

**GLANZMANN THROMBASTHENIÁT OKOZÓ MUTÁCIÓK HATÁSA A
FIBRINOGEN RECEPTOR SZINTÉZISÉRE, INTRACELLULÁRIS
TRANSPORTJÁRA, FELSZÍNI EXPRESSZIÓJÁRA ÉS FUNKCIÓJÁRA**

DOKTORI TÉZIS

DR. LOSONCZY GERGELY

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. MUSZBEK LÁSZLÓ

2007

Bevezetés

A Glanzmann thrombasthenia visszatérő bőr- és nyálkahártyavérzéssel, jellegzetesen menorrhagiával, orr- és gastrointestinalis vérzéssel járó, autoszomális recesszíven öröklődő, súlyos, de ritka betegség. A betegséget először Eduard Glanzmann (1887–1959) svájci gyermekgyógyász írta le 1918-ban. A közvetlenül a születés után jelentkező, súlyos vérzéssel, megnyúlt vérzési idővel és hiányzó véralvadék retrakcióval járó kórképet thrombastheniának nevezte el. Etiopatológiai oka a thrombocytá fibrinogén receptorának (glikoprotein IIb/IIIa komplex, GPIIb/IIIa, $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, CD41a) teljes hiánya, csökkent felszíni expressziója vagy a komplexet képző fehérjék struktúrájában bekövetkezett változások okozta csökkent működése. Mindezek következtében zavart szenved a thrombocyták fibrinogén kötése, aminek az eredménye a thrombocytá aggregáció hiánya.

A fibrinogén receptor a véralvadásban központi szerepet betöltő thrombocytá felszíni integrin, mely a glikoprotein IIb (GPIIb, α_{IIb} integrin, CD41) és a glikoprotein IIIa (GPIIIa, β_3 integrin, CD61) által alkotott non-kovalens, Ca-függő heterodimer. A GPIIb/IIIa szintézisére és felszíni expressziójára emberi szervezetben kizárólag megakaryocyták és thrombocyták képesek. A GPIIb kizárólag a GPIIIa-val alkot komplexet, míg a GPIIIa más integrinekhez is kapcsolódhat, például az α_v integrinnel komplexben alkotja a vitronektin receptort, mely kis mennyiségben a vérlemezkék felszínén és α -granulumjaiban is megtalálható, de emellett endothel sejtek, osteoblastok, monocyták és aktivált B-lymphocyták felszínén is expresszálódik. Egy vérlemezke felszínén átlagosan 50 vitronektin receptor található, azonban a GPIIb eredetű Glanzmann thrombastheniában száma megemelkedhet. A vitronektin receptor kimutatásával elkülöníthető a GPIIb és a GPIIIa defektusa által okozott Glanzmann thrombasthenia. A GPIIb/IIIa a vérlemezkék egyik legnagyobb mennyiségű fehérjéje, mely a vérlemezkék sejtmembránja mellett az α -granulumokban is megtalálható. Thrombocytá aktiváció során az α -granulumokból rövid idő alatt nagy mennyiségű fibrinogén receptor jut a vérlemezkék felszínére. Aktiválatlan vérlemezkék felszínén kb. 40.000-80.000 darab receptor található, aktiváció hatására számuk 30-50%-kal emelkedik meg.

A GPIIb és a GPIIIa génje a 17-es kromoszómán egymás közelében helyezkedik el. A GPIIb fehérje 1008, a GPIIIa fehérje 762 aminosavból épül fel, és mindkét integrin extracelluláris doménje glikozilált. A nem-redukáló körülmények között végzett nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) a GPIIb molekulatömege megközelítőleg 140 kDa, míg a GPIIIa molekulatömege 95 kDa. Az endoplazmatikus retikulumban (ER) egyláncú, ún. pro-GPIIb szintetizálódik, mely a GPIIIa-val Ca-függő, 1:1 arányú heterodimert képez. A komplexképződés sejt felszíni expresszió előfeltétele, ennek hiányában az integrinek intracellulárisan eliminálódnak. Az endoplazmatikus retikulumban

kialakulnak a molekulán belüli kénhidak, és megtörténik az integrinek N-glikozilációja. A pro-GPIIb/IIIa komplex érése során innen a Golgi apparátusba jut, ahol az integrinek O-glikozilálódnak, és emellett a pro-GPIIb egy 871 aminosavból álló N-terminális nehézláncra és egy 137 aminosavból álló C-terminális könnyűláncra hasad. A GPIIb két lánc egy diszulfid-hídon keresztül kapcsolódik egymáshoz. Redukáló környezetben végzett SDS-PAGE segítségével elkülöníthető a pro-GPIIb és az érett GPIIb. A 140 kDa molekulatömegű pro-GPIIb mobilitása redukáló közegben nem változik, míg az érett GPIIb egy a 25 kDa molekulatömegű könnyűláncra és egy 115 kDa molekulatömegű nehézláncra hasad. A GPIIIa-ban nagyszámú intramolekuláris diszulfid híd található, melyek redukció hatására felnyílnak, és ennek következtében a molekula az SDS PAGE-en lassabban vándorol.

A GPIIb/IIIa molekula N-terminális globuláris fejét a GPIIb β -propeller és a GPIIIa A doménje alkotja szoros interakcióban, ez alatt a GPIIb és a GPIIIa alkotta két láb helyezkedik el, melyek a nyugvó receptorban több helyen kapcsolatban vannak egymással, a thrombocyta aktiváció hatására azonban különválnak. A GPIIb β -propeller doménjét 7, egyenként 60-70 aminosavból álló, sugárirányban elhelyezkedő ismétlődő szekvencia (lapát) alkotja. A lapátok 4 antiparallel lemezből állnak, melyek közül a belsők amid és karbonil oxigén csoportjaikkal alkotják a propeller centrumában elhelyezkedő csatorna falát. A propeller centrumában, a csatorna mélyén 4 Ca^{2+} -kötő hely helyezkedik el, melyek a GPIIIa 261-es arginin aminosavával állnak interakcióban. A GPIIb doménjei közül a β -propeller képezi a legerősebb és legnagyobb felületű kapcsolatot a GPIIIa-val. A ligand (fibrinogén, nagy nyíró aránynál a von Willebrand faktor is) kötéséért és annak specificitásáért a β -propeller domén 2.-4. lapátjának bizonyos hurkai által létrehozott „cap” szubdomén és a GPIIIa A-doménje felelős. A GPIIb-ben a β -propeller alatt helyezkedik el a thigh domén, mely a β -propeller 7. lapátjának Ca-kötő hurkával alkot szoros, Ca-függő, kb. 700 \AA^2 felületű kapcsolatot. A thigh domén alatt található a calf-1, ez alatt a calf-2 domén. A calf domének alkotta calf modul rigid struktúráját a calf domének közötti kiterjedt, nagyjából 500 \AA^2 felületű hidrofób kapcsolat biztosítja. A thigh domén és a calf modul között helyezkedik el a globuláris fej mozgását lehetővé tevő hajlékony szakasz, melyet a molekula „térd”-ének neveznek. A calf-2 doménnek része a molekula transzmembrán és rövid intracelluláris szakasza, melyek a molekula könnyűláncán találhatók. A GPIIIa-ban N-terminálisan helyezkedik el az A domén, melynek része a ligand kötésben szerepet játszó fémion függő adhéziós hely (metal ion dependent adhesion site, MIDAS). Ettől C-terminális irányban található a hibrid és a plexin-szemaforin-integrin (PSI) domén, melyek az A domént 4 ismétlődő EGF (epidermális növekedési faktor, epidermal growth factor) - szerű doménhez kapcsolják. A molekula extracelluláris szakaszának utolsó tagja a cisztatin-szerű domén. A

GPIIb calf-1 és calf-2 doménjei nyugvó receptoron a GPIIIa EGF-szerű doménjével alkotnak kis kiterjedésű kapcsolatot.

