

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**RITKA HEMOSZTÁZIS RENDELLENESSÉGEK LABORATÓRIUMI  
DIAGNOSZTIKÁJA, MOLEKULÁRIS GENETIKAI ÉS FEHÉRJE BIOKÉMIAI  
VIZSGÁLATA**

Dr. Kovács Kitti Bernadett

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN Doktori Iskola

Debrecen, 2015

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

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

Írta: Dr. Kovács Kitti Bernadett általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája  
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Boda Zoltán, az MTA doktora

Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina  
Intézet, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék  
2015.05.26. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora

Dr. Oláh Zsolt, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Boda Zoltán, az MTA doktora

Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora

Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD

Dr. Oláh Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”  
épület tanterem 2015.05.26. 13 óra

## 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. 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](http://www.rbdd.org) és [www.rbdd.eu](http://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 ezer és 1:3 millió 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 hátterében felfedezésre kerülő új mutációknak az adott fehérje struktúrájára, funkciójára gyakorolt hatásának tanulmányozása által a fiziológiás, pathofiziológiás 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 prenatális 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. 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 hemorrhagiás diathesisekhez, azaz vérzékenységhez vezet, melyek háttérében állhat öröklött, szerzett, iatrogén vagy terápiás coagulopathia. A rutin diagnosztikában a hemosztázis szűrőtesztek elvégzése jelenti a kiindulási pontot, a humorális komponens vonatkozásában ezek a protrombin idő (PT), az aktivált parciális tromboplastin idő (APTT) és a trombin idő (TT). Negatív alvadási szűrőteszt azonban nem zárja ki coagulopathia jelenlétét, ilyen esetben gondolni kell XIII-as faktor (FXIII) vagy  $\alpha$ -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. 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 háttérében mind genetikai, mind környezeti tényezők fontos szerepet játszanak. 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 nehezen kivitelezhetőek, itt az eset-tanulmányok jóval nagyobb hangsúlyt kapnak, mint a gyakori betegségek esetében. E betegségek háttérében 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 háttérben 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 össz mennyiség közel 20%-a a thrombocyták α-granulumaiban raktározódik. A FV szerkezete mozaik-szerű, három hasonló szerkezetű A, két C és egy nagy mértékben glikozilált B domént tartalmaz. 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 Ca<sup>2+</sup>-híd kapcsolja össze aktív heterodimerré. 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. 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.

A FV kódoló génje (F5) az 1q21–25 lokalizációban található, hozzávetőlegesen 80 kilobázis terjedelmű, 25 exonból és 24 intronból áll. A cDNS egy 2224 aminosavból álló fehérjét kódol. A nukleotidok és aminosavak számozása hagyományosan Jenny és mtsai, 1987-ben megjelent közleménye szerint történik. 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](http://www.hgvs.org/mutnomen)). Mivel az V-ös faktor 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. A homozigóta FV deficiens betegek FV aktivitása 10% alatti (általában 1% alatt) és mérsékelt, vagy súlyos vérzéses tüneteik vannak. A betegek döntő többsége I-es típusú, azaz kvantitatív deficienciában szenved, habár II-es típusú (kvalitatív) deficiens esetet is közöltek már. A mutációs adatbázisokban már több mint 50 különböző mutációt jegyeznek a F5 génben. A homozigóták előfordulási gyakoriságából kiindulva, a heterozigóta állapotnak kb. 1:1000 frekvenciával kellene megjelennie, 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 véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy pro-transzglutamináz, ami heterotetramer formában fordul elő a keringésben. A plazmában található FXIII (pFXIII) két katalitikus A (FXIII-A) és két gátló/hordozó B alegységből (FXIIIB) épül fel. A B-alegység feleslegben található, ennek kb. 50%-a szabad formában mutatható ki a plazmában. A celluláris FXIII (cFXIII), a plazma formától eltérő módon, nem tartalmaz B-alegységet, így az homodimer formában mutatható ki nagy mennyiségben a trombocytákban és számos egyéb sejtfeleségben. A FXIII-A 732 aminosavból áll, 83kDa tömegű. Az iniciátor 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) nomenklatura mindössze egyetlen 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, 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  $\beta$ -szendvics domén, egy katalitikus domén és két  $\beta$ -redő domén követ. Kódoló génje (F13A1) a 6-os kromoszómán található a 6p25.3–p24.3 pozícióban és 15 exont és 14 intront tartalmaz. A FXIII-B egy mozaik szerkezetű fehérje, mely 10 sushi domént tartalmaz, kódoló génje az 1q31–32.1 pozícióban található. A FXIII-A és B alegység tehát a keringésben találkozik és alkotja a fent említett heterotetramert (FXIIIA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>), mely egészséges személyekben 14-28 mg/L koncentrációban mutatható ki a plazmából.

