordulás, a diagnózis és/vagy a kezelés szempontjából súlyos, jelentős szellemi és anyagi erőfeszítést igénylő kórképek tartoznak ide (1). A ritka betegségek kategóriáján belül a hemosztázis rendellenességek, különösen a hemorrhagiás diathesisek egy jól elkülönített csoportot képeznek. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) 2004-ben megalakította a Ritka Vérzékenységek (RBD) munkacsoportot, mely összefogja e betegségekkel kapcsolatos kutatásokat, diagnosztikai ajánlásokkal és új terápiás lehetőségek megismertetésével segíti a betegekkel, betegségekkel foglalkozó szakembereket (www.rbdd.org és www.rbdd.eu). Az RBD munkacsoport definíciója szerint a haemophilia A és B, illetve a von Willebrand betegség kivételével minden coagulopathia és thrombocytá funkció zavar ritka betegségnek minősül. E vérzékenységek homozigóta, vagy összetett heterozigóta (azaz súlyos) formájának prevalenciája 1:500 000 és 1:3 000 000 közé tehető. A ritka thrombophiliákkal kapcsolatos alap- és klinikai kutatások koordinálását is felvállalta az ISTH „Plasma Coagulation Inhibitors” albizottsága. E betegségekkel kapcsolatos kutatások több szempontból is előremutatóak; egyrészt a betegségek háttérben felfedezésre kerülő új mutációknak az adott fehérje struktúrájára, funkciójára gyakorolt hatásának tanulmányozása által a fiziológias, patofiziológias folyamatokat jobban megérthetjük, új mechanizmusokat fedezhetünk fel. Másrészt, a kutatások által szerzett ismeretek új diagnosztikus lehetőségek fejlesztéséhez, illetve új, hatékonyabb terápiás eljárások kidolgozásához vezetnek. Az egyén

diagnózisa és a tudományos célú megközelítés mellett bizonyos esetekben a perinatalis diagnosztika igénye is felmerül, mely speciális felkészültséget igényel a vizsgálatot végző laboratóriumoktól.

Ahhoz, hogy a véralvadás folyamata ott, akkor, és olyan intenzitással játszódjon le a szervezetben ahol, amikor és amilyen mértékben arra szükség van, a hemosztázis pro-és antikoaguláns tényezőinek kényes egyensúlyára van szükség (2). A véralvadási rendszer épsége három fő pilléren nyugszik: az érfal épségén, azaz a vaszkuláris komponensen, a thrombocyták megfelelő számán és működésén, vagyis a celluláris komponensen és az alvadási faktorok és inhibitorok, azaz a humorális komponens megfelelő mennyiségén és minőségén. Az alvadási faktorok hiánya, vagy csökkent szintje haemorrhagiás diathesisekhez, azaz vérzékenységhez vezet, melyek hátterében állhat öröklött, szerzett, iatrogén vagy terápiais coagulopathia. A rutin diagnosztikában a hemosztázis szűrőtesztek elvégzése jelenti a kiindulási pontot, a humorális komponens vonatkozásában ezek a protrombin idő (PI), az aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) és a trombin idő (TI). Az érintett faktortól függően észlelhetünk izolált alvadási idő megnyúlást, vagy a PI és az APTI, vagy mindhárom alvadási idő együttes megnyúlását. Negatív alvadási szűrőteszt azonban nem zárja ki coagulopathia jelenlétét, ilyen esetben gondolni kell XIII-as faktor (FXIII) vagy α -2-plazmin inhibitor deficienciára.

A véralvadás limitáló tényezőihez tartozó inaktivátor rendszer zavara esetén thromboemboliás kórképek alakulhatnak ki. A vénás thromboembolia (VTE, mélyvénás thrombosis (MVT), tüdőembólia (TE)) a nyugati társadalmakat érintő egyik leggyakoribb morbiditási és mortalitási tényező (3). A VTE továbbra is fő okozati tényezőnek tekinthető a terhességgel és halva születéssel kapcsolatos morbiditás és mortalitás tekintetében és viszonylag gyakori orális fogamzásgátlót szedő fiatal nők körében. A VTE visszatérő lehet és krónikus, kifejezett fájdalommal és gyakran fekélyképződéssel járó postthromboticus syndromához vezethet. A VTE hátterében mind genetikai, mind környezeti tényezők fontos szerepet játszanak (4). A természetes antikoagulánsok funkcióvesztéssel járó mutációi antitrombin (AT), protein C (PC) és protein S (PS) deficienciákhoz vezethetnek, míg kóros alvadási faktorok, vagy öröklötten emelkedettebb alvadási faktor szinttel járó állapotok (V-ös faktor (FV) Leiden mutációja és a protrombin (FII) 20210A allél hordozása, emelkedett VIII-as alvadási faktor (FVIII) szint) felelősek az öröklött thrombophiliás esetek döntő többségéért.

A ritka coagulopathiák és thrombophiliák esetében – éppen e betegségek alacsony prevalenciája miatt – nagy klinikai vizsgálatok és populációs tanulmányok nem, vagy nehezen

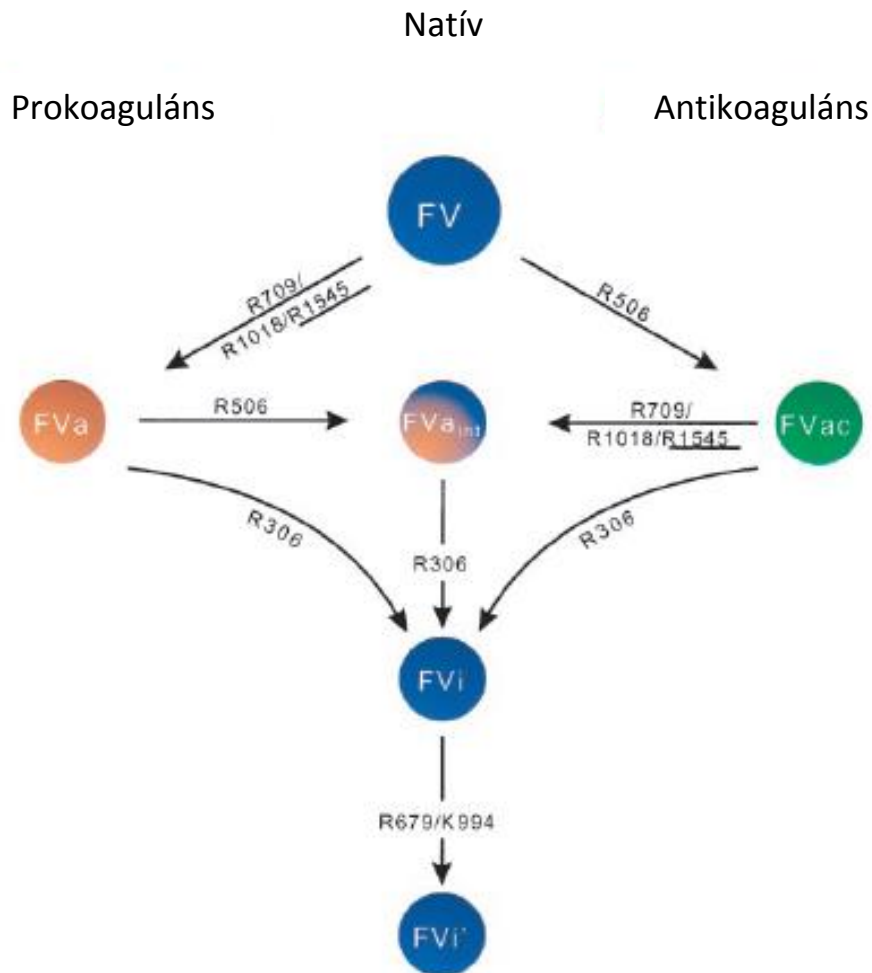
kivitelezhetőek, itt az eset-tanulmányok jóval nagyobb hangsúlyt kapnak, mint a gyakori betegségek esetében. E betegségek hátterében álló genetikai eltérések heterogének, az egyes alvadási faktorok és inhibitorok (inaktivátorok) génjeiben mutációs forró pont nem lévén, számos deficiens család vizsgálata alkalmával derülhet fény új mutáció okozati szerepére. E mutációk részletes karakterizálása a genotípus-klinikai fenotípus, genotípus-laboratóriumi fenotípus összefüggések feltárását teszi lehetővé. Az értekezésben a ritka coagulopathiák közül a FV és a FXIII deficiencia, a thrombophiliák közül a PC deficiencia hátterében álló új mutációk karakterizálásával kapcsolatban végzett vizsgálataink eredményeit foglaljuk össze.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A dolgozatban szereplő alvadási faktorok és deficienciáik bemutatása

2.1.1. A véralvadás V-ös faktorának tulajdonságai, jellemzői

A FV egy egyláncú, 330 kDa molekulatömegű glikoprotein, mely a májban és a megakaryocytákban szintetizálódik. Plazmakoncentrációja 20 nM (7 µg/mL), az összmenyiség közel 20%-a a thrombocyták α-granulumaiban raktározódik (5). A FV szerkezete mozaik-szerű, a FVIII-éhoz hasonló domén szerkezettel. Három hasonló szerkezetű A, két C és egy nagy mértékben glikozilált B domént tartalmaz, ez utóbbi köti össze az N-terminálison elhelyezkedő A1-A2 doméneket (az aktiváció után ezek képezik a nehéz láncot) a C-terminálison lévő A3-C1-C2 doménekkal, melyek az aktiváció után a könnyű láncot alkotják (A1-A2-B-A3-C1-C2) (6). A trombin által aktivált FV az aktivált X-es faktor (FXa) esszenciális kofaktora. Aktiváció során a trombin eltávolítja a B-domént, az így szabaddá váló nehéz és könnyű láncot ezentúl egy Ca²⁺-híd kapcsolja össze aktív heterodimerré (7, 8). Az aktivált FV (FVa) nagyságrendekkel meggyorsítja a protrombin aktivációját. A FVa inaktivációját az aktivált protein C végzi (APC) három Arg (Arg506, Arg306 és Arg679) mellett történő szekvenciális hasítással (7). Amennyiben az APC a negatív töltésű foszfolipidekhez kötött natív FV-öt hasítja az Arg506 mellett, úgy a fehérje antikoaguláns funkcióhoz jut, és a membránhoz kötött aktív VIII-as véralvadási faktor (FVIIIa) inaktiválásában az APC kofaktora lesz. Ha ezt az antikoaguláns funkciójú fehérjét hasítja a trombin az Arg709, Arg1018 és Arg1545 mellett, úgy a fehérje gyenge kofaktor aktivitást nyer a protrombin aktivációjában. Ekkor is az APC mediálta, Arg306 melletti hasítással lesz teljesen inaktív a fehérje (1. ábra).



1. ábra. A natív FV prokoaguláns (bal oldal) illetve antikoaguláns (jobb oldal) fehérjévé történő aktivációja és az aktív molekulák inaktivációja. (G.A.F. Nicolaes, B. Dahlbäck. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 530-8.) Az ábra magyarázata fenti szövegrészben található.

A FV kódoló génje (F5) az 1q21–25 lokalizációban található, hozzávetőlegesen 80 kilobázis terjedelmű, 25 exonból és 24 intronból áll (9). Az exonok mérete 72-286 bázispár (bp) között változik, kivéve a 13. exont, mely rendkívül nagyméretű, 2820 bp. Az intronok mérete 448 bp-11400 bp. A kódoló szekvencia (cDNS) 6672 bp, az 5'-nem transzlálódó régió (UTR) 90 bp, a 3'-UTR 163 bp hosszúságú. A cDNS egy 2224 aminosavból álló fehérjét kódol. Az első 12 exon kódolja a nehéz láncot, a 13. exon kódolja a B domént, a 14-25. exonok pedig a könnyű láncot. A nukleotidok és aminosavak számozása hagyományosan Jenny és mtsai, 1987-ben megjelent közleménye szerint történik (10). A „Human Genome Variation Society” (HGVS) irányelv alapján történő számozás azonban a fehérje első aminosavának a lánckezdő első metionint tekinti, függetlenül attól, hogy poszttranszlációs érés során lehasad-e az adott

fehérjéről propeptid, vagy sem. A FV esetében az érés során 28 aminosav hasad le az eredeti fehérjéről, ezért a hagyományos számozás (amely csak az érett fehérje aminosavait veszi figyelembe) alapján meghatározott aminosav sorszámához 28-at kell adni ahhoz, hogy megkapjuk a jelenleg elfogadott HGVS sorszámot (www.hgvs.org/mutnomen). Mivel a FV esetében – főként a Leiden mutáció, p.Arg506Gln, elterjedtsége miatt – a hagyományos számozás még ma is népszerűbb, jelen dolgozatban mi is ezt követjük.

2.1.2. Az V-ös faktor deficiencia

A régebben parahaemophiliának, Owren's disease-nek is nevezett FV deficiencia (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM +227400) ritka, autoszomális recesszív módon öröklődő coagulopathia, homozigóta (súlyos) formájának prevalenciája 1:1 millió (11). A homozigóta FV deficiens betegek FV aktivitása 10% alatti (általában 1% alatt) és mérsékelt, vagy súlyos vérzéses tünetek vannak (12). A legtöbb heterozigóta egyén tünetmentes (11–13).

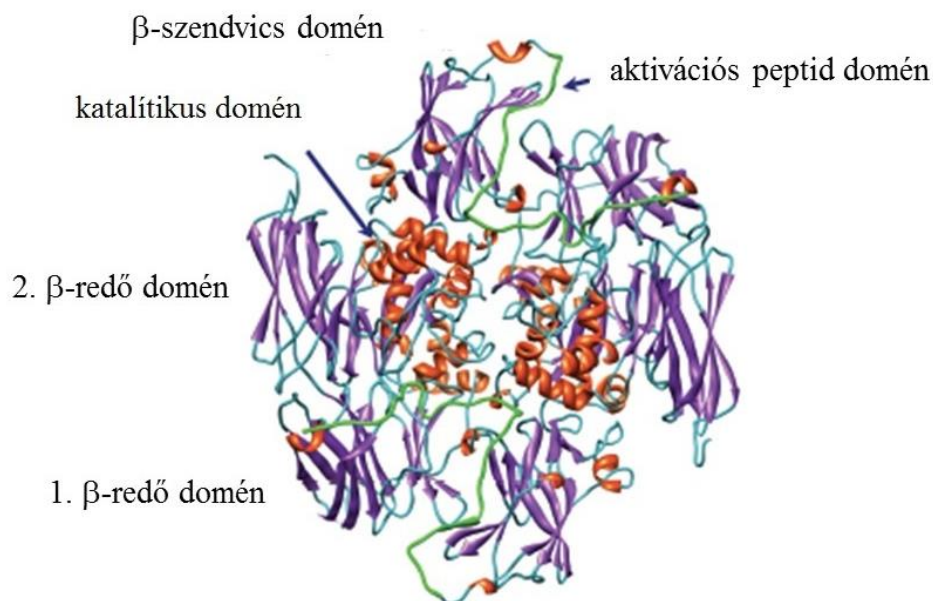
A betegek döntő többsége I-es típusú, azaz kvantitatív deficienciában szenved, habár II-es típusú (kvalitatív) deficiens esetet is közöltek már (14). A mutációs adatbázisokban már több mint 50 különböző mutációt jegyeznek a F5 génben. A misszensz mutációk többsége az A2 és a C2 doménekben található (15). A homozigóták előfordulási gyakoriságából kiindulva, a heterozigóta állapotnak 1:1000 frekvenciával kellene megjelenie, az esetek többsége azonban felderítetlenül marad, hiszen nem jellemző sem az alvadási idők jelentős megnyúlása, sem a vérzéses tünet.

2.1.3. A véralvadás XIII-as faktorának tulajdonságai, jellemzői

A FXIII egy pro-transzglutamináz, ami heterotetramer formában fordul elő a keringésben (16). A plazmában található FXIII (pFXIII) két katalitikus A (FXIII-A) és két gátló/hordozó B alegységből (FXIII-B) épül fel. A B-alegység feleslegben található, ennek kb. 50%-a szabad formában mutatható ki a plazmában (17). A celluláris FXIII (cFXIII), a plazma formától eltérő módon nem tartalmaz B-alegységet, így az homodimer formában mutatható ki nagy mennyiségben a trombocytákban (a trombocytá fehérjék 3%-át adja) és monocytákban, macrophagokban, de osteoblastokban, osteocytákban és chondrocytákban is kifejeződik egyes tanulmányok szerint (18, 19). A FXIII-A 732 aminosavból áll, 83 kDa tömegű. A lánckezdő metionint egy szerin követi, mely a metionin poszttranszlációs lehasadását követően N-acetilálódik és válik a fehérje első aminosavává. A FXIII-A alegység vezető szekvenciát nem

tartalmaz, ezért a hagyományos és az új (HGVS) nevezéktan mindössze egy aminosav figyelembe vételében különbözik: az új számozás szerint egyet kell a tradicionális aminosav sorszámhoz hozzáadni. Mivel a FXIII deficienciákkal kapcsolatos közlemények döntő többsége a hagyományos nomenklaturát követi és a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmussal kapcsolatos közlések is azt használják (az új nomenklatura szerint p.Val35Leu lenne a megnevezés, amit ma félrevezetőnek tartunk), ezért a dolgozatban mi is a tradicionális elnevezéseket követjük.

A FXIII-A alegység négy fő szerkezeti elemből áll: tartalmaz egy 37 aminosav hosszúságú N-terminális aktivációs peptidet, melyet egy β -szendvics domain, egy katalitikus domén és két β -redő domén követ (2. ábra).



2. ábra. A FXIII-A alegység szerkezete. (Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z Komáromi I, Katona É. *Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. Physiol Rev* 2011; 91: 931–72.)

A FXIII-A alegységet kódoló gén (F13A1) a 6-os kromoszómán található a 6p25.3–p24.3 pozícióban, 15 exont és 14 intront tartalmaz (20). Az 5'-UTR 84 bp hosszúságú, a 3'-UTR 1,6 kb. Az 1. exon valójában nem kódoló, az 5'-UTR-t tartalmazza. Az aktivációs peptidet a 2. exon, a β -szendvics domént a 2-4. exonok, a katalitikus domént a 4-12. exonok, a két β -redő domént pedig a 12-13. és a 13-15. exonok kódolják.

A FXIII-B egy mozaik szerkezetű fehérje, mely 10 sushi domént tartalmaz (21). Az A-alegységgel ellentétben erősen glikozilált, 8,5% szénhidrátot tartalmaz; 641 aminosavból álló, 80 kDa tömegű fehérje, a májban szintetizálódik. A FXIII-B alegységét kódoló gén (F13B) az 1-es kromoszómán található az 1q31–32.1 pozícióban, 12 exonból és 11 intronból áll. Az 1. exon a 20 aminosavból álló vezető szekvenciát kódolja, a további exonok az egyes sushi doméneket kódolják, az utolsó exon a B-alegység C-terminális részét és a 3'-szerkezeteket kódolja.

A FXIII-A és B alegység tehát a keringésben találkozhat és alkotja a fent említett heterotetramert (FXIII_A₂B₂), mely egészséges személyekben 14-28 mg/L koncentrációban mutatható ki a plazmából.

A pFXIII-t trombin és Ca²⁺ ionok aktiválják: a trombin lehasítja a FXIII-A-ról az aktivációs peptidet, majd Ca²⁺ ionok jelenlétében a FXIII-B disszociál és a megmaradó FXIII-A dimer aktív konformációt vesz fel. Az aktív FXIII (FXIII_a) egy transzglutamináz, mely keresztköti a glutamin és lizin oldalláncokat peptid kötések (izopeptid kötések) kialakításával. Fő szerepe a hemosztázisban a fibrin láncok keresztkötése és az α-2-plazmin inhibitor fibrinhez kötése. A fibrin γ-láncok kovalens dimerizációja és a fibrin α-láncok keresztkötése nagy molekulatömegű polimerekké stabilizálja a fibrint és védi a nyíróerőkkel szemben. Az α-2-plazmin inhibitor kovalens kötése a fibrin alvadékhoz megakadályozza annak a fibrinolitikus rendszer által történő gyors degradációját. A véralvadásban betöltött kulcsszerepe mellett a FXIII a sebgyógyulásban, terhesség kiviselésében is elengedhetetlen, de újabban felvetették szerepét az angiogenesisben, porc-és csontfejlődésben is (21).

2.1.4. A XIII-as faktor deficiencia

A normál átlag 1%-a alatti FXIII szint súlyos vérzékenységet eredményez. Ilyen alacsony FXIII aktivitás öröklött FXIII-A deficienciában fordul elő, míg öröklött FXIII-B deficienciában szenvedő betegek FXIII aktivitása magasabb (rendszerint 5-10%) és a vérzékenység közepes vagy enyhe (22, 23). A FXIII deficiencia egy ritka örökletes véralvadási zavar, a diagnosztizált esetek gyakorisága az átlagpopulációban hozzávetőlegesen 1:2 000 000, bár azokban az országokban, ahol gyakoriak a rokonházasságok, vagy zárt közösségekben a frekvencia jelentősen nagyobb lehet. A klinikai oldal ismeretének hiánya és a nem megfelelő laboratóriumi diagnosztikai gyakorlat miatt a FXIII deficiencia gyakran nem kerül felismerésre. Az utóbbi probléma kiküszöbölésére a FXIII deficienciák diagnosztikájára és csoportosítására vonatkozóan egy ajánlás jelent meg az ISTH Tudományos és

Standardizációs Bizottsága hivatalos közleményében (24). Erre a publikációra épülve egy diagnosztikai algoritmus is született (25). A FXIII-A deficiencia mutációs adatbázisa (<http://www.f13-database.de>) 65 okozati mutációt tartalmaz a FXIII-A alegységet kódoló génben (34 misszensz mutáció, 21 inzerció/deléción, 9 „splice-site” mutáció és 5 nonszensz mutáció). A mutációk eloszlása a gén mentén egyértelműen mutatja, hogy nincs mutációs forrópont. Habár a FXIII deficiencia intenzív kutatások tárgya lett az utóbbi időben (22, 25-28), számos megoldatlan kérdés maradt még. A genetikai defektus és a klinikai tünetek, a laboratóriumi fenotípus közötti kapcsolat nem egyértelmű, részben módszertani problémák vagy a laboratóriumi fenotípusra vonatkozó kevés adat miatt. Emiatt olyan tanulmányokra van szükség, melyekben a molekuláris genetikai defektus leírását részletes laboratóriumi vizsgálatokkal és klinikai adatokkal egészítik ki. Mi a (két új mutációt is tartalmazó) molekuláris genetikai eltérések felderítésén túl teljes körű laboratóriumi vizsgálatokat is végeztünk és a klinikai tüneteket is összegyűjtöttük két, súlyos öröklött FXIII deficienciában szenvedő betegnél (lásd később). A FXIII-A alegység deficienciában szenvedő újszülöttek 80%-ánál figyelhető meg késői köldökcsont vérzés (22, 28–31). Hiánya azonban nem zárja ki a diagnózist és mindig gondolni kell rá fiatal korban jelentkező intracranialis vérzés esetén. A profilaktikus faktorpótló terápiában nem részesülő FXIII-A alegység deficiens betegek 30%-ánál fordul elő intracranialis vérzés (22, 28–31).

Az adatbázisban jegyzett mutációk közül néhányat részletesebben is vizsgáltak, köztük a 8-as exonban lévő p.Arg326Gln aminosavcserét is. A molekulamodell azt mutatta, hogy az Arg326 az aktív helyhez tartozó Cys314-et tartalmazó amino-terminális részen lévő hélix karboxil végéhez közel helyezkedik el (32). Az Arg326 oldalláncainak atomjait érintő hidrogén kötések kapcsolják az aktív helyet tartalmazó hélixet a katalitikus domén egyéb részeihez. Az arginin neutrális aminosavra történő cseréje felborítja az elektrosztatikus egyensúlyt ebben a régióban, továbbá a kisebb glutamin oldallánc egy hézagot hoz létre a molekulában. COS sejtek tranziens transzfekcióját követően a mutáns cDNS-ről a vad típusú FXIII-A-val megegyező mennyiségű mRNA expresszáldott (33). Metabolikusan jelölt sejtekkel végzett „pulse-chase” kísérleti eredmények a Gln326-ot tartalmazó FXIII-A alegység kifejezett instabilitását és intracelluláris degradációját mutatták. Mindezek igazolják a mutáció okozati jellegét és egybecsengenek a FXIII-A alegység fehérje hiányával a plazmában és a trombocytákban.

2.2. A protein C-protein S rendszer szerepe a véralvadás szabályozásában

A PC és a PS természetes antikoagulánsként fontos szerepet játszik a véralvadás szabályozásában (34-36). A PC-t trombin aktiválja trombomodulin (TM) jelenlétében. A TM az endothel sejtek felszínén található fehérje, melyhez történő kötődést követően a trombin a PC potens aktivátorává válik. Az endotheliális protein C receptor (EPCR) szintén fontos szerepet játszik az aktiválási folyamatban, az EPCR annak Gla-doménjén keresztül köti a PC-t és bemutatja a trombin-TM komplexnek. A trombin az Arg169-es aminosavnál hasítja az aktivációs peptid domént egy 12-aminosav hosszúságú aktivációs peptid felszabadulását eredményezve a PC nehéz lánc N-terminális részéről. Az aktivált PC (APC) inaktiválja a membránhoz kötött FVIIIa-t és FVa-t azáltal, hogy specifikus arginin aminosavaknál hasítja őket. A FVa-t az Arg506-nál hasítja, amely a fő hasítási hely. A FVa teljes inaktiválásához az Arg306-nál történő hasítás is szükséges. Az Arg679-nél történő hasítás nem fontos a FVa inaktiválása szempontjából. A FVIIIa-t az Arg336-nál és az Arg562-nél hasítja. A FVIII és FV nem aktivált formája gyenge szubsztrátja az APC-nek. Esmon és munkatársai kimutatták, hogy az antikoaguláns APC komplex számára szükséges foszfolipid membrán összetétele különbözik a prokoaguláns komplexekétől (37). Az APC komplex endotheliális sejtek membránjához történő kötődéséhez foszfatidil-etanolamin szükséges foszfatidil-szerin helyett. Az APC az intakt FV-öt is tudja hasítani az Arg506 helyen, melynek hatására a FV az APC kofaktora lesz a FVIIIa inaktiválásában (1. ábra). Az APC fő inhibitora a protein C inhibitor, egy, a májban szintetizálódó egyláncú szerin proteáz inhibitor glikoprotein. Az inhibitor 1:1 arányú komplexet alkot az APC-vel és az aktív helyen hasítja (az Arg354-nél). Az APC-t az α -1-antitripszin is képes gátolni. Antikoaguláns szerepén túl a PC fontos szerepet játszik a sejtvédelemben, mely funkcióját az elmúlt évtized során térképezték fel részben. Az APC citoprotektív hatásairól Mosnier és munkatársai közöltek egy részletes összefoglalót, itt a funkció ismertetése meghaladja a terjedelmi lehetőségeket (38).

A PS szabad formája az APC fontos kofaktora, növeli annak affinitását a negatívan töltött foszfolipid felszínéhez. A PS képes kiszorítani a FXa-t annak FVa-val alkotott komplexéből lehetővé téve az APC számára, hogy az Arg506-nál hasítsa a FVa-t. A FVIIIa inaktiválása során az APC aktivitást egyaránt stimulálja a PS és a FV nem aktivált formája, míg a FVa inaktiválása során csak a PS az APC kofaktora. A PS a komplement 4b kötő fehérjével (C4bBP) is alkot komplexet, ennek a komplexnek nincs APC kofaktor aktivitása. A PS-nek direkt, APC-től független hatásai is vannak (39, 40). A PS kötődik a foszfolipid

vezikulumokon lévő FVa-hoz, és ez által verseng a protrombinnal a FVa kötésért – gátolva a protrombináz aktivitást. A PS FXa-hoz történő kötődését is leírták. Az APC-től független PS funkciók nem szorítkoznak a szabad formára, a C4bBP-val komplexet alkotó PS ugyanazon aktivitásokkal rendelkezik. A közelmúltban publikálták a PS direkt interakcióját a szöveti faktor útvonal inhibitorral (TFPI) a FXa gátlásban (41).

