

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Maja Ž. Gvozdenov

Funkcionalna analiza genskih varijanti
FIIc.1787G>A (protrombin Beograd) i
FIIc.*64_*66del i njihova povezanost sa
trombofilijom

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Maja Z. Gvozdenov

Functional analysis of FIIc.1787G>A
(prothrombin Belgrade) and FIIc.*64_ *66del
gene variants and their association with
thrombophilia

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTORI:

dr **Valentina Đorđević**, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo

KOMISIJA:

dr **Valentina Đorđević**, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo

dr **Duška Savić Pavićević**, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Zahvaljujem se svim kolegama na dragocenim savetima i nesebičnoj pomoći tokom izrade ove disertacije. Posebno se zahvaljujem svojim mentorima i članovima komisije:

Dr Valentini Đorđević, hvala na beskrajnom strpljenju, volji i upornosti da se zajedno sa mnom izbori sa svim izazovima. Vanja, hvala ti na entuzijazmu koji mi ulivaš svakim danom i na kreativnosti koja je doprinela da moje shvatanje nauke dobije novu dimenziju. Najviše od svega, hvala na svim prijateljskim razgovorima i podršci tokom ovih godina.

Dr Dragici Radojković, kao rukovodiocu Laboratorije za molekularnu biologiju, želim da se zahvalim na savetima i smernicama tokom eksperimentalnog rada, na pomoći i idejama tokom pisanja i kritičkoj analizi ove teze.

Dr Dušanki Savić-Pavićević, na kritičkoj oceni ove teze i savetima koji su doprineli njenom uobličavanju i poboljšanju.

Svim kolegama laboratorije 03 bih želela da se zahvalim na saradnji i veseloj atmosferi, a posebno:

Ivi i Branku, mojim TIM-ovcima, od kojih sam imala privilegiju da naučim mnogo toga, hvala na zajedničkom radu, razumevanju i podršci. Vaša pozitivna energija svakodnevno čini našu laboratoriju prijatnim okruženjem za rad. Hvala vam na tzv. „petak popodne“ razgovorima, šalama i smeđu uz velike količine čokolade.

Mari, Mariji i Sofiji, podmlatku trombotičke grupe, koje su svojim dolaskom unele vedrinu. Vaš perfekcionizam, upornost, strpljenje i nada da smo na putu ka Nobelovoj nagradi me oduševljavaju svakim danom.

Jovani, nezvaničnom članu našeg tima, uz koju sedenje sa suprotne strane bench-a ima svoje posebne čari. Njen veseli duh i specifičan smisao za humor unose živost u svaki radni rad.

Sandri i Miri, sa kojima sam delila sudbinu doktoranda, hvala na svim razgovorima u kojima smo se međusobno ohrabrivale i podržavale.

Alekici, čiji su me harizma i osmeh očarali od trenutka kada smo se uselile u prostoriju 13. Hvala ti na iskrenosti, prijateljstvu i našim razgovorima o najrazličitijim životnim temama.

Saški, mojoj nesuđenoj mentorki, na podršci i savetima tokom izrade ove teze.

Sneži, na korisnim sugestijama tokom eksperimentalnog rada.

Srdanu i Nemanji, koji su svojim dolaskom doprineli polnom balansu u našoj laboratoriji. Njihovo prisustvo unosi opuštenost i stalni izvor dobrog raspoloženja.

Posebno bih želela da se zahvalim mojoj devetarskoj ekipi, na svim zajedničkim trenucima, prijateljstvu i ljubavi koji traju više od jedne decenije. Sikiju i Jasni, čija podrška mi je značila tokom svih uspona i padova.

Sonji, Jeleni i Mariji, na svim divnim trenucima i neprospavanim noćima još iz naših studentskih dana.

Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima i mom Đoletu na bezuslovnoj podršci, razumevanju i ljubavi. Hvala vam što me činite srećnom, što ste moj oslonac i što mi dajete slobodu i podstrek da ostvarim sve svoje snove.

Ovu tezu posvećujem mojim roditeljima

Funkcionalna analiza genskih varijanti FIIc.1787G>A (protrombin Beograd) i FIIc.*64_*66del i njihova povezanost sa trombofilijom

REZIME

Protrombin predstavlja zimogen trombina (koagulacionog faktora II), koji ima centralnu ulogu u održanju hemostazne ravnoteže. Zahvaljujući alosteričnoj regulaciji, trombin može da vrši i prokoagulantnu i antikoagulantnu funkciju. Region 3' kraja gena za protrombin ima nekanonsku organizaciju i podložan je nastanku genskih varijanti koje mogu imati značajnu ulogu u regulaciji ekspresije i funkcije protrombina. Do sada opisane varijante u ovom regionu su povezivane sa povišenom ekspresijom protrombina koja može dovesti do hiperkoagulacije i povećane sklonosti ka trombozama, odnosno trombofiliji.

U Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u 3' kraju gena za protrombin opisane su FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijante čiji mehanizmi do sada nisu rasvetljeni. Varijanta FIIc.1787G>A (protrombin Beograd) se nalazi u poslednjem egzonu gena za protrombin i dovodi do aminokiselinske zamene Arg596Gln u proteinu. Ova varijanta se nalazi u regionu za koji se vezuju joni natrijuma, neophodni za prokoagulantnu aktivnost trombina, kao i prirodni trombinski inhibitor- antitrombin. Varijanta FIIc.*64_*66del se nalazi u 3' netranslatirajućem regionu gena i predstavlja deleciju 3 nukleotida. Imajući u vidu pozicije u različitim strukturnim elementima 3' kraja gena, pretpostavlja se da su mehanizmi delovanja ovih varijanti različiti.

Prvi deo studije je imao za cilj određivanje učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti kod 353 pacijenta sa različitim trombotičkim poremećajima i 250 zdravih ispitanika u srpskoj populaciji. Pacijenti su u zavisnosti od tipa trombotičkog poremećaja podeljeni u 4 grupe: tromboze dubokih vena (94 pacijenta), izolovani plućni embolizam (104 pacijenta), kombinovani trombotički poremećaji (49 pacijenata) i spontani pobačaji (106 pacijentkinja).

Drugi deo studije je obuhvatio *ex vivo* analize, s ciljem da se ispita uticaj navedenih varijanti na funkcionalnost i raspoloživu količinu protrombina u plazmi ispitanika.

U trećem delu studije ispitivan je uticaj FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti na ekspresiju gena za protrombin na nivou iRNK i proteina u *in vitro* uslovima.

Učestalost FIIc.1787G>A varijante u ukupnoj grupi pacijenata sa različitim trombotičkim poremećajima iznosila je 0,57%, dok u zdravoj populaciji ova varijanta nije detektovana. Varijanta FIIc.1787G>A je detektovana u heterozigotnoj formi kod dva pacijenta sa kombinovanim trombotičkim poremećajima. *Ex vivo* analize u uzorcima plazme ispitanika su pokazale da FIIc.1787G>A dovodi do statistički značajno smanjene prokoagulantne aktivnosti protrombina kod nosilaca ($49\% \pm 4,1$) u odnosu na nenosioce ($96\% \pm 2,2$), ali da ne utiče na nivo protrombina u plazmi. Endogeni trombinski potencijal je kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante 2,2 puta veći u odnosu na nenosioce (3645 nM/min vs. 1653 nM/min). Takođe je pokazano da FIIc.1787G>A varijanta dovodi do rezistencije na antitrombin i trombomodulin u plazmi nosilaca. *In vitro* analize su utvrdile da FIIc.1787G>A ne utiče na promenu ekspresije gena za protrombin ni na nivou iRNK ni na nivou proteina.

U ukupnoj grupi pacijenata FIIc.*64_*66del varijanta je bila prisutna kod 1,13% ispitanika, dok nijedan ispitanik u zdravoj populaciji nije bio nosilac. Varijanta FIIc.*64_*66del je detektovana u heterozigotnoj formi kod jednog pacijenta sa izolovanim plućnim embolizmom i tri pacijentkinje sa spontanim pobačajima. Na osnovu *ex vivo* analiza, FIIc.*64_*66del varijanta ne utiče na promenu aktivnosti i nivoa protrombina u plazmi nosilaca, a dovodi do blago povišenog nivoa endogenog potencijala trombina. Rezultati *in vitro* analiza su pokazali da FIIc.*64_*66del varijanta dovodi do statistički značajno niže ekspresije gena za protrombin na nivou iRNK i proteina. Efekat FIIc.*64_*66del varijante je modifikovan nizvodnim regulatornim elementom (DSE) u smeru izraženijeg smanjenja ekspresije. Takođe, pokazano je da u regionu FIIc.*64_*66del postoji mesto vezivanja male RNK, koja se vezuje nezavisno od ispitivane varijante. Deo sekvence u okviru koje je eksperimentalno potvrđeno mesto vezivanja, preklapa se sa mestom vezivanja hsa-mir-2052 dobijenog *in silico* predikcijom.

Rezultati ove studije pokazuju da varijanta FIIc.1787G>A predstavlja novi trombofilni marker koji treba uvrstiti u panel testova za trombofiliju kod pacijenata sa izrazitim trombotičkim fenotipom koji imaju smanjenu prokoagulantnu aktivnost

protrombina. Sa druge strane, na osnovu dobijenih rezultata, FIIc.*64_*66del varijanta ne predstavlja trombofilni marker.

KLJUČNE REČI: FIIc.1787G>A, protrombin Beograd, FIIc.*64_*66del, protrombin, 3' kraj gena, antitrombin rezistencija, regulacija genske ekspresije, thrombofilija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: [575.224.2: 612.115]: 616.151.5 (043.3)

Functional analysis of FIIc.1787G>A (prothrombin Belgrade) and FIIc.*64_*66del gene variants and their association with thrombophilia

ABSTRACT

Prothrombin is a zymogen of thrombin (coagulation factor II), which plays a central role in maintaining hemostatic balance. Due to the allosteric regulation, thrombin has dual function: procoagulant and anticoagulant. The 3' end of prothrombin gene has noncanonical organization, which is susceptible to the genetic variants that might have a significant role in the regulation of prothrombin expression and function. Variants reported within this region lead to increased prothrombin expression which is associated with hypercoagulability and increased tendency to thrombophilia.

In the Laboratory for Molecular Biology at the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, we have reported FIIc.1787G>A and FIIc.*64_*66del variants in 3' end of prothrombin gene, but their mechanisms of action have not been elucidated so far. The FIIc.1787G>A (prothrombin Belgrade) is located in the last exon of the prothrombin gene, leading to amino acid substitution Arg596Gln in the protein. This variant is positioned in a region of antithrombin (thrombin inhibitor) binding site, as well as in Na⁺ binding loop, which is significant for procoagulant activity of thrombin. The FIIc.*64_*66del is located in the 3' untranslated gene region and represents a deletion of three nucleotides. Taking into account the position of these two variants in different structural elements of 3' end of prothrombin gene, it is assumed that they differ in the mechanisms of action.

In the first part of the study, we determined the frequency of FIIc.1787G>A and FIIc.*64_*66del variants in 353 patients with thrombotic disorders and 250 healthy subjects in Serbian population. Patients were divided into 4 groups according to the type of thrombotic disorders: deep vein thrombosis (94 patients), isolated pulmonary embolism (104 patients), combined thrombotic disorders (49 patients) and fetal loss (106 patients).

The second part of the study included the *ex vivo* analyses, with aim to investigate the impact of these variants on the functionality and available amount of prothrombin in the subjects plasma samples.

In the third part of the study, the impact of FIIc.1787G>A and FIIc.*64_*66del variants on gene expression was assessed *in vitro* by determining the prothrombin mRNA and protein level.

The frequency of FIIc.1787G>A variant in total group of patients was 0.57%, whereas in healthy population this variant was not detected. Among patients, two FIIc.1787G>A heterozygous carriers were detected in combined thrombotic disorders group. *Ex vivo* analyses of subjects plasma samples showed that the presence of FIIc.1787G>A variant results in significantly reduced prothrombin activity in carriers (49±4.1%) compared to non-carriers (96%±2.2), without effect on prothrombin plasma level. Endogenous thrombin potential was 2.2 times higher in FIIc.1787G>A carriers compared to those with wild-type genotype (3645 nM/min vs. 1653 nM/min, respectfully). In carriers' plasma samples it was shown that FIIc.1787G>A variant leads to impaired inhibition of mutant thrombin by antithrombin (antithrombin resistance) and altered interaction with thrombomodulin (thrombomodulin resistance). *In vitro* analyses have revealed that FIIc.1787G>A does not affect the prothrombin gene expression on mRNA and protein levels.

In the total group of patients, FIIc.*64_*66del was present in 1.13%, while this variant was not observed among healthy subjects. The FIIc.*64_*66del variant was detected in the heterozygous form in one patient with isolated pulmonary embolism and three patients with fetal loss. Based on *ex vivo* analyses in carriers plasma samples, the FIIc.*64_*66del variant does not change the prothrombin activity and protein level and leads to slightly increased endogenous thrombin potential. Results of *in vitro* assays shown that FIIc.*64_*66del variant leads to significantly decreased gene expression by affecting the prothrombin mRNA and protein levels. This effect of FIIc.*64_*66del variant was modulated by regulatory downstream sequence element (DSE). By modified Footprinting Primer-PCR assay we detected the binding of small RNA within the region of FIIc.*64_*66del variant, which overlaps with the hsa-mir-2052 binding site obtained by *in silico* prediction.

The results of our study indicate that FIIc.1787G>A variant represents a new thrombophilic marker which should be included in the thrombophilia testing panel for patients with severe thrombotic phenotype and decreased prothrombin activity. On the

other hand, our results indicate that FIIc.*64_*66del variant does not represent thrombophilic marker.

