

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

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

DR. LOSONCZY GERGELY

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. MUSZBEK LÁSZLÓ

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS – ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI KUTATÓ KÖZPONT**

2007

A doktori értekezés impresszuma

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

**Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az általános
orvostudomány tudományágban**

Írta: dr.Losonczy Gergely általános orvos

**Készült a Debreceni Egyetem Multidiszciplináris Orvostudományok
Doktori Iskolája (Experimentális és Klinikai Hematológiai és Hemosztázis
Kutatások programja) keretében**

Témavezető: Dr. Muszbek László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 2007.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2007.

Tartalomjegyzék

Bevezetés és irodalmi áttekintés	3
Betegek	11
1. Beteg	11
2. Beteg	11
Anyagok és módszerek	13
Plazma és thrombocyta minták előkészítése	13
Vérlemezkek áramlási citometriás vizsgálata	14
Polimeráz láncreakció és direkt DNS szekvenálás	14
A thrombocyta RNS analízise	16
SDS-PAGE és immunoblotting	17
Site directed mutagenesis, BHK sejtek transzfektálása és sejt kultúra	18
A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIb/IIIa expressziójának vizsgálata	19
A GPIIb és GPIIIa immunoprecipitációja transzfektált BHK sejtekből	19
Pulse-chase analízis	20
Az L116VGPIIb/GPIIIa komplex fibrinogén kötő képességének meghatározása	21
A GPIIb intracelluláris elhelyezkedése	21
Lézer szkennning citometria és képanalízis	22
Eredmények	23
1. Beteg	23
Sejtfelszíni és intracelluláris integrinek áramlási citometriás vizsgálata thrombocytaiban	23
Thrombocyta lizátum Western blot vizsgálata	25
Thrombastheniát okozó mutációk a GPIIb génjében	25
A thrombocyta eredetű mRNS vizsgálata	26
A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIIa expressziójának vizsgálata	27
GPIIb és GPIIIa komplex kialakulásának vizsgálata BHK sejtekben	28
2. Beteg	29
Sejtfelszíni és intracelluláris integrinek áramlási citometriás vizsgálata thrombocytaiban	29
Thrombocyta lizátumok Western blot vizsgálata	30
Thrombastheniát okozó mutációk a GPIIb génjében	31
A thrombocyta eredetű mRNS vizsgálata	32
A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIIa expressziójának vizsgálata	32
GPIIb és GPIIIa komplex kialakulásának vizsgálata transzfektált BHK sejtekben	33
BHK sejtekben expresszált GPIIb és GPIIIa pulse-chase vizsgálata	35
A vad típusú és a mutáns GPIIb intracelluláris lokalizációjának vizsgálata BHK sejtekben	36
A GPIIb(L116V)/GPIIIa komplex fibrinogén kötő képességének meghatározása	37
Megbeszélés	40
Summary	48
Irodalomjegyzék	49
Tárgyszavak	57
Az értekezéshez felhasznált közlemények jegyzéke	57
Egyéb közlemények	57
A doktori értekezéshez felhasznált közlemények különlenyomatai	59

Bevezetés és irodalmi áttekintés

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 (1). Etiopatológiai oka a thrombocyta 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 thrombocyta aggregáció hiánya.

A betegség hátterében károsodott funkciójú vérlemezkék állnak, amit Hardisty és Zucker fedezett fel az 1960-as években, Glanzmann thrombastheniában szenvedő betegek perifériás vérkenetének vizsgálatával bizonyítva, hogy a betegek thrombocytaszáma normális, ám a vérlemezkék képtelenek az alakváltoztatásra, a kiterülésre és az aggregációra (2,3). Ugyanebben az évtizedben többen is felismerték, hogy a thrombastheniás betegek vérlemezkéi egyáltalán nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben tartalmaznak fibrinogént, melynek okaként a fibrinogén receptor hiányát vagy csökkent működését feltételezték (2,4,5). Először Nurden és Caen ismertették a Glanzmann thrombastheniában szenvedő betegek vérlemezkéinek poliakrilamid gél elektroforézis során megfigyelt szokatlan membrán protein mintázatát (6), majd hasonló módszerrel Phillips és Agin azonosított két nagy intenzitású, a Glanzmann thrombastheniában szenvedő betegek vérlemezkéiből hiányzó sávot, melyek a GPIIb és a GPIIIa, a fibrinogén receptor komplexet alkotó glikoproteinek voltak (7). A thrombocyta aggregáció folyamatában résztvevő fehérjék megismeréséhez az afibrinogenemiában szenvedő betegek vizsgálatán keresztül vezetett az út. A betegekből származó vérlemezkék, illetve fibrinogénmentes plazmában reszuszpendált

normál vérlemezkék képtelenek voltak aggregálódni, azonban fibrinogén hozzáadásával normál aggregációs válasz volt kiváltható (8-10). Az 1970-es évek végén és az 1980-as évek elején ismertté vált, hogy a fibrinogén képes a vérlemezkékhez kapcsolódni, majd bizonyítást nyert, hogy a fibrinogén és a GPIIb/IIIa interakciója a thrombocyta aggregáció kulcslépése (11-15).

A fibrinogén receptor a véralvadásban központi szerepet betöltő thrombocyta 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 a megakaryocyták és a thrombocyták képesek. A GPIIb kizárólag a GPIIIa-val alkot komplexet, míg a GPIIIa más integrinekhez is kapcsolódhat; az α_v integrinnel alkotott komplexe a vitronektin receptor (VnR), 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 számuk megemelkedhet. A vitronektin receptor kimutatásával elkülöníthető a GPIIb és a GPIIIa defektusa által okozott Glanzmann thrombasthenia (16-20). A GPIIb/IIIa a vérlemezkék egyik legnagyobb mennyiségű fehérjéje, mely a vérlemezkék sejtmembránja mellett az α -granulumokban is megtalálható. Thrombocyta 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 (21-27).

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 (28-30). 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 (21). Az endoplazmatikus retikulumban (ER) egyláncú, úgynevezett pro-GPIIb szintetizálódik, mely a GPIIIa-val Ca-függő, 1:1 arányú heterodimert képez. A komplexképződés a sejtfelszíni expresszió előfeltétele, ennek hiányában az integrinek intracellulárisan eliminálódnak (21, 31). 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 szerkezetét röntgen krisztallográfiás és elektron kriomikroszkópos vizsgálatokból valamint a vitronektin receptor extracelluláris doménjének kristály struktúrája alapján alkotott homológia-modellből ismerjük (32-34). A molekula transzmembrán és intracelluláris doménjeinek integrin aktiváció során bekövetkező strukturális változásait mag mágneses rezonancia vizsgálatokkal térképezték fel (35-37). 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 (35, 37-40). A GPIIb β -propeller doménjét 7, egyenként 60-70 aminosavból álló, sugárirányban elhelyezkedő ismétlődő szekvencia (lapát) alkot. 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 négy Ca-kötő hely található, melyek a GPIIIa 261. 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) kötéseért és annak specificitásáért a β -propeller domén 2.-4. lapátjának bizonyos hurkai által létrehozott cap szubdomén és a GPIIIa A-doménje felelős (59, 63). 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. $700 \text{ \AA}^2$ 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 $500 \text{ \AA}^2$ 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 „térdének” neveznek. A calf-2 domén 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 adhézión hely (metal ion dependent adhesion site, MIDAS). Ettől C-terminális irányban található a hybrid és a plexin-semaphorin-integrin (PSI) domén, melyek az A domént 4 ismétlődő epidermal growth factor (EGF)-szerű doménhez kapcsolják. A molekula extracelluláris szakaszának utolsó tagja a cystatin-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, a GPIIb és GPIIIa intracelluláris szakasza egymáshoz kapcsolódik, az extracelluláris szegment hajlott konformációban van, az N-terminális globuláris fej a sejtmembrán közelébe hajlik. Valamilyen trombocyta agonista (ADP, trombin, tromboxán A_2) receptorához történő kötődése által elindított biokémiai folyamatok szükségesek ahhoz, hogy belülről kifelé történő (inside-out) szignalizáció következtében a receptor aktiválódjon és kialakuljon a ligandot kötni képes aktív formája. A molekula aktivációjakor a GPIIIa intracelluláris szakasza a citoszkeletont alkotó talinhoz kapcsolódik, ezzel a két integrin

intracelluláris szakasza elválik egymástól. A fibrinogén receptor extracelluláris lábai eltávolodnak egymástól, így a calf domének és a GPIIIa kapcsolata felbomlik. Az N-terminális globuláris fejben konformációs változások következnek be. A molekuláris átalakulás következményeként a fibrinogén receptor a hajlott állapotból nyújtott állapotba kerül, és alkalmassá válik a ligandkötésre (41). A fibrinogén receptor képes az extracelluláris mátrix különféle adhezív proteinjeinek megkötésére, így ligandja lehet a fibrinogén, a fibrin, a vonWillebrand factor, a fibronektin, a trombospondin és a vitronektin is. Ezek a ligandok a GPIIb/IIIa-hoz kapcsolódva döntő többségükben a vérlemezék adhéziójában játszanak fontos szerepet. A fibrinogén receptor elsődleges szerepe a hemosztázisban azonban a vérlemezke aggregáció mediálása, melyhez a szolubilis fibrinogén megkötése szükséges. Nagy nyíróerejű áramlási körülmények között, mint amilyen artériás szűkületekben lép fel, a vonWillebrand factor is képes a fibrinogén receptoron keresztül thrombocytá aggregációt létrehozni. A receptor-ligand kapcsolódás kívülről befelé tartó (outside-in) szignalizációt indukál, hatására a fibrinogén receptorok transzmembrán doménjei egymáshoz kapcsolódnak, a receptorok csoportokba rendezőnek, így biztosítják az extracelluláris mátrix és a citoszkeleton közötti erős kapcsolódást, ami a véralvadék retrakció feltétele. A receptor-ligand kapcsolódás bonyolult intracelluláris szignalizációs útvonalakon keresztül vezet a vérlemezke további aktivációjához, így alakváltozáshoz, kiterüléséhez és szekrécióhoz (42).

A fibrinogén receptor szerkezetéről és funkciójáról szerzett ismereteink legnagyobb részét a Glanzmann thrombastheniában szenvedő betegek molekuláris biológiai vizsgálata szolgáltatta. A betegség kiváló modellbetegségnek bizonyult. A hasonló tünetek, a fibrinogén receptor számbeli vagy funkcionális hiányossága hátterében számos eltérő genetikai defektus állt, amelyek vizsgálata más-más, a GPIIb vagy a GPIIIa szerkezetileg vagy funkcionálisan fontos doménjére vagy aminosavára derített fényt. A betegek vizsgálata során a fibrinogén receptor mellett jelentős ismeret halmozódott fel magáról a betegségről is, mely egyike a legjobban ismert haemorrhagiás diatheiseknek. A betegséget kísérő vérzéses tünetek jellegzetesek:

purpura, epistaxis, fogínyvérzés és menorrhagia szinte minden esetben megfigyelhető. Haematuria, gastrointestinalis és intracranialis vérzés ritkábban fordul elő. Haemarthros és mély visceralis haematoma szinte sohasem kíséri a betegséget. Spontán petechiák ritkán fordulnak elő, diffúz petechiás vérzés is csak közvetlenül a szülés után alakul ki, és a legtöbb újszülöttben nem jár súlyos vérzéssel. Az epistaxis gyermekkorban gyakori és súlyos, azonban felnőtt betegekben ritkán fordul elő. A fogínyvérzés jellemzően nem jár jelentős vérvesztéssel, de gyakori oka a vashiánynak. A betegség legnagyobb vérvesztéssel járó szövődménye a menorrhagia, amely miatt a betegek gyakran transzfúzióra szorulnak. A vérzéssel járó tünetek súlyossága az életkor előrehaladtával csökken. A véralvadási faktor eredetű vérzékenységgel szemben Glanzmann thrombastheniában nagyon ritkán alakul ki spontán vérzés, viszont a trauma és a sebészeti beavatkozások után súlyos vérzéssel járó szövődmény alakulhat ki. A diagnózis felállítása alapos laboratóriumi vizsgálatot igényel. A megnyúlt vérzési idő és PFA-100 záródási idő, a normál véralvadási szűrőteszt és normál thrombocytaszám, az összes fiziológiai agonistára kapott hiányzó thrombocyta aggregációs válasz, valamint a ristocetin hatására észlelt reverzibilis thrombocyta agglutinatio patognomikus a betegségre. Áramlási citometriás méréssel a thrombocyta felszíni GPIIb és GPIIIa hiánya kimutatható, ami megerősíti a diagnózist. A laboratóriumi jellemzők alapján a denz granulum hiány jelenthet differenciáldiagnosztikai problémát, amelyben azonban az alvadék retrakció megtartott, a thrombocyta aggregáció abnormális, de nem teljesen hiányzó, és az öröklés menet autoszomális domináns. A klinikai tünetek alapján a betegség leginkább a vonWillebrand betegségre emlékeztet, ám a hiányzó thrombocyta aggregáció és a megtartott, reverzibilis thrombocyta agglutinatio megkülönbözteti attól.