A fibrinogén receptor nyugvó trombocytákon inaktív állapotban van. Valamilyen trombocyta agonista (ADP, trombin, tromboxan A₂) receptorához történő kötődése által elindított biokémiai folyamatok szükségesek ahhoz, hogy belülről kifelé történő (inside-out) szignalizáció következtében kialakuljon a receptor ligandot kötni képes aktív formája. A fibrinogén receptor elsődleges szerepe a hemosztázisban a vérlemezke aggregáció mediálása, melyhez a szolubilis fibrinogén (és/vagy von Willebrand faktor) megkötése szükséges. A receptor-ligand kapcsolódás kívülről befelé történő (outside-in) szignalizációt indukál, hatására a receptorok csoportokba rendezőnek, így biztosítják az extracelluláris mátrix és a citoskeleton közötti erős kapcsolódást, ami a véralvadék retrakció előfeltétele.

A Glanzmann thrombasthenia 3 csoportra osztható:

I-es típusú Glanzmann thrombasthenia

Hiányzó vérlemezke aggregáció, α -granulum fibrinogén tartalom és véralvadék retrakció, minimális, vagy teljesen hiányzó felszíni GPIIb/IIIa expresszió jellemzi.

II-es típusú Glanzmann thrombasthenia

Hiányzó vérlemezke aggregáció, mérhető, de csökkent α -granulum fibrinogén tartalom, normál vagy csökkent véralvadék retrakció, jól mérhető, de erősen csökkent (<15%) felszíni GPIIb/IIIa expresszió jellemzi.

Variáns Glanzmann thrombasthenia

Hiányzó, vagy abnormális vérlemezke aggregáció, változó mértékben csökkent α -granulum fibrinogén tartalom és véralvadék retrakció mellett a felszíni GPIIb/IIIa expresszió normál vagy csökkent. A betegség hátterében olyan genetikai defektus áll, mely a receptor ligandkötő képességét jelentősen csökkenti.

Tézisemben beszámolok két Glanzmann thrombastheniában szenvedő beteg laboratóriumi vizsgálatainak eredményeiről, a betegségüket okozó genetikai defektusokról, valamint ezek hatásáról a fibrinogén receptor szintézisére, intracelluláris transzportjára, felszíni expressziójára és funkciójára.

Betegek

1. Beteg

Laboratóriumunkban egy hat éves roma származású gyermek (a DEOEC Gyermekklinikájának a betege) vizsgálatát végeztük súlyos, visszatérő haemorrhagiás tünetek miatt. A gyermek újszülött korában súlyos köldökvérzés és intramuscularis injekció helyén kiterjedt haematoma jelentkezett. Visszatérő bőr és nyálkahártyavérzések, valamint súlyos

epistaxis miatt többször állt kezelés alatt. A véralvadás szűrőtesztjei és a thrombocytaszám referencia tartományon belüli értékeket mutattak, míg a vérzési időt (>20 min) és a PFA-100 záródási időt mind kollagén-ADP (>300 sec), mind kollagén-epinefrin (>300 sec) patronnal jelentősen megnyúltak mértük. A beteg vérlemezkéi nem aggregáltak ADP, adrenalin, arachidonsav, kollagén és trombin hatására sem, a véralvadék retrakció teljes mértékben hiányzott. Mindezek alapján felállítottuk az I-es típusú Glanzmann thrombasthenia diagnózisát, amit az áramlási citometriás mérések megerősítettek. A szülők között rokoni kapcsolatot nem tudtunk igazolni, a beteg családtagjai között haemorrhagiás diathesis nem fordult elő.

2. Beteg

A II. sz. Belgyógyászati Klinika Hemosztazeológiai Tanszékének korábban diagnosztizált 53 éves férfibetege szintén nem rokonházasságból született. Gyermekkora óta többször állt kezelés alatt ismétlődő epistaxis, fogíny és gastrointestinális vérzések miatt. 20 éves korában jelentős fokú melena és haematemesis miatt végzett exploratív laparotomia a tünetek háttérében organikus eltérést nem igazolt. A véralvadás szűrőtesztjei és a thrombocytaszám normál értékeket mutattak, a vérzési idő (>20 min) és a PFA-100 záródási idő mind kollagén-ADP (>300 sec), mind kollagén-epinephrin (>300 sec) patronnal jelentősen megnyúlt volt. Thrombocyta aggregációs válasz ADP, adrenalin, kollagén, arachidonsav, és trombin hatására sem volt kiváltható. A véralvadék retrakció mérhető, de csökkent volt és a kontrollhoz képest lassabban alakult ki. Mindezek alapján II-es típusú Glanzmann thrombastheniát állapítottunk meg, melyet az áramlási citometriás mérések megerősítettek. A beteg két lányának nem voltak vérzéses tünetei, thrombocyta aggregációjuk normális volt.

Anyagok és módszerek

Plazma és thrombocyta minták előkészítése

Írásos beleegyező nyilatkozat birtokában a betegektől és családtagjaiktól könyökvénából vettünk vért, amit 10% térfogatarányú 0.105 mol/l koncentrációjú nátrium-citráttal alvadástólítottunk. Thrombocytadús plazma (platelet rich plasma, PRP) nyeréséhez a mintákat 37 °C-on, 15 percen keresztül 120 g-vel centrifugáltuk. Thrombocytaszegény plazmát (platelet poor plasma, PPP) a minták 2,000 g sebességgel, 20 percen keresztül törénő centrifugálásával nyertünk. A PRP felhasználásával mosott thrombocyta szuszpenziót készítettünk.

Vérlemezkek áramlási citometriás vizsgálata

Tízszerezésre hígított nátrium-citráttal alvadásgátolt vérben fluoreszcens, direkt jelölt, 10 µg/ml koncentrációjú antitestekkel szobahőmérsékleten 20 percen keresztül jelöltük a vérlemezkek felszíni GPIX (FITC-anti GPIX, Becton-Dickinson, Erenbodegen, Belgium), GPIIb (PE/fikoeritrin/-anti GPIIb, Dako, Glostrup, Denmark) és GPIIIa (FITC/fluoreszcein izotiocianát/-anti GPIIb/IIIa, Sigma, St. Louis, MO) integrinjeit. Jelölés után a mintákat PBS-ben (phosphate buffered saline) mostuk, 1%-os paraformaldehydben fixáltuk és FACS Calibur áramlási citométerben (Becton-Dickinson) analizáltuk. Az intracelluláris GPIIb és GPIIIa kimutatásához a vérlemezkéket 0.1% Triton-X 100-zal permeabilizáltuk. A fibrinogén receptort és az első beteg esetében a vitronektin receptort kvantitatív módon is analizáltuk aktiválatlan és TRAP-pal (trombin receptor agonista peptid) aktivált trombocytákon az ADIAflo Platelet Gp kit (American Diagnostica, Greenwich, CT) szenzitív, indirekt jelölési és kalibrációs rendszerével. A vitronektin receptor kimutatásához jelöletlen monoklonális antitestet (Serotec, Kidlington, UK) használtunk. A detektáláshoz mindkét receptor esetében FITC-konjugált, kecskében termelt egér IgG ellenes IgG F(ab')₂ (Dako) antitestet használtunk.

Polimeráz láncreakció és direkt DNS szekvenálás

A betegek és családtagjaik genomiális DNS-ét perifériás fehérvérsejtekből izoláltuk a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) használatával. A GPIIb gén exonjait és a rövid határoló introni szakaszokat polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk. A PCR termékeket ultrafiltrációval megtisztítottuk, szekvenciájukat direkt szekvenálással határoztuk meg ABI Prism 310, vagy ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) készülékben.