A plazma FXIII-at (pFXIII) trombin és Ca<sup>2+</sup> ionok aktiválják: a trombin lehasítja a FXIII-A-ról az aktivációs peptidet, majd Ca<sup>2+</sup> ionok jelenlétében a FXIII-B disszociál és a megmaradó FXIII-A dimer aktív konformációt vesz fel. Az aktív FXIII (FXIIIa) egy

transzglutamináz, mely keresztköti a glutamin és lizin oldalláncokat peptid kötések (izopeptid kötések) kialakításával. Fő szerepe a hemosztázisban a fibrin láncok keresztköteése és az  $\alpha$ -plazmin inhibitor fibrinhez köteése. A véralvadásban betöltött kulcsszerepe mellett a FXIII a sebgyógyulásban, terhesség kiviselésében is elengedhetetlen, de újabban felvetették szerepét az angiogenesisben, porc-és csontfejlődésben is.

#### **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. Az öröklött FXIII-A deficiencia 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, vagy későn kerül felismerésre. A FXIII-A deficiencia mutációs adatbázisa (<http://www.f13-database.de>) 65 különböző okozati mutációt tartalmaz a FXIII-A alegységet kódoló génben. A mutációk eloszlása a gén mentén egyértelműen mutatja, hogy nincs mutációs forráspont. Habár a FXIII deficiencia intenzív kutatások tárgya lett az utóbbi időben, 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 egészítik ki.

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

A PC és PS természetes antikoagulánsként fontos szerepet játszik a véralvadás szabályozásában. 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 reziduumnál hasítja az aktivációs peptid domént egy 12-aminosav hosszúságú aktivációs peptid felszabadulását eredményezve a PC nehéz lánc N-terminális részéről. Az aktivált PC (APC) inaktíválja a

membránhoz kötött aktív FVIII-t (FVIIIa) és FVa-t azáltal, hogy specifikus arginin reziduumoknál hasítja őket. A PS szabad formája az APC fontos kofaktora, növeli annak affinitását a negatívan töltött foszfolipid felszínéhez. A FVIII és FV nem aktivált formája gyenge szubsztrátja az APC-nek. Az APC az intakt FV-öt is tudja hasítani az Arg506 helyen, melynek hatására a FV az APC kofaktora lesz a FVIIIa iaktiválásában. Az APC fő inhibitora a protein C inhibitor, egy, a májban szintetizálódó egyláncú szerin proteáz inhibitor glikoprotein. Antikoaguláns szerepén túl a PC fontos szerepet játszik a sejtvédelemben, mely funkcióját az elmúlt évtized során kezdték feltérképezni.