A betegség diagnosztikus kritériumai a következők:

- autoszomális recesszív öröklésmenet,
- vérzéses tünetek (általában purpura, epistaxis, fogínyvérzés, menorrhagia), azonban haemarthros és visceralis haematomák nem jellemzőek,
- a vérzés súlyossága az enyhe véraláfutástól a visszatérő bőr- és nyálkahártyavérzésig terjedhet, a tünetek közvetlenül a születés után jelentkeznek,
- normális thrombocytaszám és morfológia,
- megnyúlt vérzési idő, és megnyúlt PFA-100 záródási idő
- hiányzó, vagy jelentősen csökkent mértékű thrombocyta aggregáció ADP, trombin, kollagén vagy epinefrin hatására
- a véralvadék retrakció lehet hiányzó, vagy csak kis mértékben csökkent
- normál, de reverzibilis vérlemezke agglutinatio ristocetin vagy vonWillebrand faktor hatására

A betegség a vérlemezke aggregáció, a fibrinogén receptor mennyisége, az α -granulumok fibrinogén tartalma és a véralvadék retrakció alapján az alábbi 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.

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.

Variáns Glanzmann thrombasthenia

Hiányzó, vagy abnormális vérlemezke aggregáció, változó mértékben csökkent α -granulum fibrinogén tartalom és véralvadék retrakció, normál vagy csökkent felszíni GPIIb/IIIa expresszió. A betegség hátterében olyan genetikai defektus áll, mely a GPIIb/IIIa komplex kialakulását, érését, intracelluláris transzportját és felszíni expresszióját nem, vagy csak kis mértékben befolyásolja, azonban a receptor ligandkötő képességét jelentősen csökkenti (43).

A betegség általában nem igényel folyamatos terápiát, azonban sebészeti beavatkozások előtt javasolt thrombocyta szuszpenzió adása. Glanzmann thrombasthenia mellett vállalható a terhesség, de a szülés előtt, és a szülés utáni héten a thrombocyta szuszpenzió adása javasolt. Antifibrinolitikus gyógyszerek és az 1-dezamino-8-d-arginin vazopresszin (DDAVP) nem váltották be a kezdeti reményeket, ezért adásuk Glanzmann thrombastheniában nem javasolt. Fogamzásgátló tablettákkal a menorrhagia jól kontrollálható. Akut vérzéses epizódok és sebészeti beavatkozások esetén újabban rekombináns aktivált VII-es véralvadási faktor adásával értek el meggyőző eredményeket. Az aktivált VII-es véralvadási faktor fokozza a vérlemezkek kapcsolódását az érfalhoz, és a szöveti faktortól független trombin és fibrin képződés serkentésével bizonyos fokú thrombocyta aggregációt is képes kiváltani. Bár ez a kezelés kétségtelenül drágább a thrombocyta szuszpenzió adásához képest, de előnye, hogy a betegek nem immunizálódnak a számukra ismeretlen GPIIb/IIIa ellen, ami csökkentheti a későbbiekben adott thrombocyta szuszpenziók hatékonyságát és egy esetleges későbbi génterápiás kezelés gátjává válhat.

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

Betegek

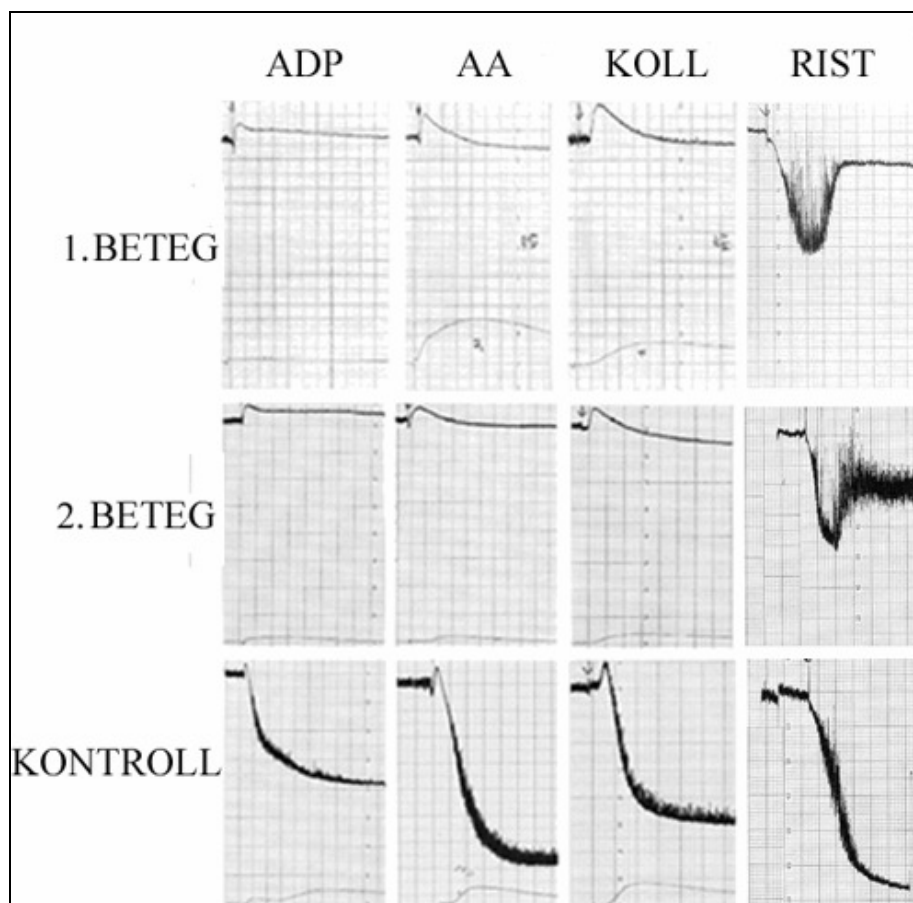
1. Beteg

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 intramuszkuláris 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 (1. ábra). 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 (44). 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 hátterében 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-epinefrin (>300 sec) patronnal jelentősen megnyúlt volt. Thrombocyta aggregációs válasz ADP, adrenalin, kollagén, arachidonsav, és trombin hatására sem volt kiváltható (1.ábra). 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.



1. ábra. A thrombocyta aggregáció vizsgálata. A két beteg és a kontroll 260 G/l thrombocytaszámú thrombocytadús plazmájához vérlemezke aktiváló anyagokat (ADP, arachidonsav, adrenalin, kollagén, trombin) adtunk. Az ábrán az ADP, arachidonsav és kollagén által kiváltott aggregációs válaszokat látjuk. Az aktiváló anyagok hatására a vérlemezkek lekerekednek, állabakat képeznek (shape change, alakváltozás), melyet a minta optikai denzitásának átmeneti, kis mértékű emelkedése kísért. Az ezután bekövetkező aggregáció során a minta optikai denzitása jelentősen csökken, mely változásokat az idő függvényében lumiaggregométer segítségével regisztráltuk (felső vastag görbék), az aktiváló ágensek hozzáadásának időpontját nyíllal jelöltük. A szekréció során felszabaduló ATP-t luciferin-luciferáz reakcióval kemilumineszcens módon detektáltuk (alsó vékony görbék). Thrombocyta aktiváció hatására a beteg és a kontroll vérlemezkek alakváltozása és szekréciója egyaránt megtartott, ám aggregáció csak a kontroll esetében volt detektálható. Hasonló módon vizsgáltuk a vérlemezkek risztocetinre adott válaszát, ami Glanzmann thrombastheniára jellegzetes reverzibilis, kétfázisú agglutinációt okozott mindkét beteg PRP mintájában. ADP: adenosin-difoszfát, AA: arachidonsav, KOLL: kollagén, RIST: risztocetin.

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 alvadásgátoltunk. Thrombocytadús plazma (platelet rich plasma, PRP) nyeréséhez a mintákat 37 °C-on, 15 percen keresztül 120g-vel centrifugáltuk. Thrombocytaszegény plazmát (platelet poor plasma, PPP) a minták 2,000 g sebességgel, 20 percen keresztül történő centrifugálásával nyertünk. Mosott thrombocyta szuszpenziót készítettünk PRP felhasználásával (45). A PRP-t 37 °C-on, 15 percen keresztül 1300g-vel centrifugáltuk, a thrombocyta pelletet a PRP térfogat felének megfelelő 37 °C-os mosóoldatban (1 U/ml Apyrase /Sigma/, 0,3 µM prosztoglandin E1, 140 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l NaHCO₃, 0,5 mmol/l NaH₂PO₄, 0,1% glükóz, 10 mmol/l N-2-hidroxietyl-piperazin-N-2-etán-szulfonsav /HEPES/ pH 7,4) reszuszpendáltuk. Ezután a mintát 1100 g sebességgel centrifugáltuk, a thrombocytákat reszuszpendáló oldatban (1 U/ml Apyrase (Sigma), 140 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l NaHCO₃, 0,5 mmol/l NaH₂PO₄, 0,1% glükóz, 10 mmol/l HEPES pH 7,4) vettük fel. Ezután a mintákat 37 °C-on, 15 percen keresztül 1200g sebességgel centrifugáltuk és „A” oldatban (140 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l NaHCO₃, 0,5 mmol/l NaH₂PO₄, 0,1% glükóz, 10 mmol/l HEPES pH 7,4) reszuszpendáltuk. A mosott thrombocyta szuszpenziót 37 °C-on, 15 percen keresztül 1100g-vel centrifugáltuk, majd a thrombocyta pelletet SDS-PAGE mintapufferben oldottuk fel, 3x20 másodpercig szonikáltuk, ezután 37 °C-on, 10 percen keresztül 1100g-vel centrifugáltuk, végül a mintákat 5 percig 100 °C-on inkubáltuk.

Vérlemezék áramlási citometriás vizsgálata

Tízszeresére hígított nátrium-citráttal alvadásgátolt vérben fluoreszcens, direkt jelölt, 10 µg/ml koncentrációjú antitestekkel szobahőmérsékleten 20 percen keresztül jelöltük a vérlemezék felszíni GPIX (FITC/fluoreszein-izotiocianát/-anti GPIX, Becton-Dickinson, Erenbodegen, Belgium), GPIIb (PE/fikoeritrin/-anti GPIIb, Dako, Glostrup, Denmark) és GPIIIa (FITC-anti GPIIb/IIIa Sigma, St. Louis, MO) integrinjeit. Jelölés után a mintákat foszfát-pufferes sóoldatban (phosphate buffered saline, PBS) mostuk, 1%-os paraformaldehidben fixáltuk és FacsCalibur áramlási citométerben (Becton-Dickinson) analizáltuk. Az intracelluláris GPIIb és GPIIIa kimutatásához a vérlemezékét 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 thrombocytákon az ADIAflo Platelet Gp kit (American Diagnostica, Greenwich, CT) szenzitív, indirekt jelölési és kalibrációs rendszerével. A kit tartalmazta a kalibrációs gyöngyöket, a GPIIb/IIIa komplex ellenes jelöletlen monoklonális antitestet és a TRAP-ot. 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 reakciókat egyenként optimalizáltuk, a reakciókhoz az alábbi saját tervezésű primerpárokat használtuk:

GPIIb 1F	5' ACTTCCTGTGGAGGAATCTGA 3'
GPIIb 1 R	5' CCCCCAGAAGCAGTGAT 3'
GpIIb 2-3 F	5' GGTGGTCTGTGAGGTGTCATTGAG 3'
GpIIb 2-3 R	5' AGTGTCCCTGCCCCCGATTG 3'
GpIIb 4 F	5' CAGGGCACAGGGAACAATCG 3'
GpIIb 4 R	5' GGAGACAAGGAGGAGGGGTCAG 3'
GpIIb 5 F	5' GCTGAGAAGACGCCCCGTAGGTAG 3'
GpIIb 5 R	5' CAGGAGCCCCAAGCACACCAG 3'
GpIIb 6-7 F	5' GGGCTTCAGCTCCGTGGTC 3'
GpIIb 6-7 R	5' CAGGACCTGACCGTCTGC 3'
GpIIb 8-9 F	5' CAGGGCTGGGGCTGAGTG 3'
GpIIb 8-9 R	5' GAACTGGGATAAGGGGCTTCG 3'
GPIIb 10 F	5' GAGTGGGAGGTTGCTTTGGG 3'
GPIIb 10 R	5' TCATTCACGCCGCTGGAC 3'
GPIIb 11 F	5' GTGGAGGGGGAAGTGAAGCTTC 3'
GPIIb 11 R	5' GAAAGGGAGACAGAGGGGCAG 3'
GPIIb 12 F	5' CAGGAGAGCAAGGGTTCGAGG 3'
GPIIb 12 R	5' CTGGTTCTGGCTGCCCTCAG 3'
GPIIb 13 F	5' CCTCCTTCACCCACACTTTGC 3'
GPIIb 13 R	5' CTTGGCACTTCCAGCGAATG 3'
GPIIb 14 F	5' AGAGGGGCTGGGTGAAACC 3'
GPIIb 14 R	5' AGGGTGATGGGGAGGCTTG 3'
GPIIb 15 F	5' GCCAGGAGGAGCCACAATG 3'
GPIIb 15 R	5' CAGGGGTTGGAGCCTTTCTG 3'
GPIIb 16-17 F	5' CCTCAGACCAAGACACCCGTG 3'
GPIIb 16-17 R	5' CTCCCAGCCCTGCCAATC 3'
GPIIb 18 F	5' AGGAGAAGGTGGGATGTGTATGG 3'
GPIIb 18 R	5' GACTGGCTGGATTTTGAGGTTTTC 3'
GPIIb 19-20 F	5' CCGAGCCCCGATACCATCTAC 3'
GPIIb 19-20 R	5' AGTGCCTCCCAGGTCCCG 3'
GPIIb 21 F	5' TGGCACACAAATCTTTCCAG 3'
GPIIb 21 R	5' TCACTACCCCAAGGACAATG 3'
GPIIb 22 F	5' ATTCAGGGCAGGGCTGTC 3'
GPIIb 22 R	5' GGAAGGGTGGTGGGTAGG 3'
GPIIb 23-24 F	5' CCTCACCCCCAGAAAGTCAC 3'
GPIIb 23-24 R	5' CAGGATGTAGAGCAGGTCGG 3'
GPIIb 25 F	5' GGTGAGAGGGAGCAGAACAG 3'
GPIIb 25 R	5' GCAAAGGAGTGGTCAGGC 3'
GPIIb 26 F	5' CCTCTGTGGGCTGGGGTTTCG 3'
GPIIb 26 R	5' CTCCTCCCATCCCCTCTGCC 3'
GPIIb 27 F	5' GCCACCGCTTCCTGAACC 3'
GPIIb 27 R	5' GCCCTCCCACACCAAACC 3'
GPIIb 28 F	5' GGTGTGGGACCTGGACTC 3'
GPIIb 28 R	5' CTGACTGGGGGACAATGG 3'
GPIIb 29 F	5' GCCTGAGGTTTGAGTCTTTG 3'
GPIIb 29 R	5' CTGGTCCCTGGATTACCC 3'
GPIIb 30 F	5' CTCCTCACATGTGCTCTGGG 3'
GPIIb 30 R	5' CCAATGGAACAGCTCCAACC 3'

A PCR termékeket 3%-os agaróz gélen ellenőriztük, ultrafiltrációval megtisztítottuk, majd 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. Ezekben az esetekben a GPIIb génjének 4-es és 24-es exonjait amplifikáltuk és direkt szekvenálásnak vetettük alá.