KEYWORDS: FIIc.1787G>A, prothrombin Belgrade, FIIc.*64_*66del, prothrombin, 3'end of gene, antithrombin resistance, gene expression regulation, thrombophilia

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: [575.224.2: 612.115]: 616.151.5 (043.3)

SKRAĆENICE

A1AT	alfa-1-antitripsin
BSA	albumin iz seruma govečeta, engl. <i>bovine serum albumin</i>
cDNK	komplementarni lanac molekula DNK, engl. <i>complementary DNA</i>
CF	faktor kidanja (isecanja), engl. <i>cleavage factor</i>
CPSF	faktor specifičan za kidanje (isecanje) i poliadenilaciju, engl. <i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
CstF	faktor koji stimulira kidanje (isecanje), engl. <i>cleavage stimulation factor</i>
DEPC	dietilpirokarbonat
DMSO	dimetilsulfoksid
DSE	nizvodni regulatorni element, engl. <i>downstream sequence element</i>
Gla	gama karboksiglutamil, engl. <i>gamma-carboxyglutamyl</i>
GPIba	glikoprotein Iba
EGF	epidermalni faktor rasta, engl. <i>epidermal growth factor</i>
eIF4G	eukariotski inicijacioni faktor 4G, engl. <i>eucaryotic initiation factor 4G</i>
ETP	endogeni potencijal trombina engl. <i>endogenous thrombin potential</i>
FBS	serum fetusa govečeta, engl. <i>fetal bovine serum</i>
Fp	fibrinopeptid
FP-PCR	reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom sa graničnikom nastalim otiskom trans-faktora, engl. <i>Footprinting Primer-PCR</i>
3'FR	3'nekodirajući region, engl. <i>3'flanking region</i>
HNF	jedarni faktor hepatocita, engl. <i>hepatocyte nuclear factor</i>
hnRNPI/PTB	protein koji se vezuje za heterogene nuklearne ribonukleoproteinske partikule/protein koji se vezuje za polipirimidinski trakt, engl. <i>heterogenous nuclear ribonuclearprotein I/polypyrimidine tract-binding protein 1</i>
HRP	peroksidaza rena, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
iRNK	informaciona RNK
miRNK	mikro RNK
PAR	proteazom aktivirani receptor

PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena-1, engl. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PABP	poli(A)-vezujući protein, engl. <i>poly-A binding protein</i>
PAP	poli-A-polimeraza
PCR	reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom, engl. <i>polymerase Chain Reaction</i>
PSM	graničnikom posredovana mutageneza u reakciji lančanog umnožavanja DNK polimerazom, engl. <i>PCR mediated site-directed mutagenesis</i>
RFLP	polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata, engl. <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
PE	plućni embolizam
RBP	RNK-vezivni proteini, engl. <i>RNA binding proteins</i>
RRAT	relativna rezidualna aktivnost trombina
rTM	rekombinantni trombomodulin
SD	standardna devijacija
SDS-PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu sa natrijum dodecil sulfatom, engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SP	spontani pobačaj
TAFI	trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize, engl. <i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>
TDV	tromboza dubokih vena
TF	tkivni faktor
t-PA	aktivator plazminogena tkivnog tipa, engl. <i>tissue-type plasminogen activator</i>
u-PA	aktivator plazminogena urokinaznog tipa, engl. <i>urokinase-type plasminogen activator</i>
USE	uzvodni regulatorni element, engl. <i>upstream sequence element</i>
UTR	netranslatirajući region, engl. <i>untranslated region</i>
vWF	von Willebrand faktor
WGS	sekvenciranje celokupnog genoma, engl. <i>whole genome sequencing</i>
Wt	neizmenjeni „divlji“ tip, engl. <i>wild-type</i>

SADRŽAJ

Uvod	1
1.1 Protrombin.....	2
1.1.1 Gen za protrombin.....	2
1.1.2 Struktura i funkcija protrombina	3
1.1.3 Uloga protrombina u hemostazi	8
1.1.4 Uloga protrombina u patogenezi trombofilije.....	14
1.2 Uloga 3' kraja protrombinskog gena u regulaciji genske ekspresije i funkcije protrombina	15
1.2.1 Struktura 3' kraja gena eukariota.....	16
1.2.2 Uloga 3' kraja u regulaciji ekspresije gena.....	18
1.2.3 Struktura 3' kraja gena za protrombin	21
1.2.4 Genske varijante u 3' kraju gena za protrombin i njihova uloga u patogenezi trombofilije.....	23
Cilj	27
Materijal i metode.....	29
3.1 Ispitanici	30
3.2 Materijal	31
3.2.1 Ćelijske linije.....	31
3.2.2 Bakterijski sojevi.....	31
3.2.3 Plazmidni vektori	31
3.2.4 Antitela	32
3.2.5 Oligonukleotidi.....	33
3.3 Metode.....	34
3.3.1 Metode za detekciju FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti.....	34
Izolacija DNK iz periferne krvi	34
Izolacija DNK iz ćelija bukalne sluzokože.....	34
PCR-RFLP metoda	35
Analiza DNK na agaroznom gelu	37
Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu	37
Vizuelizacija DNK u poliakrilamidnim gelovima srebro-nitratom	37

Sekvenciranje DNK	38
Statistička obrada podataka.....	40
3.3.2 Metode za <i>ex vivo</i> analizu genskih varijanti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del .	40
Test aktivnosti protrombina u humanoj plazmi	40
Kvantifikacija količine protrombina u humanoj plazmi	41
Test generacije trombina.....	42
Test rezistencije na antitrombin	44
Test rezistencije na trombomodulin.....	45
3.3.3 Metode za <i>in vitro</i> analizu genskih varijanti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del..	45
Kultivacija bakterija.....	46
<i>In situ</i> PCR dirigovana mutageneza.....	46
Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju	47
Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija.....	48
Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali	48
Detekcija plazmida koji nosi željenu varijantu	48
Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi.....	49
Kultivacija permanentnih ćelijskih linija	50
Izolacija proteina nukleusnog i citoplazmatskog ekstrakta HepG2 ćelijske linije ..	50
Merenje koncentracije proteina.....	51
Izolacija celokupne RNK iz HepG2 ćelijske linije	51
Transfekcija Cos-7 ćelijske linije plazmidnom DNK.....	52
Izolacija celokupne RNK iz transfekovanih ćelija u kulturi	53
Prečišćavanje RNK	53
Sinteza cDNK	54
Kvantifikacija iRNK metodom PCR-a u realnom vremenu	54
Koncentrovanje proteina iz medijuma transfekovanih ćelija.....	55
Kvantifikacija količine protrombina u medijumu transfekovanih ćelija	56
<i>In silico</i> analize FIIc.*64_*66del varijante.....	57
Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na protein/DNK interakcije.....	58
Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na vezivanje miRNK.....	60
Rezultati.....	64
4.1 Određivanje učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti.....	65

4.1.1	Porodične studije	70
4.2	<i>Ex vivo</i> analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti	73
4.2.1	Određivanje aktivnosti protrombina u plazmi ispitanika	73
4.2.2	Određivanje količine protrombina u plazmi ispitanika	74
4.2.3	Određivanje endogenog potencijala trombina u plazmi ispitanika	76
4.2.4	Određivanje rezistencije na antitrombin u plazmi ispitanika	79
4.2.5	Određivanje rezistencije na trombomodulin u plazmi ispitanika	80
4.3	<i>In vitro</i> analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti	81
4.3.1	Ekspresioni konstrukti	81
4.3.2	Određivanje uticaja na ekspresiju gena za protrombin na nivou iRNK	82
4.3.3	Određivanje uticaja na ekspresiju gena za protrombin na nivou proteina	84
4.3.4	<i>In silico</i> analize FIIc.*64_*66del varijante	86
4.3.5	Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na protein/DNK interakcije	90
4.3.6	Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na miRNK/iRNK interakcije	90
	Diskusija	94
5.1	Učestalost FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genskih varijanti	95
5.1.1	Učestalost FIIc.1787G>A varijante	96
5.1.2	Učestalost FIIc.*64_*66del varijante	99
5.2	<i>Ex vivo</i> analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti	100
5.2.1	<i>Ex vivo</i> analize FIIc.1787G>A varijante	100
5.2.2	<i>Ex vivo</i> analize FIIc.*64_*66del varijante	106
5.3	<i>In vitro</i> analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti	108
5.3.1	<i>In vitro</i> analize FIIc.1787G>A varijante	108
5.3.2	<i>In vitro</i> analize FIIc.*64_*66del varijante	110
5.4	Smernice za dalje funkcionalne analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti	114
	Zaključci	120
	Literatura	123
	Prilozi	140

Uvod

1.1 Protrombin

1.1.1 Gen za protrombin

Prvi podaci o poziciji gena koji kodira protrombin čoveka, dobijeni primenom *in situ* hibridizacije, ukazali su da se ovaj gen nalazi na 11. hromozomu, u regionu p11-q12 u blizini centromere [2], a kasnijim analizama dobijena je njegova precizna pozicija na kratkom kraku (p11.2). Degen i saradnici su 1987. godine odredili kompletnu sekvencu gena za protrombin čija dužina iznosi približno 20,3 kb i sadrži 14 egzona (dužine 25-315 bp) i 13 introna (dužine 84-9447 bp) [3]. Gen za protrombin sadrži visok procenat repetitivnih sekvenci. Najveći broj je lokalizovan u pretposlednjem intronu u kome se nalazi 20 kopija Alu sekvence raspoređenih u klasteru od 5 tandemskih ponovaka i dve kopije Kpn sekvence dužine 170 i 326 bp [4]. Informaciona RNK (iRNK) koja se sintetiše sa ovog gena ima dužinu od 2130 nukleotida, bez poliadeninskog (poli(A)) repa [2]. Ona kodira prepro vodeću sekvencu od 43 aminokiseline, karakterističnu za vitamin-K zavisne koagulacione faktore, i zreli polipeptidni lanac od 579 aminokiselina [4]. Gen za protrombin se predominantno eksprimira u jetri, a u znatno manjoj meri u mozgu, dijafragmi, bubrezima, placenti i tkivu nadbubrežne žlezde [5]. Poslednjih godina, studije su pokazale da je protrombin prisutan u različitim tipovima tumora, poreklom od tkiva u kojima se pri fiziološkim uslovima protrombin ne eksprimira [6,7].

Karakteristika svih vitamin K zavisnih koagulacionih faktora, uključujući i protrombin, je odsutvo konsenzusne TATA i CCAAT sekvence u okviru promotora [8]. Gen za protrombin poseduje dva mesta za inicijaciju transkripcije, koja se nalaze na poziciji -36 i -20 bp uzvodno od mesta početka translacije [4]. Ispitivanja na HepG2 ćelijskoj liniji su pokazala da se u promotoru gena za protrombin nalaze dva regulatorna elementa sa različitim uticajem na njegovu ekspresiju [9]. Pozitivni regulatorni element, koji se nalazi u regionu 400 bp uzvodno od mesta inicijacije transkripcije održava bazalnu aktivnost promotora. S druge strane, tkivno-specifična ekspresija gena za protrombin u jetri postiže se pomoću pojačavača (engl. *enhancer*) koji se nalazi približno 1kb uzvodnije, na poziciji između -940 i 860 bp [4,8]. *In vitro* studije urađene na HepG2 i HuH7 ćelijskim linijama hepatoblastoma su pokazale da uklanjanje ovog regiona značajno utiče na smanjenje transkripcione aktivnosti i ekspresiju protrombina [8]. Ovaj regulatorni region predstavlja mesto vezivanja transkripcionih faktora koji se

nazivaju nukleusni faktori hepatocita (engl. *hepatocyte nuclear factor*, HNF) i koji su odgovorni za tkivno-specifičnu ekspresiju protrombina u jetri. Na poziciji -922 do -897 u okviru pojačavača nalazi se konzervisana sekvenca koja predstavlja mesto vezivanja HNF4- α . U regionu od -895 do -871 nukleotida, vezuju se HNF1- α i HNF3- β i jedan za sada neidentifikovani transkripcioni faktor [8]. Za treći region, na poziciji od -860 do -847 nukleotida, vezuju se Sp1 i Sp3 (engl. *specificity protein*) [8] koji pripadaju familiji transkripcionih faktora koji sadrže cinkane „prste“ [10].

Prisustvo mutacija u pojačavaču onemogućava vezivanje transkripcionih faktora za ciljnu sekvencu, što negativno utiče na aktivaciju transkripcije gena. Mutacije u promotoru gena za protrombin kod pacijenata do sada nisu opisane. Međutim, ukidanje vezivnog mesta za neki od navedenih transkripcionih faktora u promotoru gena za koagulacione faktore (F) VII, IX i XI uzrokuje deficijenciju ovih faktora i manifestuje se krvarenjem [11-14].

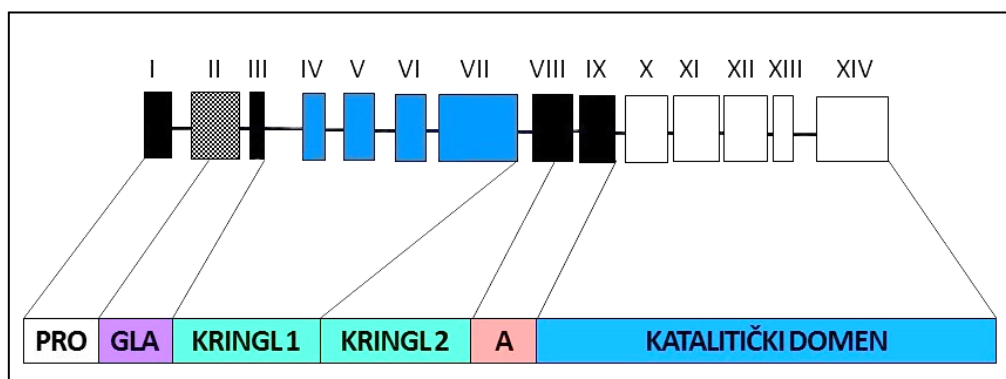
Pored opisanog 5' kraja, značajnu regulatornu ulogu ima i 3' kraj gena za protrombin koji se odlikuje specifičnom nekanonskom organizacijom. Organizacija strukturnih elemenata i uticaj genskih varijanti u ovom regionu na ekspresiju protrombina detaljno su opisani u poglavljima 1.2.4 i 1.2.5.