50 véletlenszerűen kiválasztott, nem rokon, egészséges egyénben direkt szekvenálással megvizsgáltuk a 2. betegnél kimutatott aminosavcserét okozó mutációk előfordulását.

A thrombocyta RNS analízise

A nonsense mutáció okozta gyorsult GPIIb mRNS lebomlás és az alternatív splicing lehetőségét vizsgálva a betegek és 3 független kontroll vérlemezkeiből a teljes RNS tartalmat Nucleospin RNA II kittel izoláltuk a gyártó (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) által előírt protokoll szerint. A reverz transzkripciót mintánként három párhuzamos reakcióban és egy RNS nélküli kontrollal (non-RT) végeztük, melyhez gyári kitet használtunk (First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A GPIIb cDNS 12. és 27. exon közé eső szakaszát mindkét betegben átfedő PCR termékekkel amplifikáltuk, majd direkt szekvenálással analizáltuk.

Az első beteg esetében a GPIIb relatív kvantitatív analízise céljából a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) cDNS-ének, valamint a GPIIb cDNS-ének egy-egy szegmentjét amplifikáltuk. A reverz transzkripció után mintánként 3 párhuzamos PCR amplifikációt végeztünk SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) reakcióelegyet használva Light Cycler 2.0 (Roche) berendezésben. A reakciók áttörési pontját (crossing point, Cp) a Light Cycler Software 4.0 számítógépes program algoritmusai határozta meg. A program áttörési pontként definiálta azt a ciklust, melyben a minta fluoreszcencia erőssége a reakció során először haladta meg szignifikánsan a háttér fluoreszcenciát, és amely ciklusban az amplifikációs görbe a log-lineáris fázisba lépett. A GPIIb mRNS relatív kvantitatív meghatározását az alábbi képlet segítségével végeztük: $GpIIB \text{ mRNS beteg/kontroll arány} = \frac{E_{(GPIIb)}^{\Delta Cp \text{ GPIIb (kontroll-minta)}}}{E_{(GAPDH)}^{\Delta Cp \text{ GAPDH (kontroll-minta)}}$, ahol E a PCR reakció hatékonyságát jelöli. Az E értékét az $E=10^{(-1/\text{meredekség})}$ képlet segítségével annak az egyenesnek a meredekségéből kaptuk, melyet a GPIIb és GAPDH minták 1-512-szeres, duplázódó hígítási sorának áttörési pontjait a hígítás logaritmikus skáláján történő ábrázolásával készítettünk.

SDS-PAGE és immunoblotting

A vérlemezkék teljes GPIIb és GPIIIa tartalmának kimutatásához thrombocyta lizátumok SDS-PAGE és Western blotting vizsgálatát végeztük. A fibrinogén receptort alkotó integrineket poliklonális, birkában termelt GPIIb/IIIa ellenes antitesttel (Affinity Biologicals, Hamilton, Canada) és monoklonális GPIIIa ellenes antitesttel (Serotec) jelöltük. A detektáláshoz a Vectastain Elite ABC Sheep and Mouse IgG kitet (Vector, Burlingame, CA) használtuk a gyártó által előírt protokoll alapján.

Site directed mutagenesis, BHK sejtek transzfektálása és sejt kultúra

A normál GPIIb cDNS-t, és szelekciós markerként a genecin rezisztencia gént tartalmazó pcDNA3 plazmidot Dr. Peter Newman (Blood Center of Southeastern Milwaukee) bocsátotta a rendelkezésünkre. A normál GPIIIa plazmidot és a higromicin rezisztencia gént is hordozó PCEP4 plazmidot Dr. Deborah Frenchtől (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY) kaptuk. A GPIIb génben detektált mutációkat a Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) segítségével külön-külön inzertáltuk a GPIIb cDNS-ébe. Baby Hamster Kidney (BHK) sejteket normál GPIIIa cDNS-t hordozó PCEP4 plazmiddal és normál vagy mutáns GPIIb cDNS-t tartalmazó pcDNA3 plazmiddal tranziensen ko-transzfektáltunk LipofectAMINE reagens (Gibco, Pailey, United Kingdom) használatával. Á1-transzfektált BHK sejteket az antibiotikum rezisztencia gént hordozó, de GPIIb vagy GPIIIa cDNS-t nem tartalmazó plazmidokkal végzett ko-transzfektációval készítettünk. A BHK sejteket Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) tápoldatban tenyésztettük, melyet 2

mg/ml glutaminnal és 5% fetal calf serummal (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) szuplementáltunk. A transzfektált sejtek szelektálását a tápoldathoz adott 0.5 mg/ml végkoncentrációjú geneticin (Gibco) és/vagy higromicin (Roche) antibiotikumokkal végeztük.

A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIb/IIIa expressziójának vizsgálata

A STOP509 GPIIb cDNS-sel transzfektált 5×10^5 BHK sejtet 100 mikroliter PBS-ben 10 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációjú PE-konjugált GPIIb ellenes antitesttel (Dako) szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. A sejt felszíni fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerben (FacsCalibur, BD) mértük. A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIb/IIIa jelölését mindkét beteg esetében konfokális lézer szkennig mikroszkópiával (CLSM) vizsgáltuk. Fedőlemezen lévő élő BHK sejteket 4°C -on 10 percig PE-konjugált GPIIb ellenes (Dako), vagy FITC-konjugált GPIIb/IIIa komplex ellenes monoklonális antitesttel (Becton Dickenson) inkubáltuk. A sejteket ezután PSB-sel mostuk, majd 10 percig 1%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk, végül Mowiolal (0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 25 % glycerol (w/v), and 10% Mowiol 4-88, Hoechst, Frankfurt, Germany) fedtük. A sejtek felszíni jelölését Zeiss LSM510 CLSM-mel detektáltuk olajimmerziós objektíven (63x Plan Apochromat NA=1.4) keresztül. A FITC festék esetében 488 nm-es excitációs lézert és 505-550 nm közötti emissziós filtert használtunk. A PE gerjesztéséhez 543 nm-es lézert, detektálásához 560 nm feletti szűrőt használtunk.

A GPIIb és GPIIIa immunoprecipitációja transzfektált BHK sejtekből.

Normál GPIIIa cDNS-sel és mutáns vagy normál GPIIb cDNS-sel transzfektált 5×10^6 számú BHK sejtet lízis pufferben (20 mM Tris [tris(hidroximetil)aminometán] HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholic acid, and complete protease inhibitor mix [Roche]) oldottunk fel. A sejt lizátumokat 30 percig jégen inkubáltuk, majd a sejt törmelékét 20 perces, 16.000 g sebességű centrifugálással távolítottuk el. A felülúszók GPIIb és GPIIIa tartalmát poliklonális GPIIb/IIIa ellenes (Affinity Biologicals), vagy monoklonális GPIIIa ellenes antitesttel (Becton-Dickenson) immunoprecipitáltuk. Az immunoprecipitátumokat Protein A Sefarose-zal (Sigma), illetve Protein A Agarose-zal (Sigma) izoláltuk. Az immunoprecipitált proteinek SDS-PAGE és Western blotting után poliklonális GPIIb/IIIa ellenes (Affinity Biologicals) antitesttel jelöltük és Vectastain ABC kittel (Vector) detektáltuk.