A thrombocyta RNS analízise

A nonszensz 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 kontroll) 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 direkt szekvenálással analizáltuk, ami előtt az érintett szakaszt átfedő PCR termékekkel amplifikáltuk az alábbi primer párokkal:

1F 5'GCAGCCGCGAGGCCCCACG'3, 1R5'GGGCTCAGCTTGTCCCGGAA'3;
2F5'CCACTGGGCACAACATTCCT'3, 2R5'TCATTCTCCTTCTTCTGATT'3;
3F5'AGATTGTGCTGCTGGACGTG'3, 3R5'AAGGCCAGCACCGTGACCAT'3.

Az első beteg esetében a GPIIb relatív kvantitatív analízise céljából a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) cDNS-ének, valamint a GPIIb cDNS-ének egy-egy szegmentjét amplifikáltuk az alábbi primerpárokkal:

GAPDH F: 5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTG-3',
GAPDH R: 5'-CTGGAAGATGGTGATGGG-3'
GPIIb F: 5'-AGATTGTGCTGCTGGACGTG-3',
GPIIb R: 5'-AAGGCCAGCACCGTGACCAT-3'.

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 algoritmus 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:
$$\text{GpIIb mRNS beteg/kontroll arány} = \frac{E_{(\text{GPIIb})}^{\Delta\text{Cp GPIIb (kontroll-minta)}}}{E_{(\text{GAPDH})}^{\Delta\text{Cp GAPDH (kontroll-minta)}}}$$
, 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 a thrombocyta lizátumok SDS-PAGE (7,5% gél) 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 poliklonális antitest nem-redukáló környezetben a GPIIb-t és a GPIIIa-t azonos intenzitással jelöli, azonban redukáló környezetben csak a GPIIb-t képes megfelelő intenzitással kötni; a GPIIIa redukáló környezetben ezzel az antitesttel halványan festődik. A detektáláshoz a Vectastain Elite ABC Sheep and

Mouse IgG kit-et (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 geneticin 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 (1619delC, C339G, 1772insG, C2437A, azaz STOP509, L116V, STOP575, H782N) 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. Ált-transzfektált BHK sejteket az antibiotikum rezisztencia gént hordozó, de GPIIb vagy GPIIIa cDNS-t nem tartalmazó plazmidokkal végzett ko-transzfekecióval 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 higromicin (Roche) antibiotikumokkal végeztük.

A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIb/IIIa expressziójának vizsgálata

A STOP509 GPIIb cDNS-sel és vad típusú GPIIIa cDNS-sel ko-transzfectált 5×10^5 BHK sejtet 5mM etilén-diamin-tetraecetsav (ethylene-diamine-tetraacetic acid, EDTA) tartalmú PBS-sel gyűjtöttük be, majd centrifugáltuk és DMEM-ben reszuszpendáltuk. 30 perc szobahőmérsékletű inkubáció után a sejteket lecentrifugáltuk és PBS-sel 5×10^5 sejt/100 mikroliter koncentrációra hígítottuk. A sejteket 10 µg/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 minden mutáció 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[tris(hidroximetil)aminometán]-HCl, pH 8.5, 25 % glicerol (w/v), és 10% Mowiol 4-88, Hoechst, Frankfurt, Germany) fedtük. A sejtek felszíni jelölését Zeiss LSM510 konfokális lézer szkennig mikroszkóppal 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 transzfectált BHK sejtekből

Normál GPIIIa cDNS-sel és mutáns vagy normál GPIIb cDNS-sel ko-transzfectált 5×10^6 számú BHK sejtet lízis pufferben (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholic acid, és Complete Protease Inhibitor Mix [Roche]) oldottunk fel. A sejt lizátumokat 30 percig jégen inkubáltuk, majd a

sejttörmelékét 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 proteineket 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 ko-expresszázó 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 precipitátumokat 7,5%-os gélen (SDS-PAGE) redukáló környezetben elektroforetizáltuk. A gél után izopropanol–ecetsav-víz 25:10:65 térfogatarányú oldatában fixáltuk, és Amplify oldatba (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) áztattuk. Végül a gél vakumszáritóban 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% bovin szérum albumin (BSA) és 0.25 mM $MgCl_2$ tartalmú Tris-pufferelt sóoldatban (Tris buffered saline, TBS) szuszpendáltunk. A sejteket 60 percig szobahőmérsékleten 0.1 mg/ml koncentrációjú humán fibrinogénnel (Sigma) inkubáltuk a GPII/IIIa sztérikus aktivációját kiváltó, 10 μ 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 μ g/ml végkoncentrációjú 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 10% fetal calf serum (FCS), 0.5 mg/ml geneticin és/vagy higromicin tartalmú DMEM tápoldatban 12 mm-es kerek fedőlemezen szaporítottuk 2 napon keresztül. A sejteket ezután 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 μ g/ml koncentrációjú anti-Golgin-97 egér monoklonális antitest (Invitrogen), és 4 μ 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 ezután 3x mostuk TX-BSA-PBS-sel, majd előzetesen megtisztított mikroszkópos tárgylemezre helyeztük és 5 µl Mowiolal fedtük. A mintákat Zeiss 510 LSM konfokális lézer szkennings 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 szkennings citometria és képanalízis

A lézer szkennings citometriai (LSM) mérésekhez az iCys (CompuCyte, Cambridge, MA) Olympus IX-71 invertált mikroszkópra épített berendezését használtuk 40x-es szemiapokromatikus objektívvel. Ebben a kísérletsorozatban 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. A többi festék gerjesztéséhez használt lézerek és a detektálásukhoz használt szűrők a CLSM mikroszkópia esetén használtakkal megegyezők voltak. Minden mintáról 112 különböző, 1.000x768 pixel felbontású képet készítettünk, melyek így mintánként megközelítőleg 1.500 sejt elemzését tették lehetővé.

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 expresszáló BHK sejtben határoztuk meg. A kapott hányadosok átlagával ($\pm$ SD) a GPIIb ER-ban és Golgiban mért relatív mennyiségi arányát fejeztük ki.

Eredmények

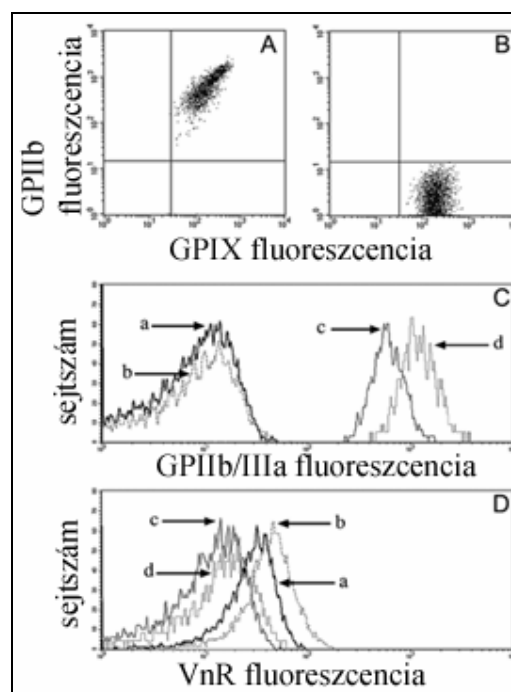
1. Beteg

Sejtfelszíni és intracelluláris integrinek áramlási citometriás vizsgálata thrombocytákban

A vérlemezkék felszínén lévő fibrinogén receptor komplexet, a vitronektin receptor komplexet és a fibrinogén receptort alkotó integrineket direkt és indirekt jelölés után áramlási citométerben vizsgáltuk. A vérlemezkék intracelluláris GPIIb és GPIIIa tartalmának kimutatására 0,1%-os Triton X100-zal permeabilizált vérlemezkéket és direkt jelölt antitesteket használtunk. Az első beteg esetében sem a thrombocyta felszínén (2. ábra A,B), sem intracellulárisan (ábrán nem szerepel) nem tudtunk GPIIb-t detektálni direkt jelölt antitestekkel ám csekély mennyiségű GPIIIa jelenléte nem volt kizárható (ábrán nem szerepel). A vérlemezkék felszínén normál intenzitású GPIX festődést mértünk (2. ábra A,B). A beteg vérlemezkéin az érzékeny, indirekt jelöléssel végzett kvantitatív áramlási citometriás módszerrel sem tudtunk fibrinogén receptor komplexet kimutatni (receptor szám <50/thrombocyta), mely

megegyeztetten az I-es típusú Glanzmann thrombasthenia diagnózisát. A beteg édesanyjában 22.415, édesapjában 22.075 fibrinogén receptort detektáltunk a vérlemezkék felszínén, mely a kontroll thrombocytaikon 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 (2.ábra C). A vitronektin receptor száma a thrombastheniás vérlemezkék felszínén (377 /thrombocyta) magasabb volt, mint a kontroll thrombocytaikon (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 thrombocytaikon változatlan maradt (2. ábra D).

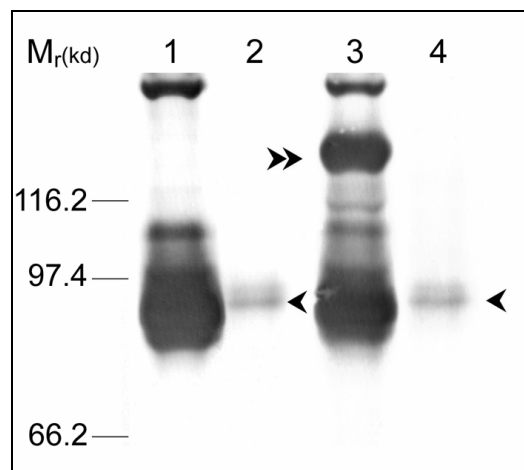
2. ábra. Vérlemezkék felszíni integrinjeinek áramlási citometriai vizsgálata (1. beteg). A thrombocytaikat a forward és side scatter tulajdonságaik alapján azonosítottuk. A kontroll thrombocyta normal GPIIb és GPIX festődést mutattak (A), míg a thrombastheniás vérlemezkéken normal GPIX jelölés mellett nem tudtunk GPIIb-t detektálni (B). Az indirekten jelölt GPIIb/IIIa és a vitronektin receptor fluoreszcencia intenzitása látható a C és a D paneleken (a: beteg TRAP nélkül, b: beteg TRAP aktiváció után, c: kontroll TRAP nélkül, d: kontroll TRAP aktiváció után).



Thrombocyta lizátum Western blot vizsgálata

A poliakrilamid gélen nem redukáló környezetben elválasztott thrombocyta fehérjéket a GPIIb-t és a GPIIIa-t egyaránt jelölő GPIIb/IIIa ellenes poliklonális, valamint GPIIIa ellenes monoklonális antitesttel jelöltük. 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 pedig a monoklonális antitesttel egyértelműen jelenlévő, de halványan festődő sávként detektáltuk a beteg mintájában (3. ábra). Az immunoblot denzitometriás vizsgálata szerint a beteg mintájában detektált GPIIIa a kontroll mintájában mért GPIIIa mennyiségnek 6,4%-a volt.

3. ábra. GPIIb és GPIIIa kimutatása a beteg és a kontroll thrombocytákban nem redukáló környezetben Western blot vizsgálattal (1. beteg). A gél minden oszlopára 30 µg fehérjét vittünk fel. 1,2: anti-GPIIIa jelölés, 3,4: anti-GPIIb/IIIa jelölés. 1,3: kontroll, 2,4: beteg. Az egyes nyílhegyek a GPIIIa-t, a dupla nyílhegyek a GPIIb-t mutatják, mely a betegben hiányzik (4.sáv). Az 1. és 3. oszlop nagy molekulatömegű sávjait GPIIIa dimerek okozzák, melyek redukáló környezetben nem jelennek meg.