1.1.2 Struktura i funkcija protrombina

Protrombin (koagulacioni faktor II-FII) čoveka je glikoprotein molekulske mase oko 72 kDa koji pripada grupi vitamin K zavisnih enzima. Predstavlja prekursor trombina, serin proteaze koja je jedan od centralnih regulatora hemostazne ravnoteže. Protrombin se sintetiše u jetri, a potom sekretuje u krvotok, gde cirkuliše u formi neaktivnog zimogena do trenutka aktivacije. Polipeptidni lanac protrombina sadrži 579 aminokiselina, strukturno raspoređenih u nekoliko domena: N-terminalnog Gla (engl. *gamma-carboxyglutamyl*) domena koji sadrži oko 40 aminokiselina, dva Kringl domena sa prosečno 80 aminokiselina i lakog i teškog lanca na C-kraju koji čine α -trombin [4]. Egzoni 1 i 2 kodiraju za pre-propeptidni region, egzoni 2 i 3 za Gla domen, region od egzona 3 do 7 kodira Kringl 1 domen, a egzoni 7 i 8 kodiraju Kringl 2 domen. Laki lanac trombina kodiran je egzonomima 8 i 9, dok sekvenca koja obuhvata egzone 9-14 kodira katalitički domen (Slika 1) [15].

Tokom biosinteze, najpre dolazi do uklanjanja signalnog peptida sa N-kraja prepro-protrombina delovanjem signalne peptidaze i usmeravanja ove forme

protrombina ka endoplazmatičnom retikulumu [16]. Za unutrašnju membranu endoplazmatičnog retikuluma, vezan je enzim γ -glutamil transferaza koji prepoznaje propeptidnu sekvencu u prekursoru protrombina (pro-protrombin). U prisustvu vitamina K, γ -glutamil transferaza vrši karboksilaciju 10 aminokiselinskih ostataka glutaminske kiseline koji se prevode u γ -karboksiglutaminsku kiselinu i formira se Gla domen protrombina [17,18]. Gla domen ostvaruje dvostruku ulogu u aktivaciji protrombina u trombin. Za N-kraj Gla domena vezuju se joni kalcijuma usled čega se indukuje konformaciona promena u protrombinu koja je neophodna za njegovu interakciju sa fosfolipidima membrane [19]. S druge strane, pomoću C-kraja Gla domena, protrombin ostvaruje protein-protein interakcije sa aktiviranim FV (FVa) [20]. Zajedno sa aktiviranim FX, FVa čini protrombinazni kompleks koji se nalazi na membrani i koji je neophodan za aktivaciju protrombina. Usled nepravilne karboksilacije Gla domena interakcija protrombina sa protrombinaznim kompleksom je otežana, što dovodi do neefikasne aktivacije protrombina [21].



Slika 1 Strukturna organizacija gena i proteinskih domena protrombina. Pro-propeptidna sekvenca; A-laki lanac protrombina.

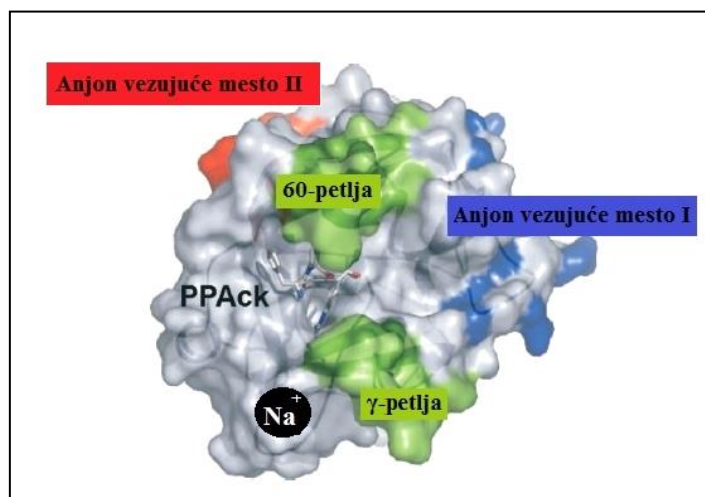
Domeni Kringl 1 i 2 su značajni za vezivanje jona kalcijuma i interakciju sa FVa u okviru protrombinaznog kompleksa [22,23]. Kringl domeni su, osim u protrombinu, prisutni i u drugim faktorima koagulacione kaskade, uključujući plazminogen, tkivni aktivator plazminogena, urokinazu, faktor XII i apolipoprotein A [4]. Kringl 1 domen je vezan delom α -heliksa za Gla domen. U njemu se na pozicijama Asn78¹ i Asn100 nalaze dva N-vezana ugljenohidratna lanca, koja doprinose stabilnosti prekursora

¹ Aminokiseline u molekulu protrombina su numerisane po himotripsinogen nomenklaturi, koja je najčešće prisutna u literaturi, izuzev Arg221a aminokiseline koja je u delu teksta navedena i kao Arg596 (po novoj nomenklaturi), jer genska varijanta FIIc.1787G>A, koja je predmet ove teze, dovodi do aminokiselinske zamene na ovoj poziciji (Arg596Gln) i kao takva je prijavljena u literaturi

protrombina tokom sinteze u endoplazmatičnom retikulumu [24]. Kringl 1 i Gla domeni zajedno čine fragment 1 protrombina [4].

Kringl 2 domen čini fragment 2 protrombina [23]. Interakcijom Kringl 2 domena sa anjon-vezujućim mestom II (engl. *exosite II*) u trombinu, smanjuje se prokoagulantna aktivnost trombina, sprečava se inaktivacija trombina antitrombinom i dolazi do poremećaja u Ca^{2+} zavisnoj aktivaciji proteina C [25-27]. Kringl 2 domen u protrombinu interaguje sa A1 (engl. *Apple1*) domenom FXI. Na taj način se ostvaruje uloga protrombina kao kofaktora u reakciji vezivanja FXI za površinu aktiviranih trombocita [28].

Laki A lanac (36 aminokiselina) i teški B lanac (259 aminokiselina) koji su međusobno povezani disulfidnim mostovima (Cys1-Cys122) i nekovalentnim vezama formiraju α -trombin. Laki lanac je značajan za održanje stabilne strukture α trombina i funkcionalnost njegovog aktivnog mesta [29]. Teški B lanac čini katalitički domen protrombina. Katalitička trijada ovog domena, koja obuhvata His363, Asp429 i Ser525, omogućava protrombinu da vrši svoju serin proteaznu funkciju. Oko katalitičkog domena nalaze se γ -petlja i petlja 60 koje su značajne za specifičnost interakcije trombina sa supstratima i inhibitorima [30,31]. Trombin sadrži i dva anjon-vezujuća mesta čija je uloga u prepoznavanju supstrata i inhibitora sa kojima trombin interaguje (Slika 2).



Slika 2 Topografija trombina sa regionima unutar katalitičkog domena. Na^+ - mesto vezivanja jona natrijuma; PPAck- inhibitor aktivnog mesta (d-Phe-Pro-Arg-ck). Preuzeto i modifikovano iz Adams i saradnici, 2006 [32]

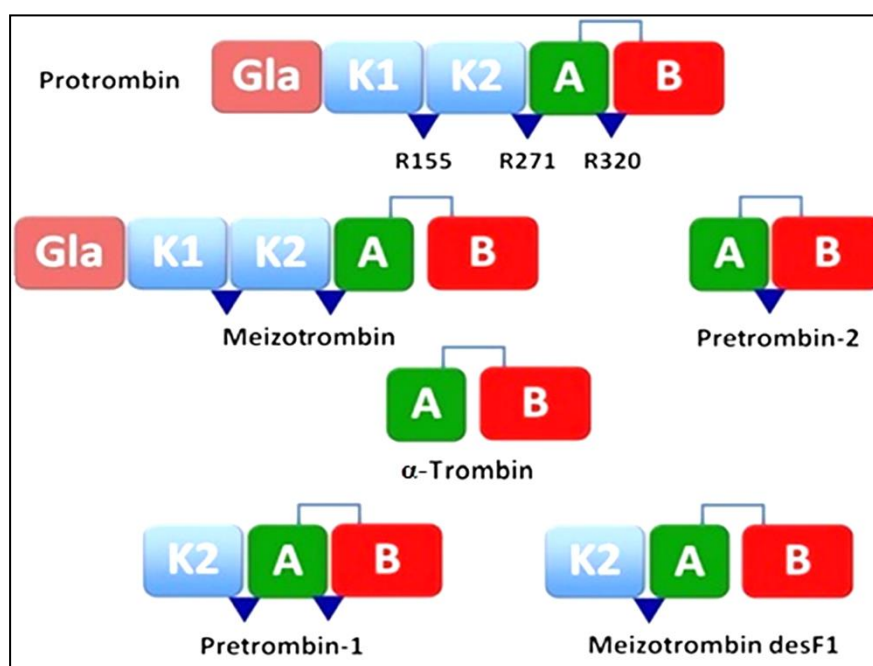
Anjon-vezujuće mesto I posreduje u vezivanju trombina za fibrinogen, prepoznavanju proteazom aktiviranog receptora 1 (PAR-1) i PAR-4 na membrani trombocita, vezivanju inhibitora trombina i aktivaciji FV. Anjon-vezujuće mesto II interaguje sa polifosfatima koji se sekretuju iz granula trombocita i zajedno sa trombinom ubrzava aktivaciju FV [33].

Protrombin se u fiziološkim uslovima u cirkulaciji nalazi u formi zimogena i za pravilno funkcionisanje koagulacione kaskade ključno je da katalitički domen i anjon-vezujući domeni budu neaktivni do procesa aktivacije u trombin. Ukoliko bi anjon-vezujući domen I sve vreme bio aktivan, došlo bi do zasićenosti trombomodulina protrombinom na površini endotela, usled čega bi bilo onemogućeno formiranje kompleksa trombomodulina i aktivacija proteina C. Ovaj domen se takođe može vezati za fibrinogen i time blokirati stvaranje fibrina [34]. Još jedna posledica prevremeno aktiviranog anjon-vezujućeg domena I bilo bi vezivanje protrombina za faktore FV i FVIII, čime bi njihova aktivacija bila sprečena [35]. Prevremeno izlaganje anjon-vezujućeg domena II dovelo bi do vezivanja neaktivnog protrombina za zid endotela i trombocita što bi uzrokovalo značajne poremećaje hemostaze [36,37]. Zbog svega navedenog, proces aktivacije protrombina u aktivnu formu α -trombin odvija se koordinisano i kaskadno, preko dva različita puta [34,38].

Ukoliko se aktivacija vrši pomoću aktiviranog FX, najpre dolazi do isecanja protrombina na poziciji Arg271-Thr272, čime nastaju protrombinski fragment 1.2 (sastoji se od fragmenta 1 i 2) i intermedijer pretrombin 2 koji ne poseduje enzimsku aktivnost (Slika 3). Biološka uloga pretrombina-2 nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da ovakav način aktivacije protrombina može biti favorizovan na membrani trombocita. U sledećem koraku, jednolančani pretrombin-2 se iseca na poziciji Arg320-Ile321, nakon čega se formira aktivni α -trombin koji sadrži dva polipeptidna lanca (laki i teški), koja su spojena disulfidnim mostovima na pozicijama Cys295 i Cys439 [4,34]. U drugi put aktivacije uključen je protrombinazni kompleks koji se sastoji od aktiviranih FV i FX i jona kalcijuma. Ovim putem, proces aktivacije protrombina ubrzava se i do 300 000 puta u odnosu na aktivaciju putem aktiviranog FX, zbog čega se smatra da je u fiziološkim uslovima ovaj put favorizovaniji. U prvom koraku, nakon isecanja na poziciji Arg320-Ile321 nastaje intermedijer meizotrombin (Slika 3) koji poseduje esterolitičnu i amidolitičnu aktivnost (isecanje estarskih i amidnih veza), ali

ima malu sposobnost (<5% aktivnosti trombina) da aktivira fibrinogen. Kao neaktivni zimogen, meizotrombin je rezistentan na inhibiciju u plazmi. Zbog toga, smatra se da postojanje ovog intermedijera može biti značajno za sposobnost trombina da se u takvoj formi prenese krvotokom do udaljenih mesta, u odnosu na mesto produkcije, gde može vršiti svoju antikoagulantnu funkciju. Delovanjem protrombinaznog kompleksa, meizotrombin se iseca na poziciji Arg271 i nastaju fragment 1.2 i aktivni α -trombin [39]. Pretrombin-1 je zimogen koji za razliku od protrombina ne sadrži Gla i Kringl 1 domen i koji nakon isecanja na poziciji Arg320 prelazi u meizotrombin des-fragment 1 [38]. Ukoliko dođe do autokatalitičkog isecanja meizotrombina na poziciji Arg155, takođe se formira intermedijer meizotrombin des-fragment 1 (Slika 3), a potom nastaje stabilna forma α -trombina [38].

Autokatalitičkim isecanjem α -trombina nastaju degradovane forme β - i γ -trombin. One mogu delimično da aktiviraju FXIII i sam protrombin, ali ne utiču na aktivaciju fibrinogena i proteina C [4].