Pulse-chase analízis

Megközelítőleg 10^6 számú vad típusú, L116V, STOP575 és H782N mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t koexpresszáló BHK sejtet egy órán keresztül metionin-mentes tápoldatban tartottunk, amit ezután 500 $\mu\text{Ci/ml}$ radioaktivitású [^{35}S] metionin izotóppal (Merck, Darmstadt, Germany) szuplementáltunk (pulse). 30 perc elteltével az izotópot a sejtek mosásával eltávolítottuk, és a sejteket normál tenyésztési körülmények közé helyeztük. Az egyes sejttenyésztőkben lévő sejteket különböző időpontokban, 0, 1, 3, 6 és 24 óra elteltével lizáltuk (chase) és poliklonális GPIIb/IIIa ellenes antitesttel (Affinity Biologicals) immunoprecipitáltuk. A precipitatumokat 7,5%-os gélen (SDS-PAGE) redukáló környezetben elektroforetizáltuk. A gélt ezután izopropanol-ecetsav-víz 25:10:65 térfogatarányú oldatában fixáltuk, és Amplify oldatba (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) áztattuk. Végül a gélt vákumszáritóban megszáritottuk. Az előhívás $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -on, Hyperfilm High Performance Autoradiography Film-re (Amersham) történt. A proteinek relatív mennyiségét GS-800 kalibrált denzitométerrel (Bio-Rad) határoztuk meg.

Az L116VGPIIb/GPIIIa komplex fibrinogén kötő képességének meghatározása

10^7 számú ál-transzfectált, illetve normál vagy L116VGPIIb cDNS-sel és normál GPIIIa cDNS-sel ko-transzfectált BHK sejtet 0,1% BSA (bovine serum albumin) és 0.25 mM MgCl_2 tartalmú TBS-ben (Tris buffered saline) szuszpendáltunk. A sejteket 60 percig szobahőmérsékleten 0.1 mg/ml koncentrációjú humán fibrinogénnel (Sigma) inkubáltuk a GPII/IIIa sztérikus aktivációját kiváltó, 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú PT25-2 monoklonális antitest (Takara, Shiga, Japan) jelenlétében, illetve nélküle. Ezután a sejteket lecentrifugáltuk, a fenti TBS pufferben reszuszpendáltuk és 20 percig szobahőmérsékleten 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú FITC-konjugált nyúlban termelt humán fibrinogén ellenes antitesttel (Dako) inkubáltuk. A sejteket FacsCalibur áramlási citométerben (Becton-Dickinson) analizáltuk. A háttérfluoreszcenciát az ál-transzfectált sejtek mérésével kaptuk.

A GPIIb intracelluláris elhelyezkedése

A transzfectált BHK sejteket PBS-sel mostuk, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -os metanollal permeabilizáltuk és fixáltuk. A fedőlemezeket ezt követően 0.05% Triton X-100 és 0.5% BSA tartalmú PBS-sel (TX-BSA-PBS) mostuk, majd TX-BSA-PBS-ben oldott fluoreszcensen jelölt antitestekkel inkubáltuk szobahőmérsékleten 40 percig. Az oldat az alábbi antitesteket tartalmazta: protein diszulfid izomeráz (PDI) ellenes egér monoklonális antitest (ascites, 1:200 hígítás) (Affinity Bioreagents, Golden, CO), 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú anti-Golgin-97 egér monoklonális antitest (Invitrogen), és 4 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú PE-konjugált GPIIb ellenes (DAKO) antitestet. A PDI és a Golgin-97 ellenes antitesteket előzőleg AlexaFluor 488-cal, illetve AlexaFluor 647-tel

jelölt, kecskében termelt egér IgG ellenes antitesttel (GAMIG) konjugáltuk a Zenon jelölő és blokkoló kittel (Invitrogen). A sejteket ezt követően 3x mostuk TX-BSA-PBS-sel, majd mikroszkópos tárgylemezre helyeztük és 5 µl Mowiolal fedtük. A mintákat Zeiss 510 LSM konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizsgáltuk. Az AlexaFluor 488 festéket 488 nm-es Ar ion lézerrel gerjesztettük, és 505-550 nm közötti szűrőn keresztül detektáltuk. A PE-t 543 nm-es HeNe lézerrel gerjesztettük és 560-625 nm közti szűrőn keresztül detektáltuk. Az AlexaFluor 647 festéket 633 nm-es HeNe lézerrel gerjesztettük, és 650 nm alatti szűrőn keresztül detektáltuk. A pinhole apertúrák beállítása 1 µm-es optikai szeleteket eredményezett. 512×512 pixel felbontású képeket vettünk fel 6.4 µs-os pixelidővel és 2x-es sorátlagolással. Minden képet multi-track módban készítettünk. Fenti beállítások mellett a csatornák közt nem volt áthallás.

Lézer szkennig citometria és képanalízis

A lézer szkennig citometriai (LSM) mérésekhez az iCys (CompuCyte, Cambridge, MA) Olympus IX-71 invertált mikroszkópra épített berendezését használtuk 40x-es szemiapokromatikus objektívvel. Ebben a kísérlet sorozatban a transzfektált BHK sejteket a CLSM-os vizsgálatoknál leírt módon kezeltük, azzal a különbséggel, hogy a sejtek magjait is jelöltük az inkubációs pufferhez az utolsó 5 percben adott 1 µg/ml koncentrációjú 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI). A DAPI-t 405 nm-es diódalézerrel gerjesztettük. Minden mintáról 112 különböző, 1.000×768 pixel felbontású képet készítettünk.

A kvantitatív digitális képanalízist a SCIL-Image (TNO, Delft, The Netherlands) szoftver C programming környezetében végeztük. A Golgi apparátusban és az ER-ben mért GPIIb fluoreszcencia átlagos hányadosának meghatározásához a sejthatárokat a sejtmag, az ER, a Golgi és az expresszált GPIIb festődésének figyelembevételével azonosítottuk. A jelöletlen mintákon azonos készülékbeállítással mért fluoreszcencia intenzitást tekintettük háttérértéknek. A GPIIb ER-ben és Golgiban mért fluoreszcencia intenzitásának hányadosát 1.776 vad típusú, 1.443 H782N mutáns és 1.859 L116V mutáns GPIIb-t expresszálo BHK sejtben határoztuk meg. A kapott hányadosok átlagával (\pm SD) a GPIIb ER-ban és Golgiban mért relatív mennyiségi arányát fejeztük ki.

Eredmények

1. Beteg

Sejtfelszíni és intracelluláris integrinek áramlási citometriás vizsgálata thrombocytákban

Az első beteg esetében sem a thrombocyta felszínén, sem intracellulárisan nem tudtunk GPIIb-t detektálni direkt jelölt antitestekkel, ám csekély mennyiségű GPIIIa jelenléte nem volt kizárható. A vérlemezkék felszínén normál intenzitású GPIX festődést mértünk. A beteg vérlemezkéin az érzékeny, indirekt jelöléssel végzett kvantitatív áramlási citometriás módszerrel sem tudtunk fibrinogén receptor komplexet kimutatni (receptor szám <50 /thrombocyta), mely megerősítette az I-es típusú Glanzmann thrombasthenia diagnózisát. A beteg édesanyjában 22.415, édesapjában 22.075 receptort detektáltunk a vérlemezkék felszínén, mely a kontroll thrombocytákon mért értéknek (57.104 ± 5.568 , $n=6$) megközelítőleg 39%-a volt. TRAP aktiváció hatására a felszíni GPIIb/IIIa komplex mennyisége a kontrollban jelentősen megemelkedett (84.355/ thrombocyta), ám a beteg vérlemezkéin a GPIIb/IIIa mennyisége továbbra is a detektálási küszöb alatt maradt. A vitronektin receptor száma a thrombastheniás vérlemezkék felszínén (377/thrombocyta) magasabb volt, mint a kontroll thrombocytákon (97 ± 36 /thrombocyta, $n=14$). Érdekes, hogy a TRAP aktiváció hatására a vitronektin receptor száma a beteg vérlemezkéin jelentősen megemelkedett (634/thrombocyta), míg a kontroll thrombocytákon változatlan maradt.