2.2.1. A protein C fehérje és kódoló génjének struktúrája

A PC K-vitamin függő glikoprotein, mely a májban szintetizálódik egyláncú fehérjeként. A szerin proteáz prekursor plazma koncentrációja 3–5 mg/L (42). Félélettideje rövid, hozzávetőlegesen 8 óra a keringésben. Az érett, 62 kDa molekulatömegű fehérje egy nehéz (41 kDa) és egy könnyű (21 kDa) láncból áll, melyeket egy diszulfid híd köt össze a Cys141 és Cys265 között. A PC doménszerkezete hasonlít a többi K-vitamin függő fehérje szerkezetéhez. Van pre-pro vezető szekvenciája (a hagyományos számozás szerint –42-től –1-ig, mely szerint a fehérje első metioninja a –42-es számot kapja), ez a Gla-doménben lévő glutamát aminosavak gamma-karboxilációjához és a szekrécióhoz szükséges. Az érett fehérje tartalmaz egy Gla-domént (1-37. aminosavak), mely tartalmazza a kilenc, a poszttranszlációs módosítások során karboxilálódó glutamátot. Egy rövid amfipatikus hélix (38–45 aminosavak) köti a Gla-domént az első epidermális növekedési faktor (EGF) doménhez (utóbbi a 46–91. aminosavakat jelenti). A második EGF domént (92–136. aminosavak) az aktivációs peptid domén (137–184. aminosavak) követi. Ez a rész tartalmazza a Lys156–Arg157 dipeptidet, mely az érés során eltávolításra kerül, valamint a trombin által történő aktiváció helyét (Arg169). A PC nehéz lánc tartalmazza az aktivációs peptidet és a katalitikus domént (185–419. aminosavak). A hagyományos aminosav sorszámhoz 42-t kell hozzáadni, hogy az új HGVS nevezéktan szerinti sorszámot megkapjuk. A dolgozatban az eredmények bemutatásakor a PC deficiencia esetében az új nevezéktan követjük, hogy az értekezés alapjául szolgáló közleménynek megfelleljenek az itt leírtak.

A humán PC kódoló génje (*PROC*) a 2q13–q14 pozícióban található, kilenc exont tartalmaz, melyek egy 1,7-kb messenger RNS-t (mRNA) kódolnak, valamint nyolc intronból áll (43, 44). Az exon/intron határok a GT-AG szabályt követik. Az 1. exon egy nem kódoló exon, egy hosszú intron követi a lánckezdő ATG kodon előtt, ez a jelenség egyedi a K-vitamin függő faktorok között. A *PROC* két Alu repeat-et tartalmaz az 5. intronban. A fő transzkripció kezdő hely 1515 bázispárral az iniciátor ATG kodon előtt található. Két kisebb transzkripció start helyet is leírtak –7 és +13 bp távolságra a fő start helytől. A transzkripció

szabályozását részletesen tanulmányozták. A PROC-on belüli Cis-elemek a HNF-1, HNF-3 és Sp1 kötőhelyek. Egy erős géncsendesítő régiót és két májspecifikus „enhancer” régiót is leírtak.

2.2.2. Protein C deficiencia: epidemiológiai vonatkozások és klinikai tünetek

Az első PC deficiens esetet Griffin és munkatársai írták le 1981-ben (45), ismétlődő vénás thromboemboliás események jellemezték. Azóta számos deficiens eset közlésre került a háttérben álló genetikai defektussal együtt. Röviddel ezt követően felismerték, hogy a PC deficiencia fokozott thrombosis rizikóval jár. A rizikó mértékét és a PC deficiencia gyakoriságát thrombosison átesett betegek között és az általános populációban jónéhány epidemiológiai tanulmányban vizsgálták, az eredmények ellentmondóak (46–59). A PC deficiencia becsült gyakorisága az általános populációban meglepően magas (0,4%) (48, 49). Szelektált beteganyagban, 163 random módon kiválasztott alsó végtagi vénás thrombosisban (LEVT) szenvedő beteg 2–4%-ának volt PC vagy PS deficienciája (52). Érdekes módon, ugyanebben a tanulmányban, egyetlen igazolt cerebrális vénás sinus thrombosisban szenvedő betegnél sem találtak PC deficienciát, míg a PS deficiencia prevalenciája nem különbözött szignifikánsan attól, amit a LEVT csoportban találtak. Egy olasz kohorsz vizsgálatban az első VTE-n átesett betegek körében 4,7% volt a PC deficiencia prevalenciája (53). PC deficienciát a proximális mélyvéna thrombosisos betegek 3%-ában találtak (n=920) (54). A Leiden Thrombophilia Study, ami a témában folytatott egyik első eset-kontroll tanulmány, eredménye szerint 3-szorosnak találták a VTE rizikót PC deficienciában nem szelektált beteganyagban (55). Más tanulmányokban 3-11-szeres VTE rizikót találtak PC deficienciában. Az eredmények a betegek beválogatásától, beleértve az etnikai hovatartozást, a tanulmány szerkezetétől, és a PC aktivitás és antigén szint meghatározás módszerétől azonban jelentősen függenek. A rekurrens VTE incidenciája PC deficienciában 6,0% (53, 56). A nagy prospektív EPCOT tanulmányban (European Prospective Cohort on Thrombophilia) az első VTE rizikóját vizsgálták igazolt thrombophiliás betegek tünetmentes rokonaiban (n=575). Az 5,7 éves követési időszak alatt az egyének 4,5%-ánál alakult ki VTE. A VTE éves incidenciája PC deficienciában 0,7% volt, magasabb volt, mint FVL mutáció hordozás esetén, és az átlagéletkor a thrombosis idején 40 év volt (57). Az epidemiológiai tanulmányok eredményeit összevetve elmondható, hogy a PROC génben lévő mutáció hordozása esetén a vénás thrombosis kialakulásának kockázata jelentősen különbözik a különböző tanulmányokban. A módszertani variabilitáson túl ez gén-gén, vagy gén-környezet kölcsönhatásoknak is

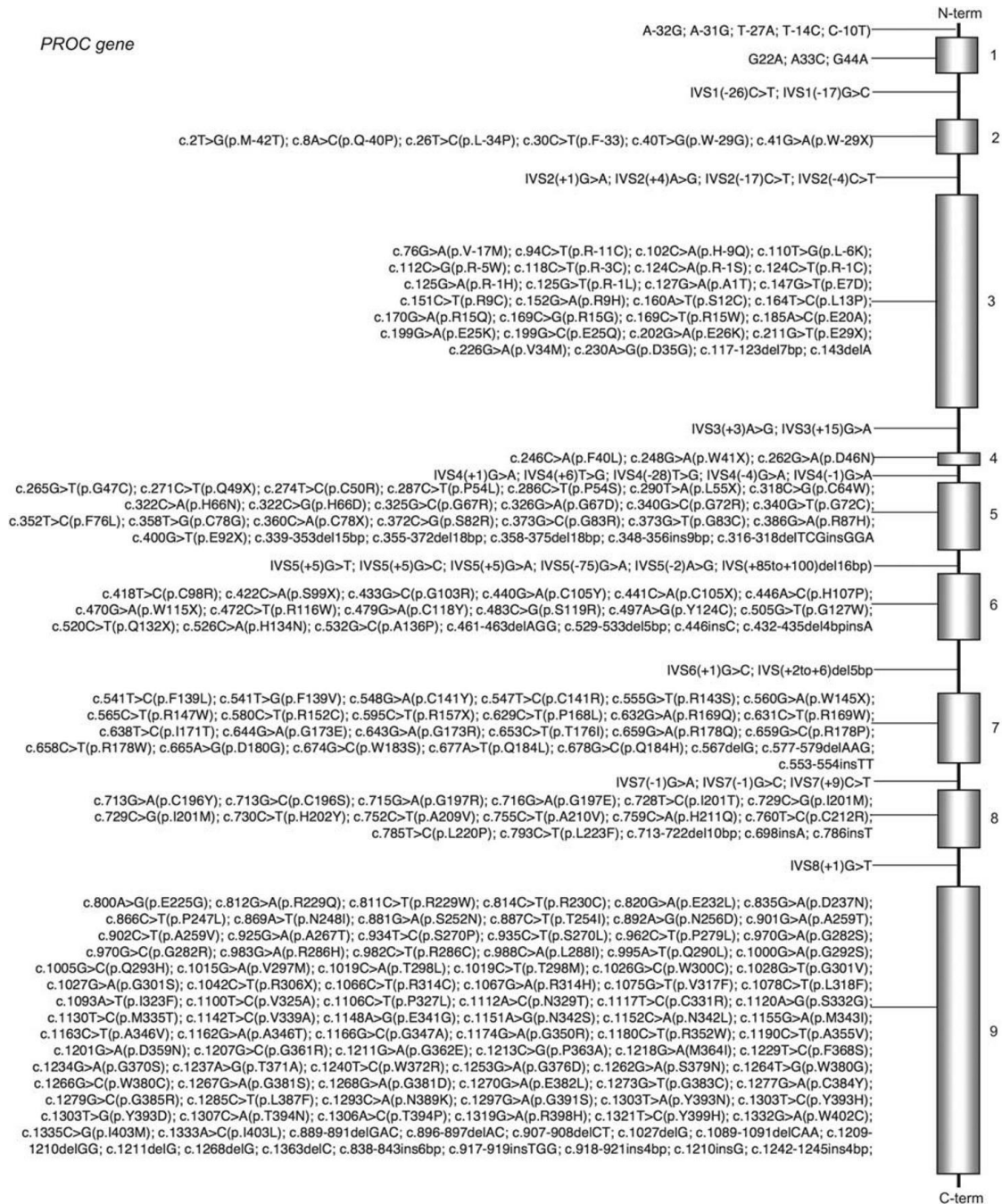
tulajdonítható, melyek nagy részét még nem ismerjük (60, 61). A PC deficiencia tünete a - gyakran visszatérő - fiatal felnőttkorban kialakuló mélyvénás thrombosis és/vagy tüdőembólia. A thrombosis szokatlan lokalizációban is megjelenhet, úgymint a végtagok proximális részén, vagy a mesenterialis vagy cerebralis vénákban. Egy öröklött PC deficiens 2 éves gyermekben szívüregi thrombust találtak (62), és több szívüreget érintő multiplex thrombosit írtak le egy középkorú, kombinált PC-PS deficienciában szenvedő betegnél (63). Terhességgel kapcsolatos thrombosisról is számoltak már be (64). Súlyos PC/PS deficienciában, amikor a plazmakoncentrációk extrém alacsonyok, súlyos thrombosis alakul ki újszülöttekben, gyakran disszeminált formában, a jelenség purpura fulminánsként ismert (65). A Warfarin-indukálta bőrnekrozis súlyos szövődmény lehet K-vitamin antagonistá terápiaiban részesülő PC vagy PS deficiens betegeknek. A vénás thrombosison túl a PC vagy PS deficiens betegekben artériás thrombosis is kialakulhat (66). Az egyedi esettanulmányok mellett (67-69) egy nagy kohorsz tanulmány eredményei szerint a PC, PS vagy AT deficiens, VTE-ban szenvedő betegek rokonainál (n=468) nagyobb volt az artériás thrombosis incidenciája, mint a deficienciában nem szenvedők esetében. Az artériás thrombosis rizikója különösen a <55 éves korosztályban volt magas, a korrigált veszélyhányados („hazard ratio”) PC deficiencia esetében 6,9 (95%-os CI, 2,1-22,2) (70). A több, mint 13 000, acut coronaria syndromában vagy ischaemias stroke-ban szenvedő beteg bevonásával végzett ARIC kohorsz tanulmányban a majdnem 17 éves követési időszak alatt azt találták, hogy az alacsony PC szintek összefüggtek stroke kialakulásával (71). Egy japán tanulmány szerint a PC deficiens betegek 10 évvel fiatalabbak voltak a myocardialis vagy cerebralis infarctus bekövetkeztekor, mint azok, akik nem szenvednek a deficienciában (46). Egy artériás ischaemias stroke-on átesett gyermekeket vizsgáló tanulmányokat összefoglaló meta-analízis szerint a rizikó 8,46 PC deficiencia esetén (72). Ezek az eredmények hangsúlyozzák az öröklött thrombophilia irányú, főleg PC és PS deficiencia vizsgálatok fontosságát artériás thrombosisban szenvedő, más nyilvánvaló rizikófaktorral nem rendelkező fiatal betegekben.

2.2.3. A Protein C deficiencia molekuláris genetikai háttere, genotípus-fenotípus

összefüggések

A PC deficiencia I-es (kvantitatív) és II-es (kvalitatív) típusra osztható. I-es típusú PC deficienciában a PC aktivitás és antigén szint arányosan csökkent a fehérje károsodott szintézisét vagy szekrécióját jelezve, míg II-es típusú deficienciában az aktivitás csökkent az antigén szint jelentős csökkenése nélkül (36). Az utóbbi típust okozhatja például a szubsztrát,

Ca^{2+} vagy receptor kötés zavara. A PC deficiencia öröklődése nem olyan egyértelmű, mint korábban gondolták. Mutathat autoszómális recesszív vagy domináns öröklődést, gyakran inkomplett penetranciával. A PC deficiens betegek többsége heterozigóta a defektusra, a PC aktivitás jellemző módon 30-60% közötti. A homozigóta és összetett heterozigóta betegek PC aktivitása és/vagy antigén szintje gyakran detektálhatatlanul alacsony és már korai életkorban életet veszélyeztető thrombosisban szenvednek. A PC deficiencia molekuláris genetikai háttere heterogén. A mutációk többsége I-es típusú deficienciát okoz, II-es típusú deficiencia az esetek körülbelül 10-15%-ában fordul elő, bár bizonyos populációkban éppen a II-es típusú PC deficiencia a gyakoribb, alapító mutáció(k) következtében (lásd később). Az alacsony PC szintekhez vezető mutációkat összefoglalóan először 1995-ben közölték (73, 74). Eddig közel 250 okozati mutációt közöltek, melyek különböző adatbázisokban érhetők el (<http://www.hgmd.cf.ac.uk> és <http://www.isth.org>) (3. ábra).



3. ábra. Az eddig a *PROC* génben talált okozati mutációk megoszlása a HGMD adatbázis szerint (www.hgmd.cf.ac.uk). A nukleotid számozást az 1-es exonban és közelében a nem kódoló 1-es exon első nukleotidjához viszonyítva adtuk meg. A nukleotid számozást a kódoló régióban a lánckezdő ATG kodon első nukleotidjához viszonyítva adtuk meg. Az aminosav számozást az érett fehérjére vonatkoztattuk, az első metionin a –42-es. Az irodalom két nagyméretű deléciót is tartalmaz, egyik a teljes gént érinti, a másik az 1-9 exonokat (75, 76) (az ábrán nincs feltüntetve).

Egy nemrégiben kialakított mutációs adatbázis, a ProCMD egy interaktív eszköz, mely fenotípus leírásokat tartalmaz funkcionális és molekulamodellezéssel nyert szerkezeti adatokkal (75). Az I-es típusú deficienciát okozó mutációk többsége egy nukleotidot érintő nukleotid csere a PROC kódoló régiójában, mely aminosavcsere eredményez (kb. 70%). Amennyiben elvégezték, a molekulamodellezés majdnem minden esetben kóros fehérje feltekeredést és következményesen a mutáns fehérje instabilitását jelezte. In vitro expressziós tanulmány az esetek csupán harmadában készült. Stop kodont eredményező pontmutációról is beszámoltak (kb. 5%). A pontmutációk egy kisebb hányada (az összes mutáció kb. 9%-a) az exon/intron határon fordult elő „splicing” zavart eredményezve. A kis deléciók (kb. 8%) vagy az inzerciók (kb. 4%) kereteltolódáshoz vezetnek korai stop kodon és csonka fehérje megjelenését eredményezve. Nagy gén régiót érintő deléció csupán az esetek 1%-ában fordul elő. Habár majdnem minden misszensz mutáció teljes szekréción blokkot okoz, néhány mutáció esetén mégis szekretálódik a fehérje, a szekréción ráta azonban jóval alacsonyabb a vad típusú fehérje szekréciónjánál (76). Az ilyen mutációkkal rendelkező homozigóta deficiens betegeknél a PC koncentráció alacsony, de 1% feletti.

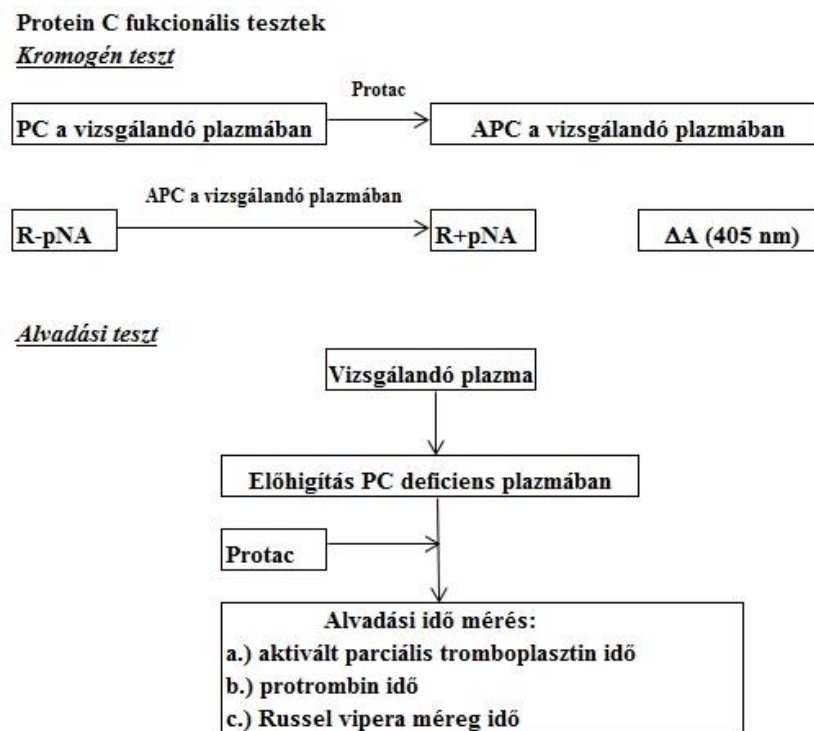
A II-es típusú deficiencia diagnózisa a funkcionális tesztek és az antigén szint mérés eredménye közötti diszcrepancián alapszik. A misszensz a leggyakrabban előforduló mutáció típus, a Gla-domént vagy pro-pepridet érintő aminosavcsere károsodott Ca^{2+} - és foszfolipid-kötést eredményez (77–85). A szerin-proteáz doménben előforduló mutációk károsodott proteáz aktivitást vagy csökkent szubsztrát kötést eredményeznek (86–88). Érdekesek az egy bizonyos populációban gyakori mutációk alapító hatásra utalva, például valamennyi finn II-es típusú PC deficiens esetet ugyanaz a mutáció okozza (p.Trp380Gly) (89). A p.Arg147Trp mutáció gyakori a tajvani kínai VTE betegeknél (90). A japán PC deficiens esetek 50%-áért öt gyakori mutáció a felelős (c.1268delG, p.Phe139Val, p.Arg211Trp, p.Val339Met és p.Met406Ile) (91). Közös öst találtak a p.Arg306X mutációt hordozó holland betegek esetében (92). A c.3363insC mutációt Észak-Amerikába vándorló francia telepések honosították meg (93).

A PC deficiens családok 10-30%-ában nem található mutáció a PROC génben (94). Ez nem jelenti szükségszerűen azt, hogy a PROC-ban nincs okozati mutáció. A gén nagyobb részét érintő deléciók a klasszikus Sanger típusú szekvenálással (azaz láncterminációs eljárással) gyakran nem kerülnek felismerésre. A PC szinteket továbbá a PROC-on kívül előforduló lokuszok is szabályozhatják. A GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia) projekt részeként egy genomi szintű kapcsoltsági vizsgálat során igyekeztek a PC plazmakoncentrációkat befolyásoló géneket lokalizálni (95). A 16-os kromoszómán

található D16S3106 és D16S516 mikroszatelita markerek által határolt régióban (16q22–23) detektáltak egy gént, mely fő kvantitatív meghatározó lókuszt lehet a PC antigén szintek változékonyságában. Ez a gén egy kinon reduktázt, a K-vitamin metabolizmusban részt vevő NADPH:menadion oxidoreduktáz 1-t (NQO1) kódolja. Ezen lókuszt más K-vitamin függő faktorok koncentrációival való összefüggését is kimutatták, bár a kapcsolat nem volt olyan szoros, mint PC estében (95).

2.2.4. A Protein C deficiencia laboratóriumi diagnosztikája

A PC deficiencia diagnosztikájában szűrőtesztként funkcionális tesztek alkalmazunk (36). E tesztek lehetnek alvadási idő meghatározáson alapulóak, vagy amidolitikus esszék kromogén szubsztrátot alkalmazva (4. ábra).



4. ábra. A PC aktivitásának meghatározására alkalmas funkcionális tesztek vázlatos áttekintése. (Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med* 2010;48 Suppl 1:S53-66.)

Akár alvadási, akár kromogén tesztet használunk, első lépésben a beteg plazmájában lévő PC-t Protac-kal (az Agkistrodon contortrix mérgéből származik) aktiváljuk. A kromogén tesztben

a szintetikus APC szubsztrátból a para-nitroanilin felszabadulás mértékét detektáljuk 405 nm-en, mely a PC aktivitásától függ. Az alvadási idő alapú tesztekben valamilyen alvadás aktiváló reagens jelenlétében (APTI, PI, RVMI) detektáljuk az APC-függő alvadási idő megnyúlás mértékét. Mindkét testnek vannak előnyei és hátrányai, melyek ismertetése meghaladja az értekezés terjedelmi lehetőségeit, de röviden annyit megemlítünk, hogy a FV Leiden mutáció befolyásolhatja az alvadási tesztet alámérést okozva, míg ez a jelenség a kromogén tesztekben nem fordul elő. A kromogén tesztek viszont nem érzékenyek bizonyos II-es típusú PC mutációkra, különösen azokra, amelyek a foszfolipid/kalcium kapcsolatokat befolyásolják.

Mivel a PC deficiencia lehet szerzett, genetikai defektus feltételezése előtt valamennyi szóba jöhető szerzett állapotot ki kell zárni. Kérdéses esetekben szükséges a tényleges öröklött deficienciát okozó mutáció jelenlétének igazolása mutáció analízissel. Mivel számos mutációt leírtak a PROC génben és nincs úgynevezett mutációs forrópont, a DNS szekvenálás a legmegbízhatóbb a genetikai diagnózis felállításában. A nagy deléciók vagy duplikációk kimutatására alkalmas, nemrégiben kifejlesztett, kereskedelmi forgalomban kapható módszer a multiplex ligáció függő próba amplifikáció módszere (MLPA). A „mutáció negatív” esetek DNS-ének ismételt vizsgálata az esetek egy részében nagy deléciókat vagy duplikációkat fedhet fel (96).

Célkitűzések

- 1.** Egy 34 éves, mérsékelten vérzékeny nőbetegben FV deficiencia igazolódott. Célul tűztük ki a háttérben álló molekuláris genetikai eltérés pontos meghatározását és a mutáció lehetséges következményének vizsgálatát molekulamodellezéssel.
- 2.** Két, súlyos vérzéses tünetekkel rendelkező beteg, egy újszülött fiú és egy 13 éves lány tüneteinek háttérében FXIII deficiencia merült fel. Célunk volt a részletes laboratóriumi kivizsgálás és a molekuláris genetikai analízis.
- 3.** Egy purpura fulminánsban szenvedő beteg összetett heterozigóta volt a p.Asp77Gly és az új p.Ala163Glu mutációkra, egy 27 évesen mélyvénás thrombosison átesett beteg heterozigóta formában hordozta az új p.Ala163Val mutációt. Célunk volt a mutáns fehérjék sorsát in vitro kísérletekben vizsgálni és a mutációk szerkezeti következményeit molekulamodellezéssel és molekuladinamikai szimulációkkal szemléltetni.

3. Metodikák

3.1. V-ös faktor deficiencia

3.1.1. Betegek

Egy 34 éves nőbetegnél számos alkalommal lépett fel vérzésem komplikáció műtéti beavatkozások során, spontán vérzései nem voltak. Kilenc éves korában tonsillectomiát követően jelent meg nehezen csillapítható vérzés. 1992-ben, első szülése során alakult ki súlyos, friss fagyasztott plazma adását igénylő vaginális vérzés. 2005-ben emlő plasztikai műtét után, 2006-ban conisatiót követően jelentkezett erős vérzés az operáció helyén. Családi anamnézise vérzékenység tekintetében negatív. A beteg két lánygyermekének eddig még nem volt vérzésem tünete, bár nem estek még át sebészi beavatkozáson. A betegről és családtagjaitól tájékozott beleegyezésüket követően a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével nyertünk vérmintákat.

3.1.2. Anyagok és módszerek

3.1.2.1. Hemosztázis laboratóriumi vizsgálatok

A beteg első jelentkezésekor elvégeztük a koaguláció szűrőtesztjeit BCS koagulométeren (Siemens/Dade- Behring, Marburg, Németország). A PI meghatározásához Innovin (Siemens/Dade- Behring), az APTI méréséhez PTT-Automate (Diagnostica Stago, Anieres, Franciaország), a TI meghatározásához Trombin idő reagenst (Reanal-Ker, Budapest, Magyarország) használtunk. A fibrinogén szintet a Clauss módszer szerint határoztuk meg (Fibrinogén reagens, Reanal-Ker). Az alvadási faktor aktivitásokat egyfázisú alvadási tesztekben határoztuk meg: a II-es, V-ös, VII-es és X-es faktor aktivitását PI alapú, a VIII-as, IX-es, XI-es és XII-es faktor aktivitását APTI alapú módszerekkel. A FXIII aktivitását módosított optimalizált kinetikus spektrofotometriás módszerrel mértük (REA-chrom FXIII, Reanal-Ker). Az α 2-plazmin inhibitor aktivitásának meghatározását kromogén teszttel (Stachrom Antiplasmin, Diagnostica Stago) végeztük. A csökkent FV aktivitás háttérben esetleg fennálló antitest jelenlétének lehetőségét beteg plazma:normál plazma 1:1 arányú keverésem vizsgálatával zártuk ki, melyet szobahőmérsékleten és 37°C-on is elvégeztünk. A vérkép vizsgálata Sysmex hematológiai automatán történt (Sysmex, Kobe, Japán). A thrombocytá funkció vizsgálata során Surgicutta template-ot használva (Edison, NJ) meghatároztuk a vérzési időt. A PFA-100 záródási időt mind kollagén/ADP, mind

kollagén/adrenalin patron felhasználásával meghatároztuk (Siemens/Dade-Behring). A thrombocyta aggregáció és szekréció vizsgálata Chrono-log lumiaggregométeren történt (Chrono-log, Havertown, PA). A von Willebrand betegség vizsgálata céljából meghatároztuk a von Willebrand faktor (vWF) antigén szintet immunturbidimetriás módszerrel és a riztocetin kofaktor aktivitást aggregometriás módszerrel, a szükséges reagenseket a Siemens/Dade-Behringtől szereztük be.

A FV antigén szint meghatározása egy házilag összeállított ELISA rendszerrel történt, ehhez két, birkában termeltetett, poliklonális anti-humán FV antitestet használtunk (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada). Első lépésben 100 μ L elfogó antitesttel (10 μ g/mL) fedtük az ELISA lemezt (Thermo Labsystems, Waltham, MA), melyet egy éjszakán át inkubáltunk 4°C-on. A fedő puffer egy 50 mM-os karbonát-puffer volt, pH 9,6. Második lépésben, a fedő puffer leöntését követően, a lemezen fennmaradó kötőhelyek blokkolása történt blokkoló pufferrel, mely PBS-t (phosphate-buffered saline: 1,15 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 0,2 g KCl, 8,0 g NaCl 1 L-ben, pH 7,4) és 1 % BSA-t (bovine serum albumin) tartalmazott. 90 perces 20°C-on történő inkubációt követően háromszor mostuk a plate-et mosópufferrel, mely PBS-ből és 0,1 % Tween-20-ból állt. Harmadik lépésben hozzáadtuk a mintákat, melyeket előzőleg 1/200 arányban hígítottunk HBS mintahígító pufferrel (100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1% BSA, 0,1% Tween-20, pH 7,2). Ismét inkubáció és mosás következett a már leírt módon. Negyedik lépésben történt a második, peroxidázzal konjugált, 100 μ L jelölő antitest (4 μ g/mL) hozzáadása. Az ismételt inkubáció és mosás után, ötödik lépésként hozzáadtuk a rendszerhez az o-feniléndiamin szubsztrátot. 15 perc elteltével a reakciót 50 μ L 2 M-os kénsavval állítottuk le és 490 nm-en ELISA lemez olvasón (Thermo Labsystems iEMS plate reader) lemértük az abszorbanciákat. A teszt kalibrációja Siemens/Dade-Behring Standard Human Plasma-val történt, normál és patológiás kontrollként Siemens/Dade-Behring gyári plazmákat használtunk. Az eredmények értékelése és a referencia görbe felvétele a standard humán plazmából végzett hígítások abszorbancia értékeit felhasználva történt négyparaméteres logisztikus illesztést alkalmazva.