### ***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. Félélettideje rövid, kb. 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 PC doménszerkezete hasonlít a többi K-vitamin függő fehérje szerkezetéhez. Van pre-pro leader 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 reziduumok gamma-karboxilációjához és a szekréciónak szükséges. Az érett fehérje tartalmaz továbbá egy Gla-domént, mely tartalmazza a kilenc, a poszttranszlációs módosítások során karboxilálódó glutamát reziduumot, egy rövid amfipatikus hélixet, két epidermális növekedési faktor (EGF) domént, egy aktivációs peptid domént és a katalitikus domént. A hagyományos aminosav sorszámmal 42-t kell hozzáadni, hogy az új HGVS nevezéktan szerinti sorszámmal megkapjuk. A dolgozatban az eredmények bemutatásakor a PC deficiencia esetében az új nevezéktan követjük, hogy az értekezés alapjául szolgáló közleménynek megfeleljenek 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.

### ***2.2.2. Protein C deficiencia: epidemiológiai vonatkozások és klinikai tünetek***

Az első PC deficiens esetet Griffin és munkatársai írták le 1981-ben, ismétlődő vénás thromboemboliás események jellemezték. Azóta számos deficiens eset közlésre került a háttérben álló genetikai defektussal együtt. A thrombosis rizikó mértékét és a PC deficiencia gyakoriságát thrombosison átesett betegek között és az általános populációban jónéhány epidemiológiai tanulmányban vizsgálták, az eredmények heterogének. A Leiden Thrombophilia Study például, ami a témában folytatott egyik első eset-kontroll tanulmány,



eredménye szerint 3-szorosnak találták a VTE rizikót PC deficienciában nem szelektált beteganyagban. Más tanulmányokban 3-11-szeres VTE rizikót találtak PC deficienciában. Az eltérő epidemiológiai adatok háttérében a módszertani variabilitáson túl gén-gén, vagy gén-környezet kölcsönhatások is állhatnak, melyek nagy részét még nem ismerjük. 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. Súlyos PC/PS deficienciában, amikor a plazmakoncentrációk extrém alacsonyok, súlyos thrombosis alakul ki újszülöttekben, gyakran disszeminált formában, a jelenség purpura fulminánsként ismert. A Warfarin-indukálta bőrnekrozis súlyos szövődmény lehet K-vitamin antagonistá terápiaiban részesülő PC vagy PS deficiens betegekben. A vénás thrombosison túl a PC vagy PS deficiens betegekben artériás thrombosis is kialakulhat.

### ***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. Az utóbbi típust okozhatja például a szubsztrát,  $Ca^{2+}$  vagy receptor kötés zavara. 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. Eddig közel 250 okozati mutációt közöltek, melyek különböző adatbázisokban érhetők el (<http://www.hgmd.cf.ac.uk> és <http://www.isth.org>). Néhány esetben végeztek in vitro expressziós tanulmányokat a mutációk következményének vizsgálatára és az I-es típusú deficienciát okozó egy-egy nukleotidot érintő mutációk esetén általában szekréciós zavart állapítottak meg, habár részletes vizsgálatok általában nem történtek.

A II-es típusú deficiencia diagnózisa a funkcionális tesztek és az antigén szint mérés eredménye közötti diskrepancián alapszik. A misszensz a leggyakrabban előforduló mutáció típus, a Gla-domént érintő aminosavcsere károsodott kalcium és foszfolipid-kötést

eredményez. A szerin-proteáz doménben előforduló mutációk károsodott proteáz aktivitást vagy csökkent szubsztrát kötést eredményeznek.

#### ***2.2.4. A Protein C deficiencia laboratóriumi diagnosztikája***

A PC deficiencia diagnosztikájában szűrőtesztként funkcionális tesztek alkalmazunk. E tesztek lehetnek alvadási idő meghatározáson alapulóak, vagy amidolitikus esszék kromogén szubsztrátot alkalmazva. 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 (pl. APTI, PI, RVV) detektáljuk az APC-függő alvadási idő megnyúlás mértékét. Mindkét tesztnek 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.

