

Új Antithrombin mutációk karakterizálása, fehérjebiokémiai vizsgálata

Gindele R¹, Udvari Á¹, Speker M¹, Oláh Z², Selmeczi A², Schlammadinger Á², Losonczy H³, Bárdos H⁴, Fekete A¹, Komáromi I⁵, Shemirani AH¹, Haramura G¹, Boda Z², Muszbek L^{1,5}, Bereczky Z¹

¹Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék, ²Thrombosis és Haemostasis Központ, ³Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ I. Belgyógyászati Klinika, ⁴Megelőző Orvostani Intézet, ⁵MTA, Vaszkuláris, Trombózis és Hemosztázis Kutatócsoport

Az Antitrombin (AT) a szerpinek családjába tartozó progresszív inhibitor, a véralvadási rendszer egyik fő szabályozója. Az AT deficiencia súlyos kockázati tényező a vénás tromboembóliák tekintetében. Az AT hiány mennyiségi és minőségi zavart jelenthet, mely a heparin-kötés zavarával járó eltérések kivételével homozigóta formában az étellel összeegyeztethetetlen. A deficienciák hátterében álló mutációk heterogének, ma már több mint 230 okozati mutációt ismerünk.

A Debreceni Egyetem Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszékén 2007-2015. áprilisa között 150 beteg (n=92 proband) esetében igazoltuk az AT deficienciát okozó genetikai eltéréseket. Összesen 16 féle mutációt azonosítottunk, melyek közül 6-ról még nem számoltak be az irodalomban.

Munkánk célja négy új, AT deficienciát eredményező mutáció (p.Asn450Ile, p.Gly456delins-Ala_Thr, p.Pro461Thr, p.Leu270ArgfsX13) biokémiai következményeinek felderítése, genotípus-fenotípus összefüggések megállapítása volt.

In vitro kísérletekben vizsgáltuk a HEK293 sejtekben expresszált vad típusú és mutáns AT fehérjék tulajdonságait. A sejtek médiumából és lizátumából ELISA és Western blotting módszerrel azonosítottuk a termeltetett fehérjék mennyiségét. Pulse-chase analízist végeztünk a fehérjék degradációjának vizsgálatára, valamint meghatároztuk az átíródó mRNS mennyiségét qPCR technikával. A vad típusú és mutáns AT fehérjék sejten belüli elhelyezkedését immunfluoreszcens festéssel, konfokális lézer szkennning mikroszkópiával detektáltuk. A fehérjék szerkezetében történő változásokat molekula modellezéssel vizsgáltuk.

Az Ile450 mutáns esetében csekély mennyiségű fehérje termelődését tapasztaltuk, mely szekrécióna került a sejtek médiumába. Az Ala-Thr456 variáns a vad típushoz képest kisebb mennyiségben termelődik, de szekrécióna csekély mértékben kerül. A pulse-chase kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a mutáns fehérje gyorsabban lebomlik. Az intracelluláris lokalizáció vonatkozásában nem tapasztaltunk jelentős eltérést a vad típushoz képest. Az ArgfsX13_270 mutáns génről csökkent mRNS szintézis történik, fehérjeszintézist nem detektáltunk. A Thr461 variáns a vad típushoz hasonló mennyiségben termelődik és szintetizálódik.

Az Ile450 és Ala-Thr456 mutánsokra csökkent fehérjeszintézis és gyors fehérje lebomlás, míg az ArgfsX13_270 mutánsra csökkent mRNS szintézis jellemző. A Thr461 variáns esetében funkcióbeli zavar állhat fenn.