A thrombocyta izolálás Muszbek és munkatársai szerint történt (97). Az egész folyamat alatt 37°C-os hőmérsékletet biztosítottunk. Thrombocyta dús plazmát (PRP) 0,18 μ M prosztaglandin E1-et (PGE1) tartalmazó acid-citrát-dextrózzal antikoagulált vérből nyertünk 15 perces 120 \times g-vel történő centrifugálással. A PRP-ben lévő thrombocyták plazmától történő szeparálása 15 perces 1300 \times g centrifugálással történt. Ezt követően a thrombocytákat reszuszpendáltuk az „A” oldatban (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM

MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 0.5 mM NaH₂PO₄, 1 mg/ml glükóz, 10 mM HEPES, pH 7,4), mely tartalmazott 3,6 mg/ml BSA-t, 1 U/ml apiráz és 0,3 µM PGE1-t. 1100×g-vel történő, 15 perces centrifugálással ismét izoláltuk a thrombocytákat és reszuszpendáltuk az előzőekben leírt összetételű „A” oldatban. A vérlemezkéket ismét lecentrifugáltuk 1100×g-vel 15 percig, majd felvettük őket az „A” oldatban, mely most csak 1 U/ml apiráz tartalmazott. A thrombocytaszámot a végleges szuszpenzióban 1000 G/L-re állítottuk be valamennyi mintában, a vérlemezkék lizálása Triton X-100 hozzáadásával (1%-os végkoncentráció) történt. A thrombocytából történő FV antigén szint meghatározás hasonlóan zajlott, mint plazma minták esetén. A kapott eredmények értékelése és a referencia görbe felvétele egészséges egyénektől nyert thrombocyták lizátumával történt. A hígításokkal mért abszorbancia értékek illesztését itt is négyparaméteres logisztikus módszerrel végeztük.

A rutin klinikai kémiai vizsgálatok (vesefunkció, májfunkció vizsgálata, CRP meghatározás) a beteg szérumból a Laboratóriumi Medicina Intézetben Roche Integra 800 analizátoron (Roche, Mannheim, Németország) történtek.

3.1.2.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok

Perifériás fehérvérsejtekből DNS-t izoláltunk QIAamp DNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország). A F5 gén 25. exonjának és az exon-inton határoknak az amplifikálásához van Wijk és mtsai (12), valamint Ajzner és mtsai (98) által leírt primereket használtuk. Van Wijk és munkatársai által közölt cikk alapján szereztük be a forward (F) és reverz (R) primereket a 3., 4., 6., 9-12., 14-16., 18-20. és 23. exonokhoz (12). Az 1., 2., 5., 7., 8., 13., 17., 21., 22., 24. és 25. exonokhoz szükséges F és R primereket pedig Ajzner és mtsai által publikált cikk alapján rendeltük. A nagyméretű 13. exon amplifikálásához négy primerpárt használtunk (13A, 13B, 13CD és 13E), melyek négy átfedő szekvencia fragmentumot eredményeztek (99). A szintézist valamennyi primer esetében az IDT cégtől (Coralville, IA) rendeltük. A PCR reakciók összetétele: 100 ng genomiális DNS, 10 pmol F és R primer a 2. exon, 20 pmol F és R primer a 13CD esetében, 5 pmol F és R primer a fennmaradó exonok esetében, 2 U Taq polimeráz (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA), PCR puffer (Applied Biosystems), 0,8 mM dNTP Mix (Applied Biosystems) 50 µL végtérfogatban, a ciklusok száma 40 volt. A hibridizációs hőmérséklet 55-60°C között változott exontól függően: 55°C a 21., 56°C a 13E, 59°C a 13A, 60°C az 1., 12. és 13B, 58°C a fennmaradó exonok esetében. Az általunk használt PCR készülék a GeneAmp

PCR System 9700 (Applied Biosystems) volt. A PCR termékek minőségét agaróz gél (Roche) elektroforézissel ellenőriztük. A megfelelő minőségű PCR termékek tisztítása Microcon YM-100 (Millipore, Billerica, MA) oszlopon történt. A folyamat két centrifugálásból állt, az első 25°C-on, 2200 rpm-en (500g) 12 percig, ekkor a membrán által átengedett anyagot eltávolítottuk, a második centrifugálás szintén 25°C-on történt, de 3200 rpm-en (1000g) 3 percig, ennek eredményeképpen kaptuk a tisztított PCR terméket. A következő lépés a szekvenáló reakció kivitelezése volt, melyhez BigDye Terminator CycleSequencing Reaction Kit-et (Perkin-Elmer Biosystems, Waltham, MA) használtuk. A reakciók összetétele: 4 µL Terminator Ready Reaction Mix, 4 µL Sequencing Buffer, 4 µL, 0,8 pmol/µL koncentrációjú F vagy R primer (külön reakciókban adtuk hozzá a kétféle primert) és 8 µL tisztított PCR termék, melyhez előzőleg 15 µL desztillált vizet adtunk. Ismét a már fent említett PCR készüléket használtuk, a következő protokoll szerint: 96°C-on 30 sec, 50°C-on 15 sec és 60°C-on 4 min, a ciklusok száma 25 volt. A következőkben megtisztítottuk a szekvenált terméket DyeEx Spin Kit-et használva (Qiagen), a gyártó utasításának megfelelően. A mintákat végül vákuumcentrifugában szárítottuk 20 percig 60°C-on (vacuum concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Germany). A szárított mintákhoz 15 µL formamidot (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) adtunk, előkészítve azokat a kapilláris elektroforézisre. A mintákat MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate lemez zárható reakciócsöveibe pipettáztuk (Applied Biosystems), majd 3100 Genetic Analyzer 96-Well Plate Septa (Applied Biosystems) segítségével zártuk az összes reakciócsövet. A plate-et 3 percre 95°C-os termosztátba, majd azonnal jégre helyeztük. A DNS fluoreszcens direkt szekvenálása ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer-n történt (Applied Biosystems), az értékeléshez Sequencing Analysis 5.1.1 szoftvert használtunk.

3.1.2.3. Molekulamodell

A mutáció (egy H α hidrogén helyettesítése egy nagy kiterjedésű poláris oldallánccal) sztérikus következményeinek feltárására állandó részecskeszám (N), nyomás (P) és hőmérséklet (T) mellett rövid (20 ns) molekuladinamikai szimulációt végeztünk 2 fs-os lépésközt választva. Az Orban és mtsai (100) által közölt szerkezetből kiinduló szimuláció során OPLS-AA erőteret (101), TIP3P explicit vízmodellt (102) és periodikus határfeltételt, míg a nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatás számolására PME (Particle Mesh Ewald) (103) módszert alkalmaztunk. Az OPLS-AA („optimized potentials for liquid simulations- all atoms”) egy empirikus erőter, melyet molekuláris szimulációkhoz szoktak

használni. Ez egyrészt egy potenciálfüggvény, amely az atomok között ható erők analitikus formáját adja meg (kötésnyújtástól a torziós potenciálon át a nem kötő van der Waals és Coulomb potenciálig), másrészt az atomi méreteknek megfelelően, a fenti potenciálfüggvény adott rendszerre történő alkalmazáshoz szükséges további paraméterekeket tartalmazza (101). A TIP3P vízmodell egy három-pontos, azaz a víz három atomjával expliciten számoló modell. A paraméterek, melyek az O-H távolság, a H-O-H szög és az atomok parciális töltése (102). Ewald (Ewald P. (1921) "Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale", Ann. Phys. 369, 253–287. doi:10.1002/and p.19213690304) fejlesztett ki egy módszert kristályok (periodikus rendszerek) elektrosztatikus kölcsönhatásának számítására. A módszert Darden és Pedersen és mások fejlesztették tovább (Darden T, Perera L, Li L and Pedersen L. (1999) "New tricks for modelers from the crystallography toolkit: the particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations", Structure 7, R55–R60, doi:10.1016/S0969-2126(99)80033-1.) nagy (biológiai) rendszerek csonkításmentes elektrosztatikus kölcsönhatásának számítására úgy, hogy az eredetileg atomokon centrált parciális töltéseket rácspontokra vetítették, gyors Fourier transzformációt alkalmaztak és számolták a periodikus rendszer (a PBC=periodic boundary condition, azaz a periodikus határfeltételnek megfelelő dobozban levő) részecskéi közötti kölcsönhatásokat (103). A szimulációt a Gromacs programcsomaggal (van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. Groningen Machine for Chemical Simulations (GroMaCS) version 3.3, <http://www.gromacs.org>) végeztük, az eredmények vizualizálására a VMD (Visual Molecular Dynamics) (104) programcsomagot használtuk.

3.2. XIII-as faktor deficiencia

3.2.1. Betegek

Két, súlyos vérzéses tünetekkel rendelkező beteget vizsgáltunk, egy újszülött fiút Hollandiából, Bredából (proband1) és egy 13 éves lányt Belgiumból, Gentből (proband2).

Proband1

Egy egy hetes újszülöttet vettek fel sárgaság és cephalhematoma miatt a hollandiai Bredában található Amphia Kórház újszülött osztályára. A gyermek egy bába által felügyelt komplikációmentes otthonszülés során született terminusra 3450 grammal. A családban nem fordult elő véralvadási zavar. Az egyéb tekintetben egészséges gyermeknél kifejezett sárgaság és nagy kiterjedésű temporo-occipitális cephalhematoma alakult ki. Három-négy napon keresztül fototerápiával kezelték, majd a 10. napon egészségesen bocsátották otthonába. Két

nappal később újra felvették köldökcsomk vérzés miatt. A lokális nyomókötés és vérzéscsillapító zselatin szivacs alkalmazása ellenére a köldökcsomk vérzés nem állt el. Rutin hemosztázis szűrőtesztek (APTI, PI, TI), fibrinogén szint és thrombocyta szám a referencia intervallumban volt. A FVIII szintje 211%, a FIX szintje 67% volt. Nagy dózisú K vitamin (5 mg) és tranexámsav adása hatástalan volt, míg friss fagyasztott plazma egyszeri dózisa (10 ml kg⁻¹ testsúlykilogramm) azonnal megállította a vérzést. A nem traumás szülés ellenére kialakuló jelentős cephalhematoma és a köldökcsomk vérzés kombinálódása felvetette öröklött FXIII deficiencia lehetőségét. Ezt a vérzéssel epizódot követően a gyermeknél enyhe vérzékenységet vettek észre, és igény szerint FXIII koncentrátum adását jelentő faktorpótló terápiában részesült.

Proband2

Egy nem rokon, vérzékenység szempontjából negatív anamnézissel rendelkező európai szülők első lánygyermekénél 13 éves korában diagnosztizáltak öröklött FXIII deficienciát a belgiumi Gent University Hospital-ban. Harminckilencedik terhességi hétre született. Születést követően nem volt köldökcsomk vérzése. Három éves korában egy kisebb fejsérülést követően kialakult extradurális hematoma miatt hospitalizálták, melyet követően koponyalékelést végeztek. A hemosztázis szűrőtesztek (PI, APTI) és thrombocyta szám referencia tartományon belül volt. Von Willebrand (VWF) faktor antigén szint és aktivitás, valamint a thrombocyta funkcionális tesztek normál eredményűek voltak. A későbbiekben számos alkalommal fordultak elő kifejezett, de felszínes horzsolásos sérülések testszerte, melyek még gyermekbántalmazás lehetőségét is felvetették. Tizenkét éves korában egy, a jobb lágyékáról történt pyogen granuloma eltávolítását követően súlyos sebgyógyulási zavar jelentkezett. A sebgyógyulás alatt hányingere és hasi panaszai voltak. Ultrahang vizsgálat és MRI egy hasüregi masszát jelzett a bal petefészek közelében. Exploratív laparotomia során masszív vérzést találtak (legvalószínűbben az első ovulatio során bekövetkezett folliculus repedésből adódóan) és 1150 mL vért távolítottak el.

3.2.2. Anyagok és módszerek

3.2.2.1. Hemosztázis laboratóriumi vizsgálatok

Az alapvető laboratóriumi vizsgálatokat a megfelelő kórházakban elvégezték, a részletes laboratóriumi kivizsgálás és a molekuláris genetikai vizsgálatok Magyarországon, tanszékünkön történtek. A gyermekek szülei és családtagjai tájékozott beleegyezésüket adták a vizsgálatokhoz és a tanulmány mindenben megfelelt a Helsink Deklarátumban

foglaltaknak. A FXIII aktivitás és antigén szint meghatározásokat plazmából és thrombocyta lizátumból a Kárpáti és munkatársai (22,105) által kidolgozott módszer kis módosításával végeztük TECHNOCHROM[®] FXIII kit felhasználásával (Technoclone, Bécs, Ausztria). Mosott thrombocyta szuszpenziót a korábban leírtaknak megfelelően készítettünk (97). A 0,109 mol/L trinátrium citráttal alvadásgátolt plazmát és thrombocyta granulátumot lefagyasztották és száraz jégen küldték Debrecenbe futárpostával. A fagyasztott thrombocytát 1% Triton X-100-ban oldottuk. A thrombocyta lizátum fehérje koncentrációját BCA Protein Assay Reagent használatával határoztuk meg (Pierce, oud-Beijerland, Hollandia). TECHNOZYM[®] FXIII Ag, FXIII-A SUB és FXIII-B SUB ELISA-kat használtunk (Technoclone) rendre a FXIII-A₂B₂ komplex antigén szint meghatározásra plazmában (106), FXIII-A antigén szint meghatározására plazmában és thrombocyta lizátumban (107) és FXIII-B antigén szint meghatározásra plazmában.

3.2.2.2. F13A1 gén mutáció analízis

A genomiális DNS izolálása perifériás fehérvéresejtekből történt QIAGEN Blood kit-tel (Hilden, Németország). A teljes kódoló régiót, az exon-intron határokat és a F13A1 gént és promóter régióját PCR reakciókban amplifikáltuk az 1. táblázatban található primerek használatával. A végtérfogat 50 µL volt, ez 5 pmol primert, 100 ng genomiális DNS-t, 0,25 mM dNTP-t (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 25 U/mL GoTaq Hot Start Polimerázt (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 2,0 mM MgCl₂-ot és 10 µL PCR puffert (Promega) tartalmazott. A mintákat 95°C-on 10 percig denaturáltuk, majd 1 perc denaturálásból (95°C), 1 perc hibridizációból (61°C a 9-es és 15-ös exonok, 57°C a 4-es és 13-as exonok vagy 55°C a maradék exonok esetében) és 1 perc extenzióból (72°C) álló 40 ciklus következett. Egy végső, 7-perces extenziós lépés egészítette ki a szintézist. A PCR termékeket tisztítottuk és direkt szekvenálást végeztünk a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) és ABI PRISM 3130 DNA szekvenátor (Applied Biosystems) használatával. A szekvenáláshoz ugyanazokat a primereket használtuk, mint a PCR reakciókhoz. Az adatokat Sequencing Analysis 5.3.1 szoftverrel értékeltük és a National Center for Biotechnology Information GenBank adatbázisban elérhető F13A1 gén szekvenciával (accession No. NG_008107) hasonlítottuk össze. (A lánckezdő metionint nem tartalmazó hagyományos nukleotid és aminosav számozást használtuk.)

	Forward	Reverse
E1	5'-TACTCCCAGCAACTGGTTGC-3'	5'-CTGGCTCATAGGGTGCAGG-3'
E2	5'-CATGCCTTTTCTGTTGTCTTC-3'	5'-CTGGACCCAGAGTGGTGG-3'
E3	5'-GATTATTTTCTTCAACCCTTG-3'	5'-TCTACAATGCAACCCATGG-3'
E4	5'-AATGGCTTGTGAAATCAACC-3'	5'-GAAAATAAATGTCTGCCTC-3'
E5	5'-GTTTGGTAATAGTCACTATG-3'	5'-CAATAACAAATTTTAAGTGGC-3'
E6	5'-GCTTGCAGAGTGAACACTAG-3'	5'-GCAAATGACAGGTGTAACAG-3'
E7	5'-CCTTCTCACTTCTCACGGAC-3'	5'-AATGTCTTAGAGTGAAGTTCC-3'
E8	5'-GCTGGTGATGTGTTTAGCTG-3'	5'-CATCAGCCAATGCCATTGTC-3'
E9	5'-ATTACAGGCATGAGCCACTG-3'	5'-TCAGCAATGAAGCAAGTTCC-3'
E10	5'-TGGACAGAATTGGAGATGAC-3'	5'-AAACAGCACTTTCCTCCAGC-3'
E11	5'-ATGATGGCTAATGCTCTCC-3'	5'-GAACTCATCTCTGAGTGAC-3'
E12	5'-TTGCCTGTCATTATCTCTGG-3'	5'-GACAGCGAGTCTCACAAAG-3'
E13	5'-AAGTCTTGATGCCAGGCCTG-3'	5'-TCTGTTCCAGGATGAGACGC-3'
E14	5'-GCTGCTAATGACCTGCATTC-3'	5'-ACAGCTCTGCACTGCCTG-3'
E15	5'-GATCTTCCGAACCTCTCCTC-3'	5'-ATGCCAGGGTTCATCTCAGC-3'

1. táblázat. A *F13A1* gén amplifikálásához használt oligonukleotid primerek szekvenciái.

3.2.2.3. *FXIII-A mRNS* analízis

A vérminákat Tempus Blood RNS csövekbe (Applied Biosystems) gyűjtöttük a proband1-től, a szüleitől és két egészséges egyéntől. Az RNS izolálást Tempus 12-port RNA Isolation kit (Applied Biosystems) használatával végeztük. A teljes RNS reverz transzkripcióját elvégeztük First Strand cDNA Synthesis Kit-tel RT-PCR reakcióban 20 µL végtétfogatban, 1,6 µg oligo-p[dT]₁₅ (108) és 3,2 µg random primerek felhasználásával. A valós idejű PCR reakciókat SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Németország) mix-szel végeztük LightCycler 480 (Roche) készülékben duplikátumokban. A *FXIII-A* génexpressziót a foszfoglicerát-kináz 1 (*PGK-1*) expressziós szintjére normalizáltuk (109). A PCR reakciók 10 µL Master Mix-et (2x-es koncentráció), a referencia génhez (*PGK-1*) 300 nM primert, a *F13A1* génhez 600 nM primert tartalmaztak. Az F:5'-tcacgagcgttcacctgttc-3', R:5'-ctgcacatagaaagactgccc- 3' primereket és F:5'-cctggatggtcctggagtaa-3', R:5'-aggga

gtcactgctcatgct-3' primereket használtuk rendre a F13A1 gén 3-as és 14-15-ös exonjának amplifikálásához. Az amplifikáláshoz használt program 10 perc 95°C-os fűtésből, majd az alábbi lépésekből álló 40 ciklusból állt: 10 sec denaturálás 95°C-on, 30 sec hibridizáció 60°C-on és 1 sec extenzió 72°C-on. A relatív genomi expresszió számításához a $2^{-\Delta\Delta Cq}$ módszert használtuk (110).

3.3. Protein C deficiencia

3.3.1. Betegek

1. beteg

Purpura fulminans neonatorum igazolódott egy újszülöttnél. Az eset részletes ismertetését és klinikai tanulságait más értekezés használja fel a jövőben, ezért erre jelen értekezésben nem térünk ki.

2. beteg

Egy 50 éves nő érkezett háziorvosi beutalóval Egyetemünk Járóbeteg Szakrendelésére thrombophilia irányú szűrővizsgálatokra pozitív anamnézisére tekintettel és a thrombosis családi halmozódása miatt. Terhessége során 27 éves korában bal véna femoralis thrombosisa lett. 42 éves korában a thrombophilia szűrővizsgálatok FV Leiden mutáció hordozást, alacsony PC aktivitást és antigén szintet (részleteket lásd alább), emelkedett Lp(a) és átmeneti antikardiolipin (ACA) és béta-2-glikoprotein I ellenes antitest pozitivitást mutattak. 44 éves korában colitis ulcerosát diagnosztizáltak nála. 16 éves kora óta dohányzik (10-15 cigaretta/nap). A PC deficiencia diagnózisa óta K-vitamin antagonistá (acenokumarol) terápián van. A beteg édesanyjának alsó végtagi mélyvénás thrombosisa volt 38 évesen, bátyjának bal véna femoropoplitea thrombosisa volt 35 évesen, majd 44 éves korában tüdőembóliával szövődött jobb véna femorális thrombosisa volt. Két lánya (30 és 33 évesek) tünetmentes.

3.3.2. Anyagok és módszerek

3.3.2.1. Rutin laboratóriumi módszerek

A Na-citrátot (3,2%) tartalmazó vacutainer csövekbe vett vérmintákat 2500 rpm-en 25°C-on 20 percig centrifugáltuk. A DNS-t QIAamp DNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden,

Németország) izoláltuk perifériás fehérvérsejtekből. A plazmát és a DNS-t -80°C-on tároltuk további felhasználásig. A PI-t, az APTI-t és a TI-t kereskedelmi forgalomban elérhető reagensekkel (Innovin és Pathromptin SL, Siemens és Trombin idő reagens, Labexpert Kft) határoztuk meg Siemens BCS-XP koagulométeren. A fibrinogén koncentrációt Clauss módszerrel határoztuk meg. A FVIII aktivitást APTI-alapú alvadási tesztben határoztuk meg. A thrombophilia irányú vizsgálatokat ugyanazon a készüléken végeztük Siemens reagensek felhasználásával: AT aktivitás meghatározásra „Berichrom ATIII”, PS aktivitás meghatározásra „Protein S Ac” és PC aktivitás meghatározásra „Protein C clotting reagent”-t alkalmaztunk. A szabad PS antigén szintet Liatest PS (Diagnostica Stago) felhasználásával mértük meg. A PC antigén szintet kereskedelmi forgalomban lévő ELISA-val (Asserachrom PC, Diagnostica Stago) határoztuk meg. Lupus antikoaguláns (LA) szűrést APTT-LA reagenssel végeztünk (Diagnostica Stago), ACA-ket és anti-béta2-glikoprotein I antitesteket Quanta Lite reagensekkel (Innova Diagnostics Inc., USA) határoztuk meg, a FV Leiden és Prothrombin 20210A polimorfizmusokat valós idejű PCR reakciókkal és olvadási görbe analízissel detektáltuk Light Cycler 2.0-n (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA). Fenti, rutin hemosztazeológiai mérések és molekuláris genetikai vizsgálatok a Laboratóriumi Medicina Intézetben történtek, az ott alkalmazott protokollok szerint. A plazma homocisztein koncentrációk és lipid szintek meghatározását, a máj- és vesefunkciós tesztek szintén rutin laboratóriumi módszerekkel végeztük.

3.3.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR) és a PROC gén szekvenálása

Mind a 9 exon, mind az exon-intron határok és a PROC 5'-határoló részének amplifikálását elvégeztük a laboratóriumunkban tervezett primerpárok felhasználásával (2. táblázat).

	Forward	Reverse
E1	5' – ATGGGGCTAAAATGAGACC – 3'	5' – GCCTTGTGTCCTTTCACC – 3'
E2	5' – GCTATGTCTCTAGCGAACAA – 3'	5' – ATGGTGAAGCTGTGAAG – 3'
E3	5' – GGAGGAAAAGAGCAGAGGACC – 3'	5' – ACCCCACAACCTCCTAAG AGG – 3'
E4-5	5' – AGCACCAGCTCCTAGCAG C – 3'	5' – ATCCACCTCTCCCCCTCA – 3'
E5-6	5' – ATCTCTGGCCGCTGACCC – 3'	5' – CCTGCACCCAGCGTGATT – 3'
E7	5' – TGGTCTAAGTATCATTGGTTC C – 3'	5' – TCTTCCCTGAAGCATCC – 3'
E8	5' – CAGGCTGACACTGTAAAA TGG – 3'	5' – AGATTCGAAGAGGGCACC – 3'

E9A	5' – TGAACCTTCTTCAGGCC – 3'	5' – CTCATGACCTCGCTGCAC – 3'
E9B	5' – CAGCAGCCGAGAGAAGGA – 3'	5' – AGAAGAGCCCAAAAGAGGGA – 3'

2. táblázat. A PROC gén amplifikálásához használt oligonukleotid primerek szekvenciái.

A PCR reakciók összetétele mind a kilenc DNS fragmens esetén az alábbi volt: 100 ng genomiális DNS 0,2 μ mol forward és reverz primer (Integrated DNA Technologies, München, Németország), 2,5 U Taq polimeráz (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA), PCR puffer (Applied Biosystems), 1 mM dNTP Mix (Applied Biosystems) és 5% DMSO (Sigma-Aldrich, GmbH, Munich, Germany) 50 μ L végtérfogatban, 40 ciklus alatt. A hibridizációs hőmérséklet 57 °C volt az 1., 2., 7. és 8. exonoknál, és 62 °C a 3., 4-5., 5-6., 9A és 9B exonoknál. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük és centrifugálással tisztítottuk (Microcon YM-100, Millipore, Billerica, MA). A szekvenáló reakciók (BigDye Terminator CycleSequencing Reaction Kit, Applied Biosystems) 4 μ L Terminator Ready Reaction Mix-et, 4 μ L Sequencing Buffer-t, 4 μ L forward vagy reverz primert (0,8 pmol/ μ L) és 8 μ L tisztított PCR terméket tartalmaztak és a gyártó utasításai szerint végeztük a reakciókat. A termékeket tisztítottuk (DyeEx Spin Kit, Qiagen) és koncentráltuk (Vacuum Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Németország) a formamid (Sigma Aldrich GmbH) hozzáadása előtt. A fluoreszcens direkt szekvenálást ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer-en végeztük (Applied Biosystems), az értékeléshez a Sequencing Analysis 5.4 szoftvert használtuk. Az újabb ajánlásoknak megfelelően a PC aminosav számozása a lánckezdő metioninnál indul (111), bár a hagyományos számozás egy alanin reziduumnál kezdődött, mely az érett fehérje N-terminális részének első aminosava. Az érés során lehasadó pre-pro vezető szekvencia -42-től -1-ig tart. Mi az International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee által megadott számozást használjuk, melynek értelmében 42-t le kell vonni az aminosavak számából ahhoz, hogy a hagyományos számozás szerint kapjuk meg az aminosavakat.

3.3.2.3. A vad típusú, p.Asp77Gly, p.Ala163Glu, és p.Ala163Val mutáns PC fehérjék tranziens expressziója HEK293 sejtekben

A HEK sejteket 10% főtális borjú szérummal (FCS), 1% L-glutaminnal (Sigma-Aldrich) és gentamicin antibiotikummal kiegészített (Chinoin, Budapest, Hungary) Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (DMEM, Invitrogen) növesztettük. Az ORF-NM_000312-pcDNA3.1(+)

wt PC és variáns c.A230G, c.C488A, és c.C488T PC klónokat az ImaGenes GmbH-től rendeltük (Berlin, Németország) és One Shot® TOP10 kémiaiilag kompetens E. coli sejtekben szaporítottuk fel, majd QIAprep Spin Miniprep Kit-tel izoláltuk (Qiagen). A HEK sejteket párhuzamosan transzfektáltuk vad típusú és mutáns plazmidokkal. A transzfekció előtt a médiumot K-vitaminnal (Roche) egészítettük ki. A transzfekciót 6 µl FuGENE HD (Roche) reagens és 2 µg plazmid DNS felhasználásával végeztük hatlyukú plate-ben. Ötven óra inkubációt követően a médiumot összegyűjtöttük, a sejtek egy részét immunfestésre és konfokális lézer szkennig mikroszkópos vizsgálatokra (CLSM), más részét 50 mM Tris-HCl-t (pH 7,5), 150 mM NaCl-t, 1% Nonidet P40-t, 0,5% nátrium dezoxikolátot és proteáz inhibitor koktélt (Roche) tartalmazó lízis pufferben lizáltuk. A médiumok és a sejtízátumok frakcióit ELISA módszerrel (Asserachrom PC:Ag, Diagnostica Stago) történő PC antigén szint meghatározásra és Western blottingra használtuk. A transzfekció hatékonyságát FluoReporterR lacZ/Galactosidase Quantification Kit-tel (Invitrogen) határoztuk meg és az ELISA eredményeket ennek megfelelően korrigáltuk. A vad típusú és mutáns PC aktivitását a médiumban amidolítikus módszerrel (Berichrom PC, Siemens) mikrotiter lemezben és alvadási teszttel (Staclo PC, Diagnostica Stago) ST4 koagulométerben is meghatároztuk.