#### ***Céltűzések***

- 1.** Egy 34 éves, mérsékelten vérsékeny nőbetegben FV deficiencia igazolódott. Céltűztük 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 háttérben FXIII deficiencia merült fel. Céltűnk 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. Céltűnk 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 vérzéses 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 vérzéses 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**

Rutin hemosztázis laboratóriumi tesztek: A beteg első jelentkezésekor elvégeztük a koaguláció szűrőtesztjeit BCS koagulométeren (Siemens/Dade- Behring, Marburg, Németország). A fibrinogén szintet a Clauss módszer szerint, az egyéb alvadási faktor aktivitásokat egyfázisú alvadási tesztekben határoztuk meg. A FXIII aktivitását módosított optimalizált kinetikus spektrofotometriás módszerrel mértük (REA-chrom FXIII, Reanal-Ker). Az  $\alpha$ 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 keveréses 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 Surgicut 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 thrombocytá 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 risztocetin kofaktor aktivitást aggregometriás módszerrel, a szükséges reagenseket a Siemens/Dade-Behringtől szereztük be.

Speciális vizsgálatok: A FV antigén szint meghatározására házilag állítottunk össze egy ELISA rendszert, ehhez két, birkában termeltetett, poliklonális anti-humán FV antitestet használtunk (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada). Első lépésben 100 µL elfogó antitesttel (10 µg/mL) fedtük az ELISA lemezt (Thermo Labsystems, Waltham, MA), melyet egy éjszakán át inkubáltunk 4°C-on. A blokkolást követően (BSA tartalmú PBS pufferrel) történt a hígított (1:200) vizsgálandó minták felvitele a plate-re. A második, peroxidázzal konjugált, 100 µL jelölő antitest (4 µg/mL) hozzáadása után a detektálás az o-feniléndiamin szubsztrát hozzáadásával történt. A reakciót 50 µL 2 M-os kénsavval állítottuk le és 490 nm-en ELISA lemez olvasón (Thermo Labsystems iEMS plate reader) mértük 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 37°C-on. Thrombocyta dús plazmát (PRP) 0,18 µM prosztaglandin E1-et (PGE1) tartalmazó acid-citrát-dextrózzal antikoagulált vérből nyertünk 15 perces 120×g-vel történő centrifugálással. A PRP-ben lévő thrombocyták plazmától történő szeparálása 15 perces 1300×g centrifugálással történt. Ezt követően a thrombocytákat reszuszpendáltuk az „A” oldatban (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mg/ml glükóz, 10 mM HEPES, pH 7,4), mely tartalmazott 3,6 mg/ml BSA-t, 1 U/ml apirázt 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 újból lecentrifugáltuk 1100×g-vel 15 percig, majd felvettük őket az „A” oldatban, mely most csak 1 U/ml apirázt tartalmazott. A thrombocyta számot 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.

### **3.1.2.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok**

Perifériás fehérvérsejtekből történő DNS izolálást követően (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Németország) a F5 25 exonját az exon-intron határokkal együtt amplifikáltuk van Wijck és Ajzner szerint, majd szekvenáltuk. A kapilláris elektroforézis 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 $\alpha$  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 2fs-os lépésközt választva. Az Orban és mtsai által közölt szerkezetből kiinduló szimuláció során OPLS-AA erőteret, TIP3P explicit vízmodellt és periodikus határfeltételt, míg a nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatás számolására PME (Particle Mesh Ewald) módszert alkalmaztunk. 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) 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 baba 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, majd köldökcsomk vérzés jelentkezett. 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<sup>-1</sup> 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 vérzéses 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 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. A hemosztázis szűrőtesztek (PI, APTI) és thrombocytá szám referencia tartományon belül volt. Von Willebrand (VWF) faktor antigén szint és aktivitás, valamint a thrombocytá funkcionális tesztek normál eredményűek voltak. A későbbiekben számos alkalommal fordultak elő kifejezett, de felszínes horzsolásos sérülések testszerte, majd 12 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.