Slika 3 Shematski prikaz aktivacije protrombina. Gla- Gla domen; K1 i K2- Kringl domeni 1 i 2; A-laki lanac i B-teški lanac. R155, R271, R320- strelicom označene pozicije isecanja protrombina. Preuzeto i modifikovano iz Chen i saradnici, 2010 [38]

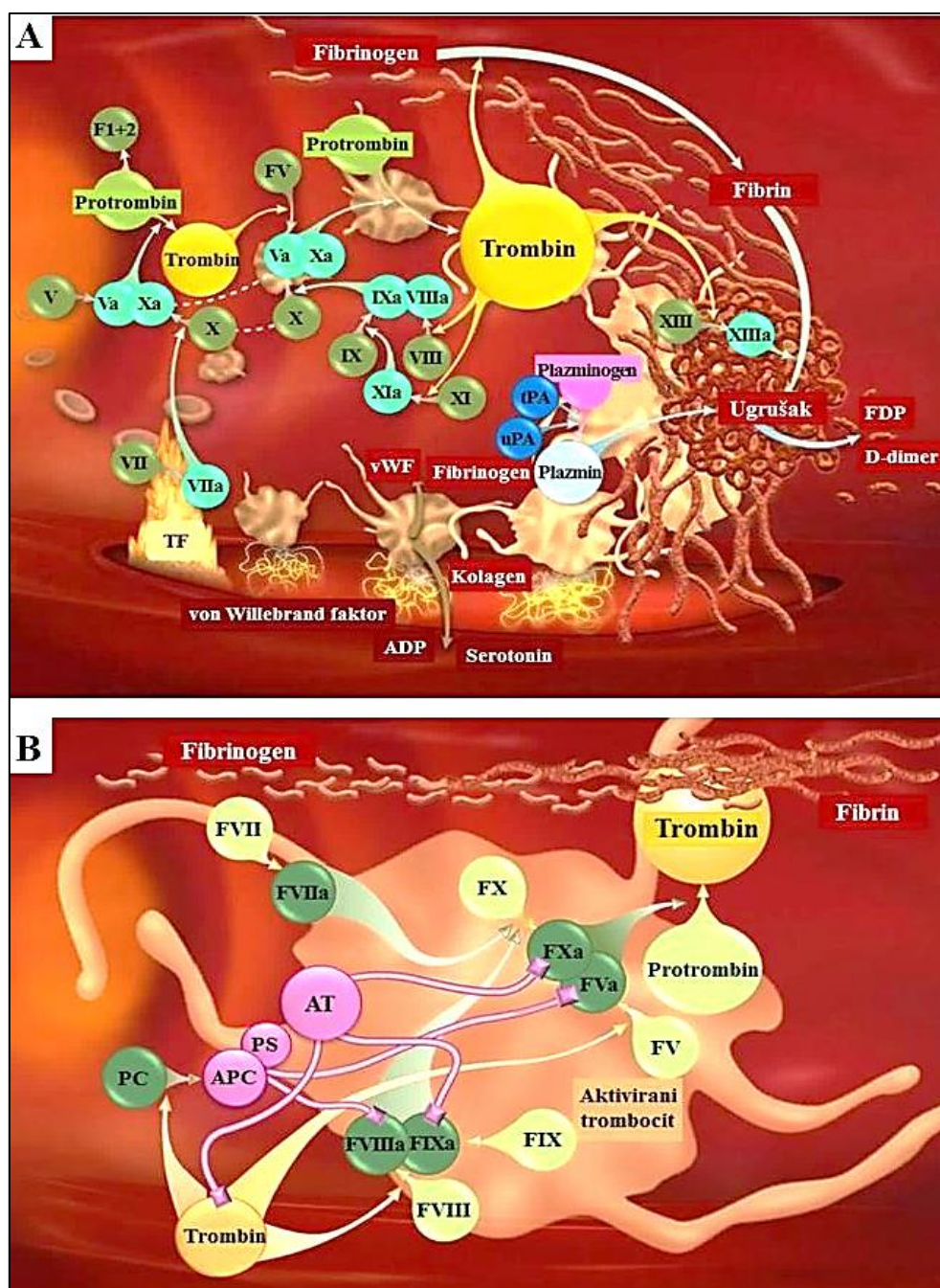
Svoju osnovnu ulogu, trombin ostvaruje u održanju hemostazne ravnoteže (detaljno opisano u poglavlju 1.1.3). Pored toga, ima značajnu ulogu u procesima neurogeneze, inflamacije i tumorogeneze [40-43].

Preko aktivacije PAR receptora, trombin učestvuje u diferencijaciji neurona iz progenitorskih ćelija [44]. Takođe, može imati neuroprotektivnu ulogu tokom ishemijskog prekondicioniranja, preventivnog stanja koje prethodi cerebrovaskularnom insultu i sprečava letalni ishod [45]. Kao medijator inflamacije u centralnom nervnom sistemu, trombin je povezan sa patologijom moždanog udara, multiple skleroze, Parkinsonove i Alchajmerove bolesti [46]. Procesi inflamacije i koagulacije uzajamno su povezani, a trombin kao medijator ova dva procesa može ispoljiti kako svoje pozitivne efekte u slučaju zarastanja rana, tako i negativne u slučaju ateroskleroze i reumatoidnog artritisa [40,41,47,48]. Tokom inflamacije aktivira se koagulaciona kaskada i stvara se trombin koji deluje na trombocite, endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije, monocite i dendritične ćelije [49]. Preko aktivacije sistema komplementa C3 i C5, trombin pokreće imuni odgovor tokom inflamacije [50]. Povezanost tumora i trombina prvi put je eksperimentalno pokazana na modelu miša sa indukovanim tumorom, kod koga je intravenozno ubrizgavanje trombina dovelo do pojave metastaze [51]. Brojne studije su potom ukazale na ulogu trombina u rastu, metastazi i angiogenezi tumora [52-55]. Tumorske ćelije na svojoj površini eksprimiraju tkivni faktor (TF), koji uz pomoć protrombinaznog kompleksa na površini trombocita može dovesti do aktivacije protrombina u trombin [52]. Na taj način, tumor utiče na pokretanje „začaranog kruga“ u kome stvoreni trombin još više stimuliše rast, adheziju i invazivnost tumora [55].

1.1.3 Uloga protrombina u hemostazi

Hemostaza predstavlja jedan od osnovnih mehanizama koji doprinose održanju celokupne homeostaze organizma. Prevažodna funkcija ovog mehanizma je da kroz ravnotežu prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora obezbedi tačno stanje krvi pri fiziološkim uslovima i spreči gubitak krvi u slučaju povrede krvnog suda. U glavne komponente hemostaznog sistema spadaju endotel krvnih sudova, trombociti, faktori koagulacione kaskade, inhibitori koagulacije i sistem fibrinolize [4]. Shematski prikaz koagulacione kaskade dat je na Slici 4. Protrombin (faktor II), odnosno njegova aktivna forma trombin, predstavlja centralni regulator hemostazne ravnoteže. Zbog svoje

alosterične regulacije, trombin može imati tzv. „brzu“ formu sa prokoagulantnom funkcijom (Slika 4A) i „sporu“ formu koja ima antikoagulantnu aktivnost (Slika 4B).



Slika 4 Shematski prikaz koagulacione kaskade **A**) prokoagulantna uloga trombina; i **B**) antikoagulantna uloga trombina u koagulacionoj kaskadi; TF-tkivni faktor; vWF-von Willebrand-ov faktor; ADP-adenozin-difosfat; FDP-produkti degradacije fibrina; tPA-tkivni-tip aktivatora plazminogena; uPA-urokinaza-tip aktivatora plazminogena; PC-protein C; APC-aktivirani protein C; PS-protein S; AT-antitrombin. Preuzeto i modifikovano sa www.healthcare.siemens.ch

Prelazak iz „spore“ u „brzu“ formu regulisan je vezivanjem jona natrijuma (Na^+) u petlji trombina koju formiraju tri antiparalelne β -ploče u teškom B lancu (Met180-Tyr184a, Lys224-Tyr228 i Val213-Gly219) koje dijagonalno preseca Glu188-Glu192 ploču. Mesto vezivanja Na^+ je više od 15 Å udaljeno od katalitičke trijade. Vezani Na^+ je okružen atomima kiseonika poreklom iz karbonilne grupe Tyr184a, Arg221a i Lys224 i sa četiri molekula vode. Deo sekvence Cys220–Gly226 i poslednje β -ploče teškog lanca u okviru Na^+ vezujućeg mesta poseduje visok stepen konzervisanosti i ukazuje na značajnu ulogu Na^+ u funkciji trombina. Uočen je, takođe, visok stepen homologije ovog regiona sa analognim sekvencama u drugim serin proteazama, uključujući FIX i FX. Petlja za koju se vezuje Na^+ značajna je takođe za interakciju trombina sa antitrombinom i proteinom C [56].

Prokoagulantna aktivnost trombina obuhvata: (1) stvaranje krvnog ugruška aktivacijom fibrinogena u fibrin; (2) mehanizme kojima doprinosi stabilnosti formiranog ugruška; (3) aktivaciju trombocita i uticaj trombina na sopstvenu produkciju preko aktivacije FV, FVIII i FXI [4].

Fibrinogen se sastoji od tri para $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ i γ lanaca koji su međusobno povezani. Svaki molekul fibrinogena sastoji se iz dva spoljašnja D domena i jednog E domena koji se nalazi u sredini molekula. Trombin je ključan za formiranje i polimerizaciju fibrina. U prvom koraku, trombin najpre iseca fibrinopeptid A (FpA) iz $\text{A}\alpha$ lanca fibrinogena. Uklanjanjem FpA, E domen jednog molekula fibrinogena se nekovalentno vezuje za D domen drugog molekula fibrinogena. Međusobno povezani E-D domeni monomera fibrina, koji su raspoređeni „cik-cak“, formiraju dvolančane protofibrile. U poslednjem koraku, trombin na sličan način kao i na početku polimerizacije, iseca fibrinopeptid B (FpB). Prilikom formiranja fibrinskog ugruška dolazi do sporadičnog grananja lanaca fibrina u vidu trodimenzionalne mreže [57-60].

Jedan od mehanizama kojima trombin utiče na stabilnost formiranog ugruška je kroz inhibiciju procesa fibrinolize. Trombin u kompleksu sa trombomodulinom aktivira trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize (TAFI, engl. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) koji sprečava lizu krvnog ugruška [61]. Sistem fibrinolize podrazumeva najpre aktivaciju plazminogena u plazmin pomoću aktivatora tkivnog (t-PA, engl. *tissue type*) i urokinaznog (u-PA, engl. *urokinase type*) tipa [62]. Kofaktor t-PA se vezuje za lizinske ostatke na C-kraju fibrina, a aktivirani plazmin vrši proteolitičko isecanje

fibrina [63]. TAFI se aktivira proteaznim delovanjem trombina koji iseca glikozilovani aktivacioni peptid na poziciji Arg92 u polipeptidnom lancu proteina TAFI [64]. Aktivirani TAFI uklanja ostatke lizina, usled čega remeti funkciju t-PA, što utiče na smanjenje nivoa plazmina i inhibiciju fibrinolize [65].

Još jedan mehanizam trombina za stabilizaciju krvnog ugruška je putem aktivacije FXIII. Faktor XIII je heterotetramer koji se sastoji od dve A subjedinice, koje sadrže aktivno mesto enzima i dve B subjedinice, koje štite A hidrofobne jedinice od hidrofilnog okruženja plazme. Trombin aktivira FXIII isecanjem aktivacionog peptida, a fibrin i joni kalcijuma indukuju disocijaciju tetramera i oslobađanje A subjedinica koje imaju katalitičku funkciju [66]. Aktivirani FXIII preko interakcije sa α C domenima fibrina utiče na unakrsno povezivanje lanaca fibrina i umetanje α 2-antiplazmina, što zajedno čini fibrinski ugrušak otpornim na fibrinolizu [61,67].

Pored toga, koncentracija trombina prilikom stvaranja fibrinskog ugruška takođe bitno utiče na njegovu stabilnost i otpornost. Koncentracija trombina se menja tokom vremena i zavisi od raspoložive količine drugih pro- i antikoagulantnih faktora. Ukoliko je koncentracija trombina visoka, arhitekturu ugruška čine tanka fibrinska vlakna koja su gusto isprepletana i otporna na fibrinolizu. Suprotno tome, pri niskim koncentracijama trombina, ugrušak se sastoji od debelih fibrinskih vlakana koja ubrzo bivaju degradovana dejstvom plazmina [57].

Jedan od mehanizama kojima trombin aktivira trombocite je kroz interakciju sa PAR-1 i PAR-4 koji pripadaju familiji G-protein kuplovanih receptora. Pri niskoj koncentraciji trombina, aktivacija se odvija preko PAR-1 receptora, dok je pri visokim koncentracijama trombina favorizovana aktivacija preko PAR-4 receptora [68]. Trombin seče peptidnu vezu na N-kraju spoljašnjeg domena PAR receptora i nastaje novi N-kraj koji ima funkciju „privezanog“ liganda (engl. *tethered*), što predstavlja specifičnu karakteristiku ove grupe receptora. Intramolekulskim vezivanjem novog N-kraja za segment receptora, koji je ukotvljen u membranu trombocita, aktiviraju se signalni putevi unutar trombocita [69].

Drugi mehanizam podrazumeva interakciju anjon-vezujućeg mesta II trombina sa glikoproteinom Ib α (GPIb α) koji se nalazi na površini trombocita [32]. Ovaj glikoprotein čini subjedinicu Gplb-IX-V kompleksa za koji se vezuje von Willebrandov faktor (vWF) i ima važnu ulogu u adheziji i agregaciji trombocita [70]. Nedavno je

opisan mehanizam koji uključuje aktivaciju i agregaciju trombocita preko interakcije sa integrinom $\alpha\text{IIb}\beta_3$, nezavisno od PAR receptora i Gplb-IX-V. Kao rezultat aktivacije, u trombocitima se aktivira Rap1b koji stimuliše sekreciju granula iz trombocita. Takođe, dolazi do polimerizacije aktina i reorganizacije citoskeleta u trombocitima, kao i ispoljavanja prokoagulantne aktivnosti trombocita, usled koje se stvaraju velike količine trombina [59,70].