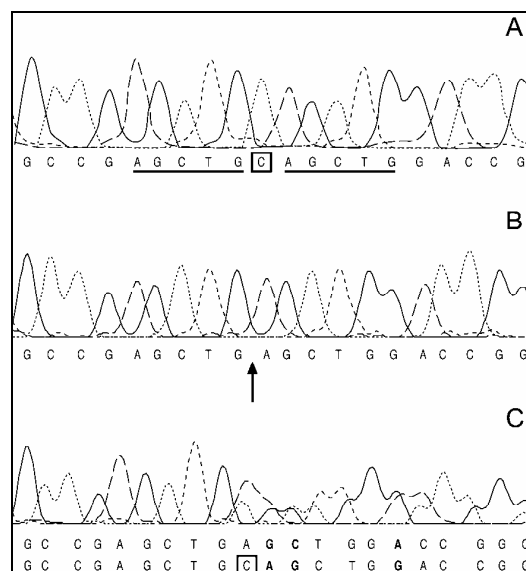


Thrombastheniát okozó mutációk a GPIIb génjében

A vérlemezkék ármalási citometriás és Western blot analízise minden kétséget kizáróan jelenlévő, de jelentősen csökkent mennyiségű GPIIIa-t, valamint emelkedett mennyiségű vitronektin receptor mennyiséget 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 (4. ábra). A beteg szülei ugyanezt a mutációt hordozták heterozigóta formában. (A nukleotid számozás a GPIIb transzkript www.ensembl.org honlapon az ENSG00000005961 azonosító alatt közölt szekvenciáján alapul.)

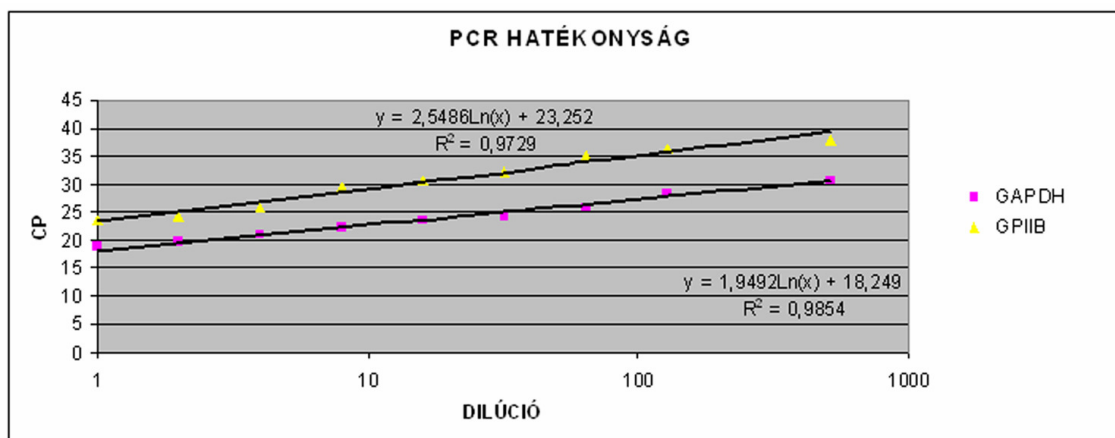
4. ábra. A Glanzmann thrombastheniát okozó mutáció a GPIIb génjében. (1. beteg) Az ábrán az első beteg GPIIb génjének forward szekvenálása látható. A: kontroll, B: beteg, C. a beteg édesapja (hasonló eredményt mutatott a beteg édesanyjának vizsgálata). A 17-es exonban lévő citozin homozigóta delécióját a beteg esetében nyíllal jelöltük, a normál kontroll és a heterozigóta mutáns szülő esetében bekereteztük. A mutációt határoló ismétlődő szekvenciát aláhúztuk.



A thrombocyta eredetű mRNS vizsgálata

A GPIIb gén nonszensz mutációjának egyik lehetséges következményét, az alternatív splicingot a thrombocyta eredetű mRNS-ből átírt cDNS direkt szekvenálásával vizsgáltuk. A GPIIb cDNS 12. és 27. exon közé eső szakaszán 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), a lehetőségét, ezért a GPIIb mRNS stabilitását a GAPDH mRNS szintjére normalizálva, a kontrollhoz viszonyított relatív kvantitással vizsgáltuk. A PCR reakciók hatékonyságát (E) a

GAPDH és GPIIb cDNS-ek 1-512-szeres hígításának Cp értékeit a dilúció logaritmikus skáláján ábrázolt egyenes meredekségéből az $E=10^{(1/\text{meredekség})}$ képlet segítségével határoztuk meg (5. ábra).



5. ábra A GPIIb és a GAPDH cDNS-ek amplifikációs hatékonyságának meghatározása. A GPIIb és GAPDH cDNS-ek 10, 1-512-szeres hígításával kapott Cp értékeket ábrázoltuk. Az y tengelyen a Cp értékek, az x tengelyen a dilúciók szerepelnek logaritmikus skálán. Mindkét reakció linearitása megfelelő volt (Pearson korrelációs koefficiens >0,97).

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 viszonyítva átlagosan 0,06% volt.

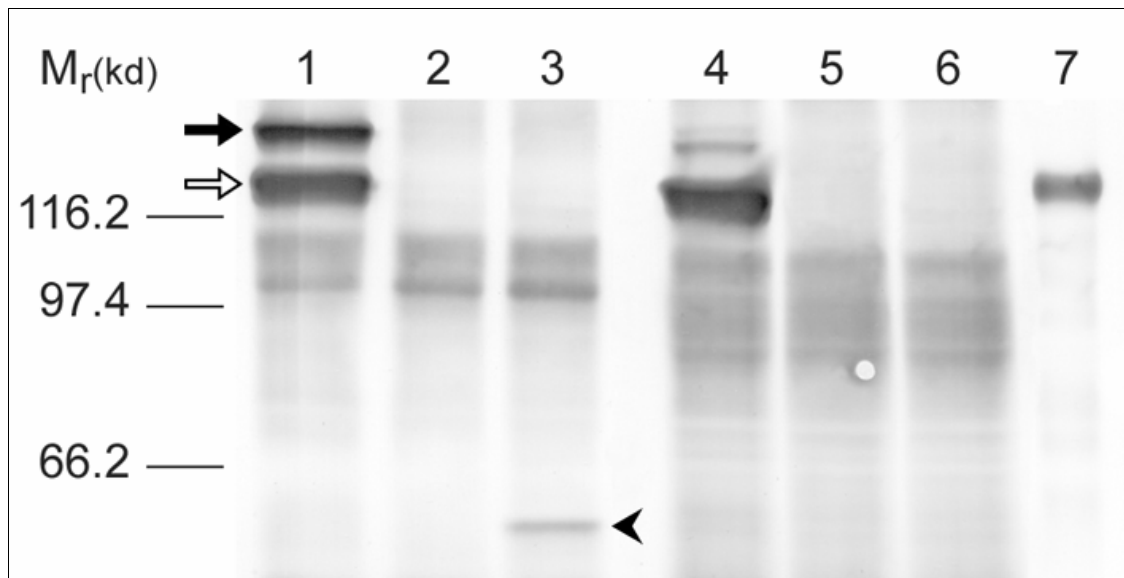
A BHK sejtek felszíni GPIIb és GPIIIa expressziójának vizsgálata

A GPIIb gén mutációjának a GPIIb/IIIa komplex felszíni expressziójára gyakorolt hatását transzfektált BHK sejteken vizsgáltuk. A vad típusú és mutáns GPIIb és GPIIb/IIIa komplexet PE-konjugált monoklonális GPIIb ellenes és FITC-konjugált monoklonális GPIIb/IIIa komplex ellenes antitestekkel áramlási citometriás és fluoreszcens mikroszkópos módszerrel detektáltuk. 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 ko-expresszálo BHK sejtek felszínén egyik módszerrel sem tudtunk GPIIb-t vagy GPIIb/IIIa-t kimutatni (ábrán nem szerepel).

GPIIb és GPIIIa komplex kialakulásának vizsgálata BHK sejtekben

A pro-GPIIb és érett GPIIb arányát és a mutáns GPIIb molekulák komplex alkotó képességét transzfektált BHK sejtekben vizsgáltuk. A sejtek lizátumából a GPIIb-t és a GPIIIa-t egyaránt megkötő GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel, illetve GPIIIa ellenes monoklonális antitesttel immunoprecipitációt végeztünk. Az immunoprecipitált fehérjéket redukáló környezetben végzett poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el egymástól, így a pro-GPIIb és az érett GPIIb eltérő molekulatömegük miatt a gélen elkülönült egymástól. A szeparált fehérjéket GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel jelöltük és Vectastain ABC kittel detektáltuk. A vad típusú GPIIb-t és GPIIIa-t expresszálo 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 ko-expresszálo 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 (6.ábra).



6. ábra BHK sejtekben expresszált vad típusú és mutáns GPIIb és vad típusú GPIIIa immunoprecipitálása és Western blot vizsgálata (1. beteg). A BHK sejtek lizátumából immunoprecipitált fehérjék elektroforézisét (SDS PAGE) redukáló környezetben végeztük. A fehérjéket GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel jelöltük. 1. és 4. oszlop: vad típusú GPIIb-t és GPIIIa-t expresszált BHK sejtek. 2. és 5. oszlop: csak GPIIIa-t expresszált BHK sejtek. 3. és 6. oszlop: STOP533 mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t expresszált BHK sejtek. 7. oszlop: thrombocyta lizátum. Az immunoprecipitációt GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel (1.-3. oszlop), vagy GPIIIa ellenes monoklonális antitesttel (4.-7. oszlop) végeztük. A nyílhegy a trunkált GPIIb-nek megfelelő sávra mutat (3. oszlop), mely a GPIIIa-val nem ko-immunoprecipitálódott (6.oszlop) A thrombocyta eredetű GPIIb kissé eltérő molekulatömegét az eltérő poszttranszlációs glikoziláció magyarázza. A GPIIIa redukáló környezetben halványan jelölődik.

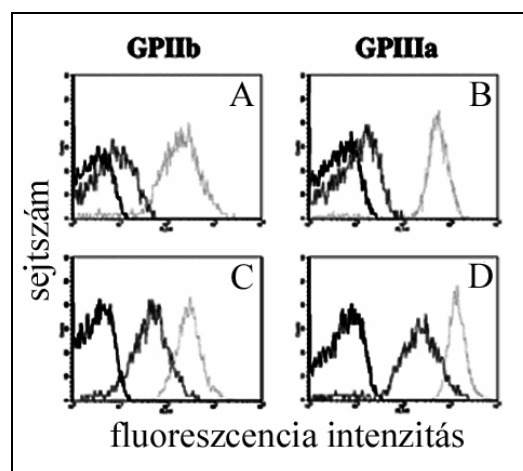
2. Beteg

Sejtfelszíni és intracelluláris integrinek áramlási citometriás vizsgálata thrombocytákban

A második betegben a direkt jelölt antitestekkel végzett áramlási citometriás vizsgálat a kontroll vérlemezékhez képest jelentősen csökkent, de detektálható thrombocyta felszíni GPIIb (7.A ábra) és GPIIIa festődést mutatott (7.B ábra). 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 thrombocytaiban a kontrollhoz képest továbbra is jelentősen alacsonyabb volt (7.C,D ábra). Kvantitatív áramlási citometriás mérések szerint a beteg vérlemezkeinek felszínén átlagosan 2.556 fibrinogén receptor expresszáódott, mely a kontroll érték (57.104 ± 5.568 , $n=6$) 4,5%-ának felelt meg. TRAP aktiváció hatására a beteg vérlemezkein a GPIIb/IIIa komplex thrombocytánkénti száma átlagosan 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 vérlemezkek 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).

7. ábra. Vérlemezkek felszíni és intracelluláris GPIIb és GPIIIa integrinjeinek áramlási citometriás vizsgálata (2. beteg). A thrombocytákat a forward és side scatter tulajdonságaik alapján azonosítottuk. A fluoreszcencia hisztogramokon a thrombocyta felszíni (a,b) és intracelluláris (c,d) GPIIb (a,c) és GPIIIa (b,d) festődésének fluoreszcencia intenzitása látható. (vastag fekete vonal: izotípus kontroll, sötét szürke vonal: beteg vérlemezkéi, világos szürke vonal: kontroll vérlemezkek)

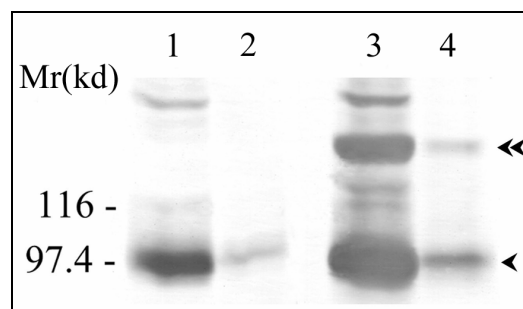


Thrombocyta lizátumok Western blot vizsgálata

A második beteg thrombocyta lizátumának Western blot vizsgálata során a kontrollban detektált mennyiséghez képest a beteg vérlemezkeiben a fibrinogén receptor mindkét komponensének mennyiségét jelentősen csökkentnek találtuk (8.

ábra). Denzitometriás analízissel a beteg vérlemezkéiben a GPIIb esetében a kontroll érték 6%-át, GPIIIa esetében 16%-át mértük.

8. ábra. GPIIb és GPIIIa kimutatása Western blot vizsgálattal a beteg és a kontroll thrombocyta lizátumában (2. beteg). A kontroll és a beteg thrombocyta lizátumait nem redukáló környezetben vizsgáltuk Western blottal. A gél minden oszlopára 30 µg fehérjét vittünk fel. 1,3: kontroll, 2,4: beteg. Az egyes nyílhegyek a GPIIIa-t, a dupla nyílhegyek a GPIIb-t mutatják. A glikoproteinek jelölését GPIIIa ellenes monoklonális (1,2) és GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel(3,4) végeztük.