Az alapvető laboratóriumi vizsgálatokat mindkét beteg esetében a megfelelő kórházakban elvégezték, a részletes laboratóriumi kivizsgálás és a molekuláris genetikai vizsgálatokat mi végeztük. A gyermekek szülei és családtagjai tájékozott beleegyezésüket adták a vizsgálatokhoz. A FXIII aktivitás és antigén szint meghatározásokat plazmából és thrombocytá lizátumból a Kárápti és munkatársai által meghatározott módszer kis módosításával végeztük TECHNOCHROM<sup>®</sup> FXIII kit felhasználásával (Technoclone, Bécs, Ausztria). Mosott thrombocytá szuszpenziót a korábban leírtaknak megfelelően készítettünk. Az 0,109 mol L<sup>-1</sup> trinátrium citráttal alvadásgátolt plazmát és thrombocytá granulátumot lefagyasztották és száraz jégen küldték Debrecenbe futárpostával. A fagyasztott thrombocytát 1% Triton X-100-ban oldottuk. A thrombocytá lizátum fehérje koncentrációját BCA Protein Assay Reagent használatával határoztuk meg (Pierce, oud-Beijerland, Hollandia). TECHNOZYM<sup>®</sup> FXIII Ag, FXIII-A SUB és FXIII-B SUB ELISA-kat használtunk (Technoclone) rendre a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplex antigén szint meghatározásra plazmában, FXIII-A antigén szint meghatározására plazmában és thrombocytá lizátumban és FXIII-B antigén szint meghatározásra plazmában.

### **3.2.2. Genetikai analízis**

#### **3.2.2.1. F13A1 gén mutáció analízis**

A genomiális DNS izolálását követően az F13A1 gén kódoló régióit, az exon-intron határok figyelembevételével és promoter régióját PCR reakciókban amplifikáltuk az intézetben korábban kidolgozott protokoll szerint. 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. (Az iniciátor metionint nem tartalmazó hagyományos nukleotid és aminosav számozást használtuk.)

### **3.2.2.2. 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 végtérfogóban, 1,6 µg oligo-p[dT]<sub>15</sub> 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. A PCR reakciók 10µL 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'-ctgcacatagaaagactgcc- 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.

## **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-akat és anti-béta2-glikoprotein I antitesteket Quanta Lite reagensekkel (Innova Diagnostics Inc., USA) határoztuk meg, a FV Leiden és



Protrombin 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 és általunk beállított protokollal. 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, bár a hagyományos számozás egy alanin reziduumnál kezdődött, mely az érett fehérje N-terminális részének első aminosava. Az érés során lehasadó pre-pro vezető -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 a reziduumokat.

### **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 kémiaiailag kompetens E. coli sejtekben szaporítottuk fel, majd QIAprep Spin Miniprep Kit-tel izoláltuk (Qiagen). A HEK sejteket párhuzamosan transzfektáltuk vad típusú, mutáns és mock 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 koktél (Roche) tartalmazó lízis pufferben lizáltuk. A médiumok és a sejtlizátumok frakcióit ELISA módszerrel (Asserachrom PC:Ag, Diagnostica Stago) történő PC antigén szint meghatározásra és Western blottingra használtuk. A transzfecció 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 transzfecciót sejt lizátumában házilag összeállított 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) érték 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/](http://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. Előbbi mellett a Pearson's korrelációs koefficiens is használtuk a kolokalizáció leírására. Manuális küszöbsökkentést követően a kolokalizációt Manders szerint is jellemeztük az M1 és M2 kolokalizációs koefficiensek megadásával a ZEN 2010 szoftverrel.