Trombin pomoću Gplb-IX-V kompleksa može da aktivira FXI na membrani trombocita. FXI je homodimer, u kome se svaki monomer sastoji od lakog lanca i teškog lanca u okviru koga se nalaze 4 A (engl. *Apple*) domena. Svojim A3 domenom, FXI se vezuje za Gplb-IX-V kompleks i aktivira vezivanjem trombina za aktivno mesto unutar A1 domena [71]. U α -granulama oslobođenim iz aktiviranih trombocita nalazi se delimično aktivirani FV koji trombin proteolitički iseca i u potpunosti aktivira [72]. Proteolitičkim delovanjem trombina iseca se teški lanac FVIII na pozicijama Arg372 i Arg740 i laki lanac na poziciji Arg1689. Time se raskida kompleks FVIII sa vWF i aktivira se FVIII. Aktivirani FV, FVIII i FXI obezbeđuju dodatnu produkciju trombina [73].

Antikoagulantnu ulogu trombin ispoljava u kompleksu sa trombomodulinom, prevashodno kroz aktivaciju inhibitora koagulacije- proteina C [74]. Trombomodulin je transmembranski protein eksprimiran na membrani endotelnih ćelija koji ima funkciju kofaktora trombina [75]. Kompleks trombin-trombomodulin ostvaruje se interakcijom anjon-vezujućeg domena I trombina sa EGF-sličnim (engl. *epidermal growth factor-like*) domenima 5 i 6 trombomodulina. U nekim slučajevima je za Ser/Thr bogat domen trombomodulina, koji se nalazi između EGF-6 i transmembranskog domena, vezan hondroitin-sulfat kojim se povećava afinitet trombomodulina za trombin. Da bi trombomodulin mogao u potpunosti da obavlja svoju funkciju kofaktora neophodan je EGF-slični domen 4 preko koga trombomodulin interaguje sa proteinom C i ubrzava njegovu aktivaciju [75-77]. Protein S se kao kofaktor vezuje za aktivirani protein C koji potom svojom proteaznom aktivnošću iseca aktivirani FV na poziciji Arg506 i Arg306 i aktivirani FVIII na poziciji Arg336 i Arg562 i inhibira ih [78-80]. Time se zaustavljaju nizvodne reakcije u koagulacionoj kaskadi i dalja aktivacija protrombina u trombin. Usled toga, aktivirani protein C indirektno utiče na proces fibrinolize i razgradnju krvnog ugruška, jer je smanjenjem koncentracije trombina smanjena i aktivacija

proteina TAFI [81]. Kada se trombin nalazi u kompleksu sa trombomodulinom sprečeno je njegovo proteolitično delovanje na fibrinogen i interakcija sa PAR-1 receptorom na trombocitima [82].

Za održavanje hemostazne ravnoteže je, osim aktivacije, važna i inhibicija samog trombina kroz njegovu interakciju sa antitrombinom i heparin kofaktorom II. Antitrombin u fiziološkim uslovima cirkuliše u formi koja ima slab afinitet ka serin proteazama. Nakon interakcije sa specifičnom pentasaharidnom sekvencom heparina, antitrombin menja svoju konformaciju i postaje potentan inhibitor trombina, FXa i FIXa [4]. Ireverzibilna inhibicija trombina antitrombinom odigrava se kroz brojne interakcije sa aktivnim katalitičkim mestom, γ -petljom i Na^+ vezujućim mestom trombina na pozicijama Arg221a i Lys224 [83].

Heparin kofaktor II u prisustvu pomoćnih glikozaminoglikana (heparina, heparan-sulfata i dermatan-sulfata) specifično inhibira trombin. Interakcija se ostvaruje preko N-kraja heparin kofaktora II koji se visokim afinitetom vezuje za anjon-vezujuće mesto II trombina [84,85].

Hemostaza je dinamičan i kompleksan proces u kome učestvuje veliki broj činilaca, tako da narušavanje njihovih interakcija dovodi do poremećaja hemostazne ravnoteže. Posledica pomeranja ravnoteže u smeru hipokoagulacije je pojava krvarenja (hemoragija). Suprotno tome, hiperkoagulacija se manifestuje trombozama nastalim usled hiperprodukcije krvnog ugruška (tromba) koji izaziva začepljenje krvnog suda [4]. Imajući u vidu da protrombin ima centralnu ulogu u regulaciji hemostazne ravnoteže, promene u njegovom raspoloživom nivou ili narušavanje njegove funkcije mogu dovesti do poremećaja hemostaze u oba smera.

Odstupanje u smeru hipokoagulacije nastaje kao posledica deficijencije protrombina, koja je redak autozomno recesivni poremećaj sa učestalošću 1:2 miliona [86]. Postoje dva oblika deficijencije: hipoprotrombinemija i disprotrombinemija. Hipoprotrombinemija se karakteriše smanjenjem nivoa i aktivnosti protrombina, dok je kod disprotrombinemije narušena samo njegova aktivnost [87,88]. Varijante koje uzrokuju hipoprotrombinemiju najčešće utiču na isecanje propeptidne sekvence iz Gla domena i stabilnost Kring1 domena 1 i 2 [89]. Protrombin Šangaj (Glu29Gly) varijanta remeti vezivanje jona kalcijuma za Gla domen i interakciju protrombina sa fosfolipidima membrane, usled čega je aktivnost protrombina narušena [90].

Disprotrombinemija nastaje usled varijanti koje remete interakciju trombina sa fibrinogenom, utiču na funkcionalnost katalitičkog domena ili dovode do poremećaja u aktivaciji protrombina [87,91,92]. Najčešće su detektovane u okviru katalitičkog ili anjon-vezujućeg mesta I, čime remete serin-proteaznu funkciju trombina [89]. Sindrom Quick spada među najranije opisane slučajeve disprotrombinemije. Prvi put je detektovan kod kombinovanog heterozigotnog nosioca dve varijante koje remete interakciju trombina sa fibrinogenom, što se manifestuje smanjenom prokoagulantnom aktivnošću trombina [93-95]. Osim navedenih, disprotrombinemija je povezana i sa varijantama koje su prisutne u mestu vezivanja jona Na^+ u trombinu, kao što su: protrombin Greenville (Arg517Gln) [96], Saint Denis (Asp552Glu) [97] i Scranton (Lys556Thr) [98]. Do sada nema literaturnih podataka o detektovanim slučajevima aprotrombinemije, odnosno kompletne deficijencije protrombina i smatra se da ona ne bi bila kompatibilna sa životom [99].

Povezanost protrombina sa odstupanjem hemostazne ravnoteže u smeru hiperkoagulacije biće opisana u poglavljima 1.1.4 i 1.2.4.

1.1.4 Uloga protrombina u patogenezi trombofilije

Povećana sklonost ka hiperkoagulaciji, pojavi i ponavljanju trombotičkih događaja definiše se kao trombofilija [100]. Trombotički događaji se po mestu nastanka klasifikuju kao arterijski (najčešći su moždani udar i infarkt miokarda) i venski (najčešće se javljaju u vidu tromboze dubokih vena (TDV) ili plućnog embolizma (PE)) [4,101]. Imajući u vidu da u toku trudnoće fiziološki dolazi do hiperkoagulacije, učestalost trombotičkih događaja je povećana kod trudnica i najčešće se manifestuje poremećajem placentalne cirkulacije koja dovodi do spontanih pobačaja (SP) [102].

U etiologiji trombofilija učestvuju brojni stečeni i nasledni faktori rizika. Najčešći stečeni faktori rizika za arterijske tromboze su: hipertenzija, dijabetes, gojaznost, hiperholesterolemija i pušenje, a kod venskih tromboza: hiruške intervencije, traume, imobilizacije, malignitet, imunizacije, primena oralnih kontraceptiva, trudnoća, puerperijum i starost [101,103].

Moguća uloga naslednih faktora u nastanku trombofilije primećena je nakon što je sklonost ka trombozama uočena kod više članova jedne porodice [104]. U nasledne faktore rizika ubrajaju se varijante u genima koji kodiraju za: 1. inhibitore koagulacije i uzrokuju njihovu deficijenciju i smanjenu inhibiciju koagulacije (deficijencije

antitrombina, proteina C i proteina S); 2. prokoagulantne faktore, usled čega je njihova količina povećana ili inhibicija smanjena (FV G1691A i FII G20210A varijante); i 3. faktore fibrinolitičkog sistema, usled čega je proces fibrinolize narušen (PAI-1 4G/5G) [105].

Protrombin bi svoju ulogu u hiperkoagulaciji mogao da ostvari kroz sledeće mehanizme: 1. povišeni raspoloživi nivo u cirkulaciji ili 2. povećana prokoagulantna aktivnost, uz normalni nivo proteina ili 3. smanjena inaktivacija ili 4. smanjena antikoagulantna aktivnost. Do sada su kod pacijenata sa trombofilijom opisana samo hiperkoagulaciona stanja koja nastaju kao posledica povišenog nivoa protrombina u cirkulaciji, dok ostala tri mehanizma nisu detektovana. Varijante u genu za protrombin koje se povezuju sa njegovom povišenom ekspresijom, nalaze se u 3' kraju. Najviše je proučena FII G20210A varijanta (rs1799963), kod koje je mehanizam prvi put i opisan [106]. Zajedno sa mutacijom FV G1691A- FV Leiden (rs6025), ova protrombinska varijanta predstavlja najčešći protrombotički nasledni faktor rizika i sastavni je deo rutinskog panela testova za trombofiliju [101,107]. U plazmi nosilaca FII G20210A varijante količina protrombina je povećana 1,2 do 1,4 puta [108]. Na osnovu literaturnih podataka, učestalost ove varijante kod obolelih od tromboza je 6-18%, a u zdravoj populaciji 1-6% [106,109]. Studije su pokazale da FII G20210A povećava rizik za pojavu venskih tromboza 2-4 puta, a njena uloga u nastanku spontanih pobačaja i arterijskih tromboza još uvek nije u potpunosti razjašnjena [110-112]. Ovi podaci se odnose na populaciju belaca, dok je u ostalim populacijama FII G20210A varijanta veoma retka [113]. Razlika u učestalosti objašnjava se periodom nastanka ove varijante za koju se pretpostavlja da je nastala pre približno 24000 godina, nakon evolutivnog odvajanja populacije belaca [114].

Obzirom na nekanonsku organizaciju 3' kraja gena za protrombin, u ovom regionu je, pored FII G20210A detektovano više genskih varijanti, čija će uloga u patogenezi trombofilije biti opisana u poglavlju 1.2.4.

1.2 Uloga 3' kraja protrombinskog gena u regulaciji genske ekspresije i funkcije protrombina

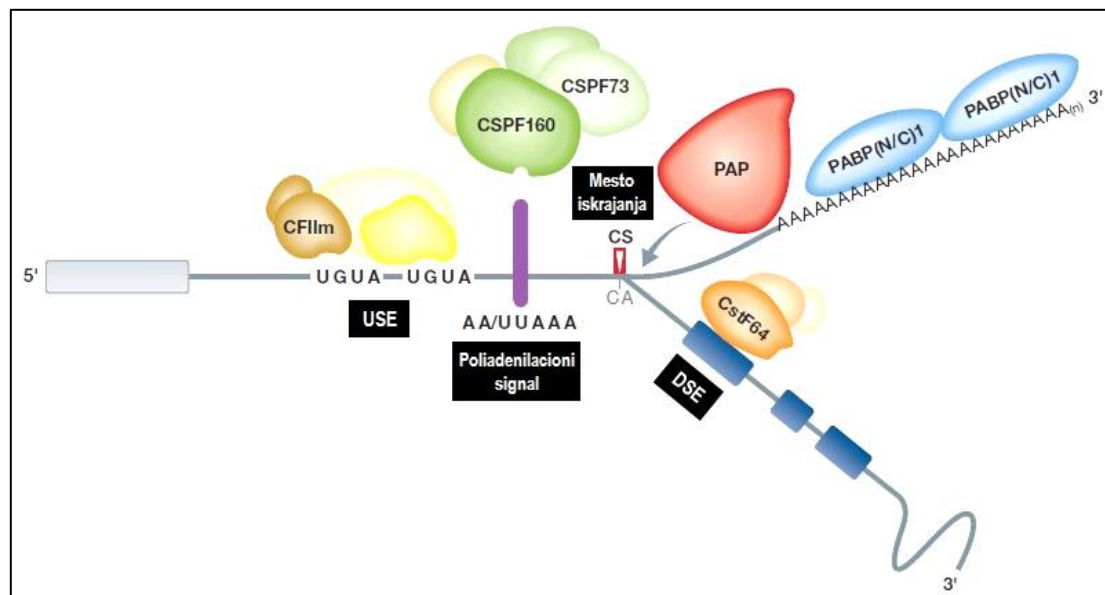
Regulacija ekspresije gena kod eukariota uključuje niz mehanizama koji su prostorno i vremenski regulisani, s ciljem da se obezbedi adekvatna sinteza RNK i proteina zavisno od potreba ćelije u datom trenutku. Najznačajniji nivoi regulacije

genske ekspresije obuhvataju mehanizme uključene u: regulaciju transkripcije, obradu pre-iRNK u zrelo iRNK, stabilnost iRNK, regulaciju translacije i epigenetičke mehanizme [115]. Dugi niz godina većina istraživanja bila je usmerena na izučavanje transkripcione regulacije, a kasnije je prepoznat značaj regulatornih elemenata u 5' i 3' kraju gena, posebno u post-transkripcionoj regulaciji [116].

1.2.1 Struktura 3' kraja gena eukariota

Osnovne regije 3' kraja gena eukariota čine 3' netranslatirajući region (3' UTR, engl. *3' untranslated region*) koji obuhvata sekvencu od stop kodona do mesta iskrajanja i koji nakon transkripcije ostaje u zreloj RNK i 3' nekodirajući region (3' FR, engl. *3' flanking region*) koji se prepisuje tokom transkripcije, ali se iskraja prilikom procesovanja RNK i ne ulazi u sastav zrele RNK.