3.3.2.4. Western Blotting

Nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézist (SDS-PAGE, 5-20% grádiens) végeztünk nem redukáló körülmények között és a géleket polivinilidén difluorid (PVDF) membránra elektroblottoltuk, majd 3% zselatinnal blokkoltuk 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,5 körülmények között. A PC-t birka anti-humán PC antitesttel (Haematologic Technologies, Essex Junction, VT) detektáltuk, az antitestet 2000-szeres hígításban használtuk. Az immunreakciót anti-birka immunglobulint 1000-szeres hígításban tartalmazó Vectastain Elite ABC kit-tel (Vector Laboratories, Burlingame, CA) viteleztük ki és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Invitrogen) segítségével tettük láthatóvá.

3.3.2.5. A poliubikvitinált protein C detektálása

A poliubikvitinált PC arányának meghatározását a transzfektált sejtek lizátumában ELISA módszerrel végeztük, melyben a PC-t a mikrotiter lemezhez kötött poliklonális anti-PC antitesttel (Diagnostica Stago) fogtuk ki, a poliubikvitint torma peroxidázzal konjugált anti-poliubikvitin monoklonális antitesttel (CycLex Co. Ltd., Ina, Nagano, Japán) detektáltuk. A reakciót tetrametilbenzidin (TMB) szubsztrát hozzáadásával tettük láthatóvá, az optikai

denzitást 450 nm-en olvastuk le mikroplate olvasóban. A mutáns fehérjék poliubikvitináltságát az OD értékek PC antigén szintre történő normalizálása után határoztuk meg minden sejtlizátumban és a mutáns:vad típusú poliubikvitinált PC arányaként adtuk meg.

3.3.2.6. Immunfestés, konfokális lézer szkennig mikroszkópia és kolokalizáció analízis

A 96% etanolban és 1% ecetsavban fixált sejteket 5% normál humán szérummal inkubáltuk foszfát puffer oldatban 15 percig a nem specifikus IgG kötések megakadályozására. A PC-t nyúl anti-humán PC antitest (Sigma-Aldrich) 1:100 hígításával inkubáltuk 60 percig. A vizualizációhoz egy DyLight 488-al jelölt második antitestet (kecskében termeltetett anti-nyúl IgG, Vector, Burlingame, CA, 1:100 hígításban, 45 perc inkubációval) használtunk. A PC festést endoplazmatikus retikulum (ER), cisz-Golgi (CG), transz-Golgi (TG) vagy 26S proteaszóma markerre történő festéssel kombináltuk kettős immunfestéses reakciókban a vad típusú és a mutáns PC intracelluláris lokalizálására. Az ER marker calnexint egér monoklonális antitesttel (Abcam Ltd, Cambridge, UK, 1:10 hígítás, 45 perc) detektáltuk. A Cis-Golgi-t egér anti-Golgi 58K fehérje antitesttel (Sigma-Aldrich, 1:200 hígítás, 60 perc) jelöltük. Egér anti-mannóz-6-foszfát receptor elsődleges antitesttel (Abcam; 1:10 hígítás, 60 perc inkubáció) jelöltük a transz-Golgit. Végül, a proteaszómát 26S proteaszóma elleni egér monoklonális antitesttel (Abcam, 1:200 hígítás, 60 perc) vizualizáltuk. A monoklonális egér antitestek detektálásához DyLight 549-el konjugált ló anti-egér IgG második antitestet (Vector, 1:200 hígítás, 45 perc inkubáció) használtunk. Valamennyi reakciót szobahőmérsékleten végeztük, az antitestek hígításához és a mosási lépésekhez foszfát puffer oldatot (PBS) használtunk. Negatív kontrollként nem immun antiszérum azonos hígításait és idiotípusos egér immunglobulin preparátumokat használtunk a primer antitestek helyettesítésére. A keneteket Plan-Apochromat 63X/1,40 olaj objektívvel és szolid-fázisú lézerekkel felszerelt konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizsgáltuk (LSM 700, Zeiss Oberkochen, Németország). A fluoreszcens jelek szeparálását a VSD (változtatható szekunder dikroikus sugárnyalábosztó) fénytörő lencsékkel történő hatékony feldarabolásával párosított szelektív lézer excitációval (405 nm, 488 nm, 555 nm lézer vonalak) értük el. A fluoreszcens jelek kolokalizációját a képpárokban ZEN 2010 képpalkotó szoftverrel (Carl Zeiss Microscopy) és Protein Proximity Analyser (PPA) szoftverrel vizsgáltuk (www.anes.ucla.edu/~wuyong/). PPA során median filter technikával történő háttér redukciót követően a kolokalizációt a fehérje közelségi index-szel (protein proximity index, PPI1, PPI2) jellemeztük, mely számszerű érték megfelel a kolokalizált molekulák frakciójának

valamennyi csatornában ideális, háttértől és zajtól mentes képek esetén. Beállításainknak megfelelően a PPI1 jellemzi a PC különböző sejtorganellumokkal kolokalizált frakcióját, míg a PPI2 adja meg a PC-vel kolokalizáló sejtorganellumok arányát. A PPA módszer a többi meglévő megközelítéssel szemben magában hordozza annak előnyét, hogy minimalizálja a képek heterogenitásának és a széles spektrumú háttérnek a befolyásoló hatását és a median filter módszer alkalmazásával egységes és stabil megközelítést ad a háttér csökkentéséhez (112). Előbbi mellett a Pearson's korrelációs koefficiens is használtuk a kolokalizáció leírására. Manuális küszöbcsökkentést követően a kolokalizációt Manders szerint is jellemeztük az M1 és M2 kolokalizációs koefficiensek (113) megadásával a ZEN 2010 szoftverrel.

3.3.2.7. Molekulamodellezés

Mivel nem volt elérhető megfelelő, az aktivációs peptidet is tartalmazó kísérletes templát szerkezet a teljes PC-re, a teljes aktivált PC (APC) szerkezetet építettük fel helyette. Feltételezhető, hogy ennek csupán jelentéktelen szerkezeti hatása van az általunk vizsgált pozíciókra (a 163-as és főként a 77-es, valamint a hozzájuk közel eső aminosavakra). A 77-es aminosav nagyon messze van az aktivációs peptidtől, míg a 163-as aminosav egységet az EGF2-SP doménközti diszulfid híd választja el az aktivációs peptidtől. A teoretikus teljes hosszúságú APC modell a teljes hosszúságú aktivált IX-es faktor (IXa), a des-Gla APC (PDB ID: 3F6U) és az elérhető PC Gla domén fragment (PDB ID: 1LQV) minta alapján készült. Az utóbbit a FVII röntgenszerkezetéből (1DAN) ismert teljes Gla domén geometria alapján egészítettük ki. A Gla és az EGF1 domén közé eső, újonnan épített hurok szerkezetet a Schrödinger programcsomag Prime moduljával (114) finomítottuk. A röntgen-diffrakciós szerkezetből hiányzó aminosav egységeket a Yasara programcsomaggal (115) pótoltuk. A modell minőségét a Procheck programmal ellenőriztük. A p.Ala163Val és a p.Ala163Glu mutációk szerkezet-stabilitásra gyakorolt hatását molekuladinamikai szimulációkkal tanulmányoztuk. A virtuális mutációkat a Yasara programcsomaggal hoztuk létre. Mivel ezek a mutációk az SP doménhez közel eső EGF2 domén felületén helyezkednek el, ezért csak ezeket a doméneket vizsgáltuk. Összehasonlításképpen, ugyanezeket a szimulációkat szintén elvégeztük a vad típusú fehérjén. A felépített szerkezetekhez tartozó energiát a Gromacs szoftvercsomaggal (116) minimáltuk. Az energiaminimálás annyit jelent, hogy a rendszer energiáját a geometriai paramétereket figyelembe véve a lehető legkisebbre állítjuk be megkeresve az adott paraméterek által meghatározott függvény minimumát. A

minimumkereső algoritmusok általában olyanok, hogy csak a kiindulási ponthoz legközelebbi lokális minimumot képesek megtalálni. Ezért szükségesek a potenciálfelület teljesebb feltérképezésére más algoritmusok, pl. dinamikai szimulációk. A Ca^{2+} és Na^+ ionokat, valamint a szerkezeti vízmolekulákat az eredeti röntgendiffrakciós felvétel alapján megtartottuk. A szolvatált modelleket dodekaédres „boxba” helyeztük. A doboz („box”) fala és a fehérje falhoz legközelebb eső atomjának távolságát 12 Å távolságra állítottuk be. Az így előállított rendszereket neutralizáltuk, majd Na^+ és Cl^- ionok hozzáadásával az ionerősséget 0,15 mol/dm³-re állítottuk be. A 310 K-re való felfűtéséhez „*simulated annealing*” módszert alkalmaztunk, majd 200 ns szimulációt futtattunk állandó részecskeszám (N), és állandó nyomás (P=10⁵ Pa) és állandó hőmérséklet (T=310K), valamint periodikus határfeltétel mellett. A „*simulated annealing*” gyakorlatilag programozott felfűtést jelent. Ahhoz, hogy a dinamikai szimulációt az adott hőmérsékleten tudjuk végrehajtani, a röntgen-krisztallográfiás szerkezeteken (annak pontatlanságából eredő nagy erők és a rendszer „felrobbanásának” megelőzése céljából) előbb geometriai optimalást kell végrehajtani, azaz megtalálni a belső koordináták függvényében a kiindulási szerkezethez legközelebb levő energiaminimumnak megfelelő geometriai paramétereket. Ezt követően az így „befagyasztott rendszert” a szimuláció hőmérsékletére (310K (~37 °C)) kell felfűteni. Ha egyszerre közölnénk az ennek a hőmérsékletnek megfelelő kinetikus energiát a rendszerrel, előfordulhat, hogy a rendszer egy közeli mélyebb energiaminimum felé indul el (a kinetikus energia elég ahhoz, hogy átsegítse az esetleg létező kis potenciális energiagáton). A mélyebb minimum felé haladva plusz kinetikus energiát nyer a rendszer, amely esetleg már olyan nagy sebességeknek felel meg, amely a rendszer szétrobbanásához vezet. A „*simulated annealing*” módszer ezt úgy küszöböli ki, hogy kis lépésenként fűti fel a rendszert, időt engedve annak, hogy minden lépésnél egyensúly alakuljon ki, így kerülve el a túl nagy sebességet és a rendszer „felrobbanását”.

OPLS-AA (101) fehérje erőteret és TIP3P explicit vízmodellt (102) alkalmaztunk. A rövid hatótávolságú elektrosztatikus és van der Waals energiagagok kiszámításakor 10 Angströmös „*cut-off*” távolságot állítottunk be, míg a nagy hatótávolságú elektrosztatikus energia korrekciókat a részecskehálós Ewald (PME) módszer segítségével vettük figyelembe (103). A virtuális pozíció protokoll lehetővé tette, hogy 4 fs-os lépésközt alkalmazzunk a számítások során. A szimulációk kivitelezéséhez és a trajektóriák elemzéséhez a Gromacs szoftvercsomagot használtuk. A fehérjeszerkezet megjelenítéséhez a VMD (104) és Chimera 1.7 programokat (107) vettük igénybe.

4. Eredmények

4.1. FV deficiencia

4.1.1. Laboratóriumi eredmények

A PI (11,3 sec) a referencia tartomány (8,7–11,3 sec) felső határán volt, az APTI megnyúlt (45,9 sec; referencia intervallum 28,3–41,0 sec), míg a TI és a fibrinogén szint normál volt. Gátlótest jelenlétét keveréses vizsgálattal kizártuk. A FV aktivitása két független mintavételből is csökkentnek bizonyult. A FV antigén szint a FV aktivitással közel azonos arányban volt csökkent a beteg plazmájában, valamint a thrombocytákban mérhető FV antigén szint is alacsony volt. Mindezek I-es típusú, enyhe FV deficienciára utaltak. Minden egyéb véralvadási faktor (beleértve a FXIII-t is) és az α 2-PI szintje normál volt. A thrombocyta szám referencia tartományon belül volt. A vérzési idő, PFA-100 záródási idő, a thrombocyta aggregáció és szekréció vizsgálatai nem mutattak eltérést. A von Willebrand faktor antigén és risztocetin kofaktor aktivitás normál volt, hasonlóan a máj-és vesefunkciós tesztek eredményeihez. A beteg fiatalabbik gyermeke hasonló laboratóriumi fenotípussal rendelkezett (3. táblázat).

4.1.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei

A beteg F5 génjében négy misszensz mutációt detektáltunk (3. táblázat). A c.2863 A>G (p.Lys897Glu) és c.5380A>G (p.Met1736Val) mutációk korábban már leírt, normál szekvencia variációk heterozigóta, míg a csendes, c.327A>G (p.Gln51) mutáció homozigóta formában volt jelen (10, 118-121). Az új, c.1651G>A (p.Gly493Arg) mutációra a beteg heterozigótának bizonyult. Ugyanezt a mutációt hordozza a beteg azonos laboratóriumi fenotípussal rendelkező lánya. Az apa és a nagyobbik lány e mutációra nézve vad típusú.

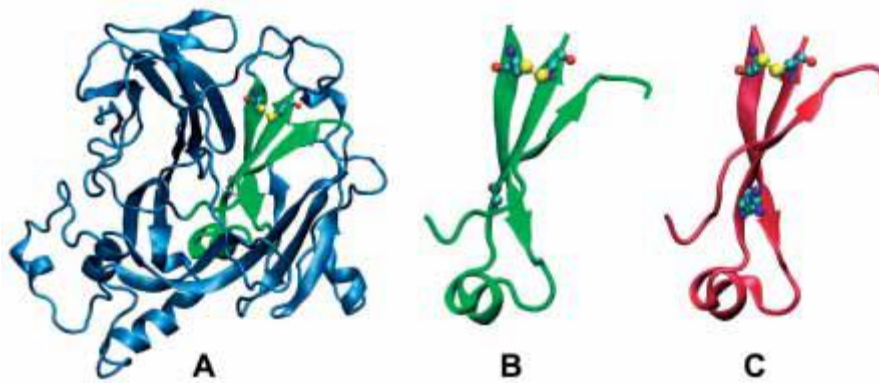
Annak igazolására, hogy nem egy gyakori polimorfizmusról van szó, elvégeztük száz, vérzékenységgel nem rendelkező egyén genetikai vizsgálatát. A p.Gly493Arg mutáció egyetlen esetben sem volt kimutatható. A hemosztázis laboratóriumi eredmények és a mutáció öröklődésmenetének vizsgálata alapján ez a mutáció a FV deficienciáért felelős genetikai eltérés.

	Genotípus				FV szint		
	c.327A>G p.Q51	c.1651G>A p.G493R	c.2863A>G p.K897E	c.5380A>G p.M1736	FV aktivitás a plazmában	FV antigén szint a plazmában	FV antigén szint thrombocyták -ban
Proband (Anya)	G/G	G/A	A/G	A/G	27%, 37%	38%	59%
Idősebbik lány- gyermek	A/G	G/G	A/G	A/G	86%	82%	97%
Fiatalabbik lány- gyermek	A/G	G/A	A/A	A/A	35%	33%	29%
Apa	A/A	G/G	A/A	A/A	119%	nincs meghatá- rozva	nincs meghatároz- va

3. táblázat. A proband és családtagjai V-ös faktor aktivitása, antigén koncentrációja és genotípusa a F5 gében talált mutációk tekintetében.

4.1.3. A mutáció lehetséges következményének vizsgálata molekulamodellezéssel

A Gly493 egy 27 aminosavból álló hurkon található, melyet a Cys472 és Cys498 között kialakuló diszulfid híd köt össze. Ebben a szerkezetben a 27 aminosavból 17, beleértve a Gly493-at, konzervált a humán FVIII, cörueloplazmin és a SwissProt adatbázisban elérhető különböző állatfajok FV molekulái megfelelő részében (122). A mutáció egy erősen hidrofób, zárt zsebben található (491LIG(R)LLLIC498). Egy nagyobb, erősen poláris, pozitívan töltött aminosav ilyen régióra kifejtett hatásának vizsgálatára molekula dinamikai szimulációt végeztünk állandó részecskeszám, állandó nyomás és hőmérséklet mellett a „protein data bank” pdb ID:1y61-ben megadott geometria alapján (100). A szimuláció eredménye azt sugallja, hogy az Arg oldallánca nem fér be a Gly kis α H „oldallancának” fenntartott (hidrofób) üregbe. Poláris guanidinium csoportja deformálja a közeli, szintén nagymértékben konzervált 390ILGPIIRAQVR400 β -redőt és megnyit egy csatornát a (poláris) oldószert környezete felé. Habár a mutációt közvetlenül a FV deficiencia fenotípushoz kapcsoló in vitro expressziós tanulmány nem készült, a molekulamodell megerősíti, hogy a lokális konformáció változás a régió instabilitásához, végső soron az A2 domén kóros feltekeredéséhez vezethet (5. ábra).



5. ábra. A FV A2 doménje és a p.Gly493Arg mutáció elhelyezkedése. A) A FV A2 domén 20 ns-os molekula dinamikai szimulációja során az utolsó 5 ns eredményei alapján átlagolt geometriai szerkezete. A Cys472 és a Cys498-határolta hurkot, melyben a p.Gly493Arg mutáció található, valamint a szomszédos 390ILGPIIRAQVR400 régiót zöld színnel jelöltük. B) A vad típusú (G493) FV A2 domén érintett részének szerkezete. C) A mutáns (R493) FV A2 domén érintett részének szerkezete. A szimulációkat Gromacs 3.3 molekuladynamikai csomaggal végeztük (*van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. Groningen Machine for Chemical Simulations (GroMaCS) version 3.3, <http://www.gromacs.org>*). A számításokhoz 2 fs-os lépésközt, OPLS-AA/L erőteret, TIP3P explicit vízmodellt, valamint periodikus határfeltételt választottunk. A távoli elektrosztatikus kölcsönhatások leírásához a részecskehálós Ewald módszert alkalmaztuk. A hurok kialakításában résztvevő Cys reziduumokat és a mutációban érintett aminosavakat golyó és pálca modell formában jelenítettük meg.

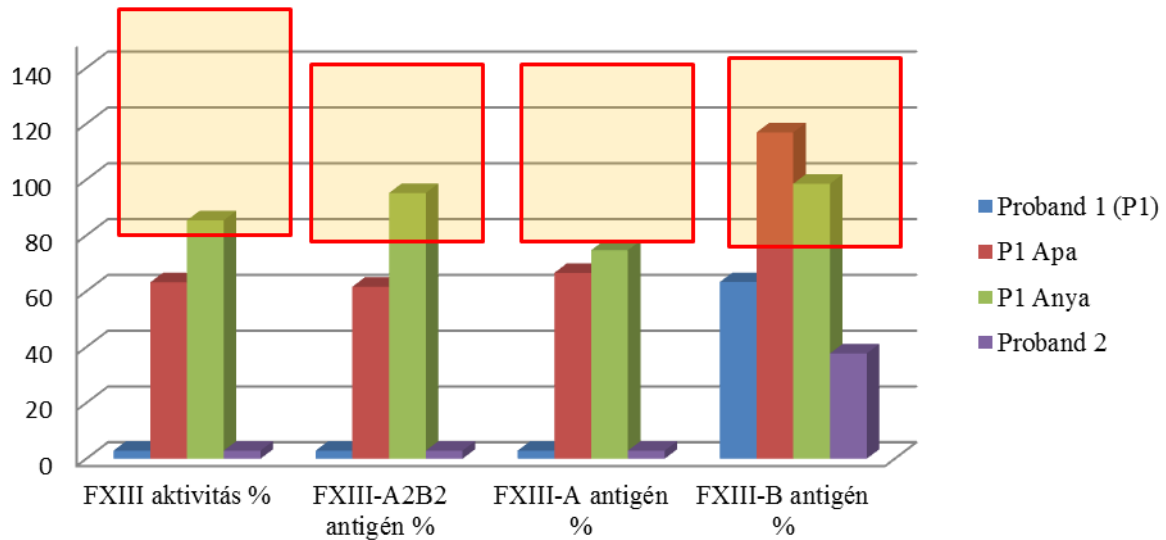
4.2. XIII-as faktor deficiencia

4.2.1. Proband1

4.2.1.1. Laboratóriumi eredmények

A holland eredményekhez hasonlóan mi sem tudunk FXIII-A₂B₂ és FXIII-A antigént detektálni a plazmában, míg a FXIII-B alegység koncentrációja a referencia intervallum alsó határán volt (6. ábra, 4. táblázat).

A Proband1 és szülei, valamint a Proband2 plazma FXIII aktivitása és antigén szintje



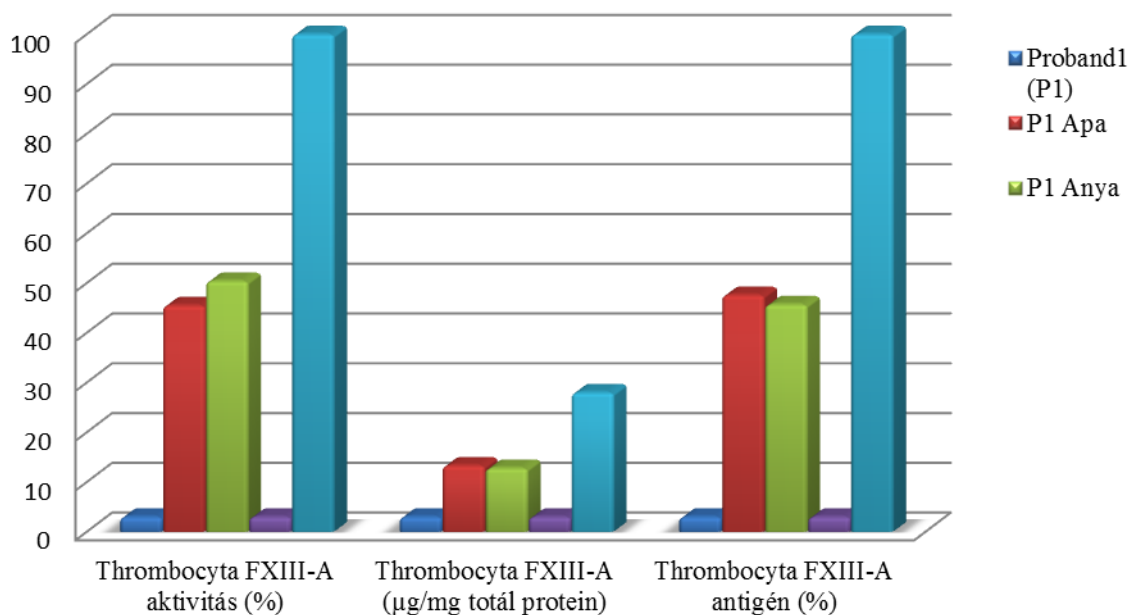
6. ábra. A betegek és a Proband 1 szüleinek plazma FXIII aktivitása és antigén szintje. A piros négyzetek a referencia tartományokat jelölik.

	FXIII aktivitás %	FXIII-A ₂ B ₂ antigén %	FXIII-A ₂ B ₂ mg/L	FXIII-A antigén %	FXIII-A mg/L	FXIII-B antigén %	FXIII-B mg/L
Proband 1 (P1)	<1%	<0,0045	<0,01	<0,03	<0,003	63,4	13,31
P1 Apa	63,3	61,7	12,9	66,7	7,14	117,0	24,58
P1 Anya	85,5	95,3	20,0	74,8	8,01	98,6	20,71
Proband 2	<1%	<0,0045	<0,01	<0,03	<0,003	37,8	7,93
referencia intervallum	69-143	67-133	14-28	67-133	7,1-14,3	64-136	12,4-26,6

4. táblázat. A betegek és szülők plazma faktor XIII (FXIII) aktivitása és antigén szintje. FXIII-A₂B₂, FXIII-A és FXIII-B antigén (ag) % szinteket a megfelelő, ELISA-val meghatározott mg⁻¹ tömeg koncentráció értékekből számítottuk.

A thrombocytákban a plazmához hasonlóan mind a FXIII aktivitás és FXIII-A aegység antigén szintje detektálási határ alatti volt (7. ábra, 5. táblázat).

A Proband1 és szülei, illetve a Proband2 thrombocyta lizátumban meghatározott FXIII aktivitása és antigén szintje



7. ábra. A Proband1 és szülei, illetve a Proband2 thrombocyta lizátumában meghatározott FXIII aktivitás és antigén szint. A kontroll értékek két egészséges egyén thrombocytaiból mért FXIII aktivitás és FXIII-A alegység antigén szint átlagát jelentik

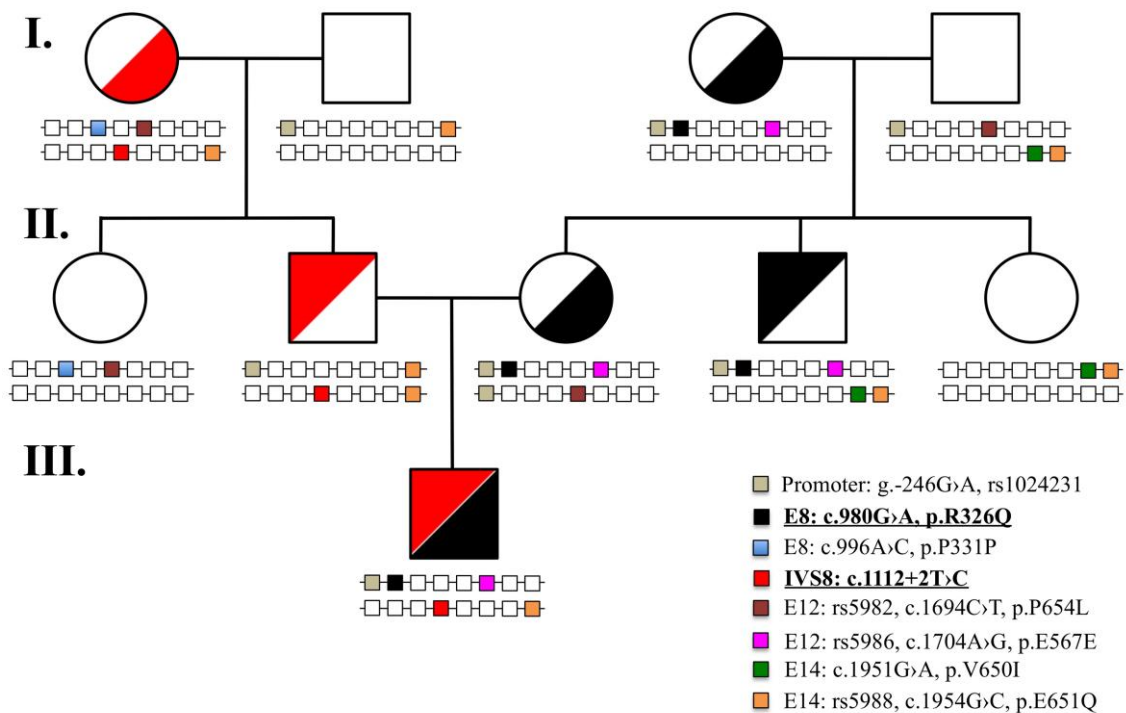
	Thrombocyta FXIII-A aktivitás (%)	Thrombocyta FXIII-A (µg/mg totál protein)	Thrombocyta FXIII-A antigén (%)
Proband1 (P1)	<1	<0,003	<0,01
P1 Apa	45,5	13,33	47,6
P1 Anya	50,4	12,8	45,7
Proband2	<1	<0,003	<0,01
Kontroll	100	28	100

5. táblázat. A betegek és szüleik thrombocyta lizátumban meghatározott factor XIII (FXIII) aktivitása és antigén szintje. A kontroll értékek két egészséges egyén thrombocytaiból mért FXIII aktivitás és FXIII-A alegység antigén szint átlagát jelentik.