### 3.3.2.7. Molekulamodellezés

Mivel nem volt elérhető megfelelő, az aktivációs peptidet 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 finomítottuk. A röntgen-diffrakciós szerkezetből hiányzó aminosav egységeket a Yasara programcsomaggal 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 itt csak ezeket a doméneket vizsgáltuk. Összehasonlításképpen, ugyanezeket a szimulációkat szintén elvégeztük a vad típusú fehérjén. A mutációkat a Yasara programcsomaggal hoztuk létre. A szerkezetekhez tartozó energiát a Gromacs szoftvercsomaggal minimáltuk. A  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Na}^+$  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  $12 \text{ \AA}$  távolságra állítottuk be. Az így előállított rendszereket neutralizáltuk, majd  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  ionok hozzáadásával az ionerősséget  $0,15 \text{ mol/dm}^3$ -re állítottuk be. A  $310 \text{ K}$ -re való felfűtéséhez „fokozatos felfűtés” módszert alkalmaztunk, majd  $200 \text{ ns}$  szimulációt futtattunk állandó részecskeszám (N), és állandó nyomás ( $P=10^5 \text{ Pa}$ ) és állandó hőmérséklet ( $T=310\text{K}$ ), valamint periodikus határfeltétel mellett. OPLS-AA fehérje erőteret és TIP3P explicit vízmodellt alkalmaztunk. A rövid hatótávolságú elektrosztatikus és van der Waals energiatagok kiszámításakor  $10 \text{ Angströmös}$  „cut-off” távolságot állítottunk be, míg a nagy hatótávolságú elektrosztatikus energia korrekciókat a részecskehálós Ewald (PME) módszer segítségével vettük figyelembe. 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 és Chimera 1.7 programokat 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  $\alpha$ 2-PI szintje normál volt. A thrombocyta szám referencia tartományon belüli volt. A vérzési idő, PFA-100 záródási idő, a thrombocyta aggregáció és szekréción 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.

#### ***4.1.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei***

A beteg F5 génjében négy misszensz mutációt detektáltunk. 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. 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.

### ***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, cöruoloplazmin és a SwissProt adatbázisban elérhető különböző állatfajok FV molekulái megfelelő részében. 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. A szimuláció eredménye azt sugallja, hogy az Arg oldallánca nem fér be a Gly kis  $\alpha$ H „oldalláncának” fenntartott (hidrofób) üregbe. Poláris guanidinium csoportja deformálja a közeli, szintén nagymértékben konzervált 390ILGPIIRAQVR400  $\beta$ -redőt és megnyit egy csatornát a (poláris) oldószer 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

## **4.2. XIII-as faktor deficiencia**

### ***4.2.1. Proband1***

#### ***4.2.1.1. Laboratóriumi eredmények***

A proband1 plazmájában a holland eredményekhez hasonlóan mi sem tudtunk FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> és FXIII-A antigént detektálni, míg a FXIII-B alegység koncentrációja a referencia intervallum alsó határán volt. A proband1 édesanyja esetében az értékek referencia tartományon belüliek voltak: plazma FXIII aktivitás 85,5% (referencia tartomány 69-143%); FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szint 95,3% (20,0 mg/L) (referencia tartomány 67-133% (14-28 mg/L)) és FXIII-A antigén szint 74,8% (8,01 mg/L) (referencia tartomány 67-133% (7,1-14,3 mg/L)). Az édesapa esetében csökkent FXIII aktivitás (63,3%) és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szintet találtunk (61,7%) (12,9 mg/L) és a referencia tartomány alsó részén lévő FXIII-A antigén szintet detektáltunk (66,7%) (7,14 mg/L). A B alegység szintje a szülők esetében referencia tartományon belüli (64-136%) volt.

A thrombocytákban a plazmához hasonlóan mind a FXIII aktivitás és FXIII-A alegység antigén szintje detektálási határ alatti volt a proband1 esetében, szüleiknél pedig a kontroll (két egészséges egyén thrombocytáiból mért FXIII aktivitás és FXIII-A alegység antigén szint átlaga) érték kb. 50%-a volt.

#### **4.2.1.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok**

DNS szekvenálással két okozati mutációt találtunk a F13A1 génben. 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. 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 és eddig nem közölték. Ezt a mutációt apai ágon örökölte és az apai nagymama is hordozza.