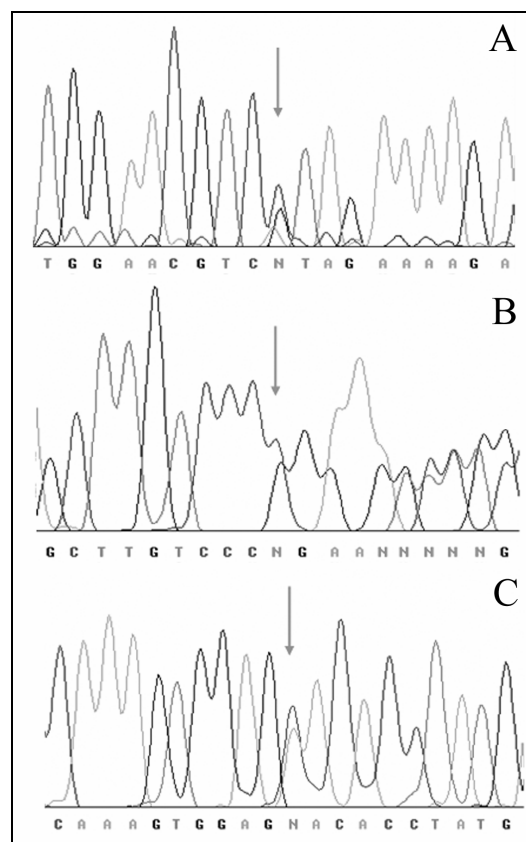


Thrombastheniát okozó mutációk a GPIIb génjében

A második betegben 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.Leu116Val, 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 aszparaginra cserélődését okozta (H782N, p.His782Asn) (9. ábra). 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.

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

9. ábra. A Glanzmann thrombastheniát okozó mutációk a GPIIb génjében. (2. beteg) Az ábrán a második beteg DNS mintájából végzett GPIIb gén szekvenálás eredménye látható. A mutációkat nyíllal jelöltük. A: 4-es exon, foreward szekvencia, C339G (L116V) mutáció. B: 18-as exon, reverse szekvencia, 1772insG (STOP575) mutáció. C: 24-es exon, foreward szekvencia, C2437A (H782N) mutáció.



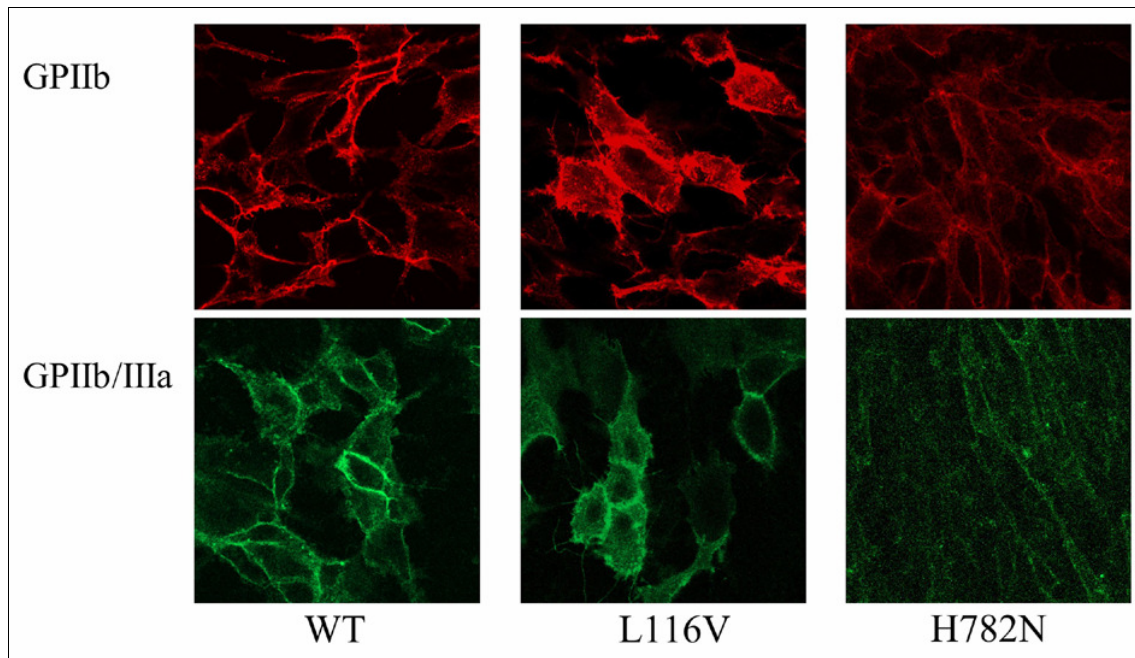
A thrombocyte eredetű mRNS vizsgálata

A második betegben a thrombocyte eredetű mRNS-ből átvitt cDNS direkt szekvenálása során alternatív splicingot nem találtunk, a betegben a splicing az exon-intron határok mentén történt. A korai terminációs kodont hordozó mRNS pontos kvantitatív analízisét a másik, stop kodont nem hordozó allél jelenléte nem tette lehetővé. A beteg GPIIb cDNS-ének 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 allélról származó mRNS-t, ha kis mennyiségben jelen is lehetett, a másik allélról származó mRNS molekulák mennyiségi túlsúlya miatt nem lehetett amplicifikálni, s így a stop kodont a beteg

vérlemezekéből származó mRNS-ben nem 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 GPIIb gén mutációinak a GPIIb/IIIa komplex felszíni expresszióra gyakorolt hatását transzfektált BHK sejteken vizsgáltuk. A vad típusú és mutáns GPIIb és GPIIb/IIIa komplexet PE-konjugált monoklonális GPIIb ellenes és FITC-konjugált monoklonális GPIIb/IIIa komplex ellenes antitestekkel áramlási citometriás (ábrán nem szerepel) és fluoreszcens mikroszkópos módszerrel detektáltuk (10. ábra). 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 (ábrán nem szerepel). 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 mért értékhez képest alacsonyabb GPIIb és GPIIb/IIIa fluoreszcencia intenzitást kaptunk.

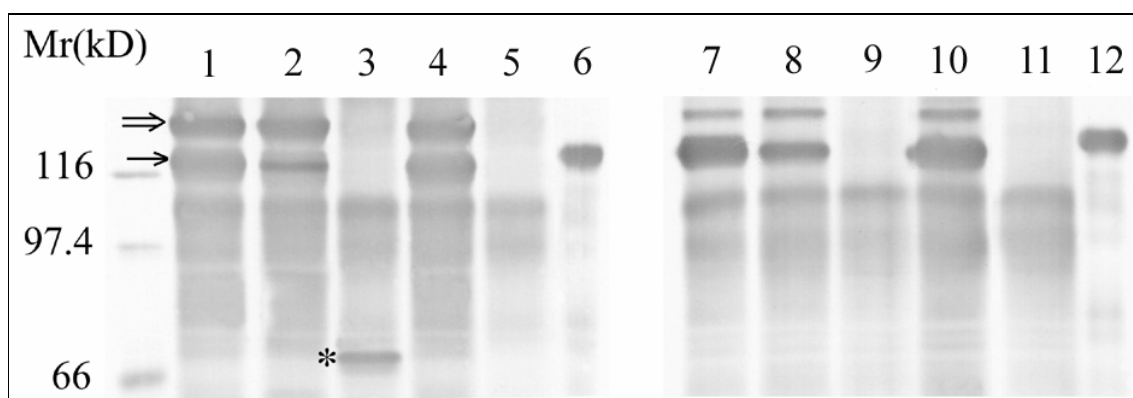


10. ábra A GPIIb és GPIIb/IIIa komplex felszíni expressziójának vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal a transzfektált BHK sejteken. A vad típusú vagy mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t expresszáló BHK sejteken a felszíni GPIIb-t (piros) és GPIIb/IIIa-t (zöld) direkt jelölt monoklonális antitestekkel detektáltuk. WT: vad típus (wild type). Az L116V mutáns felszíni fluoreszcencia intenzitása a vad típushoz hasonló mindkét jelölés esetén. A H782N mutáns a vad típushoz képest jelentősen kisebb mértékű felszíni GPIIb és GPIIb/IIIa festődést mutatott. A STOP575 esetén egyik antitesttel sem detektáltunk festődést (az ábrán nem szerepel).

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 a GPIIb-t és a GPIIIa-t egyaránt megkötő GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel, vagy a GPIIIa ellenes monoklonális antitesttel immunoprecipitációt végeztünk. Az 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 szeparált fehérjéket GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel jelöltük és Vectastain ABC kittel detektáltuk. A vad típusú GPIIb-t és GPIIIa-t expresszáló BHK sejtekhez hasonlóan 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 (11. ábra).

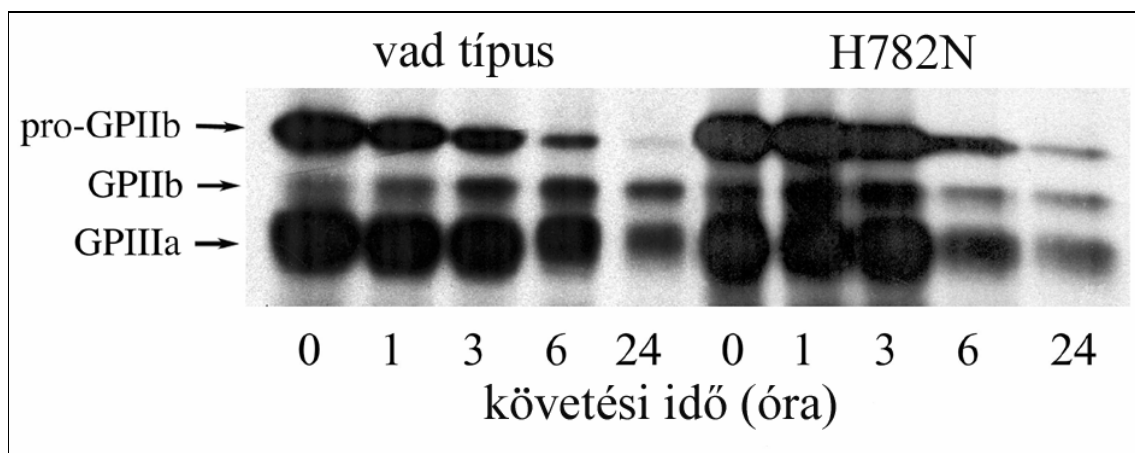


11. ábra BHK sejtekben expresszált vad típusú és mutáns GPIIb és GPIIIa immunoprecipitálása és Western blot vizsgálata (2. beteg). A BHK sejtek lizátumából immunoprecipitált glikoproteineket redukáló környezetben elektroforetizáltuk. A fehérjéket GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel jelöltük. 1. és 7. oszlop: L116V GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtek. 2. és 8. oszlop: H782N GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtek. 3. és 9. oszlop: STOP575 mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtek. 4. és 10. oszlop: vad típusú GPIIb-t és GPIIIa-t ko-expresszáló BHK sejtek. 5. és 11. oszlop: csak vad típusú

GPIIIa-t expresszáló BHK sejtek. 6. és 12. oszlop: thrombocyta lizátum. Az immunoprecipitációt GPIIb/IIIa ellenes poliklonális antitesttel (1.-6. oszlop), vagy GPIIIa ellenes monoklonális antitesttel (7.-12. oszlop) végeztük. A csillag a trunkált GPIIb-nek megfelelő sávra mutat (3. oszlop), mely a GPIIIa-val nem ko-immunoprecipitálódott (9. oszlop)

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 ko-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 (ábrán nem szerepel). 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 (12. ábra).



12. ábra Vad típusú GPIIIa-t és vad típusú vagy H782N mutáns GPIIb-t ko-expresszáló BHK sejtek pulse-chase analízise. A radioaktív jelölés után a sejteket különböző időpontokban lizáltuk és a GPIIb-t és GPIIIa-t poliklonális GPIIb/IIIa ellenes antitesttel immunoprecipitáltuk. A sejtek lizálásának időpontját az ábrán alul tüntettük fel, a pro-GPIIb-t, érett GPIIb-t és GPIIIa-t reprezentáló sávokat nyíllal jelöltük.