4.2.1.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok

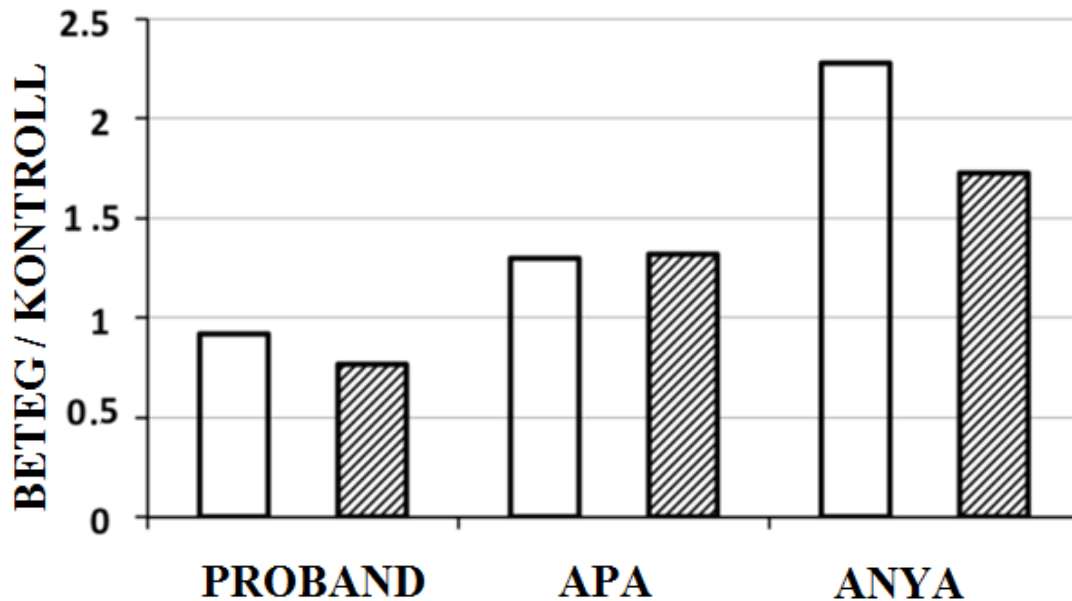
DNS szekvenálással két okozati mutációt találtunk a F13A1 génben (8. ábra). Egyik a 8-as exonban található c.980G>A csere, ami a 326-os pozícióban Arg-Gln cserét eredményez, Mikkola és munkatársai már közölték ezt az eltérést (32). A mutáció szintén jelen van

heterozigóta formában a beteg édesanyjánál, nagybátyjánál és anyai nagymamájánál. A másik okozati mutáció egy, a 8-as intronban található nukleotid csere (c.1112+2T>C), ami a 8-as exon kivágódásának zavarához vezethet. Ezt a mutációt apai ágon örökölte és az apai nagymama is hordozza. Ezt a genetikai eltérést még nem írták le és sem a FXIII mutációs adatbázis (<http://www.f13-database.de>), sem a Human Gene Mutation Database adatbázis (HGMD®; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) nem tartalmazza. A 6. ábra a talált polimorfizmusokat is tartalmazza a családban megfigyelt öröklési mintázattal együtt.



8. ábra. A proband1 három generációs családfája. Az egyéneket jelölő szimbólumok alatt a meghatározott polimorfizmusokat és az okozati mutációkat tartalmazó alléleket tüntettük fel. A színes négyzetek, amint azt az ábra jobb oldalán található magyarázatban feltüntettük, jelölik az egyedi polimorfizmusokat és mutációkat. A két új okozati mutációt vastagon szedtük és aláhúztuk.

A betegtől és szüleitől nyert teljes vér FXIII-A alegység mRNS tartalmát szintén meghatároztuk és egészséges kontrollokéval hasonlítottuk össze (9. ábra). A beteg vérében a FXIII-A alegység mRNS expressziója közel normális volt, érdekes módon az édesanyja vérében a specifikus mRNS valamelyest emelkedett volt.



9. ábra. Faktor XIII-A (FXIII-A) mRNS tartalom a proband1 és szülei vérében. A betegek és két kontroll vérében meghatározott FXIII-A alegység mRNS mennyiségét a referencia gén (PGK-1) mRNS-ére normalizáltuk. Az eredményt a betegek (proband vagy szülők) és a kontrollok mintáiban meghatározott normalizált FXIII-A mRNS arányában fejezzük ki. A kontroll érték két egészséges egyén mintáiban meghatározott FXIII-A mRNS mennyiség átlaga. Üres téglalap: exon 3 amplikonja, sötét téglalap: 14-15. exonok amplikonja.

4.2.2. Proband2

4.2.2.1. Laboratóriumi eredmények

Tekintettel arra, hogy a rutin alvadási és thrombocytá funkcionális tesztek, VW betegség irányú vizsgálatok, FVIII és FIX aktivitás normálok voltak, alvadék oldékonysági tesztet végeztek, mely pozitív lett súlyos FXIII deficienciát jelezve. A beteg plazmájának FXIII-A antigén szintje 4% alatti volt a HexamateTM latex immuno-assay-vel (MBL, Nagoya, Japán), míg édesanyja FXIII-A antigén szintje 72% volt. BERICHROM FXIII assay-vel (Siemens) 2,5%-os FXIII aktivitást mértek a beteg plazmájában a vakra történő korrekció nélkül. Ezt követően plazma és thrombocytá mintákat küldtek Debrecenbe a komplett laboratóriumi fenotípus meghatározásához és molekuláris genetikai vizsgálatokhoz. A plazma FXIII aktivitás, FXIII-A₂B₂ és FXIII-A antigén szintek a mi módszereinket alkalmazva (ahol a FXIII aktivitás meghatározás során minta vakra korrekció történik és a módszert

érzékenyítettük az igen alacsony FXIII aktivitás tartományban) detektálási határ alattiak voltak, csakúgy, mint a FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szint a thrombocyta lizátumban (4. és 5. táblázat). Ezen paraméterek megerősítették a súlyos FXIII-A alegység deficienciát. A FXIII-B antigén szint 37,8% volt a plazmában. Friss fagyasztott plazma posztoperatív adását követően a FXIII szint 22% lett. Ezt követően a beteg 30 U/kg FXIII koncentrátumot kapott (FIBROGAMMIN P; CLS Behring, Marburg, Németország). Tizennégy nappal később a FXIII szint 12% volt. Azóta 2-4 hetente profilaktikus faktorpótlásban részesül 10 U/kg FXIII-al.

4.2.2.2 Molekuláris genetikai vizsgálatok

A molekuláris genetikai analízis eredményeként egy homozigóta deléciót detektáltunk a 3-as exonban (c.215 delA), ami korai stop kodonhoz vezetett (a 74-es kodonban), ami megmagyarázza a súlyos deficienciát és a FXIII-A alegység hiányát a plazmában és a thrombocyta lizátumban. A beteg édesanyja heterozigóta volt ugyanazon mutációra, az édesapa nem volt elérhető a vizsgálatra.

4.3. Protein C deficiencia

4.3.1. A protein C deficiens betegek laboratóriumi fenotípusa és genotípusa

1. beteg

A PC aktivitás 1% alatti volt (a terminusra született 5 napos csecsemők normál értéke 42 ± 11 % (124), a PC antigén szint 5% volt. Az AT és PS aktivitás a kor szerinti referencia tartományban volt (rendre 60 és 60 %). A beteg nem hordozta a FV Leiden és a protrombin 20210A mutációkat. A PROC gén vizsgálatával megállapítottuk, hogy összetett heterozigóta volt a c.230A>G, p.Asp77Gly és a c.488C>A, p.Ala163Glu mutációkra.

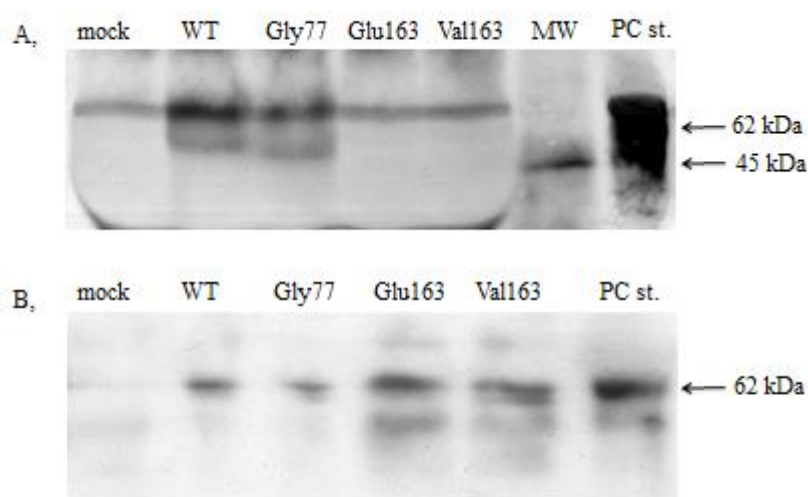
2. beteg

Esetében a PC deficienciát 24 éves korában diagnosztizálták terhességhez kapcsolódó mélyvénás thrombosis (MVT) alkalmával. A diagnózis idején 49% volt a PC aktivitása, 50% a PC antigén szintje. Heterozigóta formában hordozta a FV Leiden mutációt és magas Lp(a) szintje volt (606 mg/L). Más VTE rizikófaktora nem volt. A PROC szekvenálása esetében az új, c.488C>T, p.Ala163Val mutáció heterozigóta formában történő hordozását igazolta. A

beteg lányai nem örökölték a PROC mutációt, de mindketten hordozzák a FV Leiden mutációját. Más családtagok nem voltak elérhetőek a részletes laboratóriumi és genetikai vizsgálatokra.

4.3.2. A HEK 293 sejtekben expresszált vad típusú és mutáns protein C detektálása, koncentrációjának és aktivitásának meghatározása

A talált mutációk következményének vizsgálata során három különböző kísérletben határoztuk meg a vad típusú és a 77Gly, a 163Val és 163Glu mutánsok koncentrációját a médiumokban és a sejt-lizátumokban. A transzfekció hatékonyságát a FluoReporterR lacZ/Galactosidase Quantification Kit-tel határoztuk meg és a PC ELISA eredményeket ennek megfelelően korrigáltuk. A vad típusú fehérje antigén koncentrációja 0.142 ± 0.007 $\mu\text{g/mL}$ és 0.034 ± 0.003 $\mu\text{g/mg}$ protein volt rendre a médiumban és a sejt-lizátumban. A vad típusú és a mutáns PC fehérjék antigén koncentrációja nem különbözött jelentősen a sejt-lizátumokban (0.033 ± 0.002 , 0.019 ± 0.002 és 0.021 ± 0.002 $\mu\text{g/mg}$ protein rendre a 77Gly, 163Val és 163Glu PC esetében). A 77Gly mutáns koncentrációja mérhető volt a médiumban, de valamivel alacsonyabb volt a vad típusú fehérjéjénél (0.059 ± 0.001 $\mu\text{g/mL}$). A 163Val és 163Glu mutánsok koncentrációja detektálási határ alatt volt a médiumban. Mind a vad típusú, mind a 77Gly PC jól látható diszkrét sávként jelent meg a transzfektált sejtek mediumában Western blotting során (10. ábra). Ezzel ellentétben, a 163Glu és 163Val mutánsok médiuma esetében nem jelent meg sáv Western blot során. Az ELISA eredményekkel összhangban a vad típusú és valamennyi mutáns detektálható volt a sejtek lizátumában. Nem lehetett PC-t detektálni a negatív kontrollként alkalmazott „mock” mintákból.

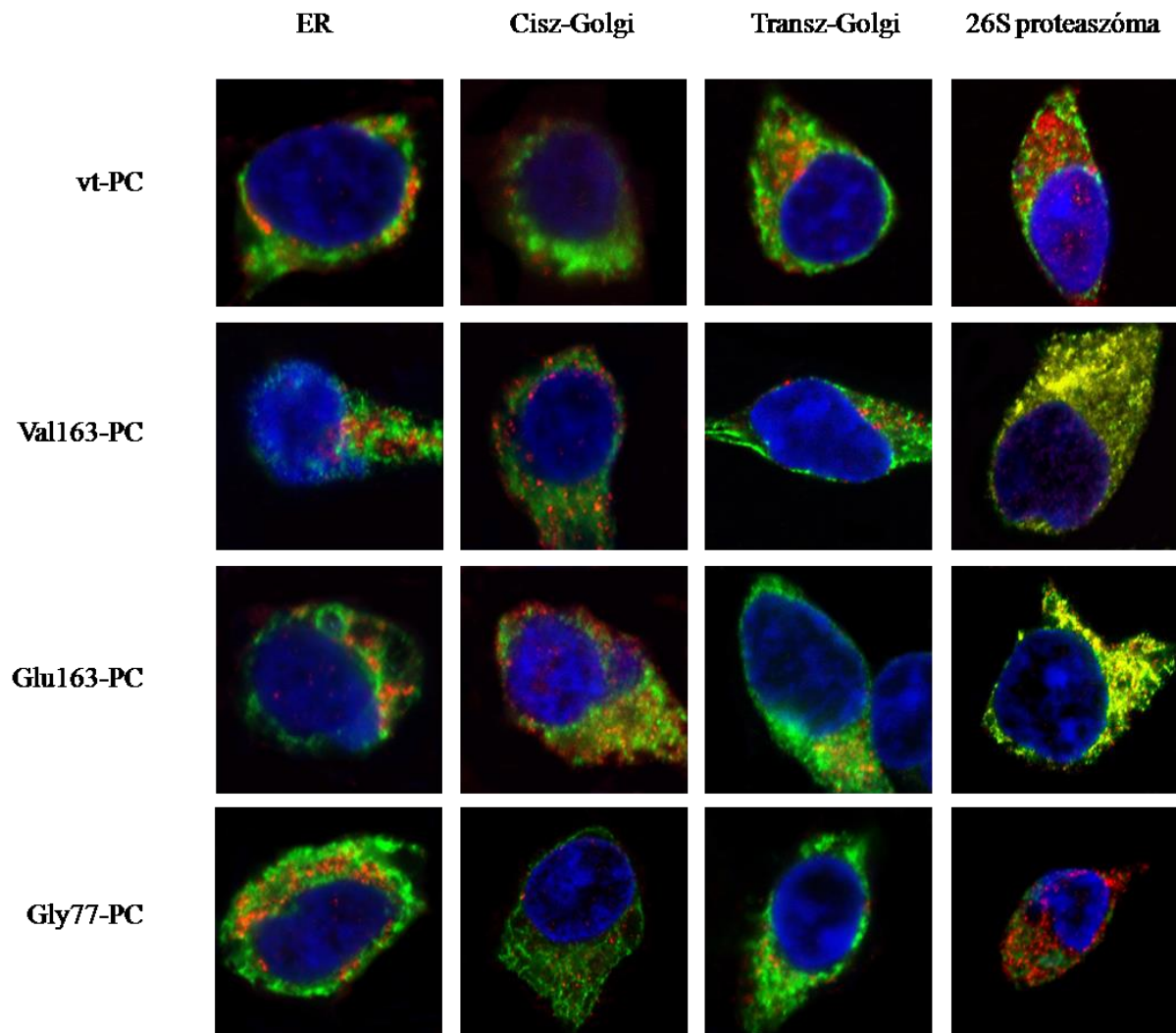


10. ábra. A vad típusú és mutáns protein C fehérjéket tartalmazó médiumok (A) és sejtlizátumok (B) Western blot analízise. Az SDS-PAGE elektroforézist 5-20% grádiens gélen végeztük nem redukáló körülmények között. A valamennyi mintában - beleértve a mock-ot is – detektált, a PC-nél nagyobb molekulatömegű fehérjé(ke)t jelölő sávok nem specifikus reakció eredményei feltehetően a médiumban jelenlévő főtális borjú szérum miatt. MT, molekulatömeg standard; PC st., tisztított humán protein C

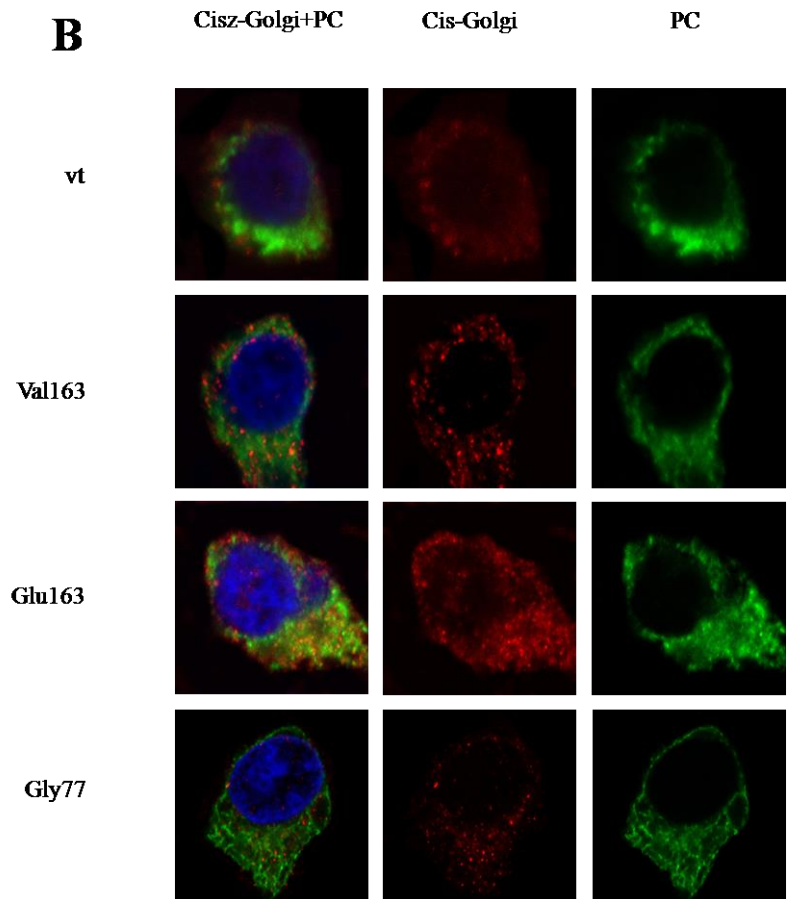
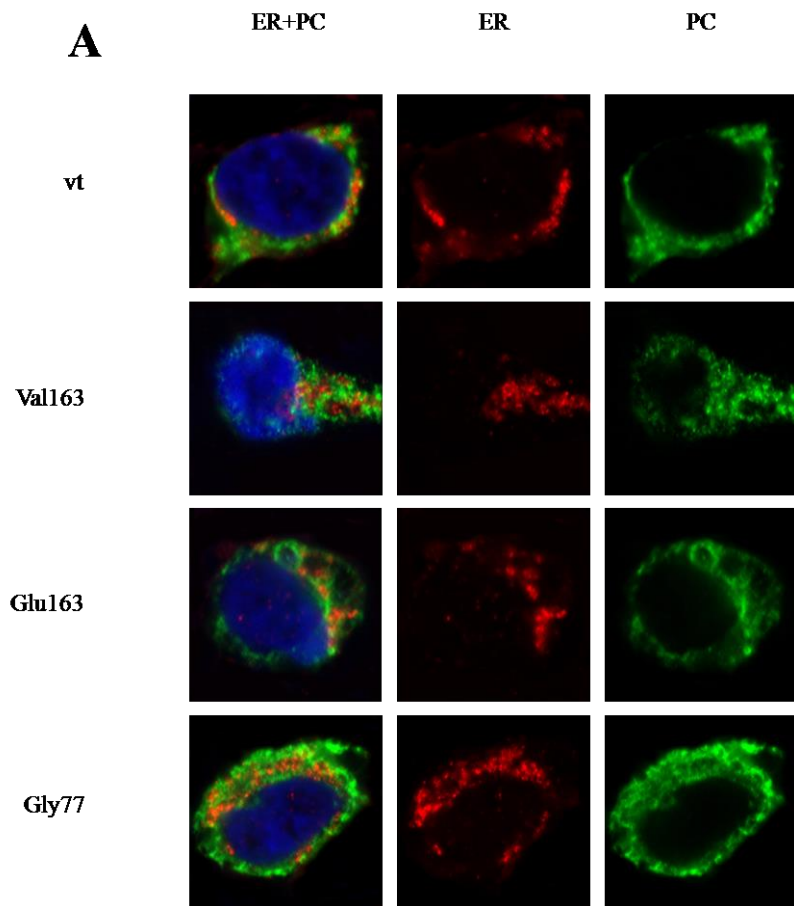
A 77Gly PC amidolítikus teszttel a médiumból történő aktivitás meghatározása során kapott eredmény összehasonlítható volt a vad típusú PC aktivitásával három különböző kísérletben ($77.5\% \pm 15.1\%$, a vad típusú PC aktivitását 100%-nak tekintve). Továbbá a 77Gly specifikus aktivitása (vagyis az egy mg PC fehérjére vonatkoztatott aktivitása) megegyezett a vad típusú PC-jével ($104.2\% \pm 28.4\%$, a vad típusú PC specifikus aktivitását 100%-nak véve). A mock transzfekcióból származó médiumban nem lehetett PC aktivitást detektálni, hasonlóan a 163Val és 163Glu mutánsok médiumához. A 77Gly PC aktivitása alvadási tesztben a vad típusú PC $80\% \pm 9.4\%$ -a volt. Az amidolítikus assay-hez hasonlóan, az alvadási teszttel sem lehetett PC aktivitást mérni a mock, a 163Val és 163Glu minták médiumából. Annak vizsgálatára, hogy van-e különbség a vad típusú és a 77Gly PC aktivációjának sebességében a médiumokat Protac-kal előinkubáltuk különböző időtartamon keresztül 1-től 10 percig terjedően és a mintákhoz APTI reagenst és kalcium-kloridot adva megmértük az alvadási időket. Nem volt különbség a vad típusú és 77Gly mutáns között ebben a tekintetben.

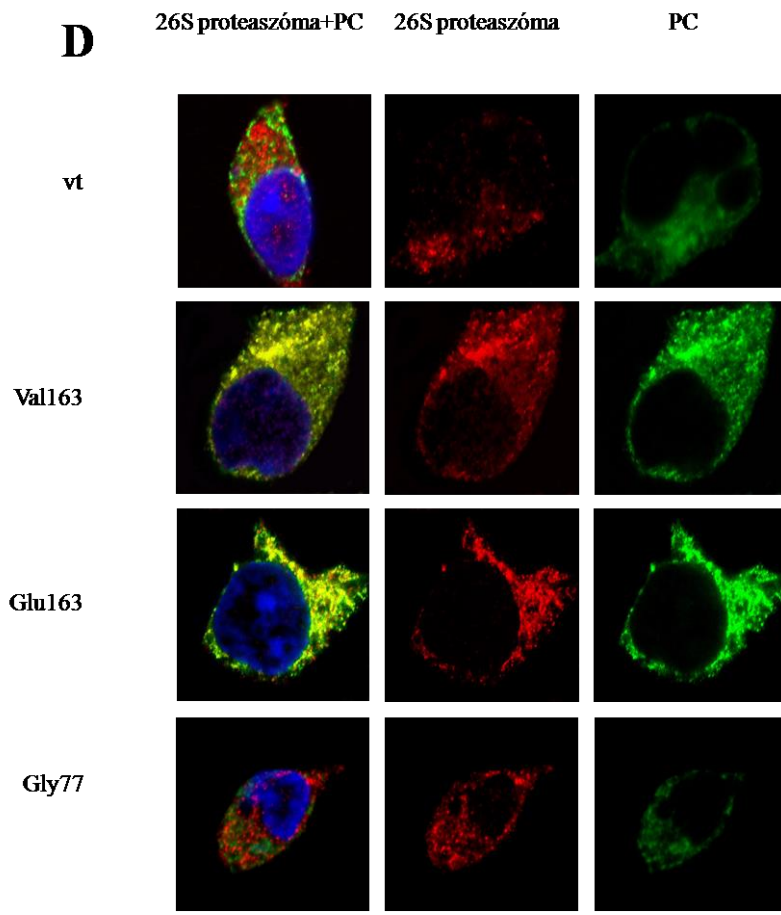
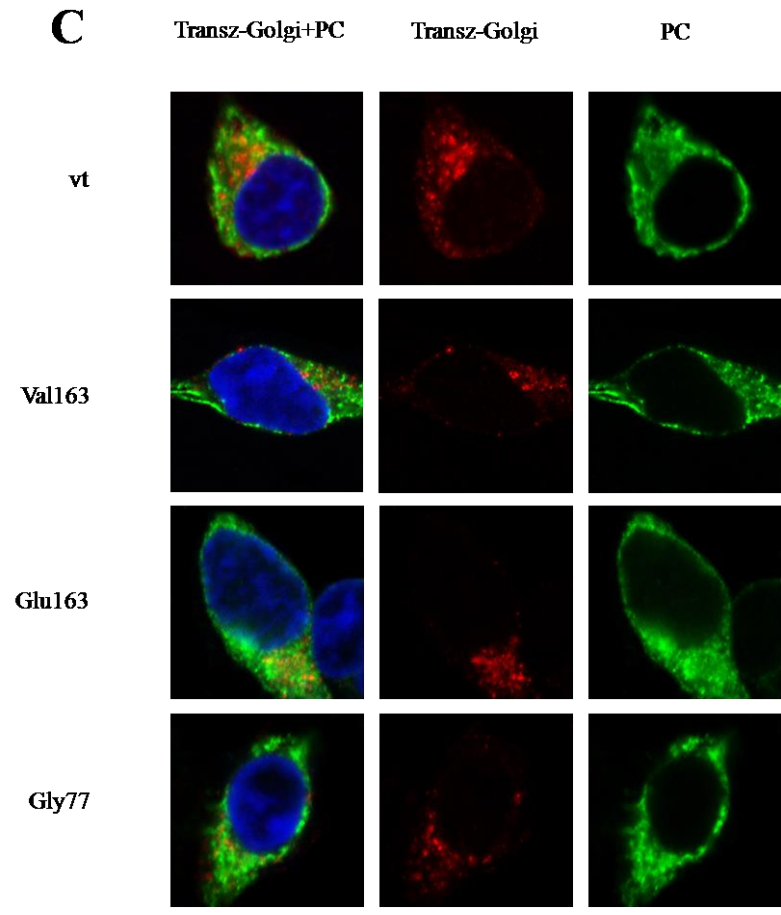
4.3.3. A vad típusú és mutáns protein C intracelluláris lokalizációja

A vad típusú, 163Val, 163Glu és 77Gly mutáns fehérjék intracelluláris lokalizációját immunfluoreszcens festéssel, majd konfokális mikroszkópos vizsgálattal tettük láthatóvá és kolokalizációs koefficiensek számításával kvantifikáltuk. Azon egyre inkább elterjedt törekvés ellenére, hogy két molekula kolokalizációjának mértékét numerikusan fejezzék ki különböző számítógépes technikákkal és matematikai módszerekkel, ezek az eljárások ma még sok hibát hordoznak. A kettős immunfluoreszcens festés kvalitatív analízise ezért továbbra is fontos szerepet játszik az adatok interpretációjában (11. és 12. ábra). Amint az várható volt, a vad típusú PC azonos mértékben volt jelen az ER-ben, a cis-és a transz-Golgiban és ezekkel a sejtorganellumokkal történő kolokalizáció PPA szoftverrel meghatározott értékei is hasonlóak voltak (6. táblázat). A vad típusú fehérjéhez hasonlóan a 163Val, a 163Glu és a 77Gly mutánsok is detektálhatóak voltak az ER-ben, a cis-és a transz-Golgi apparátusban. A 77Gly mutáns egyik sejtorganellummal sem mutatott kifejezett együttállást (11. ábra). A helyzet más volt a 163Glu és 163Val mutánsoknál, esetükben az egymásra illesztett felvételeken látható sárga szín mutatja a 26S proteasomában feltételezett akkumulálódást.