U okviru 3' kraja gena nalaze se tri glavna regulatorna elementa: heksanukleotid AAUAAA koji predstavlja signal za poliadenilaciju, mesto iskrajanja i nizvodni regulatorni element DSE (engl. *downstream sequence element*) [117,118]. Često su za efikasnu poliadenilaciju potrebni i pomoćni elementi koji se nalaze uzvodno ili nizvodno od mesta iskrajanja [119]. Shematski prikaz 3' kraja iRNK kod eukariota i *trans*-faktora uključenih u proces iskrajanja i poliadenilacije dat je na slici 5.



Slika 5 Struktura 3' kraja iRNK i proteini mašinerije za iskrajanje i poliadenilaciju kod eukariota. Preuzeto i modifikovano iz Hollerer i saradnici, 2014 [120]

Poliadenilacioni signal je pozicioniran 10-30 nukleotida uzvodno od mesta iskrajanja. Motiv AAUAAA je visoko konzervisan i prisutan kod većine poliadenilovanih iRNK. Manji procenat iRNK sadrži UAUAAA, AACAAA, ili ACUAAA kao poliadenilacioni signal, dok histonske iRNK ne podležu poliadenilaciji, već na svom 3' kraju imaju petlju [120,121]. Očuvanost sekvence poliadenilacionog signala je ključna za efikasnu obradu i poliadenilaciju iRNK. Proteinski kompleks CPSF (engl. *cleavage and polyadenylation specificity factor*) specifično prepoznaje poliadenilacioni signal i vezuje se za njega svojom CPSF-160 subjedinicom, dok pomoću ostalih subjedinica interaguje sa drugim faktorima, koji su takođe uključeni u proces poliadenilacije i obrade primarnog transkripta [118].

Nizvodni regulatorni element DSE se nalazi u 3' FR regionu i lokalizovan je 30 do 45 nukleotida nizvodno od AAUAAA heksanukleotida [122]. Evolutivno je manje konzervisan u odnosu na poliadenilacioni signal i predstavlja region bogat uridinom ili UG dinukleotidnim ponovcima. Za ovaj element se vezuje CstF (engl. *cleavage stimulation factor*) koji interaguje sa CPSF kompleksom [118,123].

Udaljenost DSE i AAUAAA heksanukleotida određuje poziciju poli(A) mesta, na kome se iseca pre-iRNK i dodaje poli(A) rep, i najčešće se nalazi u regionu od približno 13 nukleotida između ova dva elementa [124]. Dinukleotid CA je najoptimalnije mesto iskrajanja prisutno kod većine pre-iRNK kičmenjaka, ali se na ovoj poziciji u manjem broju slučajeva mogu naći U ili C, a najređe G [125].

Da bi otpočeo proces isecanja i poliadenilacije, osim interakcije između CPSF i CstF neophodno je da se vežu CF I i CF II (engl. *cleavage factor*) koji stabilizuju kompleks i omogućavaju vezivanje poli-A polimeraze (PAP) koja vrši dodavanje poli(A) repa. Osim PAP, za efikasno dodavanje poli(A) repa neophodni su i poli(A)-vezujući proteini (PABP, engl. *poly-A binding protein*) [118].

Osim poliadenilacionog signala i DSE, u određenom broju gena prisutni su pomoćni *cis*-elementi bogati uridinima, GU ili AU dinukleotidima koji se nalaze uzvodno ili nizvodno od mesta isecanja. Ovi elementi imaju pojačavački efekat kod gena sa slabim poliadenilacionim signalom, a takođe imaju ulogu u odabiru mesta iskrajanja ukoliko je prisutno više poliadenilacionih signala. Najbolje okarakterisan pomoćni element USE (engl. *upstream sequence element*) se nalazi uzvodno od poliadenilacionog signala i predstavlja uridinima bogatu sekvencu u primarnom

transkriptu iRNK, za koju se vezuju *trans*-faktori koji stabilizuju mašineriju potrebnu za obradu primarnog transkripta i poliadenilaciju [119]. Najpre su opisani u mnogim virusnim iRNK [126], ali je kasnije utvrđeno njihovo prisustvo i u nekim iRNK čoveka među kojima su iRNK za ciklooksigenazu 2 (COX-2), komplement C2, lamin B2, kolagen (COL1A1, COL1A2, COL2A1), 2'-5' oligo(A) sintetazu i protrombin [127-132]. Još jedan pomoćni uzvodni element je UGUA koji predstavlja vezujuće mesto za poliadenilacioni faktor CF I [133]. Među distalnim pomoćnim elementima do sada je opisana guanidinima bogata sekvenca GRS (engl. *G-rich sequence*) čiji mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da učestvuje u stabilizaciji vezivanja CstF faktora za DSE [134].

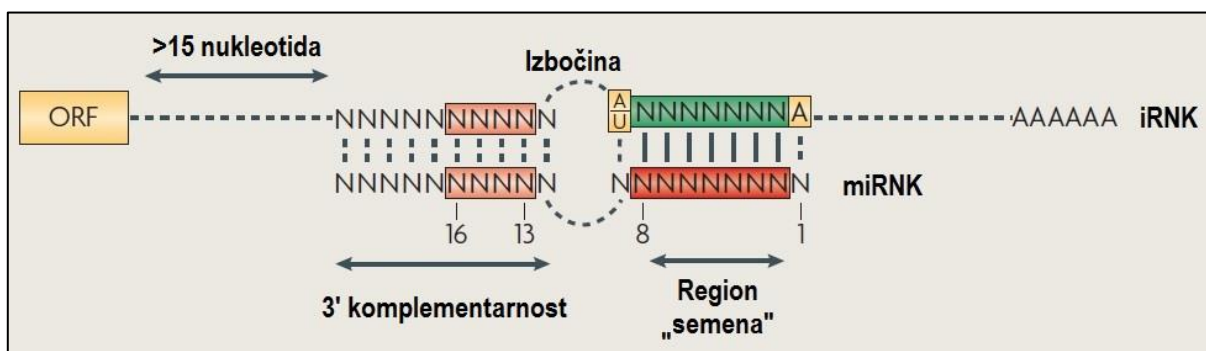
1.2.2 Uloga 3' kraja u regulaciji ekspresije gena

Značaj 3' kraja u regulaciji ekspresije gena ogleda se kroz njegovu ulogu u brojnim mehanizmima na nivou transkripcije, obrade primarnog transkripta, transporta iz jedra i lokalizacije iRNK u citoplazmi [135], stabilnosti iRNK [136] i translacije [137]. U okviru 3' kraja nalaze se brojni regulatorni elementi za koje se vezuju specifični RNK-vezivni proteini (RBP, engl. *RNA binding proteins*), miRNK i druge nekodirajuće RNK, koji zajedno post-transkripciono regulišu ekspresiju gena [138].

Sam proces poliadenilacije je važan za efikasan završetak transkripcije. Očuvanje konzervisanosti poliadenilacionog signala obezbeđuje efikasnu obradu primarnog transkripta [118]. Pored toga, prisustvo više poliadenilacionih signala u jednom genu je značajno za odgovor ćelije na spoljašnje stimulse [120]. Tokom procesa alternativne poliadenilacije koriste se različiti poliadenilacioni signali, a kao rezultat toga nastaju iRNK sa različitom dužinom 3' kraja. Time je omogućeno stvaranje dovoljne količine odgovarajuće izoforme iRNK i proteina koji su neophodni tokom određenog fiziološkog procesa. Pokazano je da su izoforme sa kraćim 3' krajem uglavnom prisutne u ćelijama tokom ranih stadijuma razvića, tokom reprogramiranja indukovanih pluripotentnih ćelija i u visoko proliferišućim tkivima [139]. Suprotno tome, tokom kasnijih stadijuma razvića i u diferenciranim ćelijama uglavnom su prisutne izoforme sa dužim 3' krajem [140]. Alternativna poliadenilacija je prisutna kod većine sisarskih gena i smatra se važnim mehanizmom u regulaciji genske ekspresije koji doprinosi kompleksnosti transkriptoma i proteoma [120].

Po završetku poliadenilacije, na 3' kraju se formira poli(A) rep koji je ključan za zaštitu 3' kraja od degradacije nukleazama, značajan je za transport iRNK kroz nukleusne pore do citoplazme i za stimulaciju procesa translacije. Za poli(A) rep na 3' kraju iRNK su vezani PABP koji interaguju sa eIF4G (engl. *eucaryotic initiation factor 4G*) proteinom koji je vezan za 5' kapu iRNK preko interakcije sa eIF4E, i koji regrutuje malu subjedinicu ribozoma tokom inicijacije translacije. Interakcijom proteina vezanih za 3' i 5' kraj iRNK dolazi do njene cirkularizacije, usled čega je omogućeno da se ribozom nakon disocijacije sa 3' kraja nađe u neposrednoj blizini 5' kraja i započne novi ciklus translacije [137].

Regulacija genske ekspresije putem miRNK najčešće se ostvaruje njihovom interakcijom sa 3' UTR-om iRNK. Klasa miRNK obuhvata male nekodirajuće jednolančane RNK, dužine od približno 22 nukleotida. Interakcija sa ciljnom iRNK se ostvaruje po principu baznog sparivanja. Ključnu ulogu u prepoznavanju ciljne iRNK igra region od 2. do 8. nukleotida u miRNK, tzv. region „semena“ (Slika 6).



Slika 6 Prikaz interakcije iRNK sa miRNK. Komplementarno sparivanje u šrafiranom regionu miRNK (crveno) i iRNK (zeleno) predstavlja region „semena“. Preuzeto i modifikovano iz Filipowicz i saradnici, 2008 [141]

Skoro perfektno sparivanje miRNK i iRNK indukuje degradaciju iRNK, dok izostanak sparivanja u srednjem delu miRNK dovodi do inhibicije translacije i/ili destabilizacije iRNK [142,143]. Međutim, u određenim fiziološkim uslovima, miRNK mogu dovesti i do aktivacije translacije [144,145]. Analizom sekvenci utvrđeno je da iRNK koje se prepisuju sa gena koji su uključeni u osnovne ćelijske procese imaju kratke 3' UTR regione koji uglavnom ne sadrže vezujuća mesta za miRNK. Međutim, 3' UTR regioni su duži kod iRNK koje se prepisuju sa gena koji su važni za odvijanje

određenih procesa tokom razvića i poseduju brojna vezujuća mesta za miRNK [146]. To ukazuje da je kod sisara prirodna selekcija mogla delovati u smeru povećanja broja iRNK čija se aktivnost reguliše preko miRNK.

Za pravilnu sintezu proteina tokom translacije, neophodno je da sekvenca i arhitektura *cis*-elemenata u 5' i 3' kraju iRNK bude očuvana. Mutacije u 3' kraju iRNK koje remete stop kodon, poliadenilacioni signal, vezivanje miRNK ili RNK-vezivnih proteina ili dovode do promene u sekundarnoj strukturi iRNK se odražavaju na proces translacije i funkcionalnost proteina [147].

Pojava prevremenog ili odloženog stop kodona odražava se na dužinu 3' UTR regiona i sintezu polipeptida, što za posledicu može imati različita patološka stanja. Aniridija je kongenitalni poremećaj koji se manifestuje delimičnim ili potpunim izostankom irisa i drugim poremećajima kao što su katarakta i glaukom. Nastaje tokom embrionalnog razvića usled mutacije koja dovodi do pojave prevremenog stop kodona u PAX6 (engl. *paired box 6*) genu koji ima važnu ulogu tokom procesa formiranja očiju kod fetusa. Do razvoja ove bolesti može doći i ukoliko se mutacija pojavi u samom stop kodonu PAX6 gena umesto koga nastaje kodon za leucin koji se ugrađuje u C-kraj polipeptidnog lanca [148,149]. U genima koji kodiraju za keratin opisane su slične mutacije koje dovode do autozomno dominantnog oboljenja EBS (lat. *epidermolysis bullosa simplex*), odnosno keratinske bolesti [150,151].

Mutacije u poliadenilacionom signalu onemogućavaju završetak transkripcije, pravilnu obradu primarnog transkripta i poliadenilaciju, usled čega se proteinski produkt ne sintetiše ili se sintetiše u značajno manjoj meri. Promene u poliadenilacionom signalu u genima koji kodiraju α -2 i β globin uzrokuju talasemije [152,153]. IPEX sindrom (engl. *immune dysfunction, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked*) je skup autoimunih poremećaja koji su posledica mutacije u poliadenilacionom signalu FOXP3 gena. U prisustvu mutacije sintetiše se nestabilna forma iRNK, usled čega je količina FOXP3 proteina smanjena, a funkcija T limfocita narušena [154].

Održavanje sekundarne strukture iRNK obezbeđuje interakciju sa *trans*-faktorima koji učestvuju u lokalizaciji iRNK i procesu translacije. Ukoliko je mutacija prisutna u 3' UTR-u, sekundarna struktura iRNK može biti izmenjena i pristup translacione mašinerije može biti otežan. Primer toga su mutacije u GATA4 genu koje

menjaju sekundarnu strukturu iRNK i utiču na njen transport i lokalizaciju [155]. Izmene u sekundarnoj strukturi mogu učiniti vezivna mesta za određene miRNK ili RNK-vezivne proteine manje ili više dostupnim i time se odraziti na njihove interakcije sa iRNK. Na primer, koronarna arterijska bolest je povezana sa mutacijom u 3' UTR regionu MRAS gena koja olakšava vezivanje miR-195 za svoju ciljnu sekvencu u okviru ovog gena i smanjuje nivo M-ras proteina [156].