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

#### **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 Hexamate<sup>TM</sup> 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-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 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 thrombocytá 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 deléció-t 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 thrombocytá 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  $42 \pm 11$  % (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  $0.142 \pm 0.007$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  és  $0.034 \pm 0.003$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein volt rendre a médiumban és a sejtlizátumban. A vad típusú és a mutáns PC fehérjék antigén koncentrációja nem különbözött jelentősen a sejtlizátumokban ( $0.033 \pm 0.002$ ,  $0.019 \pm 0.002$  és  $0.021 \pm 0.002$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein rendre a 77Gly, 163Val és 163Glu PC esetében). A 77Gly mutáns koncentrációja mérhető volt a médiumban, de valamivel alacsonyabb volt a vad típusú fehérjénél ( $0.059 \pm 0.001$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A 163Val és 163Glu mutánsok nem voltak detektálhatóak a médiumban. Mind a vad típusú, mind a 77Gly PC jól látható diszkrét sávként volt látható a transzfektált sejtek mediumában Western blotting során. 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.

A 77Gly PC amidolítikus teszttel a médiumból történő aktivitás meghatározása során kapott eredmény összehasonlítható volt a vad típusú PC aktivitásával három különböző független 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 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. Amint az várható volt, a vad típusú PC azonos mértékben volt jelen az ER-ben, a cis-és a transz-Goligiban és ezekkel a sejtorganelumokkal történő kolokalizáció PPA szoftverrel meghatározott értékei is hasonlóak

voltak. 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 sejtorganelummal sem mutatott kifejezett együttállást. A helyzet más volt a 163Glu és 163Val mutánsoknál, esetükben az egymásra illesztett felvételek alapján a 26S proteaszómában feltételeztük az akkumulálódást.

A Pearson féle kolokalizációs koeficiensek a 26S proteaszómára nagyobbak voltak a 163Glu és 163Val PC esetén, mint a vad típusnál vagy a 77Gly esetében, azt sugallva, hogy ezek megrekedhettek ebben a sejtorganelumban. A ZEN szoftverrel meghatározott Manders kolokalizációs paraméterek értelmezése alapján a 26S proteaszóma markere kevesebb, mint 50%-os átfedést mutatott a vad típusú (33%) és a 77Gly PC-vel (43%), és több mint 50%-os átfedést mutatott 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.

#### ***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 ( $2.25 \pm 0.49$ ) és a 163Glu ( $2.95 \pm 0.51$ ) PC esetében, míg a 77Gly mutáns nem mutatott jelentős poliubikvitináltságot (aránya a vad típusú fehérjéhez  $0.96 \pm 0.10$  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. 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. 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. Jelentős különbségeket fedezhettünk fel a vad típusú és a mutáns fehérjék között: 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, itt 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. 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.

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 allélján a nt524delG mutációt hordozta, emellett a VII-es faktor génjében is volt egy heterozigóta mutációja. A második beteg, aki a p.Glu1608Lys mutációra volt heterozigóta, spontán hematomáktól és metrorrhagiától szenvedett. FV aktivitása 38%, antigén szintje 50% volt. A harmadik betegnél tonsillectomiát követően alakult ki vérzéses szövödmény, spontán vérzése nem volt. FV aktivitása 30% volt és a p.Tyr1702Cys mutációt hordozta, mely gyakori oka a FV deficienciának az olasz populációban.

Betegünknek nem volt spontán vérzése, de esete felhívja a figyelmet arra, hogy heterozigóta FV deficiens betegeknél sebészeti beavatkozás alkalmával jelentős vérzéses szövödmény 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 megakaryocytákban történő szintézis, nagyobb részben a plazmában található FV endocytosis révén kerül az  $\alpha$ -granulumokba.