11. ábra. A vad típusú, a 163Val és 163Glu PC mutánsok kettős immunfluoreszcens festése. A képeken a PC zöld, a különböző sejtorganelleket jelölő markerek piros színben láthatók. A PC kolokalizációja valamely sejtorganellel sárga színben látható. Az ábra a 163Val és 163Glu PC nagyfokú kolokalizációját mutatja a 26S proteaszómával. VT, vad típus; ER, endoplazmatikus retikulum





12. ábra. A vad típusú, 163Val, 163Glu és 77Gly PC kettős immunfluoreszcens festése. A különböző panelek a PC és az ER (A), cisz-Golgi (B), transz-Golgi (C) és 26S proteaszóma (D) együttes jelölését mutatják. Az első oszlop mutatja az összevont képet, a második oszlop a pirossal jelölt sejtorganellumot, a harmadik oszlop a zölddel jelölt különböző PC mutánsokat ábrázolja. VT, vad típus; ER, endoplazmatikus retikulum

A Pearson féle kolokalizációs koefficiensek értékei a 26S proteaszómára nagyobbak voltak a 163Glu és 163Val PC esetén, mint a vad típusnál vagy a 77Gly esetében, azt sugallva, hogy ezek megrekedhetnek ebben a sejtorganellumban. A ZEN szoftverrel meghatározott Manders kolokalizációs paraméterek értelmezése nehezebb az ismert (fentebb kifejtett) probléma miatt, miszerint magas a szenzitivitása az intracelluláris szerkezetek térbeli mintázatára és a háttér csökkentésére alkalmazott vitatott küszöbmeghatározási módszer miatt (112). Ezzel a módszerrel a 26S proteaszóma markere kevesebb, mint 50%-os átfedést mutat a vad típusú (33%) és a 77Gly PC-vel (43%), és több mint 50%-os átfedést mutatta a 163Glu PC-vel (81%) és a 163Val PC-vel (61%) azt jelezve, hogy az utóbbi két mutáns a 26S proteaszóma viszonylag nagy részét kitölti.

Sejt organellum	PC genotípus	PPI1 medián (minimum-maximum)	PPI2 medián (minimum-maximum)	Korrelációs koefficiens medián (minimum-maximum)
ER	WT	0,131 (0,130-0,132)	0,131 (0,130-0,131)	0,132 (0,130-0,264)
	Glu163	0,160 (0,160-0,161)	0,112 (0,110-0,113)	0,132 (0,130-0,134)
	Val163	0,061 (0,060-0,061)	0,088 (0,088-0,090)	0,071 (0,070-0,073)
	Gly77	0,030 (0,026-0,183)	0,040 (0,038-0,188)	0,032 (0,030-0,185)
Cisz-G*olgi	WT	0,130 (0,028-0,132)	0,076 (0,037-0,083)	0,089 (0,088-0,098)
	Glu163	0,119 (0,118-0,120)	0,111 (0,110-0,111)	0,112 (0,110-0,114)
	Val163	0,058 (0,036-0,080)	0,116 (0,051-0,120)	0,099 (0,075-0,100)
	Gly77	0,042 (0,040-0,043)	0,058 (0,057-0,060)	0,055 (0,050-0,060)
Trasz-Golgi	WT	0,121 (0,120-0,122)	0,128 (0,125-0,130)	0,122 (0,120-0,124)
	Glu163	0,080 (0,063-0,081)	0,200 (0,107-0,203)	0,129 (0,082-0,130)
	Val163	0,090 (0,078-0,090)	0,172 (0,170-0,192)	0,122 (0,120-0,124)
	Gly77	0,061 (0,060-0,062)	0,082 (0,080-0,084)	0,071 (0,070-0,072)
26S-P	WT	0,125 (0,079-0,158)	0,077 (0,029-0,104)	0,090 (0,032-0,091)
	Glu163	0,190 (0,185-0,202)*	0,240 (0,183-0,242)*	0,210 (0,192-0,211)*

	Val163	0,220 (0,161-0,224)*	0,106 (0,100-0,110)*	0,150 (0,127-0,154)*
	Gly77	0,105 (0,078-0,111)	0,076 (0,059-0,096)	0,089 (0,069-0,103)

6. táblázat. *A vad típusú és mutáns PC Protein Proximity Analyser-rel (PPA) kvantifikált kolokalizációja a különböző sejtorganellumokkal.*

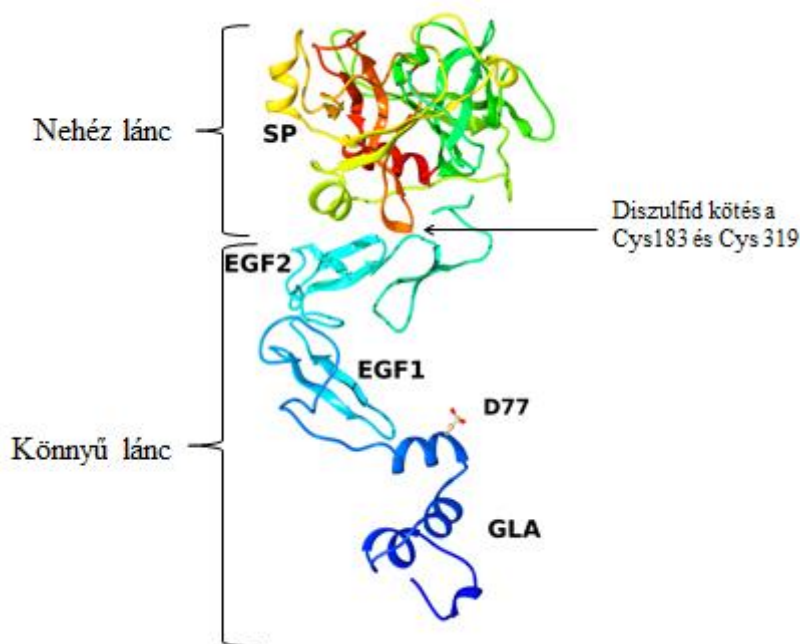
Rövidítések: ER, endoplazmatikus retikulum; 26S-P, 26S proteaszóma; wt, vad típus; PPA, protein proximity analízis; PPI1, protein proximity index – a különböző sejtorganellumokkal kolokalizáló PC százalékát jelenti; PPI2, protein proximity index – a PC-vel kolokalizáló sejtorganellum százalékát jelenti; kor. koeff., a Pearson's korrelációs koefficienst jelenti; a legalább 3 független analízissel nyert értékek mediánját és zárójelben a minimum-maximum értékeket feltüntettük * $p < 0.05$ a vad típushoz viszonyítva

4.3.4. A vad típusú és mutáns protein C poliubikvitináltságának vizsgálata

A poliubikvitinált mutáns PC aránya a vad típusú fehérjéhez több mint 2:1 volt a 163Val (2.25 ± 0.49) és a 163Glu (2.95 ± 0.51) PC esetében, míg a 77Gly mutáns nem mutatott jelentős poliubikvitináltságot (aránya a vad típusú fehérjéhez 0.96 ± 0.10 volt).

4.3.5. A p.Asp77Gly, p.Ala163Val és p.Ala163Glu mutációk szerkezeti következményei

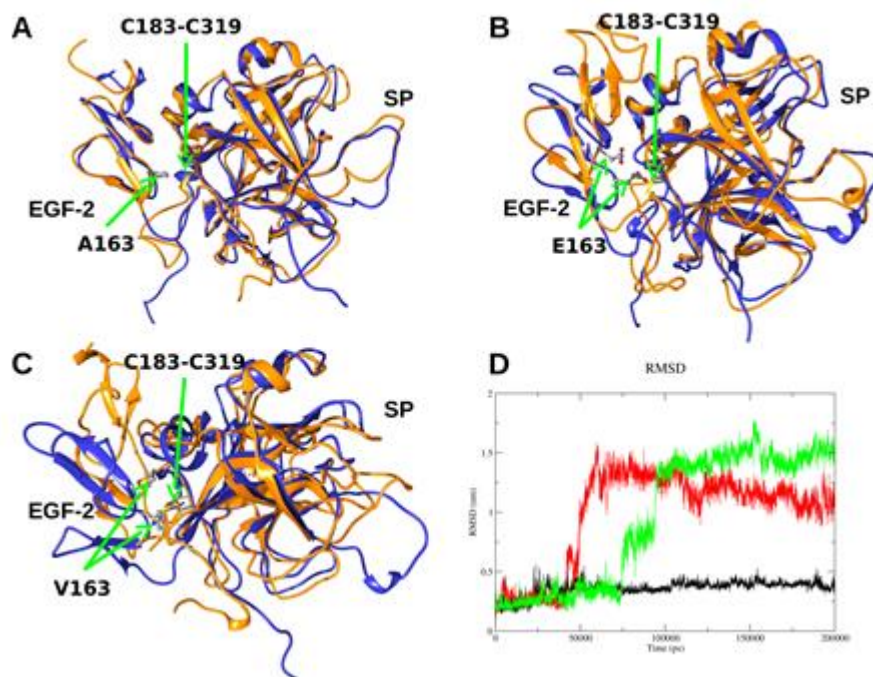
A p.Asp77Gly mutáció a Gla-domén C-terminális helikális szegmensén található. A mutáció által érintett aminosavnak nincs közvetlen interakciója egyik környező reziduummal sem (13. ábra). Ennél fogva nem valószínű, hogy a mutáció esszenciális intramolekuláris H-hidakat (vagy sóhidakat) szakítana fel. A másik két mutáció esetében nem ez a helyzet. Azok az EGF2 és SP doméneket összekötő láncközi diszulfid híd közelében helyezkednek el. Molekuladinamikai szimulációk segítségével megkíséreltük kideríteni, miként befolyásolják az utóbbi mutációk az EGF2 és SP domének közötti interakció erősségét és/vagy ezen domének relatív helyzetét.



13. ábra. Az aktivált protein C 3-dimenziós szerkezetének szalag reprezentációja. A fehérjét az alkotó aminosavak sorrendje szerint kéktől (N-terminális rész) a pirosig (C-terminális rész) színeztük. A pre-pro peptidet nem ábráztuk. GLA, Gla-domén; EGF1, epidermális növekedési faktor domén 1; EGF2, epidermális növekedési faktor domén 2; SP, szerin proteáz domén. A 77Asp és 163Ala reziduumok pozícióját az ábrán jelöltük.

A kérdés tisztázására az egyes trajektóriákból származó szerkezetek pillanatfelvételét a megfelelő SP domén első (kiindulási szerkezetnek megfelelő) pillanatfelvételére illesztettük vissza. Ilyen módon könnyen követhetővé vált az EGF2 domén elmozdulása az SP doménhez viszonyítva. Az 14. ábra A-C részén ennek az illesztésnek az első és utolsó pillanatképét mutatjuk a vad típusú (14A. ábra), a 163Glu (14B. ábra) és a 163Val (14C. ábra) PC esetében. Jelentős különbségeket fedezhetünk fel a vad típusú és a mutáns fehérjék között. A 14A. ábrán látható, hogy a vad típusú fehérje esetében a szimuláció végén a két domén relatív helyzete közelítőleg ugyanolyan, mint a szimuláció kezdetén. Jelentősen eltér a helyzet a mutáns fehérjék esetében, ahogy azt a 14B. és 14C. ábrák mutatják. Ezekben az esetekben a szimuláció alatt mindvégig diszulfid hídon keresztül egymáshoz rögzített domének egymáshoz viszonyított helyzete szignifikánsan különbözik a szimuláció kezdetén és végén. A referenciától való eltérést (root mean square deviation, RMSD) a megfelelő EGF2 domén első pillanatfelvétel geometriájából (ez a referencia) és a visszaillesztett, trajektóriából

származó pillanatfelvétel geometria (ez az eltérés) alapján számoltuk ki a vad típusú fehérje és a 163Glu és 163Val PC fehérjék esetén (14D. ábra). A vad típusú PC esetében a kicsi, közel állandó RMSD értékek jelzik azt, hogy az EGF2 domén relatív helyzete csak minimálisan változott a 200 ns-os szimuláció alatt. Ezzel ellentétben a 163Glu és 163Val mutációk esetében az EGF2 domén relatív helyzete jelentős mértékben megváltozott, ahogy azt a vonatkozó RMSD értékek is mutatják. A 163Val mutáns fehérje deformációja, habár később alakul ki, szembetűnőbb, mint a 163Glu mutánsé.



14. ábra. A p.Ala163Glu és p.Ala163Val mutációk által eredményezett szerkezeti változások a PC-ben. A 200 ns-os molekuladinamikai szimuláció trajektóriákból származó első és utolsó pillanatfelvétel az EGF2 és SP doménekről a vad típus (A), a 163Glu (B) és 163Val (C) APC esetében. Az EGF2 és SP doméneket és az azokat összekötő diszulfid hidat alkotó ciszteineket, a 163Ala (vad típus), 163Glu és 163Val reziduumokat az ábra A-C részein jelöltük. A diszulfid hidat alkotó ciszteineket, a 163 pozícióban lévő vad típusú és mutáns reziduumokat golyó és pálcika ábrázolással jelöltük. Az ábra D részén látható az EGF2 domén kiindulási röntgenszerkezettől, mint referenciától való eltéréseit (root mean square deviation, RMSD) jelző grafikon. A megfelelő szerkezeteket úgy állítottuk elő, hogy szuperponáltuk az EGF2-SP geometriákat a kiindulási röntgendiffrakciós szerkezetre, minden egyes szimuláció esetében. A visszaillesztés során a legkisebb négyzetek módszerét használtuk és csak az SP doménekre illesztettük. Az RMSD-eket a vad típus esetén feketével, a 163Glu mutánsnál pirossal, a 163Val mutánsnál zölddel jelöltük.

Összefoglalva az előbb részletezett szimulációs eredményeket elmondható, hogy a mutáns 163Glu és 163Val reziduumok helyzete a vad típussal ellentétben jelentősen megváltozik a szimulációs periódus alatt, ami megváltozott foldingot valószínűsít. Ennek a kóros foldingnak az egyik lehetséges következménye az, hogy nem jön létre a diszulfid-kötés.

5. Megbeszélés

5.1. V-ös faktor deficiencia

Munkánk eredményeképpen a p.Gly493Arg mutációt detektáltuk a betegnél és egyik lányánál heterozigóta formában. A mutáns allél expresszióját mRNS szinten nem vizsgáltuk, az alacsony FV antigén szintből azonban következtetni lehet a mutáns fehérje hiányára a keringésben. Bár in vitro expressziós tanulmányt a FV deficiencia esetében nem végeztünk, de a molekuláris modellezés eredménye alapján arra következtethettünk, hogy a mutáns arginin okozta lokális konformáció változás hatással van az adott régió stabilitására és az A2 domén hibás feltekeredésével jár, ami végső soron az egész fehérje kóros szerkezeti változását és degradációját okozhatja. A p.Gly493Arg mutáció FV deficienciát okozó természetét a molekulamodellezéssel sugallt eltérés mellett több tényező is alátámasztja. A beteg kisebbik lánya, aki a csendes variáns (p.Gln51) mellett csak a p.Gly493Arg mutációt örökölte, a másik két genetikai eltérést nem, a beteghez hasonló csökkent FV aktivitás és antigén szintekkel rendelkezett. Azt, hogy a p.Gly493Arg nem egy gyakori polimorfizmus, a száz, hemosztázis szempontjából egészséges egyén genetikai vizsgálatával zártuk ki, ahol a mutáns allél egy esetben sem volt kimutatható. Az általunk talált mutáció a FV fehérje egy nagy mértékben konzervált területét érinti, maga az érintett aminosav is megegyezik valamennyi vizsgált gerinces fajban.

Az irodalomban saját közlésünket megelőzően csak három olyan heterozigóta FV deficiens esetet közöltek, akiknél vérzéses komplikáció jelentkezett. Az első beteg FV aktivitása 45% volt, mikroszkópikus hematuriaja és enyhe nyálkahártya vérzései voltak. A F5 gén egyik alléljén a nt524delG mutációt hordozta, emellett a VII-es faktor génjében is volt egy heterozigóta mutációja. Az nt524delG (az új nomenklatura szerint c.144delG) egy guanin delécióját jelenti a 4. exonban, mely a FV molekula N-terminális részén, a nehéz lánc A1 doménjét érinti. A mutáció következtében olvasási kereteltolódás alakul ki, ami korai STOP kodon megjelenéséhez és 33 aminosavval később láncterminációhoz vezet. A kialakult fehérje tehát erősen csonkolt, a molekula kb. 70%-a hiányzik, ez nyilvánvalóan I-es típusú FV deficienciához vezet. In vitro vizsgálatokat a mutációval kapcsolatban nem végeztek (125). A második beteg, aki a p.Glu1608Lys (új nomenklatura szerint p.Glu1636Lys) aminosavcseréhez vezető, a 14. exonban bekövetkező nukleotid cserére volt heterozigóta, spontán hematomáktól és metrorrhagiától szenvedett. FV aktivitása 38%, antigén szintje 50% volt. A mutáció a FV fehérje könnyű láncának A3 doménjét érinti és erősen konzervált. A

mutációt több olasz betegben is megtalálták a FV Leiden mutációval, a HR2 haplotípussal vagy más FV polimorfizmussal együtt előfordulva, de nyilvánvalóan magának a p.Glu1608Lys mutációnak a hatására vonatkozó következtetést csak abban az esetben lehetett levonni, ha más genetikai eltérés az F5 génben nem volt jelen. Részben ezért is (és az okozati szerep bizonyítására) a mutáció fehérje szintű következményeinek vizsgálatára *in vitro* expressziót követő FV aktivitás meghatározást és Western blot analízist végeztek. A sejtlyázumban megjelenő mutáns fehérje a vad típussal azonos molsúlyú volt, de mennyisége csupán a vad típus 44%-a volt. A mutáns fehérje aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a vad típusé, specifikus aktivitása annak egyharmada volt. A FV1608Lys allélról átíródó mRNS mennyisége normálnak mutatkozott. Molekulamodellzés az aminosavcsere okozta lehetséges lokális szerkezeti hatásokra vonatkozóan nem történt. Összefoglalva eredményeiket, a szerzők bizonyították a mutáció okozati szerepét FV deficienciában, a genotípus-fenotípus elemzések alapján CRM^{Red} variánst véleményeztek (126). A harmadik betegnél tonsillectomiát követően alakult ki vérzéses szövődmény, spontán vérzése nem volt. FV aktivitása 30% volt és a p.Tyr1702Cys (új nevezéktan szerint p.Tyr1730Cys) mutációt hordozta, mely gyakori oka a FV deficienciának az olasz populációban. A mutációt okozó nukleotid csere a 15. exonban található, szintén az A3 domént érinti. A genetikai eltérés leírói a mutáció következményeit illetően egy korábban publikált cöruoplazmin alapú szerkezeti modellre hivatkoznak, miszerint a Tyr-Cys csere az 1702-es pozícióban a fehérje instabilitását okozza az A3 domén szerkezetének károsításával. A mutáció következtében megjelenő Cys interferálhat a közeli Cys1697 és Cys1723 között kialakuló diszulfid híd képződéssel. *In vitro* expressziós tanulmány e mutációval kapcsolatban nem készült (13).

Betegünknek nem volt spontán vérzése, de esete felhívja a figyelmet arra, hogy heterozigóta FV deficiens betegeknél sebészeti beavatkozás alkalmával jelentős vérzéses szövődmény alakulhat ki. Megjegyzendő, hogy mind betegünk, mind a p.Gly493Arg mutációt öröklő lánya esetén a FV aktivitása 50% alatti volt, ami hozzájárulhat a vérzékenységhez. Habár enyhe FV deficienciával nem egyértelműen jár vérzékenység, eredményeink azt mutatják, hogy néhány heterozigóta formában előforduló FV mutáció növelheti a vérzésveszélyt, ezért – típusos anamnézis esetén – határérték megnyúlt alvadási szűrőtesztek mellett is érdemes az esetek részletes kivizsgálása. Más esetekben alacsony FV szintek ellenére nem jelentkezik vérzéses tünet, vagy csak nagyon enyhe formában. A diskrepancia magyarázatául szolgálhat a thrombocytákban található FV raktár, mely kisebb részben a megakariocytákban történő szintézis, nagyobb részben a plazmában található FV endocytosisa

révén kerül az α -granulumokba. Az endocytosist követően a FV intracellulárisan módosul (a folyamat részleteiben nem ismert) és ezáltal egyedi szerkezeti és funkcionális jellemzőkhöz jut, a plazma formánál kifejezettebb prokoaguláns sajátosságokkal. Súlyos FV deficiens betegekben a thrombocyták aktivációja és degranulációja az érsérülés helyén a lokális FV koncentrációja emelésével életmentő lehet (127). Az European Network of Rare Bleeding Disorders eredményei szerint általában véve 10%-os FV aktivitás elegendő a tünetmentességhez (128).

5.2. XIII-as faktor deficiencia

A FXIII-A alegység deficienciát I-es típusú (quantitatív) és II-es típusú (qualitatív, kóros fehérje okozta) deficienciára oszthatjuk, hasonlóan az egyéb coagulopathiákhoz. Utóbbi, azaz a II-es típusú FXIII deficiencia extrém ritka, egyetlen közleményben írtak le ilyen mutációt homozigóta formában (129). Érdekes módon, a FXIII-A alegység nagymértékben kompakt domén struktúrája miatt, még a misszensz mutációk is I-es típusú deficienciához vezetnek. A diagnosztika során az ISTH SSC ajánlásain (23) alapuló algoritmust (24) követtük. Mindkét esetben a detektálhatatlanul alacsony plazma FXIII aktivitás alapozta meg a FXIII deficiencia diagnózisát, míg a detektálhatatlan FXIII-A₂B₂ és FXIII-A antigén 30% FXIII-B antigén szinttel együtt feltételezte a FXIII-A alegység deficienciát, melyet a molekuláris genetikai vizsgálat megerősített. A thrombocytákban detektálhatatlan FXIII aktivitás és FXIII-A alegység antigén szint kizárta autoantitest jelenlétének lehetőségét. Megjegyzendő, hogy rutin diagnosztikai körülmények között a thrombocyta FXIII szint meghatározása nélkül keveréses vizsgálat is elegendő a neutralizáló autoantitest detektálására (130), míg a nem neutralizáló antitest kizárása bonyolultabb, rutin laboratóriumban nem elérhető kötődési vizsgálatokat igényel.

Mindkét beteg esetében súlyosak voltak a vérzéses tünetek. A holland betegnél a köldökcsomkvérzés és a cephalhematoma korán felvetette FXIII deficiencia gyanúját, korai diagnózist eredményezve. A belga proband esetében a klinikum egyértelműen súlyos vérzékenységre utalt. A jellegzetes köldökcsomkvérzés nem jelentkezett, vagy nem volt elég jelentős mértékű ahhoz, hogy felismerésre kerüljön. A betegnek intracraniális vérzése sem volt. Esete felhívja a figyelmet arra, hogy súlyos vérzékenység esetén negatív hemosztázis szűrőtesztek esetén kötelező FXIII (és α 2-plazmin inhibitor) aktivitást meghatározni. A belga laboratóriumban elvégzett pozitív alvadék oldékonysági teszt, a BERICHROM assay-vel

2,5%-os FXIII aktivitás és a latex immunoassay-vel <4% FXIII-A antigén szint bizonyította a FXIII deficiencia diagnózisát, de ezek a tesztek nem jelzik elég jól a betegség súlyosságát. Az 1% és 5% közötti FXIII aktivitás ugyanis rendszerint közepesen súlyos vérzékenységet eredményez, míg az 1% alatti FXIII aktivitás súlyos, spontán vérzéseket okoz. A FXIII aktivitás spektrofotometriás meghatározásával kapcsolatban ismert, hogy a minta vakra történő korrigálás hiányában a BERICHROM FXIII assay túlbecsüli a FXIII aktivitást alacsony értékek esetén (22, 131-133), ez magyarázza a BERICHROM assay-vel nyert érték és a detektálhatatlan FXIII-A antigén szint, valamint a TECHNOCHROM FXIII assay-vel mért <1% FXIII aktivitás közötti diskrepanciát.

A Proband1 összetett heterozigótának bizonyult a genetikai vizsgálat során. Egy misszensz mutáció a 8-as exonban p.Arg326Gln aminosavcseréhez vezetett. A molekulamodell azt mutatta, hogy az Arg326 az aktív helyhez tartozó Cys314-et tartalmazó amino-terminális részen lévő hélix karboxil végéhez közel helyezkedik el (32). Az Arg326 oldalláncainak atomjait érintő hidrogén kötések kapcsolják az aktív helyet tartalmazó hélixet a core domén egyéb részeihez. Az Arg neutrális aminosavra történő cseréje felborítja az elektrosztatikus egyensúlyt ebben a régióban, továbbá a kisebb glutamin oldallánc egy hézagot hoz létre a molekulában. COS sejtek tranziens transzfekcióját követően a mutáns cDNS-ről a vad típusú FXIII-A-val megegyező mennyiségű mRNS expresszáldott (33). Metabolikusan jelölt sejtekkel végzett pulse-chase kísérleti eredmények a Gln326-ot tartalmazó FXIII-A alegység kifejezett instabilitását és intracelluláris degradációját mutatták. Mindezek igazolják a mutáció okozati jellegét és egybecsengenek a FXIII-A alegység fehérje hiányával a plazmában és a thrombocytákban. A másik mutáció a 8-as intronban (IVS8 c.1112+2T>C) „splicing”-hely defektust jelez. A FXIII-A mRNS tartalom a beteg vérében, a thrombocytákban és a monocytákban közel normál volt a „splicing”-hely defektust megelőző 3-as exont vagy az azt követő 14-15-ös exonokat amplifikáló primerek használatával. Ez alapján a nonszensz-mediálta mRNS lebomlás nem valószínűsíthető. (A mRNS transzkript részletes karakterizálását nem végeztük el.) A proband1 édesanyja plazmában mért FXIII aktivitása, FXIII-A₂B₂ és FXIII-A antigén szintje magasabb volt annál, mint amit heterozigótáknál várnánk. A mRNS szintjei a normálnál valamivel magasabbak voltak, ami összefügghet a relatíve magasabb FXIII szinttel. Ennek ellenére a FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szint közel 50%-os volt a thrombocytáiban. Ennek magyarázatát egyelőre nem ismerjük, elképzelhető, hogy az A-és B-alegység kapcsolatának változásában rejlik a magyarázat, melynek hátterében álló genetikai eltérést érdemes lenne vizsgálni a jövőben.

A Proband2 esetében egy adenin homozigóta deléciója állt fenn egy négy adenint tartalmazó sorból a 212–215. nukleotidok között. Ennélfogva az E-N-N-K-L aminosavak kódoló gaa-aac-aac-aag-ctg nukleotid szekvencia a 70–74. kodonokban gaa-aca-aca-agc-tga nukleotidokra változott, ami az E-T-T-S-STOP szekvenciát kódolja, vagyis a 71. pozícióban megjelenő három új aminosavat követően a fehérjeszintézis leállt. Ez az N-terminálishoz nagyon közel lévő β -szendvicsben jelent meg, ami megmagyarázza, miért nem volt mérhető a betegben FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szint.

Összefoglalva, két, súlyos FXIII-A deficienciában szenvedő beteg esetét mutattuk be. A laboratóriumi fenotípus komplett meghatározása mellett az okozati mutációkat is meghatároztuk, illetve egyik esetben egy három-generációt ábrázoló családfát is módunk volt elkészíteni. Az egyik beteg összetett heterozigóta volt a c.980G>A, p.Arg326Gln és az új, „splicing”-hely defektust eredményező c.1112+2T>C mutációkra. A másik betegnél egy új nukleotid deléció (c.212delA) vezetett korai stop kodonhoz csupán a molekula egy kis N-terminalis részének translációját téve lehetővé. A súlyos klinikai tünetek, a plazmában és a thrombocytákban detektálhatatlan FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szint összhangban van a molekuláris defektussal. A FXIII deficienciára vonatkozó irodalom alapján nem állapítható meg egyértelmű kapcsolat a klinikai tünetek súlyossága, a laboratóriumi fenotípus és a genotípus között. Ez leginkább a kvalitatív alvadék oldékonysági teszt vagy a kvantitatív ammónia felszabadulás vizsgálattal járó esszék plazma vakra történő korrekció nélküli használatának tudható be a FXIII aktivitás meghatározása során (22, 23). Ilyen összefüggés vizsgálatához genetikai analízist és megfelelő módszertannal kivitelezett komplett laboratóriumi vizsgálat szükséges. Jelen tanulmány a korai diagnózis fontosságára is felhívja a figyelmet a súlyos klinikai következmények elkerülése érdekében, a betegség lehetőségének észbentartása és adekvát laboratóriumi háttér szükséges ezen cél eléréséhez. A korai diagnózis fontosságát az is alátámasztja, hogy a közelmúltban elérhetővé vált a FXIII deficienciában szenvedő betegek számára a rekombináns FXIII készítmény (Novothirteen, Novo Nordisk), mely profilaxisként alkalmazva hatékonyan csökkenti a vérzéses epizódok számát és alkalmazásával lehetővé válik a terhességek sikeres kiviselése is (134).