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

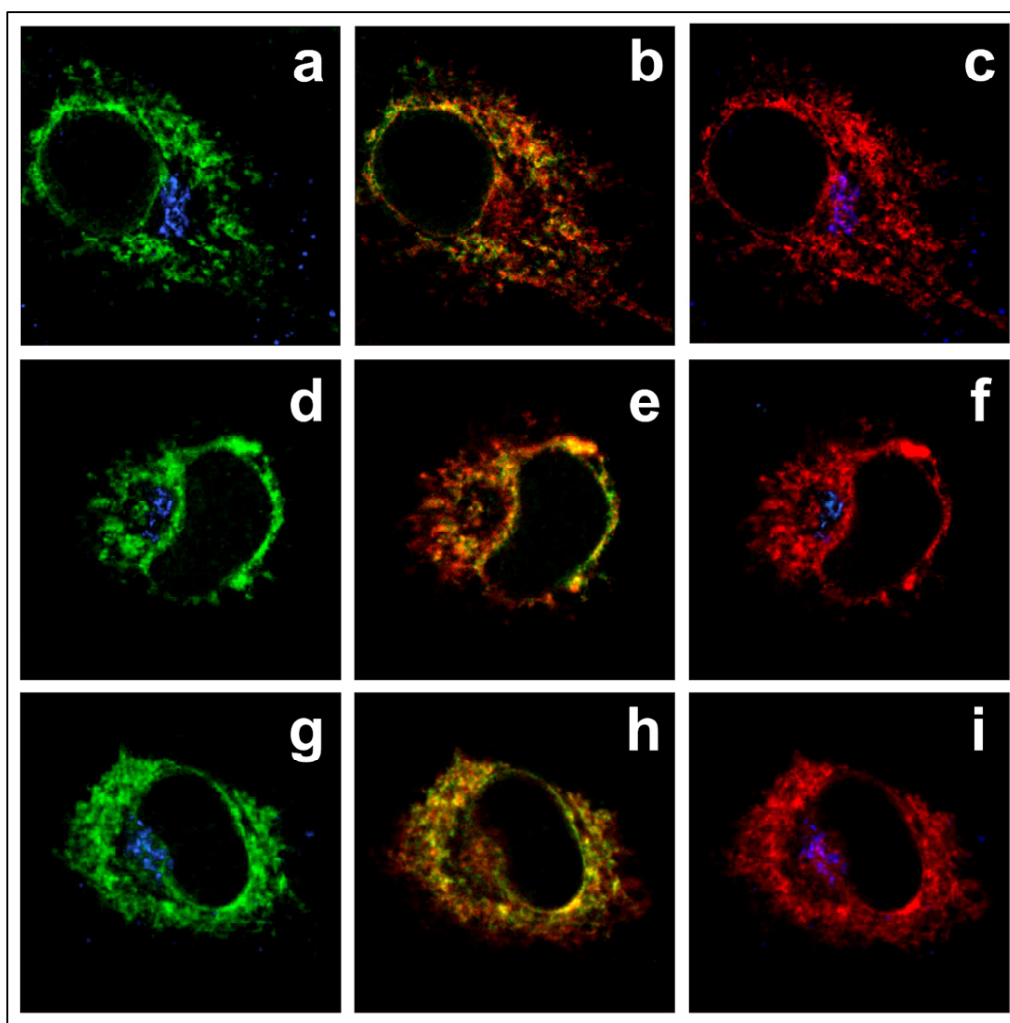
A vad típusú és mutáns GPIIb molekulák intracelluláris lokalizációját vad típusú GPIIIa-val és valamely mutáns, vagy vad típusú GPIIb-vel ko-transzfectált BHK sejtekben CLSM segítségével vizsgáltuk. A sejtek hármass immunfluoreszcens festésével a GPIIb-t (piros), a PDI-t (ER marker, zöld), és a Golgin-97-et (Golgi marker, kék) jelöltük. A vad típusú GPIIb-t expresszáló sejtekben a GPIIb festődése a Golgi és az ER jelölésével egyaránt erős kolokalizációt mutatott, melyet az egyes színeknek megfelelő csatornák szuperponálásakor az ER-ben megjelenő narancssárga, és a Golgiban megjelenő lila színek megjelenése 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 (13. ábra).. A STOP575 mutáns GPIIb-t expresszáló sejtekben nem detektáltunk a háttérfluoreszcenciánál erősebb GPIIb festődést (ábrán nem szerepel).

A kolokalizáció számszerű értékelése céljából lézer szkennig citometriás 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 (14. ábra).

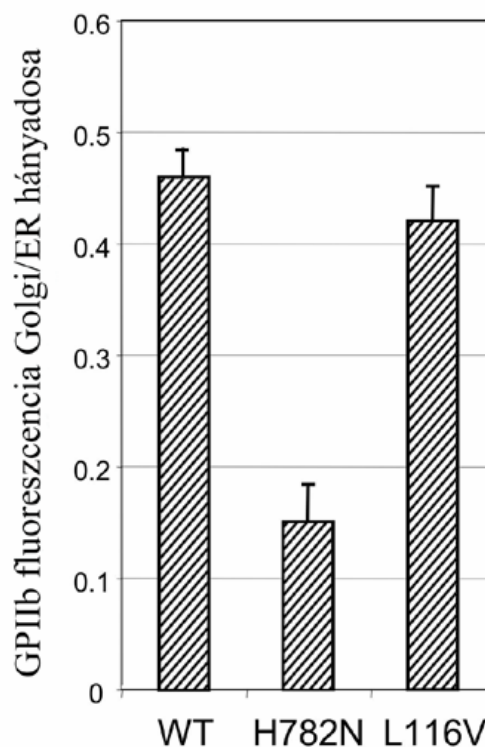
A GPIIb(L116V)/GPIIIa komplex fibrinogén kötő képességének meghatározása

Az L116V mutáns és a vad típusú GPIIb szintézise, érése, intracelluláris transzportja és felszíni expressziója nem különbözött. Az L116V mutáció a második betegben a STOP575 mutációval azonos allélen helyezkedett el, és a thrombocytában az allél mRNS-ét nem tudtuk kimutatni, így a mutációnak valószínűleg nem volt szerepe a betegség kialakulásában. Ennek ellenére érdekes kérdés volt, hogy egy, a β -propeller domén cap szubdoménjében lévő mutáció hogyan befolyásolja a fibrinogén receptor ligand kötő képességét, ezért ál-transzfectált, illetve normál vagy L116V mutáns GPIIb cDNS-sel és normál GPIIIa cDNS-sel ko-transzfectált BHK sejteken áramlási citométerben vizsgáltuk a PT25-2 monoklonális antitesttel sztérikusán aktivált sejtfelszíni GPIIb/IIIa komplex fibrinogén kötő képességét. A háttérfluoreszcenciát az ál-transzfectált sejtek mérésével kaptuk. 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 (15. ábra).

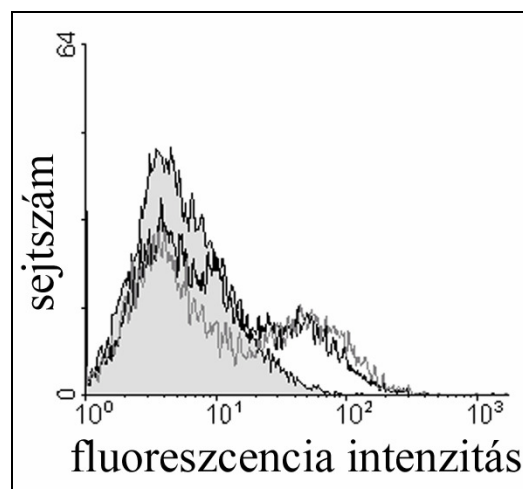


13. ábra A GPIIb és GPIIb/IIIa komplex intracelluláris lokalizációjának vizsgálata konfokális lézer szkennings fluoreszcens mikroszkóppal a transzfektált BHK sejtekben. Vad típusú (a,b,c) H782N mutáns (d,e,f) vagy L116V mutáns (g,h,i) GPIIb-vel és vad típusú GPIIIa-val ko-transzfektált BHK sejtekben jelöltük a GPIIb-t (piros), az ER-t (zöld), és a Golgit (kék). a,d,g: ER és Golgi kettős jelölés; b,e,h: GPIIb és ER kettős jelölés; c,f,i: GPIIb és Golgi kettős jelölés. A GPIIb és az ER jelölésének átfedése narancssárga, az ER és a Golgi jelölésének átfedése lila színt eredményez.

14. ábra A GPIIb Golgiban és ER-ben mért fluoreszcencia intenzitásának meghatározása transzfectált BHK sejtekben lézer szkennig citométerrel. Vad típusú, H782N mutáns vagy L116V mutáns GPIIb-vel és vad típusú GPIIIa-val ko-transzfectált BHK sejtekben jelöltük a sejtmagot, a GPIIb-t, az ER-t, és a Golgit. A sejteket a sejtmag és a sejtmembrán festődése alapján azonosítottuk. A GPIIb ER-ben és Golgiban mért fluoreszcencia intenzitásának hányadosának átlagát ($\pm$ SD) 1776 vad típusú, 1443 H782N mutáns és 1859 L116V mutáns GPIIb-t expresszáló BHK sejt mérése alapján határoztuk meg, és az ábrán az y tengelyen jelöltük. WT:vad típus (wild type).



15. ábra. L116V mutáns felszíni GPIIb/IIIa fibrinogén kötő képességének vizsgálata BHK sejteken. Vad típusú, ál-transzfectált és L116V mutáns GPIIb-t és vad típusú GPIIIa-t ko-expresszáló sejtek humán, FITC-cel konjugált fibrinogén kötését vizsgáltuk a GPIIb/IIIa szterikus aktivációja után. A szürkével kitöltött görbe az ál-transzfectált sejtek mérésével kapott háttérfluoreszcencia. Világosszürke vonal: vad típusú GPIIb/IIIa-t expresszáló BHK sejtek fluoreszcencia intenzitása; fekete vonal: L116V GPIIb/IIIa-t expresszáló BHK sejtek fluoreszcencia intenzitása.



Megbeszélés

Munkánk során két beteget vizsgáltunk születésük óta észlelhető vérzéses tüneteik miatt. Az első beteg a vizsgálatkor 6 éves volt, újszülött korában súlyos köldökvérzés és intramuszkuláris injekció nyomán kiterjedt haematoma alakult ki, később visszatérő epistaxis, bőr és nyálkahártyavérzések jelentkeztek. A második, 53 éves beteg ismétlődő epistaxis, fogíny és gastrointestinalis vérzés miatt állt többször kezelés alatt. 20 éves korában a jelentős fokú melena és hematemesis miatt végzett exploratív laparotomia tüneteinek háttérében organikus eltérést nem igazolt. Mindkét beteg véralvadási szűrőtesztjeinek eredményei és thrombocytaszáma referencia tartományon belül voltak, viszont mindkét esetben jelentősen megnyúlt vérzési és PFA-100 záródási időt mértünk. Thrombocyta aggregációt a fiziológiás agonisták egyik esetben sem váltottak ki, azonban a ristocetin mindkét beteg mintájában reverzibilis agglutinatit indukált. 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 tüneteinek háttérében 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 (16, 17, 20). Érdekes, hogy esetünkben az aktiválatlan thrombastheniás vérlemezkének eleve emelkedett vitronektin receptor számát a TRAP aktiváció jelentős mértékben tovább növelte, míg a kontroll thrombocytaikon a TRAP nem volt hatással a vitronektin receptor számára, de – ahogy várható volt – jelentősen növelte a felszíni fibrinogén receptor mennyiségét. Ennek a jelenségnek a háttérében az állhat, hogy GPIIb hiányában a feleslegben jelenlévő GPIIIa miatt sokkal több

vitronectin receptor képződik, így a thrombastheniás vérlemezkék α -granulumaiban nagyobb mennyiségű vitronectin receptor található az egészséges vérlemezkékhez képest, melyekben az α -granulumot jelentős mennyiségű fibrinogén receptor foglalja el. A thrombocyta felszíni vitronectin receptor, valamint a thrombocyta lizátum GPIIIa tartalmának kimutatásával kizártuk a GPIIIa érintettségének a lehetőségét, így a molekuláris genetikai eltérést az első beteg esetében a GPIIb génjében kerestük.

A második betegben az 5% körüli thrombocyta felszíni és az egyértelműen detektálható kis mennyiségű intracelluláris GPIIb/IIIa II- es típusú Glanzmann thrombastheniát igazolt. A thrombocyta 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 delécia két ismétlődő AGCTG szekvencia között alakult ki, melyek a primordiális intergénikus spacerek ismétlődő szekvenciái, s melyek az immunglobulin nehézlánc átrendeződéséért is felelősek. Elképzelhető, hogy a mutáció kialakulásában ez az ismétlődő szekvencia szerepet játszott (47,48).

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. A 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 thrombocyta 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 mutáció következtében

kialakult korai 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 (49, 50). Az alternatív splicing mellett a stop kodonok leggyakoribb hatása a nonszensz-mediálta mRNS degradáció (nonsense-mediated decay of mRNA, NMD), amelynek során a sejtek a trunkált, funkció nélküli fehérjéktől védve magukat a korai terminációs kodont hordozó mRNS-t eliminálják (51). A nonszensz-mediálta mRNS degradáció feltétele, hogy a stop kodon és a következő exon-exon határ között legalább 50-55 nukleotid távolság legyen, vagyis a stop kodonnak ennyivel kell az exon-exon határtól 5' irányban lennie (52). A thrombocyta mRNS-ből reverz transzkripció során átírt cDNS szekvenálásával a mi eseteinkben alternatív splicingot nem tudtunk kimutatni, mindkét beteg thrombocytájában kizárólag az exon-intron határok mentén történő splicing eredményeként átíródott GPIIb mRNS-t tudtunk detektálni. 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 mindkét stop kodon az mRNS nonszensz-mediálta degradációra hajlamos szakaszában található (52,53). Az első betegben detektált homozigóta STOP533 mutáció esetén kvantitatív mRNS vizsgálatot végeztünk, és a betegben a GPIIb mRNS mennyiségét jelentősen a 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. A második betegben azonban a GPIIb mRNS-ről átírt cDNS direkt szekvenálásával a STOP575 mutációt hordozó mRNS molekulát 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 thrombocytaiban. Néhány korábbi közlemény foglalkozott a GPIIb gén nonszensz mutációinak a GPIIb mRNS stabilitására gyakorolt hatásával. A 288delC mutáció, valamint az 5. exon-intron határtól 2 nukleotiddal a 3' irányban található citozin-adenin csere egyaránt olvasási keret eltolódáshoz és a polipeptid szintézis korai

terminációjához vezettek (54, 55). 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 (56,57). 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 (31, 58). Az mRNS nonszensz – mediálta lebontása mellett a betegek vérlemezkéiben a trunkált GPIIb molekulák teljes hiányát a GPIIb/IIIa komplex képződésének elmaradása is magyarázhatta. A trunkált GPIIb és a vad típusú GPIIIa komplexképzését a két integrin kapcsolódásának konformációs szerkezeti feltételeinek pontosabb megértése céljából 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 az 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. Az immunoprecipitációt GPIIIa ellenes antitesttel végezve csaknem ugyanannyi vad típusú GPIIb mennyiséget nyertünk, mint a GPIIb/IIIa poliklonális antitesttel végzett immunoprecipitáció után. Azonban a 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, ami a nonszensz-mediálta GPIIb mRNS lebomlás mellett magyarázattal szolgál a betegek vérlemezkéinek teljes mértékben hiányzó trunkált GPIIb tartalmára.