Razvoj bolesti nije povezan isključivo sa smanjenom efikasnosti *cis*-elemenata lokalizovanih u 3' kraju gena, već može biti i posledica mutacija prisutnih u ovom regionu koje dovode do povećane ekspresije gena (engl. *gain of function*). Jedna takva genska varijanta (FII G20210A) detektovana je u genu za protrombin i nalazi se na mestu iskrajanja pre-iRNK [157]. Mehanizam FII G20210A varijante i njen uticaj na ekspresiju gena biće detaljno opisani u poglavlju 1.2.5.

1.2.3 Struktura 3' kraja gena za protrombin

Za razliku od većine sisarskih gena, 3' kraj gena za protrombin ima nekanonsku organizaciju. Shematski prikaz ove organizacije dat je na slici 7. Specifičnost ovakve organizacije se ogleda u aktivnom pomoćnom USE elementu kojim se nadomešćuje smanjena efikasnost glavnih elemenata u procesu obrade 3' kraja u koje spadaju mesto iskrajanja i DSE regulatorni element [157].

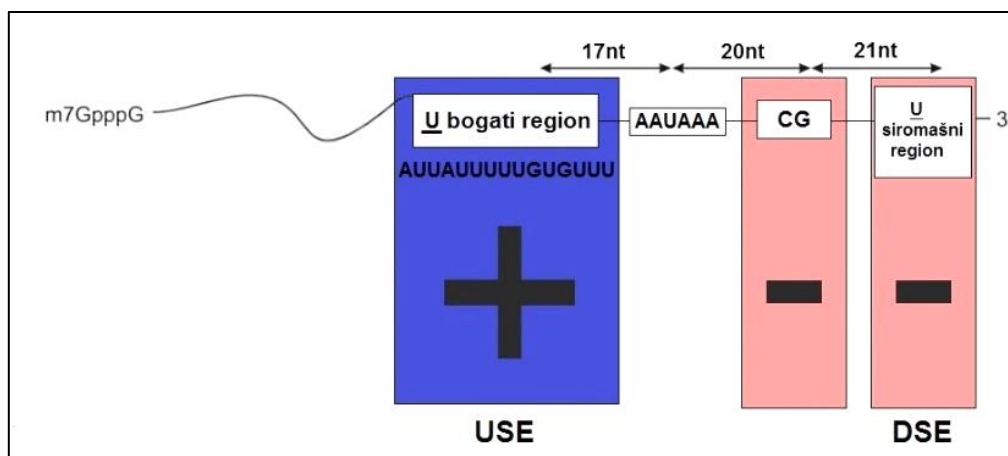
U 3' kraju gena za protrombin, USE element ima funkciju pozitivnog regulatora procesa obrade primarnog transkripta [157,158]. Ovaj element, dužine 15 nukleotida, predstavlja region bogat uridinima koji je pozicioniran 17 bp uzvodno od poliadenilacionog signala u sekvenci iRNK. U okviru USE elementa nalazi se konzervisana sekvencija od 9 nukleotida koja se sastoji od dva motiva, UAUUUUU i UUUUGU, koja se međusobno preklapaju. Izostanak nekog od navedenih motiva remeti proces obrade 3' kraja iRNK za protrombin. U *in vitro* eksperimentima je pokazano da je za funkcionalnost USE elementa ključno očuvanje sekvence i da svako povećanje ili smanjenje broja uridina u ovom elementu remeti obradu i formiranje 3' kraja iRNK. Promena položaja USE elementa u odnosu na poliadenilacioni signal odražava se na brzinu obrade 3' kraja. Pomeranje ovog elementa nizvodno utiče na povećanje efikasnosti procesovanja, dok suprotno tome, ukoliko je element postavljen uzvodnije gubi svoju funkcionalnost i izostaje obrada 3' kraja. Ovo ukazuje da je veća efikasnost obrade 3' kraja iRNK za protrombin postignuta evolucijom optimalne

sekvence i pozicije USE elementa. U okviru USE sekvence nalaze se vezujuća mesta za *trans*-faktore koji učestvuju u iskrajanju i poliadenilaciji primarnog transkripta. U faktore iskrajanja koji se vezuju za pre-iRNK za protrombin spadaju U2AF35 (engl. *splicing factor U2AF 35-kDa subunit*), U2AF65 (engl. *splicing factor U2AF 65-kDa subunit*) i hnRNPI/PTB (engl. *heterogenous nuclear ribonuclearprotein I/polypyrimidine tract-binding protein 1*). Drugu klasu vezujućih proteina USE elementa čine subjedinice CPSF i CstF faktora koji pripadaju poliadenilacionoj mašineriji. Ove dve klase proteina utiču pozitivno jedna na drugu, pa je tako pokazano da U2AF65 faktor interaguje sa PAP i CF I_m, čime su procesi iskrajanja poslednjeg egzona i obrade 3' kraja iRNK za protrombin blisko povezani i regulisani USE elementom [158]. Pored toga, USE element može imati značajnu ulogu u regulaciji ekspresije gena za protrombin u odgovoru ćelije na stresne stimuluse. U fiziološkim uslovima aktivnost USE elementa je blokirana pomoću FBP2 i FBP3 inhibitornih proteina. Međutim, u uslovima stresa, u ćeliji se aktivira p38MAPK kinaza koja indirektno, preko fosforilacije FBP2 i FBP3 proteina i njihove disocijacije sa USE elementa, omogućava vezivanje U2AF35, U2AF65 i hnRNPI/PTB faktora [159].

Za razliku od „klasične“ strukture većine eukariotskih iRNK, koje na mestu isecanja poseduju CA dinukleotid, u *wild-type* sekvenci iRNK za protrombin, mesto isecanja predstavlja dinukleotid CG [158]. Zamenom drugog nukleotida na mestu iskrajanja i poređenjem njihove efikasnosti u *in vitro* uslovima, pokazano je da ukoliko se G nukleotid nalazi na toj poziciji, efikasnost isecanja je značajno manja u poređenju sa rezultatima dobijenim za A, C, T nukleotide [124,125]. Ukoliko se G nukleotid na mestu isecanja u genu za protrombin zameni bilo kojim drugim nukleotidom, stepen ekspresije protrombina se povećava [157].

U 3' FR regionu gena za protrombin nalazi se DSE regulatorni element koji je u odnosu na većinu sisarskih gena karakterističan po maloj zastupljenosti timina, odnosno uridina u molekulu pre-iRNK. Usled toga, tokom procesa obrade primarnog transkripta sposobnost DSE elementa da veže CstF faktor je smanjena, zbog čega se ovaj element smatra negativnim regulatorom ekspresije gena za protrombin. U *in vitro* eksperimentima je pokazano da obogaćivanje ovog regiona uridinom, povećava njegovu efikasnost u obradi primarnog transkripta [157]. Na osnovu svega navedenog, predložen je model po kome efikasnost iskrajanja i obrada 3' kraja primarnog transkripta

protrombina zavise od ravnoteže između USE elementa kao pozitivnog regulatora i mesta iskrajanja i DSE elementa kao negativnog regulatora [160].



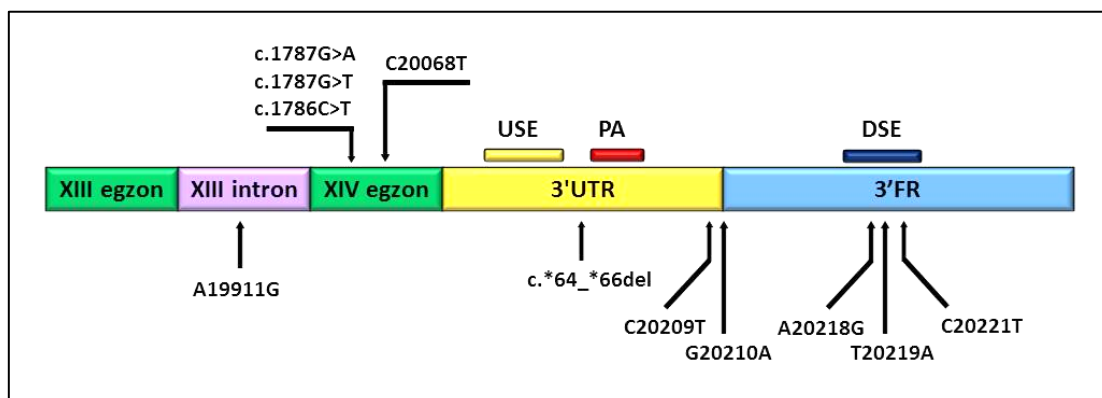
Slika 7 Prikaz organizacije 3' kraja iRNK za protrombin. nt-nukleotid; USE-uzvodni regulatorni element (engl. *upstream sequence element*); DSE-nizvodni regulatorni element (engl. *downstream sequence element*); U-uridin; Preuzeto i modifikovano iz Danckwardt i saradnici, 2006 [160]

1.2.4 Genske varijante u 3' kraju gena za protrombin i njihova uloga u patogenezi trombofilije

Ekspresija gena za protrombin regulisana je ravnotežom između pozitivnih i negativnih regulatora u 3' kraju ovog gena koji ima specifičnu nekanonsku arhitekturu. Posledica toga je prisutvo elemenata u *wild-type* sekvenci gena za protrombin koji imaju smanjenu efikasnost što čini ove regione „ranjivim“, odnosno podložnim za nastanak funkcionalnih genskih varijanti koje utiču na povećanje ekspresije protrombina (engl. *gain-of function*) [157]. Genske varijante, opisane u ovom regionu, prikazane su na slici 8.

Poort i saradnici su kod pacijenata sa trombofilijom prvi put opisali **FII G20210A** varijantu u 3' kraju gena za protrombin čije prisustvo utiče na povećanje ekspresije gena. Njen značaj kao faktora rizika za trombofiliju opisan je u poglavlju 1.1.4. Ova varijanta dovodi do zamene G u A na poziciji isecanja primarnog transkripta [106], tako da je manje efikasno CG mesto koje je prisutno u *wild-type* 3' kraju zamenjeno efikasnijim CA dinukleotidom. Posledica ovakve zamene je bolje prepoznavanje mesta isecanja od strane mašinerije koja vrši obradu 3' kraja. Usled toga,

pospešen je proces iskrajanja i poliadenilacije pre-iRNK, što se dalje odražava na veću količinu zrele iRNK i sintezu proteinskog produkta protrombina [160].



Slika 8 Shematski prikaz genskih varijanti u 3' kraju gena za protrombin. USE-uzvodni regulatorni element; PA-poliadenilacioni signal; DSE-nizvodni regulatorni element; UTR-netranslatirajući region; FR-*flanking region*

U regionu iskrajanja, opisana je takode **FII C20209T** (rs72550707) varijanta koja je prvi put detektovana u afro-američkoj populaciji kod pacijenata sa trombozama dubokih vena ili moždanim udarom [161]. Nekoliko slučajeva je kasnije prijavljeno i u beloj populaciji, među kojima jedna pacijentkinja sa ponovljenim spontanim pobačajima, heterozigotni nosilac ove varijante, sa normalnim nivoom protrombina [162]. Učestalost FII C20209T varijante u afro-američkoj populaciji je oko 1%, dok je u populaciji belaca veoma retka sa učestalošću manjom od 1% [163]. Iako je opisana kod pacijenata sa trombotičkim manifestacijama, njen mehanizam i povezanost sa trombofilijom nisu u potpunosti rasvetljeni. *In vitro* funkcionalni esaji dali su oprečne rezultate. Van der Putten i saradnici su pokazali da C20209T varijanta dovodi do blagog smanjenja ekspresije [164]. Suprotno tome, prema rezultatima istraživača iz Hajdelberga ova varijanta dovodi do povećane ekspresije gena [165].

U okviru DSE elementa 3' kraja gena za protrombin opisano je više genskih varijanti: FII A20218G, FII T20219A i FII C20221T [166-168]. Varijanta **FII A20218G** (referentna sekvenca NM_000506.4; c.*105A>G) je detektovana kod dve pacijentkinje sa trombozama, kod kojih su bili prisutni i drugi protrombotički faktori rizika, tako da uloga FII A20218G varijante u etiologiji tromboza nije jasna [166,167]. Varijanta **FII T20219A** (referentna sekvenca NM_000506.4; c.*106T>A) je prvi put

detektovana kod pacijentkinje koja je nakon porođaja razvila trombozu dubokih vena [167]. Varijanta **FII C20221T** (rs562369397) je detektovana u tri studije kod pojedinačnih pacijenata sa trombotičkim manifestacijama [168-170]. *In vitro* studije su pokazale da mehanizam FII C20221T varijante, dodatkom jednog timina umesto citozina utiče na veću efikasnost DSE elementa i time povećava ekspresiju gena za protrombin [157].

U poslednjem intronu gena za protrombin opisana je **FII A19911G** (rs3136516) varijanta koja takođe dovodi do povišenog nivoa protrombina, ali to povećanje nije statistički značajno, zbog čega se smatra blagim faktorom rizika za nastanak tromboza [171]. Međutim, ukoliko su prisutne FII G20210A i FV Leiden mutacije, FII A19911G varijanta može predstavljati dodatni faktor rizika [171-173]. S obzirom da poslednji intron može da utiče na efikasnost obrade 3' kraja, pretpostavlja se da bi prisustvo GGG motiva, koji se javlja u slučaju zamene adenozina na poziciji 19911 guanozinom, povećalo efikasnost iskrajanja pre-iRNK [174,175].

Poslednji egzon gena za protrombin ima značajnu ulogu tokom procesa obrade 3' kraja primarnog transkripta [158]. Takođe, ovaj region je sastavni deo katalitičkog domena trombina koji je značajan za interakciju sa Na⁺ i antitrombinom [56]. Zbog toga se smatra da bi prisustvo genskih varijanti u ovom regionu moglo imati značajan uticaj na nivo ekspresije i funkciju protrombina.