5.3. Protein C deficiencia

Egy felnőtt, súlyos mélyvéna thrombosisban szenvedő beteg és egy purpura fulminánsban szenvedő újszülött PC deficiensnek bizonyult. A háttérben álló okozati mutációkat

azonosítottuk. Két új mutáció a PC EGF2 doménje ugyanazon pozícióját érintette (p.Ala163Glu és p.Ala163Val). A harmadik genetikai eltérés (p.Asp77Gly) egy már közölt, de eddig részletesen még nem vizsgált mutáció. Ezen mutációk egyike sem fordult elő 100 egészséges, normál PC szintekkel rendelkező egyénben és valamennyi mutáció heterozigóta hordozója csökkent PC aktivitással és antigén szinttel rendelkezett.

A p.Ala163Glu és p.Ala163Val mutációk az EGF2 domén azonos pozícióját érintik. A 163-as pozíció konzervált az adatbázisban elérhető fajok PC-je esetén és a humán FX megfelelő pozíciójában szintén alanin reziduum található (15B. ábra). Habár a szekvenciában több mint húsz aminosav választja el, a 3D szerkezetben a 163Ala az EGF2 és SP doméneket összekötő láncok közti diszulfid híd közelségében található.

A

sp P04070 PROC_HUMAN	E E I C D F E E A K E I F Q N V D D T L A F W S K H V D G D Q C
sp P00745 PROC_BOVIN	E E V C E F E E A R E I F Q N T E D T M A F W S F Y S D G D Q C
sp P33587 PROC_MOUSE	E E I C D F E E A Q E I F Q N V E D T L A F W I K Y F D G D Q C
sp Q28278 PROC_CANFA	E E I C D F E E A K E I F Q N V D D T L A Y W S K Y V D G D Q C
sp P31394 PROC_RAT	E E I C D F E E A Q E I F Q N V E D T L A F W I K Y F D G D Q C
sp Q9GLP2 PROC_PIG	E E T C D F E E A R E I F Q N T E N T M A F W S K Y H D G D Q C
sp Q28661 PROC_RABBIT	E E V C D L E E A K E I F Q S V D D T L A F W Y K Y V D G D Q C
sp P08709 FA7_Human	E E Q C S F E E A R E I F K D A E R T K L F W I S Y S D G D Q C
sp P00740 FA9_Human	E E K C S F E E A R E V F E N T E R T T E F W K Q Y V D G D Q C
sp P00742 FA10_Human	E E T C S Y E E A R E V F E D S D K T N E F W N K Y K D G D Q C

B

sp P04070 PROC_HUMAN	C L E E V G - W R R C S C A P G Y K L G D D L L Q C
sp P00745 PROC_BOVIN	C M E E E G - R R H C S C A P G Y R L E D D H Q L C
sp P33587 PROC_MOUSE	C L E E S N - G R R C A C A P G Y E L A D D H M R C
sp Q28278 PROC_CANFA	C L E E E G - G R H C S C A P G Y R L G D D H L Q C
sp P31394 PROC_RAT	C L E E T R - G R R C R C A P G Y E L A D D H M H C
sp Q9GLP2 PROC_PIG	C L E E E G - G R R C A C A P G Y R L G D D H L Q C
sp Q28661 PROC_RABBIT	C L E E E A - G R S C S C A P G Y E L A D D H L Q C
sp P08709 FA7_Human	C S D H T G T K R S C R C H E G Y S L L A D G V S C
sp P00740 FA9_Human	C K N S A D N K V V C S C T E G Y R L A E N Q K S C
sp P00742 FA10_Human	C H E E Q N - S V V C S C A R G Y T L A D N G K A C

15. ábra. Aminosav sorrend a humán PC és különböző állatfajok PC fehérjéje és egyéb, K-vitamin függő humán alvadási fehérjék esetén. A vizsgálataink tárgyát képező két rövid, mutációt övező aminosavszekvenciát tüntettük fel. **A PC fehérjében nyilak jelölik a 77Asp reziduumot a Gla doménben (A) és a 163Ala reziduumot az EGF2 doménben (B) a PC fehérjében.** A Gla-doménben a transláció során megjelenő Glu reziduumokat tüntettük fel a Gla reziduumok helyett, melyek poszttranszlációs módosítás eredményeként jönnek létre.

A PC EGF2 doménjében (134-178. aminosavak) összesen 11 különböző misszensz mutációt írtak le. Ezek közül egy esetben sem végeztek in vitro expressziós kísérletet, molekulamodellézés is csak a p.Cys140Arg mutáció esetében történt (135). A PC deficienciával kapcsolatosan ismertetett kevés in vitro kísérleti eredmény alapján majdnem minden misszensz mutáció teljes szekréción blokkhoz vezet a mutáns fehérje károsodott feltekeredése miatt (76) és csak néhány mutáció van, mely jelenléte esetén a fehérje szekretálódni képes. A transzfektált sejtek médiumába szekretálódott Gln220 és Gly222 PC mutánsok szintje rendre a normál kontrollok 38%-a és 21%-a volt, ezzel szemben az Arg373-é csak 0,3% volt. A mutáns fehérjék sejten belüli koncentrációja nem különbözött jelentősen a normál kontrolltól és a mutáns és vad típusú fehérjék mRNS szintje is hasonló volt (76, 136, 137). Egyre inkább nyilvánvalóvá válik, hogy a misszensz mutációk nagy része által okozott betegség molekuláris szintű alapja a károsodott fehérje folding, miként az a nem megfelelően hajtogatott fehérje molekuláris chaperonokhoz történő elhúzódó kötődéséhez vezet. Ez oldhatatlan aggregátumok képződéséhez, vagy még gyakrabban a mutáns fehérje intracelluláris degradációjához vezet (138). Közöltek már kórosan feltekeredett PC felhalmozódást az endoplazmatikus retikulumban (ER) vagy a Golgi komplexben (139, 140). A p.Arg211Trp, p.Arg394Trp és p.Gly418Asp mutációk következtében létrejött kóros PC fehérjék intracelluláris akkumulációját Naito és munkatársai vizsgálták (140). Kvantitatív analízist végeztek, melynek során a kolokalizálódó területet a sejten belüli PC százalékában adták meg. A PC és a Golgi apparátus kolokalizációja különbözött a vad típusú és a három mutáns esetében, és arra a következtetésre jutottak, hogy a mutánsok a transz-Golgiban maradnak és nem kerülnek szekréción vezikulumokba.

Összesen 20 PC Gla-domén mutációt tartalmaz a HGMD adatbázis, közülük 18 misszensz mutáció. A Gla-doménben előforduló mutációk szerkezeti és/vagy funkcionális következményét kevés esetben vizsgálták. A p.Asn44Ile mutáció csökkent antikoaguláns aktivitáshoz vezet károsodott PS és EPCR interakció miatt anionos foszfolipid jelenlétében (83). Az Arg57 reziduomot érintő mutációkat (p.Arg57Gly, p.Arg57Trp and p.Arg57Gln) hordozó fehérjék tranziens expresszióját végezték HEK293 és BHK sejtekben (141). Valamennyi mutáns mennyisége a médiumban a vadhoz képest 50% vagy kevesebb volt. Mindegyik mutáns detektálható volt az ER-ben, de a magban nem, a mintázat minden esetben az aminosavcserétől függetlenül megegyezett egy ER-kötött fehérjéjével (fehérje diszulfid izomeráz), de nem hasonlított a Golgi-marker lektinére. A p.Arg57Gly mutáció (PC Yonago) szétrombolta a Gla domén nagymértékben konzervált szerkezetét károsodott plazma

antikoaguláns aktivitást eredményezve (142). A p.Arg51His csere szerkezeti következményeit molekulamodellezéssel vizsgálták. Tekintettel, hogy a PC kristályszerkezete nem tartalmazza a Gla domént, ezt a FVIIa megfelelő részének homológia modellezésével alkották meg (82). Azt találták, hogy az Arg51 és Glu45 között létrejövő ion pár megsemmisül a His-re történő csere miatt, de nem vontak le következtetést a Ca²⁺ kötő kapacitásra vagy helyi foldingot károsító hatásra vonatkozóan. Megjegyzendő, hogy a modellezést oldószer és Ca²⁺ hiányában végezték. Grandille és munkatársai beszámoltak az általunk is azonosított p.Asp77Gly mutációról (143). Dávid és munkatársai heterozigóta formában közölték ezt a mutációt két, I-es típusú deficienciában szenvedő betegnél, akiknek súlyos, ismétlődő vénás thromboemboliás eseményeik voltak (144). In vitro expressziót a p.Asp77Gly mutációval kapcsolatban előttünk még nem végeztek. Harmon és munkatársai az ebben a pozícióban lévő Asp Thr-ra történő cseréjének molekuláris következményeit azonban vizsgálták (145). Azt találták, hogy az APC variánsok (p.Asp77Thr), (p.Asp78Ala), és (p.Ala81Val) PS függő antikoaguláns aktivitása csak kissé csökkent, és a 77-es, 78-as és 81-es Gla domén reziduumok PS kötéshez való hozzájárulása viszonylag kicsi. Wildhagen és munkatársai megerősítették ezeket az eredményeket és arra a megállapításra jutottak, hogy az Asp77 nem fontos a PS kötéshez (146).

Vizsgálatainkban a 163Val és 163Glu 26S proteaszómával történő kolokalizációját észleltük, utóbbi a kóros feltekeredésű fehérjék ismert, sejten belüli degradációjának potenciális színhelye poliubikvitinációt követően (147, 148). Ezeket az eredményeket alátámasztja a 163Val és 163Glu mutánsok magasabb poliubikvitináltsági szintjeinek kimutatása, mely így az intracelluláris degradáció egyik indirekt bizonyítéka. Összefoglalásként eredményeink azt mutatják, hogy a p.Ala163Glu és p.Ala163Val mutációk a PC szerkezeti károsodásához és szekréción defektusához vezetnek.

Saját vizsgálatainkban a p.Asp77Gly mutációra heterozigóta személyek PC aktivitása és antigén szintje arányosan csökkent volt I-es típusú deficienciát sugallva. Mivel a 77Gly PC fehérje nagy mennyiségben volt jelen a transzfektált sejtek médiumában, súlyos szekréción zavar nem igazolódott. Továbbá mind az amidolitikus, mind az alvadási funkcionális tesztek normál aktivitásúnak mutatták a 77Gly fehérjét. Azt is kimutattuk, hogy a 77Gly aktiválódási rátája Protac-kal nem különbözött a vad típusú PC fehérjétől. Kettős immunfluoreszcens festéssel nem tapasztaltunk kolokalizációt egyik sejtalkotóval sem és nem detektáltunk fokozott poliubikvitinációt sem. A molekula ezen része konzerváltnak tűnik az emlős fajokban és más K-vitamin függő alvadási fehérjékben (15A. ábra). A 77-es pozícióban aszpartát található a humán PC-ben és FX-ben és vagy aszpartát, vagy a hasonló karakterű

glutamát található meg a FVII-ben és a FIX-ben hasonlóan más fajok PC-jéhez. Molekulamodellézési tanulmányok nem mutattak jelentős molekulán belüli szerkezeti eltérést. A mutáció befolyásolhatja azonban a sejtmembrán külső részével, a PC receptoraival történő interakciót, hatása lehet továbbá a protein komplexek stabilitására, melyek alkotásában részt vesz a PC. A 77Gly mutáns PC médiumban való jelenléte és normál aktivitása alapján és arra tekintettel, hogy nem igazolódott jelentősebb szekréción defektus, azt várhatnánk, hogy a heterozigóta betegek PC plazma koncentrációja legalább 70%. Ennek ellenére a mutációra heterozigóták plazma PC antigén szintje csak 50% körüli. (Megjegyzendő, hogy a HEK sejtek által történő in vitro szekréció összehasonlítása a májsejtekben zajló in vivo szekrécióval túl mechanikus.) Valamennyi eredményünket összevetve elmondható, hogy a p.Asp77Gly mutáció normál aktivitású PC-hez vezet, és mivel esetében nem látható jelentősebb szekréción zavar, elképzelhető, hogy a mutáció az intermolekuláris kölcsönhatásokat módosítja, melyekben a PC részt vesz és annak clearance-t is befolyásolhatja. E hipotézis későbbi kutatásaink érdekes tárgya lehet.

A homozigóta PC deficiencia nem letális eltérés (szemben az antitrombin deficienciák jelentős hányadával, ahol a homozigóta magzatok nem életképesek), azonban újszülött korban, vagy csecsemőkorban gyakran purpura fulminánshoz vezet. Az összetett heterozigóták klinikai fenotípusa általában megegyezik a homozigótáéval, mint ahogyan esetünkben is (36). A közelmúltban publikált két, összetett heterozigóta PC deficiens személynél azonban a klinikai tünetek enyhébbek voltak, egyikük 38 éves korában jelentkezett MVT-sal, a másik beteg 15 éves korában jelentkezett súlyos, kiterjedt thrombosissal (149, 150). Érdekes módon, a második beteg ugyanazon mutációkat hordozó összetett heterozigóta nővérének csak egy alkalommal, terhességhez kapcsolódóan volt MVT-sa. A első beteg összetett heterozigóta volt a c.595C>T, p.Arg199* és c.541T>G, p.Phe181Val mutációkra, mindkét genetikai eltérés a 7. exonban található. A mutációk következményeit mRNS szinten és in vitro expressziós kísérletekben is vizsgálták. A nonszensz mutációt tartalmazó plazmidot külön, illetve a misszensz mutációval cisz-helyzetben együtt is transzfektálták HEK293 sejtekbe (pEGFP-PC-Arg199* és pEGFP-PC-Phe181/Arg199* plazmidok). A transzfekciót követően a mRNS szintek mindkét esetben szignifikánsan csökkentek voltak a vad típushoz képest és cikloheximiddel történő kezeléssel, illetve UPF1 siRNS-sel történő kotranszfekcióval is igazolták, hogy a p.Arg199* következménye nonszensz mutáció okozta RNS lebomlás, azaz „nonsense mediated decay”. A mutáns fehérjék expresszióját fluoreszcens mikroszóppal vizsgálva és Western blottal

csökkentnek találták és a p.Arg199* esetében kis mennyiségű csonkolt fehérje jelenlétét igazolták. A p.Phe181Val mutáció izolált hatását nem vizsgálták (149).

A másik beteg a már közölt p.Asp297His és az új p.Val420Leu mutációt hordozta. A beteg (PC akt. 4%, PC ag. 90,5%) és a mutációkat szintén hordozó nővére (PC akt. 5%, PC ag. 88,7%) hasonló PC aktivitással és antigén szinttel rendelkeztek és II-es típusú PC deficienciában szenvedtek. A p.Asp297His mutációt édesanyjuktól (PC akt. 67%, PC ag. 64,8%), a p.Val420Leu mutációt édesapjuktól (PC akt. 66%, PC ag. 145%) örökölték. In vitro expressziót követően a p.Asp297His mutációt hordozó plazmidról készült PC antigén szintje a médiumban a vad típus $37,7 \pm 4,3\%$ -a volt. A p.Val420Leu estében ez $152 \pm 10,1\%$ volt. Western blot alapján a sejtizátumokban nem volt különbség a vad típusú fehérje és a mutánsok mennyisége között. A p.Val420Leu specifikus aktivitása erősen csökkent. A p.Asp297His mutáns főként az ER-al mutatott kolokalizációt, míg a p.Val420Leu mutáns a vad típushoz hasonlóan eljutott a cisz-Golgi szintjéig. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az előbbi mutáció szekréción zavarhoz vezet, míg az utóbbi minőségi deficienciát okoz, feltehetően a szubsztrátkötő hely konformációváltozása következtében (150).

Összefoglalva, vizsgálataink során mi két, thrombosisban szenvedő beteg PROC génjében detektált három mutáció következményeit vizsgáltuk. Míg a 163-as pozícióban lévő mutációk (p.Ala163Glu és p.Ala163Val) kóros foldinghoz és következményesen károsodott szekréciónhoz vezetnek, a 77-es pozíciót érintő mutáció (p.Asp77Gly) nem mutatott jelentősebb különbséget a vad típusú PC fehérjéhez képest sem a szekréción sem az aktivációt/aktivitást illetően és molekulamodellzés alapján nem tételezhető fel jelentős szerkezeti eltérés. Mivel a mutáció I-es típusú deficienciában nyilvánul meg valamennyi hordozóban, feltételezhetjük, hogy vagy az intermolekuláris interakciók megváltozása és/vagy a fehérje fokozott eliminációja lehet felelős a deficienciáért.

A jelölt saját eredményei, új megállapításai

- Ritka coagulopathiák (FV és FXIII deficienciák) és thrombophilia (PC deficiencia) részletes laboratóriumi fenotípus vizsgálatát és genotipizálását elvégezve új, még nem karakterizált mutációkat azonosítottunk, majd e mutációk lehetséges pathogén szerepének magyarázatára fehérjebiokémiai vizsgálatokat és molekulamodellezést végeztünk. Részleteiben:

V-ös faktor deficiencia

- Egy mérsékelt súlyosságú vérzékenységben szenvedő nőbetegnél megnyúlt APTI-t, csökkent FV aktivitást és ezzel arányosan csökkent antigén szintet találtunk, ez I-es típusú FV deficienciának felel meg. Molekuláris genetikai vizsgálattal a FV génben megtaláltuk a betegséget okozó, eddig még nem közölt p.Gly493Arg mutációt heterozigóta formában.
- Megállapítottuk, hogy az általunk talált mutáció a FV fehérje egy nagymértékben konzervált területét érinti, maga az érintett aminosav is megegyezik valamennyi vizsgált gerinces fajban. „In silico” kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a mutáció következtében hibás feltekeredésű FV fehérje jön létre, mely feltehetően intracellulárisan degradálódik.
- Esetünk kapcsán felhívtuk a figyelmet a heterozigóta, spontán vérzékenységben nem szenvedő, 50% alatti, de 10% feletti FV szintekkel rendelkező FV deficiens személyek intervenciók kapcsán felmerülő fokozott vérzésveszélyére és arra, hogy FV deficienciában az enyhe laboratóriumi fenotípust mutató betegek esetében a klinikai fenotípus a vártnál súlyosabb lehet, a komplex laboratóriumi diagnosztikának kiemelt jelentősége van.

XIII-as faktor deficiencia

- Két, súlyos FXIII deficienciában szenvedő betegnél végeztük el a deficiencia korrekt laboratóriumi karakterizálását és állítottuk fel a veleszületett FXIII-A alegység deficiencia laboratóriumi diagnózisát a plazmában és thrombocytá lizátumban történő, munkacsoportunk által korábban beállított funkcionális és immunológiai módszereket végezve.
- Molekuláris genetikai vizsgálattal három különböző mutációt azonosítottunk: az egyik beteg összetett heterozigóta volt a c.980G>A, p.Arg326Gln és az új, „splicing”-hely

defektust eredményező c.1112+2T>C mutációkra, utóbbinál mRNS kvantitálással kizártuk „nonsense mediated decay” lehetőségét. A másik betegnél egy új nukleotid deléciót azonosítottunk (c.212delA), mely korai stop kodonhoz vezetve csupán a molekula egy kis N-terminalis részének transzlációját tette lehetővé.

- Felhívtuk a figyelmet a FXIII deficiencia esetében a korai, komplex laboratóriumi diagnózis fontosságára, valamint arra, hogy a genotípus-fenotípus összefüggések pontos meghatározása csak adekvát laboratóriumi módszerekkel lehetséges, melyek az alacsony FXIII aktivitás tartományban is pontos eredményt szolgáltatnak. Ennek a betegek profilaxisa és annak laboratóriumi követésének szempontjából is döntő jelentősége van.

Protein C deficiencia

- Két, súlyos mély vénás thrombosisban szenvedő betegnél azonosítottuk az I-es típusú PC deficiencia hátterében álló mutációkat a PROC génben. A p.Ala163Glu és p.Ala163Val új mutációk a PC fehérje azonos pozícióját érintették az EGF2 doménben, míg a p.Asp77Gly mutáció egy korábban közölt, de nem karakterizált mutáció a Gla doménben.
- Mindhárom mutáció esetében in vitro expressziós kísérletekben és molekulamodellezéssel vizsgáltuk azok következményeit a fehérjére nézve: a 163-as pozíciót érintő mutációk esetében hibás fehérje foldingot és szekréción zavar állapítottunk meg, ezzel együtt elsőként mutattuk ki a mutáns, szerkezeti torzulást elszenvedett PC 26S proteaszómában történő intracelluláris akkumulációját és fokozott poliubikvitinilációját
- A p.Asp77Gly mutációról igazoltuk, hogy I-es típusú deficienciához vezet, azonban sem kóros folding, sem szekréción zavar nem alakul ki a mutáció következtében. Kimutattuk, hogy a 77Gly PC mennyisége, aktivációja és aktivitása nem különbözik a normál in vitro expresszált PC-től, holott a keringésben a mutáns PC aktivitása és koncentrációja 50% körüli.
- A p.Asp77Gly mutációval kapcsolatban új, eddig nem vizsgált mechanizmusok (intermolekuláris interakciók megváltozása és/vagy fokozott fehérje clearance) szerepét vetettük fel.

6. Összefoglalás

Az öröklött hemosztázis rendellenességek ritka kórképek, az adott egyénre nézve életveszélyes, vagy az életminőséget jelentősen rontó, <2-5:10 000 fő prevalenciájú kórképek. A véralvadási rendszer pro-vagy anticoaguláns oldalának érintettségétől függően hemorrhagiás diathesisek, vagy thrombophiliák alakulhatnak ki. Jelen értekezésben a coagulopathiák közül az V-ös (FV) és a XIII-as (FXIII) véralvadási faktorok zavarait, a thrombophiliák közül a protein C deficienciát tárgyaljuk esetbemutásokon és in vitro kísérleteken keresztül. Valamennyi esetben meghatároztuk a háttérben álló okozati mutáció(ka)t, és lehetőség szerint vizsgáltuk a talált mutációk előfordulását a betegek elérhető családtagjaiban. Az új, vagy korábban nem karakterizált genetikai eltérések esetén fehérje biokémiai vizsgálatokat, és/ vagy molekulamodellezést végeztünk.

FV deficiencia:

- a 34 éves mérsékeltén vérzékeny nőbetegnél és egyelőre tünetmentes egyik lánygyermekénél a p.Gly493Arg mutációt detektáltuk heterozigóta formában;
- a mutáció a molekulamodellezés alapján lokális konformáció változást okozva instabilitáshoz, az A2 domén kóros foldingjához vezet.

FXIII deficiencia:

- két, súlyos FXIII-A deficienciában szenvedő esetet mutattunk be, ahol elvégeztük a deficiencia komplex laboratóriumi karakterizálását. Az újszülött proband1 összetett heterozigóta volt a c.980G>A, p.Arg326Gln és az új, splice-hely defektust eredményező c.1112+2T>C mutációkra. A 13 éves proband2-nél egy új nukleotid deléció (c.212delA) vezetett korai stop kodonhoz csupán a molekula egy kis N-terminalis részének transzlációját téve lehetővé.

Protein C deficiencia:

- két, thrombosisban szenvedő beteg PROC génjében detektált három mutáció következményeit vizsgáltuk, egy újszülött összetett heterozigóta volt és purpura fulminánsban szenvedett, egy 50 éves nőnek recidív mélyvénás thrombosisai voltak;
- a 163-as pozícióban lévő mutációk (p.Ala163Glu és p.Ala163Val) kóros foldinghoz és következményesen károsodott szekrécióhoz vezetnek;
- a 77-es pozíciót érintő mutáció (p.Asp77Gly) esetében feltehetően vagy az intermolekuláris interakciók megváltozása, vagy a fehérje fokozott eliminációja lehet felelős a deficienciáért.

6. Summary

Inherited hemostatic disorders are rare and they can be life-threatening to the affected person or might be disabling; their prevalence is $<2-5:10\ 000$. Depending on whether the pro- or the anticoagulant part of the hemostatic system is affected, hemorrhagic diatheses or thrombophilias might develop. In the present thesis we focus on factor V (FV) and factor XIII (FXIII) deficiencies among coagulopathies, and protein C deficiency leading to thrombophilia. The above-mentioned diseases are presented via case reports and in vitro studies. The causative mutations are described in all cases and if possible, the molecular genetic testing of the family members has been also carried out. The consequences of the novel or previously not characterized mutations are investigated in protein biochemistry experiments and/ or molecular modelling.

FV deficiency:

- the p.Gly493Arg mutation was detected in heterozygous form in a 34-year-old female with moderate bleeding symptoms and in one of her asymptomatic daughters;
- molecular modelling studies suggest that the mutation leads to local conformational changes, instability of the affected region and improper folding of the A2 domain.

FXIII deficiency:

- We presented two cases of severe FXIII-A deficiency. The newborn proband1 was compound heterozygote for the c.980G>A, p.Arg326Gln and the novel c.1112+2T>C mutations, the latter leads to splice site defect. The 13-year-old proband2 carried the novel c.212delA single nucleotide deletion causing early stop codon enabling the translation of only small portion of the N-terminal part of the molecule.

Protein C deficiency:

- we examined the molecular consequences of three PROC mutations found in two patients suffering from venous thromboembolism. A neonate was a compound heterozygote and had purpura fulminans, a 50-year-old female had multiple severe deep venous thrombotic events;
- the mutations affecting the 163 position (p.Ala163Glu and p.Ala163Val) cause abnormal folding and as a consequence impaired secretion;
- the mutation affecting position 77 (p.Asp77Gly) probably influences the intermolecular interactions in which PC takes part and/or leads to increased elimination of the mutant protein.

7. Irodalomjegyzék és publikációs lista

7.1. Irodalomjegyzék

1. Pfliegler György. Ritka betegségek fogalma, jelentősége és ellátásuk néhány kérdése. *Debreceni Szemle*. 2014: 297-303.
2. White GC, Marder VJ, Schulman S, Aird WC, Bennett JS. Overview of basic coagulation and fibrinolysis. In: Marder V, Aird WC, Bennett JS, Schulman S and White GC. (eds.) *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*.
3. ISTH Steering Committee for World Thrombosis day. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *J Thromb Haemost* 2014;12:1580-90.
4. Reitsma PH, Rosendaal FR. Past and future of genetic research in thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007;5Suppl 1:264–9.
5. Kane WH. Factor V. In: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW et al., eds. *Hemostasis and Thrombosis*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2006: 177–187.
6. Cai X-H, Wang X-F, Ding Q-L, Fu QH, Wang HL. Factor V C1149G and 5609–10INSCGTGGTT causing factor V deficiency: Molecular characterization by in vitro expression. *Thromb Haemost* 2007; 98: 683–685.
7. Nicolaes GAF, Dahlbäck B. Factor V and Thrombotic Disease: Description of a Janus-Faced Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 530–538.
8. Delev D, Pavlova A, Heinz S, Blaise MC, Chandra T, Poetsch B, Seifried E, Oldenburg J. Modelling and expression studies of two novel mutations causing factor V deficiency. *Thromb Haemost* 2008; 100: 766–772.
9. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood* 2003; 101: 20–30.
10. Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, Kaufman RJ, Mann KG. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human coagulation factor V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4846-50
11. Asselta R, Tenchini ML, Duga S. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 26–34.
12. van Wijk R, Nieuwenhuis K, van den Berg M, Huizinga EG, van der Meijden BB, Kraaijenhagen RJ, van Solinge WW. Five novel mutations in the gene for

- coagulation factor V associated with type I factor V deficiency. *Blood* 2001; 98: 358–367.
13. Castoldi E, Lunghi B, Mingozi F, Muleo G, Redaelli R, Mariani G, Bernardi F. A missense mutation (Y1702C) in the coagulation factor V gene is a frequent cause of factor V deficiency in the Italian population. *Haematologica* 2001; 86: 629–633.
 14. Steen M, Miteva M, Villoutreix BO, Yamazaki T, Dahlbäck B. Factor V New Brunswick: Ala221Val associated with FV deficiency reproduced in vitro and functionally characterized. *Blood* 2003; 102: 1316–1322.
 15. Vos HL. An online database of mutations and polymorphisms in and around the coagulation factor V gene. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 185–188.
 16. Komáromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 9–20.
 17. Muszbek L, Berczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 2011; 91: 931–72.
 18. Nurminskaya M, Kaartinen MT. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci* 2006;11:1591–1606.
 19. Nurminskaya M, Magee C, Nurminsky D, Linsenmayer TF. Plasma transglutaminase in hypertrophic chondrocytes: expression and cell-specific intracellular activation produce cell death and externalization. *J Cell Biol* 1998; 142:1135–1144.
 20. Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5829–5833, 1988.
 21. Karimi M, Berczky Z, Cohan N, Muszbek L. Factor XIII deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 426–38.
 22. Katona É, Péntes K, Molnar É, Muszbek L. Measurement of factor XIII activity in plasma. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 1191–202.
 23. Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1404–6.
 24. Muszbek L, Bagoly Z, Cairo A, Peyvandi F. Novel aspects of factor XIII deficiency. *Curr Opin Hematol* 2011; 18: 366–72.
 25. Hsieh L, Nugent D. Factor XIII deficiency. *Haemophilia* 2008; 14: 1190–200.