## 5.2. XIII-as faktor deficiencia

A FXIII-A alegység deficiencia diagnosztikája során az ISTH SSC ajánlásain alapuló algoritmust követtük. Mindkét esetben a detektálhatatlanul alacsony plazma FXIII aktivitás alapozta meg a FXIII deficiencia diagnózisát, míg a detektálhatatlan FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 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 a thrombocyta FXIII szint meghatározása nélkül keverékes vizsgálat is elegendő a neutralizáló autoantitest detektálására, míg a nem neutralizáló antitest kizárása bonyolultabb kötődési vizsgálatokat igényel.

Mindkét beteg esetében súlyosak voltak a vérzéses tünetek. A holland betegnél a köldökcsomóvérzés és a cephalhematoma korán felvetette FXIII deficiencia gyanúját, korai diagnózist eredményezve. A belga proband esetében a klinikum egyértelműen súlyos vérzékenységre utalt. A jellegzetes köldökcsomó vérzés nem jelentkezett (FXIII-A alegység deficienciában szenvedő újszülöttek 80%-ánál figyelhető meg késői köldökcsomó vérzés), 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  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor) aktivitást meghatározni. A 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, 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 diszcrepanciát.

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. 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. 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-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 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 thrombocytaiban. Ennek magyarázatát egyelőre nem ismerjük, elképzelhető, hogy az A-és B-alegység kapcsolatának változásában rejlik a magyarázat, melynek háttérében 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-terminális 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 thrombocytaiban 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. 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.

### 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. Habár a szekvenciában több mint húsz reziduum választja el, a 3D szerkezetben a 163Ala az EGF2 és SP doméneket összekötő láncok közti diszulfid híd közelségében található.

A PC EGF2 doménjében (134-178. aminosavak) összesen 11 különböző misszensz mutációt írtak le. Ezek közül egy esetben sem végeztek in vitro expressziós kísérletet, molekulamodellzés is csak a p.Cys140Arg mutáció esetében történt. 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 és csak néhány mutáció van, mely jelenléte esetén a fehérje szekretálódni képes. 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. Közöltek már kórosan feltekeredett PC felhalmozódást az endoplazmatikus retikulumban (ER) vagy a Golgi komplexben is.

Összesen 20 PC Gla-domén mutációt tartalmaz a HGMD adatbázis, közülük 18 misszensz mutáció. A Gla-doménben előforduló mutációk szerkezeti és/vagy funkcionális következményét szintén igen kevés esetben vizsgálták. Grandille és munkatársai beszámoltak korábban a p.Asp77Gly mutációról. Dávid és munkatársai heterozigóta formában közölték ezt a mutációt két, I-es típusú deficienciában szenvedő betegnél, akiknek súlyos, ismétlődő vénás

thromboembóliás eseményeik voltak. 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. 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.

Vizsgálatainkban a 163Val és 163Glu 26S proteaszómával történő kolokalizációját észleltük, utóbbi a kóros feltekeredésű fehérjék ismert sejten belüli degradációjának potenciális színhelye poliubikvitinációt követően. Ezeket az eredményeket alátámasztja a 163Val és 163Glu mutánsok magasabb poliubikvitináltsági szintjeinek kimutatása, mely így az intracelluláris degradáció egyik indirekt bizonyítéka. Összefoglalásképpen 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 fehérjéjétől. 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. 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 szekréción összehasonlítása a májsejtekben zajló in vivo szekréciónal túl mechanikus.) Valamennyi eredményünket összevetve elmondható, hogy a p.Asp77Gly mutáció normál FVa



és FVIIIa inaktiváló hatású 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.

Összefoglalva 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 molekulamodellezés alapján nem tétélezhető 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 patogén szerepének magyarázatára fehérjebiokémiai vizsgálatokat és molekulamodellézést 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 szekréciós zavart 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 szekréciós 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 esetbemutatókon 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 mérsékelten 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.



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

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

### 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.