Thrombocyta lizátumok Western blot vizsgálata

A poliakrilamid gélen nem redukáló környezetben a GPIIb a kontrollban erősen festődő sávként jelentkezett, míg a beteg mintájában mennyisége a detektálási küszöb alatt volt. A GPIIIa a kontroll mintában mindkét antitesttel történt jelölés után megfelelő erősséggel festődött. A GPIIIa-t mind a poliklonális, mind a monoklonális antitesttel egyértelműen jelenlévő, de halványan festődő sávként detektáltuk a beteg mintájában. Az immunoblot denzitometriás vizsgálata szerint a beteg mintájában detektált GPIIIa a kontroll mintájában mért GPIIIa mennyiségnek 6,4%-a volt.

Thrombastheniát okozó mutáció a GPIIb génjében

A vérlemezkék áramlási citometriás és Western blot analízise minden kétséget kizáróan jelenlévő, de jelentősen csökkent mennyiségű GPIIIa-t mutatott, ezért a thrombastheniát okozó mutációt a GPIIb génjében kerestük. A beteg DNS mintájában a GPIIb génjének exononkénti direkt szekvenálásával a 17-es exonban az 1618. helyen lévő citozin homozigóta delécióját (c.1618delC) találtuk, ami az 509. aminosavnál kezdődő olvasási keret

eltolódást, és az 533. aminosavnál kialakuló korai stop kodont (p.Glu509SerfsX24, STOP533, X533) okozott. A beteg szülei ugyanezt a mutációt hordozták heterozigóta formában.

A thrombocyta eredetű mRNS vizsgálata

A mutációk egyik lehetséges következményét, az alternatív splicingot a thrombocyta eredetű mRNS-ből átírt cDNS direkt szekvenálásával vizsgáltuk. A splicing az exon-intron határok mentén történt, alternatív splicingot nem találtunk. A homozigóta deléció és a következményes korai terminációs kodon felvetette a hibás mRNS gyors lebomlásának (nonsense-mediated decay of mRNA, NMD) a lehetőségét, ezért a GPIIb mRNS stabilitását a GAPDH mRNS szintjére normalizálva, a kontrollhoz viszonyított relatív kvantitálással vizsgáltuk. A három párhuzamos mintán, mintánként 3 párhuzamos PCR amplifikálással végzett mérés eredménye, valamint a PCR reakciók hatékonysága alapján az első betegben a GPIIb cDNS aránya a kontrollban mért értékhez képest átlagosan 0,06% volt.

A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIIa expressziójának vizsgálata

A GPIIb gén mutációinak a GPIIb/IIIa komplex felszíni expresszióra gyakorolt hatását transzfektált BHK sejteken vizsgáltuk. A vad típusú GPIIb-t és GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtek felszínén az áramlási citometria és a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat is intenzív GPIIb és GPIIb/IIIa festődést mutatott. A STOP533 mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t expresszáló BHK sejtek felszínén egyik módszerrel sem tudtunk GPIIb-t vagy GPIIb/IIIa-t kimutatni.

GPIIb és GPIIIa komplex kialakulásának vizsgálata transzfektált BHK sejtekben

A pro-GPIIb és érett GPIIb arányát és a mutáns GPIIb molekulák komplex alkotó képességét transzfektált BHK sejtekben vizsgáltuk. A sejtek lizátumából immunoprecipitált fehérjéket redukáló környezetben elektroforézissel (PAGE) választottuk el egymástól, így a pro-GPIIb és az érett GPIIb eltérő molekulatömegük miatt a gélen elkülönült egymástól. A vad típusú GPIIb-t és GPIIIa-t expresszáló BHK sejtekben a GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel közel azonos mennyiségű pro-GPIIb-t és érett GPIIb-t detektáltunk. A STOP533 mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t koexpresszáló sejtekben sem a pro-GPIIb-nek, sem az érett GPIIb-nek megfelelő molekulatömegű fehérjét nem találtunk, viszont jelen volt egy 60 kDa körüli molekulatömegű fehérje, mely a vad típusú sejtekből hiányzott, s amely tömege alapján megfelelt a trunkált GPIIb molekulának. A trunkált fehérjét nem tudtuk a GPIIIa ellenes antitesttel végzett immunoprecipitáció után detektálni, viszont ugyanezzel az antitesttel jelentős mennyiségű pro-GPIIb és érett GPIIb ko-immunoprecipitálódott a vad típusú BHK sejtekben.

2. Beteg

Sejtfelszíni és intracelluláris integrinek áramlási citometriás vizsgálata thrombocytákban

A második betegben a direkt jelölt antitestekkel végzett áramlási citometriás vizsgálat a kontroll vérlemezkékhez képest jelentősen csökkent, de detektálható thrombocytá felszíni GPIIb és GPIIIa festődést mutatott. 0.1% Triton X-100-zal végzett permeabilizálást követően mind a betegben, mind a kontrollban jelentősen megemelkedett a GPIIb és GPIIIa fluoreszcencia intenzitása, mely azonban a beteg thrombocytáiban a kontrollhoz képest továbbra is jelentősen alacsonyabb volt. Kvantitatív áramlási citometriás mérések szerint a beteg vérlemezkéinek felszínén 2.556 fibrinogén receptor expresszáldott, mely a kontroll érték (57.104 ± 5.568 , $n=6$) 4,5%-ának felelt meg. TRAP aktiváció hatására a beteg vérlemezkéin a GPIIb/IIIa komplex thrombocytánkénti száma 4.148-ra emelkedett. Az áramlási citometriás vizsgálatok megerősítették a Glanzmann thrombasthenia diagnózisát, mely a mérhető alvadék retrakció és a GPIIb/IIIa kvantitatív meghatározása alapján a II-es típusba volt sorolható. A beteg két lányában a vérlemezkék felszínén a kontrollhoz képest csökkent mennyiségű fibrinogén receptort (31.157, illetve 35.030 receptor) detektáltunk, a receptor szám TRAP aktiváció hatására mindkét esetben megemelkedett (45.061 illetve 44.788).

Thrombocytá lizátumok Western blot vizsgálata

A kontrollban detektált mennyiséghez képest a beteg vérlemezkéiben a fibrinogén receptor mindkét komponensének mennyisége jelentősen csökkent volt. Denzitometriás analízissel a beteg vérlemezkéiben a GPIIb esetében a kontroll érték 6%-át, GPIIIa esetében 16%-át mértük.

Thrombastheniát okozó mutációk a GPIIb génjében

A GPIIb génben három heterozigóta mutációt találtunk. A 4-es exonban lévő C339G, (c.339C>G) mutáció a 116. aminosav pozícióban leucin-valin cserét okozott (p.Leu116V, L116V). A 18-as exonban talált 1772insG (c.1771_1772insG) insertio az 560. aminosavtól kezdődően olvasási keret eltolódást és az 575. aminosavnál kialakuló korai terminációs kodont okozott (p.Asp560GlyfsX16; STOP575, X575). A 24. exonban a C2437A (c.2437C>A) mutáció a 782. hisztidin aszpariginra cserélődését okozta (H782N, p.H782N). A beteg egyik lánya az L116V és a STOP575 mutációt együtt, míg a másik lánya csak a H782N mutációt hordozta, ami – ha eltekintünk a mutációk közötti rekombináció rendkívül csekély

esélyétől - azt bizonyítja, hogy az L116V és a STOP575 mutáció azonos allélen található, míg a H782N mutáció a másik allélen helyezkedik el a betegben.

A L116V és H782N mutációk egyikét sem tudtuk kimutatni 50 egészséges kontroll 100 alléljében, ami azt igazolja, hogy a mutációk a hazai populációban nem tekinthetők gyakori polimorfizmusnak.