A GPIIb és a GPIIIa kapcsolódásának konformációs feltételeit ligand kötés közben és a ligandmentes „nyugvó” állapotban csak részlegesen, a GPIIb N-terminális 452 aminosava (β -propeller domén) és a GPIIIa N-terminális 440 aminosava (A, PSI és

hybrid domének) által alkotott komplex háromdimenziós kristályszerkezeti modelljéből ismerjük (59). A két glikoprotein extracelluláris doménjének kölcsönhatásáról szerzett ismereteink nagyobb része a vitronektin receptorral való nagyfokú homológiára és a nyugvó, ligandmentes, hajlott konformációjú vitronektin receptor extracelluláris doménjének ismert kristályszerkezetére támaszkodik (33). Az $\alpha_v\beta_3$ extracelluláris doménje a β -propeller (1-438. aminosav), a thigh (439-592. aminosav), a calf-1 (607-738. aminosav) és a calf-2 (739-956. aminosav) doménekből áll. Az α_v és β_3 közötti legnagyobb kiterjedésű kontaktus az α_v integrin β -propeller és a GPIIIa A doménjei között található. Az α_v integrin calf-1 és calf-2 doménjei kisebb felületű kapcsolatokat alakítanak ki a GPIIIa molekulával. A GPIIb/IIIa vitronektin receptor kristályszerkezetén alapuló homológia modellje hasonló kapcsolatokat tárt fel a GPIIb és a GPIIIa között (60). A GPIIb gén különböző lokalizációjú nonszensz mutációi következtében kialakult eltérő hosszúságú trunkált GPIIb molekulák változó mértékű komplexképződési képességet mutattak. A calf-2 doménben található STOP870 (61), STOP859 (62) és STOP960 (58) 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, és emiatt a komplexek az endoplazmatikus retikulumban retineálódtak. A STOP597 mutáció következtében a GPIIb vad típusú GPIIIa-hoz történő kapcsolódása jelentősen csökkent, de kimutatható mértékű volt (57). 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 nonszensz mutáció mindkét calf domén és a thigh domén egyik esetben hosszabb, másik esetben rövidebb részének elvesztését okozta. A thigh domén a β -propeller doménnel alkot szoros, Ca-függő, körülbelül $700 \text{ \AA}^2$ 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 a STOP575 mutáció azonos allélen helyezkedett el, amely allél a beteg vérlemezkéiben nem expresszáldott. Emiatt az L116V mutáció szerepe a betegség patogenezisében kizárható volt. A mutáció a β -propeller második lapátjának második hurkán helyezkedik el, és részét képezi a β -propeller ligand kötésért felelős cap szubdoménjének (59, 63). Az L116 melletti kísérletesen létrehozott E117A mutáció, valamint a 110-129. aminosav közötti peptidszakasz azonos hosszúságú szekvenciális cseréje a GPIIb/IIIa komplex ligandkötésének elvesztéséhez vezetett (63), ezért fontosnak tartottuk a mutáció hatását transzfektált BHK sejtekben megvizsgálni. Az L116V mutációt hordozó GPIIb cDNS-t és a vad típusú GPIIIa cDNS-t BHK sejtekben ko-expresszáltuk. 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 expresszáldott, intracelluláris transzportja zavartalan volt, és a glikoproteinek szintézise és lebontása is a vad típusú GPIIb/IIIa kinetikáját követte. Áramlási citométerben a PT-25 antitesttel történt aktiváció után vizsgáltuk az L116V mutáns GPIIb és vad típusú GPIIIa komplex affinitását a szolubilis fibrinogénhez. A molekulán belüli kritikus lokalizáció ellenére a hidrofób leucin szintén hidrofób valinra cserélődése nem befolyásolta a komplex fibrinogénköti képességét. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy az L116V mutáció nem kauzatív mutáció, amely akkor sem okozna Glanzmann thrombastheniát, amennyiben a vérlemezkékben expresszáldna.

A második beteg vérlemezkéinek mRNS analízise során kizárólag a H782N mutációt hordozó allélt tudtuk kimutatni. Az áramlási citometriás és a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok szerint a H782N mutáns GPIIb a beteg vérlemezkéin és a ko-transzfektált BHK sejtek felszínén egyaránt csökkent expressziót mutatott. A mutáns és

a vad típusú pro-GPIIb mennyisége hasonló volt, azonban a vad típusúhoz képest lényegesen kevesebb érett H782N mutáns GPIIb-t detektáltunk a ko-transzfectált 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 típusúhoz képest lényegesen lassabban megy végbe, azonban az érett mutáns GPIIb a vad típusú GPIIb lebomlásának kinetikáját követte. 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 (60, 64-72). Ezek közül három mutáció - V951M, Q747P és a 786. aminosavpozíció után inzertálódott 8 aminosav - szintén a calf-2 doménban helyezkedett el (72,67,60). A calf domének nyugvó receptoron a GPIIIa EGF-szerű doménjével alkotnak kis kiterjedésű kapcsolatot (33), melynek felbomlása nem befolyásolja a két integrin komplexképzését, viszont a GPIIb/IIIa intracelluláris transzportját akadályozhatja (60). A H782N mutáció hasonló hatással lehetett a GPIIb/IIIa transzportjára, mivel szintén a calf-2 doménban helyezkedik el és vizsgálataink szerint a mutáns GPIIb az ER-ben retineálódott. A beteg vérlemezkéi és a transzfectált BHK sejtek felszínén megfigyelt alacsony GPIIb/IIIa expressziót azonban az ER és Golgi közötti 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.

Összefoglalás

Doktori értekezésemben beszámolok két, születésük óta visszatérő vérzéses tüneteket mutató beteg laboratóriumi vizsgálatainak eredményeiről. Mindkét beteg véralvadási szűrőtesztjeinek eredményei és thrombocytaszáma a referencia tartományon belül voltak. Vérzési idejük és PFA-100 záródási idejük jelentősen megnyúlt volt, és thrombocytaik egyik fiziológiás agonista hatására sem aggregáltak. Ezek alapján mindkét betegben felállítottuk a Glanzmann thrombasthenia diagnózisát. Az első beteg esetében a hiányzó véralvadék retrakció és thrombocyta felszíni fibrinogén receptor (GPIIb/IIIa) alapján a betegséget az I-es típusba soroltuk. A második esetben a jelentősen csökkent, de mérhető véralvadék retrakció és thrombocyta felszíni fibrinogén receptor (2.556 receptor/thrombocyta) alapján II-es típusú Glanzmann thrombastheniát állapítottunk meg. Az első betegben a GPIIb génben a korábban nem ismert 1618delC homozigóta deléciót találtuk, amely olvasási keret eltolódást és az 533. aminosavnál korai terminációs kodont (STOP533) eredményezett. A második betegben három korábban még nem közölt heterozigóta mutációt találtunk. Az 1772insG mutáció olvasási keret eltolódást és az 575. aminosavnál korai stop kodont (STOP575) okozott. Ezzel a mutációval azonos allélen helyezkedett el a C339G (L116V) mutáció, míg a másik allélen a C2437A (H782N) mutációt detektáltuk. A mutációk hatását a vérlemezkékben és mutáns vagy vad típusú GPIIb és vad típusú GPIIIa cDNS-sel ko-transzfektált BHK (baby hamster kidney) sejtekben vizsgáltuk. A GPIIb thigh doménjében lévő STOP533 és STOP575 mutációk a thigh domén C-terminális részének és a calf modulnak az elvesztésével jártak. Mindkét mutáció a GPIIb mRNS felgyorsult lebomlását okozta a thrombocytákban. Az expresszált trunkált GPIIb egyik esetben sem volt képes a GPIIIa-val komplexet alkotni, ami azt bizonyítja, hogy a GPIIb/IIIa komplex kialakulásában a GPIIb β -propeller doménje mellett a thigh doménnek is jelentős szerepe van. Az L116V mutáció nem volt hatással a GPIIb/IIIa komplex szintézisére, lebontására, intracelluláris transzportjára, felszíni expressziójára és fibrinogénkötő képességére. A calf-2 doménben talált H782N mutáció akadályozta a GPIIb/IIIa komplex ER és Golgi közötti transzportját és így a GPIIb/IIIa csökkent felszíni expresszióját és intracelluláris retencióját okozta. Az eredmények azt igazolták, hogy a calf-2 doménnek szerepe van a GPIIb/IIIa intracelluláris transzportjában.

Summary

Two patients suffering from severe recurrent hemorrhagic symptoms since early childhood were investigated. The coagulation screening tests and platelet count were normal while bleeding time and PFA-100 closure times were highly prolonged in both cases. Platelet aggregation occurred in neither of the patients in response to any of the physiological agonists. The absence of clot retraction and the lack of fibrinogen receptor (GPIIb/IIIa) on the platelet surface indicated type I Glanzmann thrombasthenia in the first case. Clot retraction was partially retained and the platelets displayed strongly reduced but well detectable number (2556/platelet) of surface expressed fibrinogen receptor (GPIIb/IIIa) indicating type II disease in the second patient. In the GPIIb gene a novel homozygous deletion (1618delC) causing frameshift and premature termination of protein synthesis (STOP533) was identified in the first patient. In the second case three novel heterozygous GPIIb gene mutations were identified. The 1772insG mutation caused frameshift and premature termination of protein synthesis (STOP575). On the same allele the C339G (L116V) mutation was detected. C2437A (H782N) mutation was found on the other allele. The effects of the novel GPIIb mutations on the synthesis, complex formation, intracellular transport, surface expression and function of the GPIIb/IIIa complex were studied by expression experiments using BHK (baby hamster kidney) cells co-transfected with wild type or mutant GPIIb constructs and with wild type GPIIIa. As a consequence of the STOP533 and STOP575 nonsense mutations part of the thigh domain and the whole calf module were lost. Both mutations induced nonsense-mediated decay of GPIIb mRNA in platelets and when expressed in BHK cells the truncated GPIIb proteins were unable to form complex with GPIIIa. The results suggest that complex formation of GPIIb and GPIIIa does not only rely on the β -propeller domain but also requires the integrity of the thigh domain. Normal synthesis, maturation, intracellular transport, surface expression and fibrinogen binding ability indicated that L116V was not a causative mutation. The H782N mutation situated in the calf-2 domain interfered with the transport mechanism delivering pro-GPIIb/IIIa complex from the endoplasmic reticulum to the Golgi, hampered its maturation and surface expression suggesting that calf-2 domain plays an important role in the intracellular trafficking of the GPIIb/IIIa complex.

Irodalomjegyzék

1. Glanzmann E. Hereditäre Hemorrhagische Thrombasthenie: Ein Beitrag zur Pathologie der Blut Plattchen. J Kinderk 1918;88:113.
2. Hardisty RM, Dormandy KM, Hutton RA. Thrombasthenia: studies on three cases. Br J Haematol 1964;10:371.
3. Zucker MB, Pert JH, Hilgartner MW. Platelet function in a patient with thrombasthenia. Blood 1966;28:524-34.
4. Jackson DP, Morse EE, Zieve PD, Conley CL. Thromocytopathic purpura associated with defective clot retraction and absence of platelet fibronogen. Blood 1963;22:827.
5. Caen JP, Castaldi PA, Lecrec JC, Inceman S, Larrieu MJ, Probst M, Bernard J. Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. I. Glanzmann thrombasthenia. Am J Med 1966;41:4.
6. Nurden AT, Caen JP. An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann thrombasthenia. Br J Haematol 1974;28:253-260.
7. Phillips DR, Agin PP. Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia: Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. J Clin Invest 1977;60:535.
8. Inceman S, Caen J, Bernard J. Aggregation, adhesion, and viscous metamorphosis of platelets in congenital fibrinogen deficiencies. J Lab Clin Med 1966;68:21-32.
9. Weiss HJ, Rogers J. Fibrinogen and platelets in the primary arrest of bleeding. Studies in two patients with congenital afibrinogenemia. N Engl J Med 258:396-374, 1971.
10. Solum NO, Stormorken H. Influence of fibrinogen on the aggregation of washed human blood platelets induced by adenosine diphosphate, trombin, collagen and adrenaline. Scand J Clin Lab Invest 1965;17 (suppl.84):170.

11. Mustard JF, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL et al. Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood* 1978;52:453-466.
12. Bennet JS, Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen-receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 1979;64:1393-1401.
13. Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, et al. Comparison of fibrinogen association with normal and thrombasthenic platelets on exposure to ADP or chymotrypsine. *Blood* 1979;54:987-993.
14. Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem* 1979;254:5357-63.
15. Peerschke EI, Zucker MB, Grant RA, et al. Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood* 1980;55:841-7.
16. Zimrin AB, Eisman R, Vilaire G, et al. Structure of platelet glycoprotein IIIa. A common subunit for two different membrane receptors. *J Clin Invest* 1988;81:1470-75.
17. Collier BS, Cheresh DA, Asch E, et al. Platelet vitronectin receptor expression differentiates Iraqi-Jewish from Arab patients with Glanzmann thrombasthenia in Israel. *Blood* 1991;77:75-83.
18. Grimaldi CM, Chen F, Wu C, et al. Glycoprotein IIb Leu214Pro mutation produces Glanzmann thrombasthenia with both quantitative and qualitative abnormalities in GPIIb/IIIa. *Blood* 1998;91:1562-71.
19. Poujol C, Nurden AT, Nurden P. Ultrastructural analysis of the distribution of the vitronectin receptor (alpha v beta 3) in human platelets and megakaryocytes reveals an intracellular pool and labelling of the alpha-granule membrane. *Br J Haematol* 1997;96:823-35.
20. Rosenberg N, Dardik R, Rosenthal E, et al. Mutations in the alphaIIb and beta3 genes that cause Glanzmann thrombasthenia can be distinguished by a simple procedure using transformed B-lymphocytes. *Thromb Haemost* 1998;79:244-8.
21. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, et al. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-43.