26. Levy JH, Greenberg C. Biology of Factor XIII and clinical manifestations of Factor XIII deficiency. *Transfusion* 2013; 53: 1120–31.
27. Ichinose A. Factor XIII is a key molecule at the intersection of coagulation and fibrinolysis as well as inflammation and infection control. *Int J Hematol* 2012; 95: 362–70.
28. Board PG, Losowsky MS, Miloszewski KJ. Factor XIII: inherited and acquired deficiency. *Blood Rev* 1993; 7: 229–42.
29. Anwar R, Miloszewski KJ. Factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 1999; 107: 468–84.
30. Ivaskevicius V, Seitz R, Kohler HP, Schroeder V, Muszbek L, Ariens RA, Seifried E, Oldenburg J; Study Group. International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data. *Thromb Haemost* 2007; 97: 914–21.
31. Lak M, Peyvandi F, Ali SA, Karimi K, Mannucci PM. Pattern of symptoms in 93 Iranian patients with severe factor XIII deficiency. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1852–3.
32. Mikkola H, Yee VC, Syrjälä M, Seitz R, Egbring R, Petrini P, Ljung R, Ingerslev J, Teller DC, Peltonen L, Palotie A. Four novel mutations in deficiency of coagulation factor XIII: consequences to expression and structure of the A-subunit. *Blood* 1996; 87: 141–51.
33. Mikkola H, Muszbek L, Haramura G, Hamalainen E, Jalanko A, Palotie A. Molecular mechanisms of mutations in factor XIII A-subunit deficiency: in vitro expression in COS-cells demonstrates intracellular degradation of the mutant proteins. *Thromb Haemost* 1997;77:1068-72.
34. Dahlback B. Factor V and protein S as cofactors to activated protein C. *Haematologica* 1997;82:91–5.
35. Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008;112:19–27.
36. Berczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med* 2010;48 Suppl 1:S53-66.
37. Esmon NL, Smirnov MD, Safa O, Esmon CT. Lupus anticoagulants, thrombosis and the protein C system. *Haematologica* 1999;84:446–51.
38. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109:3161–72.

39. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993;268:2872–7.
40. van Wijnen M, van't Veer C, Meijers JC, Bertina RM, Bouma BN. A plasma coagulation assay for an activated protein C independent anticoagulant activity of protein S. *Thromb Haemost* 1998;80:930–5.
41. Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3106–11.
42. Tuddenham EG, Cooper DN. Protein C and protein C inhibitor. In: Tuddenham EG, Cooper DN, editors. *The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders*. Oxford: Oxford University Press, 1994:149–63.
43. Esmon CT. Protein C, protein S, and thrombomodulin. In: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, editors. *Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincott and Williams and Wilkins, 2006:249–69.
44. Patracchini P, Aiello V, Palazzi P, Calzolari E, Bernardi F. Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Hum Genet* 1989;81:191–2.
45. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68:1370–3.
46. Sakata T, Kario K, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T. Studies on congenital protein C deficiency in Japanese: prevalence, genetic analysis, and relevance to the onset of arterial occlusive diseases. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:11–6.
47. Biguzzi E1, Razzari C, Lane DA, Castaman G, Cappellari A, Bucciarelli P, Fontana G, Margaglione M, D'Andrea G, Simmonds RE, Rezende SM, Preston R, Prisco D, Faioni EM; Protein S Italian Team. Molecular diversity and thrombotic risk in protein S deficiency: the PROSIT study. *Hum Mutat* 2005;25: 259–69.
48. Miletich J, Sherman L, Broze G, Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987;317:991–6.
49. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995;73:87–93.

50. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 2001;113:636–41.
51. Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T. Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 2006;83:217–23.
52. Wysokinska EM, Wysokinski WE, Brown RD, Karnicki K, Gosk-Beirska I, Grill D, McBane RD 2nd. Thrombophilia differences in cerebral venous sinus and lower extremity deep venous thrombosis. *Neurology* 2008;70:627–33.
53. De Stefano V, Simioni P, Rossi E, Tormene D, Za T, Pagnan A, Leone G. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with inherited deficiency of natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S. *Haematologica* 2006;91: 695–8.
54. Rossi E, Za T, Ciminello A, Leone G, De Stefano V. The risk of symptomatic pulmonary embolism due to proximal deep venous thrombosis differs in patients with different types of inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 2008;99:1030–4.
55. Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; 85:2756–61.
56. Brouwer JL, Lijfering WM, Ten Kate MK, Kluin-Nelemans HC, Veeger NJ, van der Meer J. High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *Thromb Haemost* 2009;101:93–9.
57. Vossen CY, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, VAN DER Meer FJ, Pabinger I, Palareti G, Preston FE, Scharrer I, Souto JC, Svensson P, Walker ID, Rosendaal FR. Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *J Thromb Haemost* 2005;3:459–64.
58. Shen MC, Lin JS, Tsay W. Protein C and protein S deficiencies are the most important risk factors associated with thrombosis in Chinese venous thrombophilic patients in Taiwan. *Thromb Res* 2000;99:447–52.

59. Altinisik J, Ates O, Ulutin T, Cengiz M, Buyru N. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and protein C mutation frequency in Turkish venous thrombosis patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008;14:415–20.
60. Tjeldhorn L, Sandset PM, Haugbro K, Skretting G. Hereditary protein C deficiency caused by the Ala267Thr mutation in the protein C gene is associated with symptomatic and asymptomatic venous thrombosis. *Thromb Res* 2010;125:230–4.
61. Scott BT, Bovill EG, Callas PW, Hasstedt SJ, Leppert MF, Valliere JE, Varvil TS, Long GL. Genetic screening of candidate genes for a prothrombotic interaction with type I protein C deficiency in a large kindred. *Thromb Haemost* 2001;85:82–7.
62. Matitiau A, Tabachnik E, Stoecker D, Birk E. Thrombus in the left ventricle of a child with systemic emboli: an unusual presentation of hereditary protein C deficiency. *Pediatrics* 2001; 107:421–2.
63. Kim MJ, Hur SH, Lee YS, Hyun DW, Han SW, Kim KS, Kim YN, Kim KB. Intracardiac multichamber thrombi in a patient with combined protein C and protein S deficiencies. *Int J Cardiol* 2005;100: 505–6.
64. Pabinger I, Grafenhofer H. Thrombosis during pregnancy: risk factors, diagnosis and treatment. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:322–4.
65. Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ. Protein C deficiency. *Haemophilia* 2008;14:1214–21.
66. Kohler J, Kasper J, Witt I, von Reutern GM. Ischemic stroke due to protein C deficiency. *Stroke* 1990;21:1077–80.
67. Acar G, Dogan A, Altinbas A, Turker Y. Recurrent acute stent thrombosis associated with protein C and S deficiencies. *Int J Cardiovasc Imaging* 2006;22:333–7.
68. Cakir O, Ayyildiz O, Oruc A, Eren N. A young adult with coronary artery and jugular vein thrombosis: a case report of combined protein S and protein C deficiency. *Heart Vessels* 2002;17:74–6.
69. Peterman MA, Roberts WC. Syndrome of protein C deficiency and anterior wall acute myocardial infarction at a young age from a single coronary occlusion with otherwise normal coronary arteries. *Am J Cardiol* 2003;92:768–70.
70. Mahmoodi BK, Brouwer JL, Veeger NJ, van der Meer J. Hereditary deficiency of protein C or protein S confers increased risk of arterial thromboembolic events at a young age: results from a large family cohort study. *Circulation* 2008;118:1659–67.

71. Folsom AR, Ohira T, Yamagishi K, Cushman M. Low protein C and incidence of ischemic stroke and coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Thromb Haemost* 2009;7:1774–8.
72. Kenet G, Lutkhoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, et al. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation* 2010;121:1838–47.
73. Reitsma PH. Protein C deficiency: summary of the 1995 database update. *Nucleic Acids Res* 1996;24:157–9.
74. Aiach M, Gandrille S, Emmerich J. A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost* 1995;74:81–9.
75. D'Ursi P, Marino F, Caprera A, Milanese L, Faioni EM, Rovida E. ProCMD: a database and 3D web resource for protein C mutants. *BMC Bioinformatics* 2007;8 Suppl 1:S11.
76. Sugahara Y, Miura O, Hirosawa S, Aoki N. Compound heterozygous protein C deficiency caused by two mutations, Arg-178 to Gln and Cys-331 to Arg, leading to impaired secretion of mutant protein C. *Thromb Haemost* 1994;72:814–8.
77. Bovill EG, Tomczak JA, Grant B, Bhushan F, Pillemer E, Rainville IR, Long GL. Protein C Vermont: symptomatic type II protein C deficiency associated with two GLA domain mutations. *Blood* 1992;79:1456–65.
78. Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Gaussem P, Aillaud MF, Dupuy E, Juhan-Vague I, Aiach M. Five novel mutations located in exons III and IX of the protein C gene in patients presenting with defective protein C anticoagulant activity. *Blood* 1993;82: 159–68.
79. Ido M, Ohiwa M, Hayashi T, Nishioka J, Hatada T, Watanabe Y, Wada H, Shirakawa S, Suzuki K. A compound heterozygous protein C deficiency with a single nucleotide G deletion encoding Gly-381 and an amino acid substitution of Lys for Glu-26. *Thromb Haemost* 1993; 70:636–41.
80. Gaussem P, Gandrille S, Duchemin J, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aillaud MF, Aiach M. Influence of six mutations of the protein C gene on the Glu domain conformation and calcium affinity. *Thromb Haemost* 1994;71:748–54.
81. Lu D, Bovill EG, Long GL. Molecular mechanism for familial protein C deficiency and thrombosis in protein C Vermont (Glu20--Ala and Val34--Met). *J Biol Chem* 1994;269: 29032–8.

82. Faioni EM, Hermida J, Rovida E, Razzari C, Asti D, Zeinali S, Mannucci PM. Type II protein C deficiency: identification and molecular modelling of two natural mutants with low anticoagulant and normal amidolytic activity. *Br J Haematol* 2000;108: 265–71.
83. Preston RJ, Morse C, Murden SL, Brady SK, O'Donnell JS, Mumford AD. The protein C omega-loop substitution Asn2Ile is associated with reduced protein C anticoagulant activity. *Br J Haematol* 2009;144:946–53.
84. Simioni P1, Kalafatis M, Tormene D, Luni S, Zerbinati P, Barzon L, Palù G, Girolami A. Abnormal propeptide processing resulting in the presence of two abnormal species of protein C in plasma: characterization of the dysfunctional protein C Padua3 (proteinC(R-1L/propeptide)). *Thromb Haemost* 2001;86:1017–22.
85. Nakabayashi T1, Mizukami K, Naitoh S, Takeda M, Shikamoto Y, Nakagawa T, Kaneko H, Tarumi T, Mizoguchi I, Mizuno H, Ieko M, Koike T. Protein C Sapporo (protein C Glu 25 --) Lys): a heterozygous missense mutation in the Gla domain provides new insight into the interaction between protein C and endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 2005;94:942–50.
86. Marchetti G, Patracchini P, Gemmati D, Castaman G, Rodeghiero F, Wacey A, Cooper DN, Tuddenham EG, Bernardi F. Symptomatic type II protein C deficiency caused by a missense mutation (Gly 381-->Ser) in the substrate-binding pocket. *Br J Haematol* 1993;84:285–9.
87. Doig RG, Begley CG, McGrath KM. Hereditary protein C deficiency associated with mutations in exon IX of the protein C gene. *Thromb Haemost* 1994;72:203–8.
88. Zheng YZ, Sakata T, Matsusue T, Umeyama H, Kato H, Miyata T. Six missense mutations associated with type I and type II protein C deficiency and implications obtained from molecular modelling. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:687–96.
89. Levo A, Kuismanen K, Holopainen P, Vahtera E, Rasi V, Holopainen P, Rasi V, Krusius T, Partanen J. Single founder mutation (W380G) in type II protein C deficiency in Finland. *Thromb Haemost* 2000;84:424–8.
90. Tsay W, Shen MC. R147W mutation of PROC gene is common in venous thrombotic patients in Taiwanese Chinese. *Am J Hematol* 2004;76:8–13.
91. Miyata T, Sakata T, Yasumuro Y, Okamura T, Katsumi A, Saito H, Abe T, Shirahata A, Sakai M, Kato H. Genetic analysis of protein C deficiency in nineteen

- Japanese families: five recurrent defects can explain half of the deficiencies. *Thromb Res* 1998;92:181–7.
92. Zeegers MP, van Poppel F, Vlietinck R, Spruijt L, Ostrer H. Founder mutations among the Dutch. *Eur J Hum Genet* 2004;12:591–600.
 93. Couture P, Bovill EG, Demers C, Simard J, Delage R, Scott BT, Valliere JE, Callas PW, Jomphe M, Rosendaal FR, Aiach M, Long GL. Evidence of a founder effect for the protein C gene 3363 inserted C mutation in thrombophilic pedigrees of French origin. *Thromb Haemost* 2001;86:1000–6.
 94. Koeleman BP, Reitsma PH, Bertina RM. Familial thrombophilia: a complex genetic disorder. *Semin Hematol* 1997;34: 256–64.
 95. Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasy L, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1321–5.
 96. Pintao MC, Garcia AA, Borgel D, Alhenc-Gelas M, Spek CA, de Visser MC, Gandrille S, Reitsma PH. Gross deletions/duplications in *PROS1* are relatively common in point mutation-negative hereditary protein S deficiency. *Hum Genet* 2009;126:449–56.
 97. Muszbek L, Polgár J, Boda Z. Platelet Factor XIII Becomes Active without the Release of Activation Peptide during Platelet Activation. *Thromb Haemost* 1993; 69: 282-5.
 98. Ajzner E E1, Balogh I, Szabó T, Marosi A, Haramura G, Muszbek L. Severe coagulation factor V deficiency caused by 2 novel frameshift mutations: 2952delT in exon 13 and 5493insG in exon 16 of factor V gene. *Blood* 2002; 99: 702–705.
 99. Traynis I, Jones CD, Gibb CB, Acharya SS, Zehnder JL. First molecular characterization of a patient with combined factor V and factor VII deficiency. *Thromb Haemost* 2006; 95: 1031–1032.
 100. Orban T, Kalafatis M, Gogonea V. Completed Three-Dimensional Model of Human Coagulation Factor Va. *Molecular Dynamics Simulations and Structural Analyses*. *Biochemistry* 2005; 44: 13082–13090.
 101. Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J Phys Chem* 2001; 105: 6474–6487.

102. Jorgensen, WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 1983; 79: 926–935.
103. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993; 98: 10089–10092.
104. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996;14:33-8,27-8.
105. Kárpáti L, Penke B, Katona É, Balogh I, Vámosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 1946–55.
106. Katona É, Haramura G, Kárpáti L, Fachel J, Muszbek L. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost* 2000; 83: 268–73.
107. Katona É, Ajzner É, Tóth K, Kárpáti L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 2001; 258: 127–35.
108. Stahl C, Staehelin T, Miggiano V, Schmidt J, Haring P. High frequencies of antigenspecific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *J Immunol Methods* 1980; 32: 297–304.
109. Falkenberg VR, Whistler T, Murray JR, Unger ER, Rajeevan MS. Identification of Phosphoglycerate Kinase 1 (PGK1) as a reference gene for quantitative gene expression measurements in human blood RNA. *BMC Res Notes* 2011; 4: 324.
110. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing realtime PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101–8.
111. Goodeve AC, Reitsma PH, McVey JH. Nomenclature of genetic variants in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2011;9:852-55.
112. Wu Y, Eghbali M, Ou J, Lu R, Toro L, Stefani E. Quantitative determination of spatial protein-protein correlations in fluorescence confocal microscopy. *Biophys J*. 2010;98:493-504.
113. Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* 1993;169:375-82.
114. Jacobson MP, Pincus DL, Rapp CS, Day TJ, Honig B, Shaw DE, Friesner RA. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* 2004;55:351-67.

115. Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, Raman S, Thompson J, Tyka M, Baker D, Karplus K. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*. 2009;77 Suppl 9:114-22.
116. Pronk S, Pall S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 2013;29:845-54.
117. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605-12.
118. Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry* 1992; 31: 3777–3785.
119. Yamazaki T, Nicolaes GAF, Sørensen KW, Dahlbäck B. Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor V R2 haplotype. *Blood* 2002; 100: 2515–2521.
120. Bayston TA, Ireland H, Olds RJ, Thein SL, Lane DA. A polymorphism in the human coagulation factor V gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2085.
121. Murray JM, Rand MD, Egan JO, Murphy S, Kim HC, Mann KG. Factor V New Brunswick: Ala221-to-Val substitution results in reduced cofactor activity. *Blood* 1995; 86: 1820–1827.
122. Montefusco MC, Duga S, Asselta R, Malcovati M, Peyvandi F, Santagostino E, Mannucci PM, Tenchini ML. Clinical and molecular characterization of 6 patients affected by severe deficiency of coagulation factor V: broadening of the mutational spectrum of factor V gene and in vitro analysis of the newly identified missense mutations. *Blood* 2003; 102: 3210–3216.
123. van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Aldert R. van Buuren AR, Apol E, Meulenhoff PJ, Tieleman DP, Sijbers ALTM, Feenstra KA, van Drunen R, Berendsen HJC. Groningen Machine for Chemical Simulations (GroMaCS) version 3.3, <http://www.gromacs.org>
124. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987;70:165-72.

125. Traynis I, Jones CD, Gibb CB, Acharya SS, Zehnder JL. First molecular characterization of a patient with combined factor V and factor VII deficiency. *Thromb Haemost* 2006; 95: 1031–1032.
126. Lunghi B, Scanavini D, Castoldi E, Gemmati D, Tognazzo S, Redaelli R, Ghirarduzzi A, Ieran M, Pinotti M, Bernardi F. The factor V Glu1608Lys mutation is recurrent in familial thrombophilia. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2032–2038.
127. Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood*. 2015;125(13):2052-2061.
128. Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Siboni SM, Halimeh S, Faeser B, Pergantou H, Platokouki H, Giangrande P, Peerlinck K, Celkan T, Ozdemir N, Bidlingmaier C, Ingerslev J, Giansily-Blaizot M, Schved JF, Gilmore R, Gadisseur A, Benedik-Dolničar M, Kitanovski L, Mikovic D, Musallam KM, Rosendaal FR; European Network of Rare Bleeding Disorders Group. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. *J Thromb Haemost*. 2012;10(4):615-21.
129. Morange P, Trigui N, Frère C, Chambost H, Pouymayou C, Uters M, Boucly C, Juhan-Vague I, de Mazancourt P. Molecular characterization of a novel mutation in the factor XIII a subunit gene associated with a severe defect: importance of prophylactic substitution. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20: 605–6.
130. Árokszallási A, Kerényi A, Katona É, Bereczky Z, Muszbek L, Boda Z, Schlammadinger Á. The use of recombinant factor XIII in a major bleeding episode of a patient with congenital factor XIII deficiency--the first experience. *Haemophilia* 2015;21:e118-21.
131. Ajzner É, Muszbek L. Kinetic spectrophotometric factor XIII activity assays: the subtraction of plasma blank is not omissible [corrected]. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2075–7.
132. Lawrie AS, Green L, Mackie IJ, Liesner R, Machin SJ, Peyvandi F. Factor XIII—an under diagnosed deficiency—are we using the right assays? *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2478–82.
133. Meijer P. Clinically needed sensitivity for very low levels of Factor XIII: not yet proven for a new functional assay. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 1753–4.
134. Odame JE, Chan AK, Wu JK, Breakey VR. Factor XIII deficiency management: a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014;25(3):199-205.

135. Rovida E, Merati G, D'Ursi P, Zanardelli S, Marino F, Fontana G, Castaman G, Faioni EM. Identification and computationally-based structural interpretation of naturally occurring variants of human protein C. *Hum Mutat* 2007;28:345-55.
136. Lind B, Gedde-Dahl T, Tjønnfjord G, Villoutreix BO, Brosstad F. Protein C deficiency caused by homozygosity for a novel PROC D180G mutation--in vitro expression and structural analysis of the mutation. *Thromb Haemost* 2002;88:632-8.
137. Lind B, Koefoed P, Thorsen S. Symptomatic type 1 protein C deficiency caused by a de novo Ser270Leu mutation in the catalytic domain. *Br J Haematol* 2001;113:642-8.
138. Greengard JS, Fisher CL, Villoutreix B, Griffin JH. Structural basis for type I and type II deficiencies of antithrombotic plasma protein C: patterns revealed by threedimensional molecular modelling of mutations of the protease domain. *Proteins* 1994;18:367-80.
139. Yu T, Dai J, Liu H, Wang J, Ding Q, Wang H, Wang X, Fu Q. Homozygous protein C deficiency with late onset venous thrombosis: identification and in vitro expression study of a novel Pro275Ser mutation. *Pathology* 2012;44:348-53.
140. Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yasu T, Kariya Y, Hoshino Y, Sakata Y. Defective sorting to secretory vesicles in trans-Golgi network is partly responsible for protein C deficiency: molecular mechanisms of impaired secretion of abnormal protein C R169W, R352W, and G376D. *Circ Res* 2003;92:865-72.
141. Tokunaga F, Tsukamoto T, Koide T. Cellular basis for protein C deficiency caused by a single amino acid substitution at Arg15 in the gamma-carboxyglutamic acid domain. *J Biochem* 1996;120:360-8.
142. Mimuro J, Muramatsu S, Kaneko M, Yoshitake S, Iijima K, Nakamura K, Sakata Y, Matsuda M. An abnormal protein C (protein C Yonago) with an amino acid substitution of Gly for Arg-15 caused by a single base mutation of C to G in codon 57 (CGG-->GGG). Deteriorated calcium-dependent conformation of the gammacarboxyglutamic acid domain relevant to a thrombotic tendency. *Int J Hematol* 1993;57:9-14.
143. Gandrille S, Aiach M. Identification of mutations in 90 of 121 consecutive symptomatic French patients with a type I protein C deficiency. *The French*

- INSERM Network on Molecular Abnormalities Responsible for Protein C and Protein S deficiencies. *Blood* 1995;86:2598-605.
144. Dávid M, Losonczy H, Sas G, Nagy A, Kutscher G, Meyer M. Identification of mutations in 15 Hungarian families with hereditary protein C deficiency. *Br J Haematol.* 2000;111:129-35.
 145. Harmon S, Preston RJ, Ni Ainle F, Johnson JA, Cunningham MS, Smith OP, White B, O'Donnell JS. Dissociation of activated protein C functions by elimination of protein S cofactor enhancement. *J Biol Chem* 2008;283:30531-9.
 146. Wildhagen KC, Lutgens E, Loubele ST, ten Cate H, Nicolaes GA. The structurefunction relationship of activated protein C. Lessons from natural and engineered mutations. *Thromb Haemost* 2011; 106:1034-45.
 147. Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* 2010;12:836-41.
 148. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1807-19.
 149. Luan CJ, Shen W, Yu Z, Chen L, Gu Y, Tang LY, Wang ZG, Dai L, Gu MM. Two nonsense mutations cause protein C deficiency by nonsense-mediated mRNA decay. *Thromb Res.* 2015;135(4):733-8.
 150. Liu H, Wang HF, Tang L, Yang Y, Wang QY, Zeng W, Wu YY, Cheng ZP, Hu B, Guo T, Hu Y. Compound heterozygous protein C deficiency in a family with venous thrombosis: Identification and in vitro study of p.Asp297His and p.Val420Leu mutations. *Gene.* 2015 Mar 4. pii: S0378-1119(15)00254-1. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.002. [Epub ahead of print]

7.2 Publikációs lista



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Jelölt: Kovács Kitti Bernadett
Neptun kód: JBEG2D
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10038836

Nyilvántartási szám: DEENK/40/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, K.B.**, Pataki, I., Bárdos, H., Fekete, A., Pfliegler, G., Haramura, G., Gindele, R., Komáromi, I., Balla, G., Ádány, R., Muszbek, L., Bereczky, Z.: Molecular characterization of p.Asp77Gly and the novel p.Ala163Val and p.Ala163Glu mutations causing protein C deficiency.
Thromb. Res. Epub ahead of print (2015)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2015.01.011>
IF:2.427 (2013)
2. Katona, É., Muszbek, L., Devreese, K., **Kovács, K.B.**, Bereczky, Z., Jonkers, M., Shemirani, A., Mondelaers, V., Ermens, A.A.M.: Factor XIII deficiency: Complete phenotypic characterization of two cases with novel causative mutations.
Haemophilia. 20 (1), 114-120, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/hae.12267>
IF:2.468 (2013)
3. Bereczky, Z., **Kovács, K.B.**, Muszbek, L.: Protein C and protein S deficiencies: Similarities and differences between two brothers playing in the same game.
Clin. Chem. Lab. Med. 48 (Suppl.1), S53-S66, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2010.369>
IF:2.069





4. **Kovács, K.B.**, Tisza, B., Komáromi, I., Muszbek, L., Bereczky, Z.: Inherited factor V deficiency associated with a novel heterozygous missense mutation (p.G493R) in a patient with excessive surgical bleeding.

Thromb. Haemost. 102 (4), 787-789, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH-09-04-0272>

IF:4.451

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,415

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,415

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

Debrecen, 2015.02.23.



8. Tárgyszavak

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Hemosztázis rendellenesség | 1. Hemostatic disorder |
| 2. Ritka koagulopathia | 2. Rare coagulopathy |
| 3. Ritka thrombophilia | 3. Rare thrombophilia |
| 4. FV deficiencia | 4. FV deficiency |
| 5. FXIII deficiencia | 5. FXIII deficiency |
| 6. PC deficiencia | 6. PC deficiency |
| 7. Molekuláris genetikai vizsgálat | 7. Molecular genetic examination |
| 8. Mutáció analízis | 8. Mutation analysis |
| 9. In vitro expressziós tanulmányok | 9. In vitro expression studies |
| 10. Molekuladinamikai modellezés | 10. Molecular dynamics simulation |

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bereczky Zsuzsannának, lassan egy évtizedes támogatását, segítségét, hiszen az idén 9 éve annak, hogy harmadéves orvostanhallgatóként először megkerestem azzal, hogy valamilyen hemosztázis kutatómunkát szeretnék végezni az irányítása alatt. Hálával tartozom Muszbek László professzor úrnak segítségéért, támogatásáért, jó tanácsaiért, melyek végigkövették mind TDK, mind PhD hallgatóként az Intézetben eltöltött éveimet. Köszönöm az egykori Klinikai Kutató Központ, jelenlegi Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék valamennyi munkatársának segítségét, támogatását. Hálás vagyok a Laboratóriumi Medicina Intézet és a Megelőző Orvostani Intézet kollégáinak segítségéért. Nem elhanyagolható a családom szüntelen támogatása, biztatása, lélek-tartása az elmúlt évek alatt, nagyon hálás vagyok türelmükért.

E mű megvalósítását a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 és OTKAPD101120 pályázati támogatások tették lehetővé.

10. Függelék