A thrombocyta eredetű mRNS vizsgálata

A splicing az exon-intron határok mentén történt, alternatív splicingot nem találtunk. A korai terminációs kodont hordozó mRNS pontos kvantitatív analízisét a másik, stop kodont nem hordozó allél jelenléte nem tette lehetővé. A beteg vérlemezkéinek mRNS-éből átírt cDNS direkt szekvenálása során azonban kizárólag a C2437A mutáció volt detektálható, a stop kodont hordozó mRNS-t nem tudtuk detektálni. A jelenség hátterében minden valószínűség szerint a stop kodont hordozó mRNS gyorsult eliminációja áll. A stop kodont hordozó allélről származó mRNS-t, ha kis mennyiségben jelen is lehetett, a másik allélről származó mRNS molekulák mennyiségi túlsúlya miatt nem lehetett amplifikálni, s így a stop kodont a beteg vérlemezkéiből származó mRNS-ben tudtuk detektálni. Ezzel az eredménnyel összhangban a beteg stop kodont hordozó lányában csak a vad típusú allélt tudtuk a thrombocyta eredetű mRNS-ben kimutatni. A beteg másik lányában a mutáns és a vad típusú allél egyaránt megtalálható volt a thrombocytából izolált RNS mintában.

A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIIa expressziójának vizsgálata

A STOP575 mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtek felszínén a GPIIb/IIIa komplex, illetve a GPIIb nem volt kimutatható. Az L116VGPIIb és az L116VGPIIb/IIIa komplex a vad típusúhoz hasonló intenzitással festődött. A H782NGPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtek felszínén a háttérfluoreszcenciánál kétségtelenül magasabb, de a vad típusú GPIIb/IIIa komplexet expresszáló sejteken mérhető képest alacsonyabb GPIIb és GPIIb/IIIa fluoreszcencia intenzitást kaptunk.

GPIIb és GPIIIa komplex kialakulásának vizsgálata transzfektált BHK sejtekben

Az L116V mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtekben a GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel végzett immunoprecipitációt követően nagyjából megegyező mennyiségű pro-GPIIb-t és érett GPIIb-t detektáltunk. A H782N mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtekben a vad típusú pro-GPIIb-vel azonos mennyiségű pro-GPIIb-t, de csökkent érett GPIIb mennyiséget találtunk. A STOP575 mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtekben nem tudtunk normál molekulatömegű pro-GPIIb-t, vagy érett GPIIb-t kimutatni, azonban detektáltunk egy

megközelítőleg 70 kDa molekulatömegű sávot, mely a trunkált GPIIb-nek felelt meg. A trunkált fehérjét a GPIIIa ellenes antitesttel végzett immunoprecipitáció után ebben az esetben sem tudtuk kimutatni, ami azt jelenti, hogy a STOP533-hoz hasonlóan a STOP575 trunkált GPIIb fehérje sem képes a vad típusú GPIIIa molekulával komplexet képezni. A GPIIIa ellenes antitest közel azonos mennyiségű GPIIb-t ko-immunoprecipitált a vad típusú és az L116V mutáns GPIIb-t expresszáló BHK sejtekben. Ezekhez képest a H782N mutáns pro-GPIIb mennyisége nem változott, de a GPIIIa ellenes antitest jelentősen kevesebb érett H782N GPIIb molekulát ko-immunoprecipitált.

BHK sejtekben expresszált GPIIb és GPIIIa pulse-chase vizsgálata

A mutáns GPIIb szintézisének, érésének és degradációjának kinetikáját a transzfektált BHK sejtekben a fehérjék radioaktív metioninnal történt jelölése után vizsgáltuk. A vad típusú GPIIb-t és GPIIIa-t expresszáló BHK sejtekben közvetlenül a 30 perces radioaktív jelölés után jelentős mennyiségű pro-GPIIb és GPIIIa, és csak csekély mennyiségű érett GPIIb volt kimutatható. A követési periódus során a pro-GPIIb és a GPIIIa szintje fokozatosan csökkent, ezzel szemben az érett GPIIb-nek megfelelő sáv intenzitása a 6. óráig fokozódott, és ekkor már meghaladta a pro-GPIIb sávjának intenzitását. A követési periódus 24. órájában a pro-GPIIb már csak halvány sávként volt látható, ezzel szemben a sejtek még jelentős mennyiségű érett GPIIb-t tartalmaztak. A fluorogram kvantitatív denzitometriás analízise 2.03 és 4.56 GPIIb/pro-GPIIb arányt mutatott a 6. illetve a 24. órában. Az arány változása a pro-GPIIb proteolitikus hasításának, és ezzel érett GPIIb-vé alakulásának a következménye. Az L116V mutáns pro-GPIIb átalakulása a vad típushoz hasonló kinetikát követett. A H782N mutáns GPIIb-t expresszáló sejtekben a radioaktívan jelölt GPIIb érett és pro-formák, valamint a GPIIIa lebomlása a vad típushoz hasonló ütemben zajlott. Kvantitatív denzitometriás méréseink szerint a követési periódus 6. órájában a pro-GPIIb és érett GPIIb együttes mennyisége mind a vad, mind a H782N mutáns esetében a 0. órában mért érték 36%-a volt. Ez az érték a 24. órában 21% és 18%-nak adódott, ami a vad és mutáns fehérjék lebomlásának hasonló kinetikáját igazolta. Ugyanakkor a H782N mutáns esetében meghatározott GPIIb/pro-GPIIb arány a 6. órában 0.55, a 24. órában 1.41 volt, ami azt mutatja, hogy a H782N pro-GPIIb átalakulási sebessége - vagyis érésének üteme - jelentősen elmarad a vad típushoz képest.

A vad típusú és a mutáns GPIIb intracelluláris lokalizációjának vizsgálata BHK sejtekben

A vad típusú és mutáns GPIIb molekulák intracelluláris lokalizációját vad típusú GPIIIa-val és valamely mutáns, vagy vad típusú GPIIb-vel ko-transzfektált BHK sejtekben

CLSM segítségével vizsgáltuk. A vad típusú GPIIb-t expresszáló sejtekben a GPIIb festődése a Golgi és az ER jelölésével egyaránt erős kolokalizációt mutatott. Az L116V mutáns GPIIb-t expresszáló sejtekben hasonló kolokalizációs mintázatot kaptunk, mely az L116V mutáns GPIIb megfelelő mennyiségű szintézisére, valamint a molekula ER és Golgi közti normális transzportjára utal. A H782N mutáns GPIIb és az ER jelentős kolokalizációt mutatott, viszont a vad típushoz képest a Golgival kevesebb mutáns GPIIb kolokalizálódott. A STOP575 mutáns GPIIb-t expresszáló sejtekben nem detektáltunk a háttérfluoreszcenciánál erősebb GPIIb festődést.

A kolokalizáció számszerű értékelése céljából lézer szkenningscitometriás mérésekkel meghatároztuk a GPIIb ER-ben és Golgiban mért fluoreszcencia intenzitásának hányadosát. A vad típusú és az L116V mutáns GPIIb-t expresszáló sejtekben a Golgiban és az ER-ben mért GPIIb fluoreszcencia intenzitás hányadosa közel azonos volt (0,46 és 0,42). A H782N mutáns esetén azonban a GPIIb Golgiban mért relatív fluoreszcenciája a vad típushoz képest jelentősen alacsonyabb volt (0,15), ami a H782N mutáns GPIIb intracelluláris transzportjának zavarára utal.