22. Niiya K, Hodson E, Bader R, et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 1987;70:575-83,
23. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, et al. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996;88:907-14,
24. Gogstad GO, Hagen I, Korsmo R, et al. Characterization of the proteins of isolated human platelet alpha granules. Evidence for a separate alpha-granule pool of the glycoproteins IIb and IIIa. *Biochim Biophys Acta* 1981;670:150-162.
25. Woods VL Jr, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986;261:15242-51.
26. Wencel-Drake JD, Dahlbäck B, White JG, et al. Ultrastructural localization of coagulation factor V in human platelets. *Blood* 1986;68:244-9.
27. Wencel-Drake JD. Plasma membrane GPIIb/IIIa. Evidence for a cycling receptor pool. *Am J Pathol* 1990;136:61-70.
28. Fitzgerald LA, Poncz M, Steiner B, et al. Comparison of cDNA-derived protein sequences of the human fibronectin and vitronectin receptor alpha subunits and platelet glycoprotein IIb. *Biochemistry* 1987;26:8158-65.
29. Fitzgerald LA, Steiner B, Rall SC Jr, et al. Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem* 1987;262:3936-9.
30. Duperray A, Berthier R, Chagon E, et al. Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J Cell Biol* 1987;104:1665-73.
31. Duperray A, Troesh A, Berthier R, et al. Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood* 1989;74:1603-11.

32. Adair BD, Yeager M. Three dimensional model of the human $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrin based on electron cryomicroscopy and x-ray cristallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14059-64.
33. Xiong JP, Stechle T, Diefenbach B, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\text{v}\beta_3$. *Science* 2001;294:339-45.
34. Xiong JP, Stechle T, Zhang R, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002;296:151-5.
35. Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, et al. A structural mechanism of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ „inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 2002;110:587-97.
36. Vinogradova O, Vaynberg J, Kong X, et al. Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic tail durin integrin activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4094-9.
37. Li R, Mitra N, Gratkowski H, et al. Activation of intergin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ by modulation of transmembrane helix associations. *Science* 2003;300:795-8.
38. Takagi J, Petre BM, Walz T et al. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002;110:599-611.
39. Kim M, Carman CV, Springer TA, et al. Bidirectional transmebrane signaling by cytoplasmic separation in integrins. *Science* 2003;301:1720-5.
40. Vinogradova O, Haas T, Plow EF, et al. A structural basis of integrin activation by the cytoplasmic tail of αIIb subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1450-5.
41. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* 2004;2:169.
42. Kasirer-Friede A, Qin J, Plow EF, et al. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ and platelet aggregation. In.: *Thrombosis and haemostasis* ed.: Collier BS. p. 517-26.

43. Nurden AT, George JN. Inherited abnormalities of the platelet membrane: Glanzmann thrombasthenia, Bernard Soulier syndrome, and other disorders. In.: Thrombosis and haemostasis ed.: Collier BS. p. 987-1012.
44. Boda Z, Rák K. Athrombia essentialis: az elsődleges thrombocyta-aggregatio örökletes zavara. Orv Hetil 1983;124:435-7.
45. Muszbek L, Polgár J, Boda Z. Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. Thromb Haemost 1993;69:282-5.
46. Pfaffl MW. A new mathematical method for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29:2003-7.
47. Ohno S. (AGCTG) (AGCTG) (AGCTG) (AGCTG) as the primordial sequence of intergenic spacers: the role of immunoglobulin class switch. Differentiation 1981;18:65-74.
48. Ohno S. Evolution is condemned to rely upon variations of the same theme: the one ancestral sequence for genes and spacers. Perspect Biol Med 1982;25:599-607.
49. Iwamoto S, Nishiumi E, Kajii E, et al. An exon 28 mutation resulting in alternative splicing of the glycoprotein IIb transcript and Glanzmann's thrombasthenia. Blood 1994;83:1017-23.
50. Peretz H, Rosenberg N, Landau M, et al. Molecular diversity of Glanzmann thrombasthenia in southern India: new insights into mRNA splicing and structure-function correlations of alphaIIb beta3 integrin (ITGA2B, ITGB3). Hum Mutat 2006;27:359-69.
51. Kadowaki T, Kadowaki H, Taylor SI. A nonsense mutation causing decreased levels of insulin receptor mRNA: detection by a simplified technique for direct sequencing of genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:658-62.

52. Nagy, E. and Maquat, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 1998;23:198-199.
53. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, et al. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 2004;36:801-8.
54. Tao J, Arias-Salgado EG, González-Manchón C, et al: A novel (288delC) homozygous mutation in exon 2 of GPIIb associated with type I Glanzmann thrombasthenia. *Br J Haematol* 2000; 111:96-103.
55. González-Manchón C, Fernández-Pinel M, Arias-Salgado EG, et al. Molecular genetic analysis of a compound heterozygote for the glycoprotein (GP) IIb gene associated with Glanzmann's thrombasthenia: disruption of the 674-687 disulfide bridge in GPIIb prevents surface exposure of GPIIb-IIIa complexes. *Blood* 1999;93:866-75.
56. Kato A, Yamamoto K, Miyazaki S, Jung SM, Moroi M, Aoki N. Molecular basis for Glanzmann's thrombasthenia (GT) in a compound heterozygote with glycoprotein IIb gene: a proposal for the classification of GT based on the biosynthetic pathway of Glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1992;79:3212-8.
57. Arias-Salgado EG, Tao J, González-Manchón C, Butta N, Vicente V, Ayuso MS, et al. Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thrombasthenic phenotype. Failure of GPIIb(Δ 597-1008) to form stable complexes with GPIIIa. *Thromb Haemost* 2002;87:684-91.
58. Bennett JS, Kolodziej MA, Vilaire G, et al. Determinants of the intracellular fate of truncated forms of platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Biol Chem* 1993;268:3580-5.
59. XiaoT, Takagi J, Collier BS, et al. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004;432:59-67.
60. Rosenberg N, Yatuv R, Sobolev V, Peretz H, Zivelin A, Seligsohn U. Major mutations in calf-1 and calf-2 domains of glycoprotein IIb in patients with Glanzmann thrombasthenia enable GPIIb/IIIa complex formation, but impair its

- transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Blood* 2003;101:4808-15.
61. Vinciguerra C, Khelif A, Alemany M, Morle F, Grenier C, Uzan G, et al. A nonsense mutation in the GPIIb heavy chain (Ser870→stop) impairs platelet GPIIb-IIIa expression. *Br J Haematol* 1996;95:399-407.
 62. Frachet P, Duperray A, Delachanal E, Marguerie G. Role of the transmembrane and cytoplasmic domains in the assembly and surface exposure of the platelet integrin IIb-IIIa. *Biochemistry* 1992;31:2408-15.
 63. Kamata T, Tieu K, Irie A, et al. Amino acid residues in the α IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin α IIb β 3 are clustered in the β -propeller model. *J Biol Chem* 2001;276:44275-83.
 64. Wilcox DA, Wautier JL, Pidard D, Newman PJ. A Single amino acid substitution flanking the fourth calcium-binding domain of α IIb prevents maturation of the α IIb β 3 integrin complex. *J Biol Chem* 1994;269:4450-7.
 65. Poncz M, Rifat S, Collier BS, Newman PJ, Shattil SJ, Parrella T, et al. Glanzmann thrombasthenia secondary to a Gly273→Asp mutation adjacent to the first calcium-binding domain of platelet glycoprotein IIb. *J Clin Invest* 1994;93:172-9.
 66. Wilcox DA, Paddock CM, Lyman S, Gill JC, Newman PJ. Glanzmann thrombasthenia resulting from a single amino acid substitution between the second and third calcium-binding domains of GPIIb. Role of the GPIIb amino terminus in integrin subunit association. *J Clin Invest* 1995;95:1552-60.
 67. Tadokoro S, Tomiyama Y, Honda S, Arai M, Yamamoto M, Shiraga M, et al. A Gln747→Pro substitution in the α IIb subunit is responsible for a moderate α IIb β 3 deficiency in Glanzmann thrombasthenia. *Blood* 1998;92:2750-8.
 68. Milet-Marsal S, Breillat C, Peyruchaud O, Nurden P, Combrie R, Nurden AT, et al. Analysis of the amino acid requirement for a normal α IIb β 3 maturation at

- α IbGlu324 commonly mutated in Glanzmann thrombasthenia. *Thromb Haemost* 2002;88:655-62.
69. Mitchell WB, Li J, Singh F, Michelson AD, Bussel J, Collier BS, et al. Two novel mutations in the α Ib calcium-binding domains identify hydrophobic regions essential for α Ib β 3 biogenesis. *Blood* 2003;101:2268-76.
70. Nelson EJR, Li J, Mitchell WB, Chandy M, Srivastava A, Collier BS. Three novel β -propeller mutations causing Glanzmann thrombasthenia result in production of normally stable pro- α Ib, but impair progression of pro- α Ib β 3 from endoplasmic reticulum to Golgi. *J Thromb Haemost* 2005;3:2773-83.
71. Rosenberg N, Hauschner H, Peretz H, Mor-Cohen R, Landau M, Shenkman B, et al. A 13-bp deletion in the α Ib gene is a founder mutation that predominates in Palestinian-Arab patients with Glanzmann thrombasthenia. *J Thromb Haemost* 2005;3:2764-72.
72. Nurden AT, Breillat C, Jacquelin B, Freedman J, Blanchette VS, Schmugge M, et al. Triple heterozygosity in the integrin α Ib subunit in a patient with Glanzmann thrombasthenia. *J Thromb Haemost* 2004;2:813-9.

Tárgyszavak

haemorrhagiás diathesis, Glanzmann thrombasthenia, fibrinogén receptor, GPIIb/IIIa, genetikai vizsgálat, thigh domén, calf-2 domén

hemorrhagic diathesis, Glanzmann thrombasthenia, fibrinogen receptor, GPIIb/IIIa, genetic analysis, thigh domain, calf-2 domain

Az értekezéshez felhasznált közlemények jegyzéke

1. Losonczy G, Rosenberg N, Kiss C, Kappelmayer J, Vereb G, Kerenyi 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. Tsorbatzoglou A, Módos 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)

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti mindenekelőtt témavezetőmet, Dr.Muszbek László professzor urat, a témaválasztásban, a laboratóriumi kísérletes munka megtervezésében, az eredmények értékelésében nyújtott segítségével, és az ötleteiért, melyek nehéz időszakokon segítettek át. Életre szóló útravaló számomra a megalkuvást nem ismerő szakmai igényessége, a tudományos igazsághoz való feltétel nélküli ragaszkodása, a kutatómunka iránti lelkesedése és kollégáival szembeni közvetlensége.

Dr.Kappelmayer János tanár úrnak – aki a későbbi PhD témámhoz szervesen kapcsolódó TDK munkám során témavezetőm volt – sok metodikai ismeret mellett köszönöm a későbbi munkámat is végigkísérő folyamatos figyelmét és nélkülözhetetlen szakmai iránymutatásait.

A doktori disszertációban közölt eredményeink a II. sz. Belgyógyászati Klinikával és a Gyermekklinikával folytatott szoros klinikai kollaboráció keretében születtek. A ritka betegség felismerése és a betegek magas szakmai színvonalú ellátása Dr. Boda Zoltán professzor úr, Dr. Kiss Csongor professzor úr és munkatársaik érdeme. Segítőkészségük mellett a betegség tudományos mélységű megismerésének motivációja nagyban hozzájárult az eredményes laboratóriumi munkához és a sikeres kollaborációhoz. A disszertációban szereplő második beteg esetét és a beteg bizonyos laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatainak eredményeit Dr. Boda Zoltán professzor úr 1983-ban ismertette (44).

Együttműködésükért köszönet illeti a Glanzmann thrombastheniában szenvedő betegeket és családtagjaikat.

Dr.Vereb György tanár úr segítségével nélkül a sejtenyésztes, a konfokális lézer szkennning mikroszkópiai és a lézer szkennning citometriai vizsgálatok eredményei nem szerepelnének a disszertációban. Köszönöm a szemléletet, melyet a közös munka során megismerhettem, s melyet magam is követni igyekszem.

Köszönettel tartozom a laboratóriumi munkám kezdetén, az első szárnypróbálgatások nehéz időszakában segítséget és támogatást nyújtó Dr.Balogh István adjunktus úrnak és Dr.Póka Róbert tanár úrnak.

Köszönet illeti Nurit Rosenberget, akiben a Glanzmann thrombasthenia szerény és nagytudású kutatóját ismerhettem meg, és akinél egy nagyon jó hangulatú és eredményes hónapot tölthettem tel-hashomeri laboratóriumában.

A munkámhoz nyújtott nélkülözhetetlen és önzetlen segítségét, támogatását köszönöm Dr.Szántó Attilának, Haramura Gizellának, Bratu Henriettának, Péntes Krisztinának, Veszprémi Anikónak, Bézi Andreának, Dzsudzsák Erikának, Bhattoa-Buzás Edinának, Kópis Ildikónak és Antal Csabának.

Függelék

A doktori értekezéshez felhasznált közlemények különlenyomatai