A GPIIb(L116V)/GPIIIa komplex fibrinogén kötő képességének meghatározása

Az L116V mutáció a második betegben a STOP575 mutációval azonos allélen helyezkedett el, s a thrombocytában az allél mRNS-ét nem tudtuk kimutatni, így a mutációnak valószínűleg nem volt szerepe a betegség kialakulásában. Ennek ellenére megvizsgáltuk, hogy a β -propeller doménben lévő mutáció hogyan befolyásolhatta a fibrinogén receptor ligand kötő képességét. Az L116V mutáns GPIIb-t expresszáló BHK sejtek a vad típusú GPIIb-t expresszáló BHK sejtekhez hasonló mértékben kötötték a fibrinogént, vagyis a mutáció nem módosította a GPIIb/IIIa fibrinogén iránti affinitását.

Megbeszélés

Mukánk során két beteget vizsgáltunk születésük óta észlelhető vérzéses tünetek miatt. Thrombocytá aggregációt a fiziológiás agonisták egyik esetben sem váltottak ki. A véralvadék retrakció az első betegben teljesen hiányzott, a második betegben csökkent mértékű volt és a kontrollhoz képest lassabban alakult ki. Mindezek alapján mindkét beteg tünetei hátterében Glanzmann thrombastheniát állapítottunk meg.

Az első beteg vérlemezkéinek áramlási citometriás mérése hiányzó felszíni GPIIb-t és GPIIb/IIIa komplexet, és igen kis mennyiségű GPIIIa-t mutatott, mely alapján a betegséget az I-es típusba soroltuk. A GPIIb kizárólag a GPIIIa integrinnel alkot komplexet, ezzel szemben a GPIIIa az α_v integrinnel is képes heterodimert alkotni, létrehozva ezzel a vitronektin

receptort. Egyes Glanzmann thrombastheniás betegekben a vérlemezke felszíni vitronektin receptor számát korábbi tanulmányokban is emelkedettnek találták. Érdekes, hogy esetünkben az aktiválatlan thrombastheniás vérlemezkek eleve emelkedett vitronektin receptor számát a TRAP aktiváció jelentős mértékben tovább növelte, míg a kontroll trombocytákon a TRAP nem volt hatással a vitronektin receptor számára, de – ahogy várható volt – jelentősen növelte a felszíni fibrinogén receptor mennyiségét. Ennek a jelenségnek a háterében az állhat, hogy GPIIb hiányában a feleslegben jelenlévő GPIIIa miatt sokkal több vitronektin receptor képződik, így a thrombastheniás vérlemezkek α -granulumaiban nagyobb mennyiségű vitronektin receptor található az egészséges vérlemezkekhez képest, melyek esetében az α -granulumot jelentős mennyiségű fibrinogén receptor foglalja el. A sejtfelszíni vitronektin receptor valamint a trombocyta lizátum GPIIIa tartalmának kimutatásával kizártuk a GPIIIa defektusának lehetőségét, így a genetikai eltérést a GPIIb génjében kerestük.

A második betegben az 5% körüli trombocyta felszíni és az egyértelműen detektálható kis mennyiségű intracelluláris GPIIb/IIIa II-es típusú Glanzmann thrombastheniát igazolt. A trombocyta lizátum Western blot vizsgálta 6% GPIIb és 16% GPIIIa mennyiséget mutatott, így a genetikai defektust ebben az esetben is a GPIIb génben feltételeztük.

Az első betegben a GPIIb génben a homozigóta 1618delC mutációt találtuk, mely olvasási keret eltolódást és 24 kórosan átírt aminosav után az 533. aminosavnál korai terminációs kodont eredményezett. A mutáció következtében a beteg vérlemezkéiből teljes mértékben hiányzott a GPIIb fehérje. Érdekes, hogy a deléción két ismétlődő AGCTG szekvencia között alakult ki, melyek a primordiális intergénikus spacerek ismétlődő szekvenciái, s melyek az immunglobulin nehézlánc átrendeződéséért is felelősek. Ezért elképzelhető, hogy a mutáció kialakulásában ez az ismétlődő szekvencia szerepet játszott.

A második betegben a GPIIb génben három heterozigóta mutációt találtunk. A C339G mutáció a béta propellerben, a 116. aminosav pozícióban található leucin valinra cserélődését okozta. C2437A mutáció a calf-2 doménben a 782. helyen lévő hisztidin-aszparagin cseréért volt felelős. Az 1772insG mutáció olvasási keret eltolódást és az 575. aminosav pozícióban korai terminációs kodon kialakulását eredményezte. A beteg lányainak molekuláris genetikai vizsgálata, valamint a trombocyta GPIIb mRNS analízise azt bizonyította, hogy az L116V és a STOP575 mutáció azonos allélen, míg a H782N mutáció a másik allélen helyezkedett el.

A stop kodonnal járó mutációk a sejtekben különböző javító és védekező folyamatokat indíthatnak el. Az alternatív splicing során a stop kodon protein szintézist termináló hatását elkerülendő a sejt alternatív splice site-ok segítségével olyan mRNS-t készíthet, melyből a mutáció, és az azt határoló hosszabb-rövidebb szekvencia hiányzik. Emellett a stop kodonok leggyakoribb hatása a nonsense-mediálta mRNS lebontás (NMD), amelynek során a sejtek a

trunkált, funkció nélküli fehérjéktől védve magukat a korai terminációs kodont hordozó mRNS-t eliminálják. Az NMD feltétele, hogy a stop kodon és a következő exon-exon határ között legalább 50-55 nukleotidnyi távolság legyen. A thrombocyta mRNS szekvenálásával a mi eseteinkben alternatív splicingot nem tudtunk kimutatni. Az 533. aminosav pozícióban lévő stop kodon a következő exon-exon határtól 59, az 575. aminosavnál fellépő stop kodon 110 nukleotiddal 5' irányban helyezkedik el, vagyis mindkettő az mRNS NMD-re hajlamos szakaszában található. Az első betegben detektált homozigóta STOP533 mutáció esetén kvantitatív mRNS vizsgálatot végeztünk, és a betegben a GPIIb mRNS mennyiségét jelentősen csökkentnek, a kontroll érték 0,06 %-ának találtuk. A második betegben a stop kodont hordozó allélról származó mRNS kvantitatív vizsgálatát megnehezítette a másik allélról származó vélhetően normál mennyiségű mRNS jelenléte, ezért ebben az esetben nem végeztünk kvantitatív analízist. Azonban a STOP575 mutációt hordozó mRNS molekulát direkt szekvenálással nem tudtuk kimutatni, ami azt igazolta, hogy a stop kodont tartalmazó mRNS a másik allélról származó GPIIb mRNS-hez képest jelentősen csökkent mennyiségben volt jelen a beteg thrombocytáiban. Néhány korábbi közlemény foglalkozott a GPIIb gén nonsense mutációinak a GPIIb mRNS stabilitására gyakorolt hatásával. A 288delC mutáció, valamint az 5. exon-intron határtól 2 nukleotiddal 3' irányban található citozin-adenin csere egyaránt olvasási keret eltolódáshoz és a polipeptid szintézis korai terminációjához vezettek. Mindkét mutáció csökkent GPIIb mRNS mennyiséggel társult. Hasonló hatással volt a GPIIb mRNS szintjére két másik mutáció, melyek az 584. illetve az 594. aminosav pozícióban alakítottak ki korai terminációs kodont. Az mRNS analízise szerint az általunk detektált mindkét stop kodon csökkent GPIIb mRNS szinttel járt, vagyis a mutáns GPIIb mRNS molekulák degradációja a thrombocytákban és a megakaryocytákban jelentősen felgyorsult.

A GPIIb és GPIIIa molekulák az endoplazmatikus retikulumban képeznek egymással komplexet, melynek elmaradása esetén a komplexalkotó fehérjék gyors degradáción mennek keresztül. Az mRNS NMD lebontása mellett a betegek vérlemezkéiben a trunkált GPIIb molekulák teljes hiányát a GPIIb/IIIa komplex képződésének elmaradása is magyarázhatta. A trunkált fehérjék komplexképződését mutáns GPIIb cDNS-sel és vad típusú GPIIIa cDNS-sel tranziensen ko-transzfektált BHK sejtekben vizsgáltuk. A BHK sejtek lizátumából poliklonális GPIIb/IIIa ellenes antitesttel végzett immunoprecipitáció után a STOP533 és a STOP575 mutáns GPIIb-t egyaránt kimutattuk, igaz ugyan, hogy mindkét trunkált GPIIb mennyisége a BHK sejtek által szintetizált vad típusú GPIIb mennyiségéhez mérten jelentősen csökkent volt. GPIIIa ellenes antitesttel trunkált GPIIb fehérjét nem sikerült ko-immunoprecipitálni. Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy sem a STOP533, sem pedig a STOP575 mutáns trunkált GPIIb nem volt képes az intakt GPIIIa molekulával komplexet képezni. A GPIIb gén különböző lokalizációjú nonsense mutációi következtében kialakult

eltérő hosszúságú trunkált GPIIb molekulák változó mértékű komplexképződési képességet mutattak. A calf-2 doménben található X870, X859 és X960 mutációk következtében kialakult trunkált GPIIb molekulák megőrizték komplexképzési képességüket, ugyanakkor a mutáns GPIIb és vad típusú GPIIIa alkotta komplexek transzportja az endoplazmatikus retikulum és a Golgi között zavart szenvedett, a komplexek az endoplazmatikus retikulumban retineálódtak. Az X597 mutáció következtében a GPIIb vad típusú GPIIIa-hoz történő kapcsolódása jelentősen csökkent. Az általunk vizsgált két esetben sem az 533 aminosav, sem az 575 aminosav hosszúságú trunkált GPIIb fehérje nem volt képes az intakt GPIIIa-val komplexet alkotni. A két nonsense mutáció mindkét calf domén és a thigh domén egyik esetben hosszabb, másik esetben rövidebb részének elvesztésével járt. A thigh domén a β -propeller doménnel alkot szoros, Ca-függő, körülbelül 700 \AA^2 felületű kapcsolatot, mely vélhetően fontos szerepet játszik a β -propeller domén térszerkezetének és helyes orientációjának kialakításában. Emellett nem hagyható figyelmen kívül, hogy a mutációk és a stop kodon közötti 24 illetve 16 aminosav hosszúságú tévesen átírt szakasz minden bizonnyal megváltoztatja a thigh domén térszerkezetét, és interferálhat a thigh domén és a β -propeller közötti kapcsolat kialakulásával. Mindezeket összevetve nagyon valószínű, hogy a teljes GPIIb molekula és a GPIIIa kapcsolódása során a β -propeller domén helyes orientációját a thigh domén integritása biztosítja.

A második betegben detektált L116V és STOP575 mutáció azonos allélen helyezkedett el, amely allél a vérlemezkékben nem expresszálódott. Az L116V mutáció szerepét emiatt a betegség pathogenezisében nem tudtuk igazolni. A mutáció a propeller második lapátjának második hurkán helyezkedik el, és részét képezi a β -propeller ligand kötésért felelős cap szubdoménjének. A mesterségesen létrehozott E117A mutáció, valamint a 110-129. aminosav közötti peptidszakasz azonos hosszúságú szekvenciális cseréje a GPIIb/IIIa komplex ligandkötésének elvesztéséhez vezetett, ezért fontosnak tartottuk a mutáció hatását transzfektált BHK sejtekben megvizsgálni. Az áramlási citometriás és a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok szerint a mutáns GPIIb/IIIa komplex a BHK sejtek felszínén a vad típusú GPIIb/IIIa komplexhez hasonló mennyiségben expresszálódott, intracelluláris transzportja zavartalan volt, és a glycoproteinek szintézise és lebontása is a vad típusú GPIIb/IIIa kinetikáját követte. A kritikus lokalizáció ellenére a hidrofób leucin szintén hidrofób valinra cserélődése nem befolyásolta a komplex fibrinogénkötő képességét sem. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy az L116V nem kausztív mutáció, s akkor sem okozna Glanzmann thrombastheniát, amennyiben a vérlemezkékben expresszálódna.

Az áramlási citometriás és a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok szerint a H782N mutáns GPIIb a beteg vérlemezkéin és a BHK sejtek felszínén egyaránt csökkent expressziót mutatott. A mutáns és a vad típusú pro-GPIIb mennyisége hasonló volt, azonban a vad

típushoz képest lényegesen kevesebb érett H782N mutáns GPIIb-t detektáltunk a transzfektált BHK sejtekben. A mutáns GPIIb a vad típusú GPIIIa molekulával képes volt komplexet alkotni. A pulse-chase analízis során igazolást nyert, hogy a H782N pro-GPIIb érett GPIIb-vé alakulása a vad típushoz képest lényegesen lassabban megy végbe. Az intracellulárisan jelölt BHK sejtek konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata ezzel összhangban azt igazolta, hogy a H782N mutáns pro-GPIIb transzportja az ER-ből a Golgiba akadályozott. A GPIIb gén számos mutációjáról igazolódott, hogy interferál a GPIIb/IIIa komplex ER és a Golgi közötti transzportjával és ezzel akadályozza a molekula érését.

Ezek közül három mutáció - V951M, Q747P és a 786. aminosav után inzertálódott 8 aminosav - szintén a calf-2 doménben helyezkedett el. A calf domének nyugvó receptoron a GPIIIa EGF-szerű doménjével alkotnak kis kiterjedésű kapcsolatot, melynek felbomlása nem befolyásolja a két integrin komplexképzését, viszont a GPIIb/IIIa intracelluláris transzportját akadályozhatja. A H782N mutáció hasonló hatással lehetett a GPIIb/IIIa transzportjára, mivel szintén a calf-2 doménben helyezkedik el és vizsgálataink szerint a mutáns GPIIb az ER-ben retineálódott. A beteg vérlemezkéi és a transzfektált BHK sejtek felszínén megfigyelt alacsony GPIIb/IIIa expressziót azonban az ER és Golgi közötti csökkent transzport nem magyarázza teljes mértékben. Nem zárható ki, hogy a Golgi és a sejtfelszín, illetve a Golgi és az α -granulumok közti transzport is károsodott a H782N mutáció következtében.

Az értekezéshez felhasznált közlemények jegyzéke:

1. Losonczy G, Rosenberg N, Kiss C, Kappelmayer J, Vereb G, Kerényi A, Balogh I, Muszbek L. A novel homozygous mutation (1619delC) in GPIIb gene associated with Glanzmann thrombasthenia, the decay of GPIIb-mRNA and the synthesis of a truncated GPIIb unable to form complex with GPIIIa. *Thromb Haemost.* 2005;93:904-9. (IF: 3,056)
2. Losonczy G, Rosenberg N, Boda Z, Vereb G, Kappelmayer J, Hauschner H, Bereczky Z, Muszbek L. Three novel mutations in the glycoprotein IIb gene in a patient with type II Glanzmann thrombasthenia. *Haematologica* 2007 in press. (IF: 4,575)

Egyéb közlemények:

1. Balogh I, Poka R, Losonczy G, Muszbek L. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. *Thromb Haemost.* 1999;82:1555-6. (IF: 4,983)

2. Tsohatzoglou A, Módis L, Losonczy G, Biró Z, Berta A. 40%ige Glukose-Augentropfen gegen Hornhautödeme. Eine seltene Nebenwirkung. Der Ophthalmologe 2007 in press. DOI: 10.1007/s00347-006-1436-2. (IF: 1,559)