U poslednjem egzonu je opisana **C20068T** sinonimna varijanta koja dovodi do povišene ekspresije protrombina. Njena učestalost je do sada određena samo u srpskoj populaciji, gde je detektovana kod 0,52% zdravih ispitanika i 3,39% pacijenata sa trombozama. U plazmi pacijenata koji su nosioci ove varijante detektovana je povećana količina protrombina. To ukazuje, sa statistički značajno povećanom učestalosti kod pacijenata, da C20068T varijanta može predstavljati faktor rizika, ali su potrebne studije u drugim populacijama kako bi se rasvetlila njena uloga u patogenezi trombofilije [176].

Nedavno je u japanskoj populaciji detektovana varijanta u poslednjem egzonu gena za protrombin koja je povezana sa hiperkoagulacijom. Uočena je kod pacijentkinje koja je imala tromboze u odsustvu drugih protrombotičkih faktora rizika. Ova *missense* varijanta dovodi do nukleotidne zamene guanina sa timinom (c.1787G>T), što se na nivou proteina manifestuje aminokiselinskom zamenom arginina na poziciji 596 leucinom (Protrombin Yukuhashi Arg596Leu). Prisustvo ove varijante remeti vezivanje

antitrombina za trombin (rezistencije na antitrombin) [177]. Pozicija Arg596 (Arg221 po himotripsinogen nomenklaturi [178]) je takođe značajna za elektrostatičke interakcije između Na^+ i trombina [56,177].

U Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), nedavno je opisana **FIIc.1787G>A** varijanta (Protrombin Beograd) koja dovodi do aminokiselinske zamene arginina glutaminom (Arg596Glu), na istoj poziciji kao Yukuhashi varijanta. Kod nosilaca FIIc.1787G>A je takođe utvrđena rezistencija na antitrombin, ali mehanizam ove genske varijante još uvek nije rasvetljen [179].

U Laboratoriji za molekularnu biologiju, IMGGI, takođe je opisana FIIc.*64_*66del varijanta kod pacijentkinje sa plućnim embolizmom [180]. Varijanta FIIc.*64_*66del se nalazi u 3' UTR-u gena za protrombin i predstavlja deleciju tri adenzina u regionu koji se nalazi između poliadenilacionog signala i mesta sečenja primarnog transkripta. Mehanizam ove varijante i njen potencijalni uticaj na ekspresiju gena za protrombin za sada su potpuno nerasvetljeni.

Cilj

Kao posledica nekanonske organizacije 3' kraja gena za protrombin, ovaj region je podložan nastanku genskih varijanti koje mogu imati značajnu ulogu u regulaciji ekspresije i funkcije protrombina. Većina do sada opisanih genskih varijanti u ovom regionu je povezana sa povišenom ekspresijom protrombina, koja može dovesti do poremećaja hemostazne ravnoteže u smeru hiperkoagulacije i povećane sklonosti ka trombozama, odnosno trombofilije. U Laboratoriji za molekularnu biologiju, IMGGI, nedavno su u 3' kraju gena za protrombin opisane FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genske varijante, čiji mehanizam do sada nije rasvetljen.

Varijanta FIIc.1787G>A je lokalizovana u poslednjem egzonu koji je značajan za nativnu konformaciju i funkciju protrombina. Varijanta FIIc.*64_*66del se nalazi u 3' UTR-u gena koji je veoma važan za regulaciju ekspresije gena. Na osnovu lokalizacije navedenih varijanti u različitim strukturnim elementima gena, pretpostavlja se da su mehanizmi njihovog delovanja različiti.

Ova studija je usmerena na rasvetljavanje mehanizama navedenih varijanti i ispitivanje njihove povezanosti sa pojavom trombofilije. U skladu sa tim, ciljevi ove doktorske disertacije su definisani na sledeći način:

1. Određivanje učestalosti genskih varijanti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del kod pacijenata sa trombofilijom i u odgovarajućoj kontrolnoj grupi ispitanika u srpskoj populaciji.
2. Određivanje uticaja FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti na raspoloživi nivo i funkciju protrombina *ex vivo*.
3. *In vitro* ispitivanje mehanizma FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti kroz određivanje njihovog uticaja na profil ekspresije protrombina.
4. Ispitivanje značaja FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti kao potencijalnih markera trombofilije.

Materijal i metode

3.1 Ispitanici

U studiju određivanja učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genskih varijanti je bilo uključeno ukupno 603 ispitanika, od toga 353 pacijenta i 250 ispitanika kontrolne grupe.

Pacijenti su odabrani pretraživanjem podataka iz biorepozitorijuma za trombofilije Laboratorije za molekularnu biologiju, IMGGI. Biorepozitorijum sadrži više od 4500 uzoraka pacijenata sa različitim trombotičkim manifestacijama koji su nakon biohemijskih testova za trombofiliju upućeni na IMGGI radi genetičkog testiranja na prisustvo FII G20210A i FV Leiden mutacije. Kriterijumi za uključivanje u studiju podrazumevali su objektivno dijagnostikovanu, najmanje jednu, epizodu tromboze dubokih vena, plućnog embolizma ili spontanog pobačaja. Iz asocijativne studije su isključeni pacijenti sa malignitetom i pacijenti sa deficijencijom inhibitora koagulacije-antitrombina, proteina C i proteina S, kao i ispitanici koji su u međusobnom srodstvu. Od ovako selektovana 353 pacijenta, 94 je bolovalo od tromboze dubokih vena, 104 je imalo izolovani plućni embolizam, 49 pacijenta je imalo kombinovane trombotičke poremećaje, dok je grupu sa spontanim pobačajima činilo 106 žena. Kontrolnu grupu je činilo 250 zdravih ispitanika oba pola, sa geografskog područja Srbije. Kontrolna grupa za pacijentkinje sa spontanim pobačajima je formirana odabirom 154 žene iz opšte kontrolne grupe, po kriterijumu da su po starosti odgovarale pacijentkinjama, a nisu imale istoriju spontanog pobačaja.

U deo ove studije koji je obuhvatio *ex vivo* ispitivanja, uključeni su i članovi porodica nosilaca FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti. U ispitivanje FIIc.1787G>A varijante bilo je uključeno 19 članova jedne porodice, dok je studija o FIIc.*64_*66del varijanti obuhvatila po 4 člana iz tri različite porodice.

Za analize u okviru ove studije korišćeni su uzorci DNK i plazme ispitanika. Za izolaciju DNK korišćeni su limfociti periferne krvi i ćelije bukalne sluzokože. Krv je uzimana sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, dok su uzorci bukalne sluzokože uzimani sterilnim štapićem za bris. Izolovana DNK je čuvana na +4°C. Plazma pacijenata je izdvojena centrifugiranjem uzoraka pune krvi uzete sa Na-citratom kao antikoagulansom, 10 min na 3000 rpm (engl. *rotations per minute*) i čuvana na -80°C do analize. Ova studija je odobrena od strane Etičkog odbora IMGGI (O-EO-004/2015/1) i od svih ispitanika uključenih u studiju dobijena je pisana saglasnost.

3.2 Materijal

3.2.1 Ćelijske linije

Za funkcionalne analize c.1787G>A i c.*64_*66del varijanti u genu za protrombin korišćene su komercijalno dostupne permanentne ćelijske linije: Cos-7 (ATCC[®] CRL-1651[™]) i HepG2 (ATCC[®] HB-8065[™]). Permanentna ćelijska linija Cos-7 je nastala transformacijom ćelijske linije CV-1 (ATCC[®] CCL-70[™]), koja je dobijena od fibroblasta izolovanih iz bubrega afričkog zelenog majmuna, pomoću SV-40 virusa. HepG2 permanentna ćelijska linija je dobijena imortalizacijom epitelnih neoplastično transformisanih ćelija jetre poreklom od muške osobe starosti 15 godina koja je bolovala od hepatocelularnog karcinoma.

3.2.2 Bakterijski sojevi

U studiji je korišćen DH5 α *E. coli* soj kompetentnih ćelija (genotip: *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Prisustvo *lacZ* Δ M15 omogućava plavo/belu selekciju kolonija pomoću X-gala ili Bluo-gala, dok *recA1* obezbeđuje povećanu stabilnost inserta i sprečava neželjenu rekombinaciju, a *endA1* utiče na povećan prinos i kvalitet plazmidne DNK.

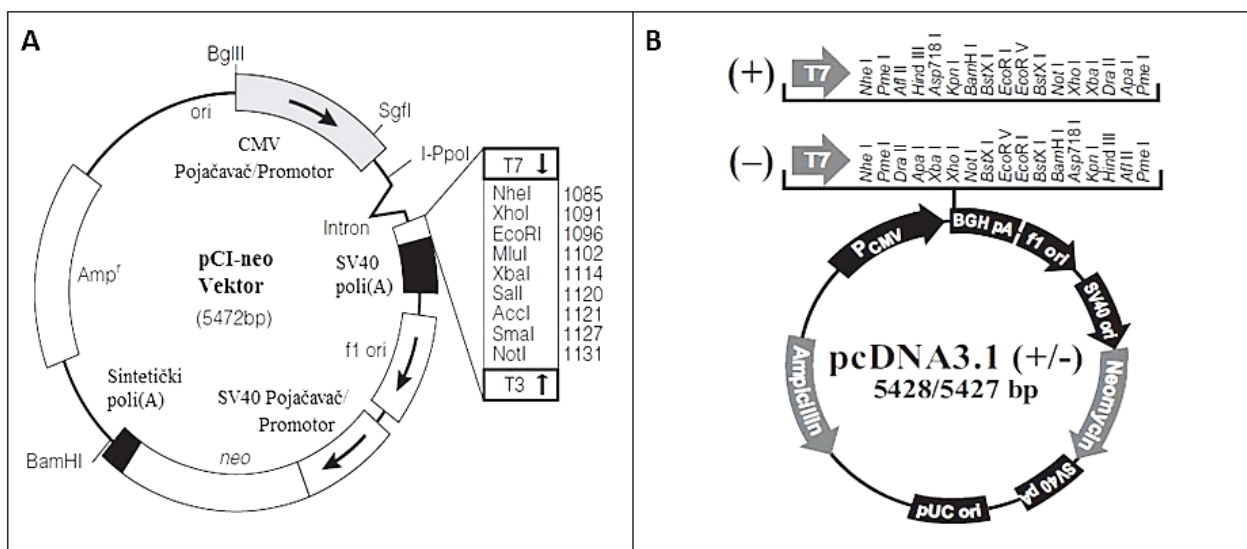
3.2.3 Plazmidni vektori

U ovoj studiji korišćeni su ekspresioni vektori pCI-neo (*Promega*) i pcDNA3.1(+) (*Invitrogen*).

Vektor pCI-neo, veličine 5472 bp, sadrži citomegalovirusni promotor, čime je omogućena konstitutivna ekspresija ukloniranog fragmenta u sisarskim ćelijama. Selekcija uspešno transfekovanih ćelija omogućena je genom za neomicin fosfotransferazu koji se nalazi na ovom vektoru i koji obezbeđuje otpornost na antibiotik geneticin (G-418). Vektor poseduje i virusni SV40 signal za poliadenilaciju, koji utiče na povećanu efikasnost obrade i translacije kloniranih DNK fragmenata. Za propagaciju u prokariotskim ćelijama vektor sadrži gen za rezistenciju na ampicilin i "origin" replikacije poreklom od bakteriofaga *fl*. Cirkularna mapa pCI-neo vektora je prikazana na slici 9A.

Vektor pcDNA3.1(+), veličine 5428 bp, takođe poseduje citomegalovirusni promotor koji obezbeđuje efikasnu ekspresiju u različitim sisarskim ćelijama (Slika 9B). Kao i pCI-neo vektor, sadrži gen za rezistenciju na ampicilin za selekciju u bakterijskim

sojevima i na antibiotik G418 za selekciju u sisarskim ćelijama, kao i virusni SV40 signal za poliadenilaciju.



Slika 9. Cirkularna mapa **A)** pCI-neo vektora; Preuzeto i modifikovano sa www.promega.com; **B)** pcDNA3.1(+) vektora; Preuzeto i modifikovano sa www.invitrogen.com

3.2.4 Antitela

Spisak antitela korišćenih u ovoj studiji dat je u Tabeli 1.

Tabela 1 Pregled korišćenih primarnih i sekundarnih antitela

Antitelo	Poreklo/tip antitela	Proizvođač (kataloški broj)
Anti-humani protrombin/trombin	Kozje poliklonalno	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> (sc-16972)
Anti-humani alpha-1-antitrypsin	Kozje poliklonalno	<i>Abcam</i> (ab7633)
Anti-kozje-IgG-HRP*	Zečje poliklonalno	<i>Sigma-Aldrich</i> (A5420)

*Antitelo konjugovano sa peroksidazom rena, HRP (engl. *Horseradish peroxidase*)

3.2.5 Oligonukleotidi

Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida dati su u Tabeli 2.

Tabela 2 Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida

Naziv	Sekvenca	Eksperiment
FII _s	5'-ATGTGACCTTGAACCTGACT-3'	1
FII _{sb}	5'-CTACCTATGTCTTCCAGTAA-3'	1
FII _{psm3}	5'-GAAAGAATTATTTTTGTGTTTGTA-3'	1
Pt2	5'-AGTTACGAGGGTCACGATAAG-3'	1, 2
FII13a	5'-GGAAACGAGGGGATGCCTGT-3'	2
A6b	5'-CACTCTCCTTTCTACCGTCC-3'	2
D3	5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'	2
BGN-R	5'-TTCAAAGCCACTGTTCTCCAG-3'	2
Pt1	5'-GGATGGGAAATATGGCTTCTAC-3'	2
RT418a	5'-CCGGTCTTGTCGATCAG-3'	3
RT418b	5'-CTTGACAAGCGGTCCGAGT-3'	3
G418-proba	5'-VIC-ATGCTCTTCGTCAGAT-MGBNFQ-3'	3
A5a	5'-GGCTCCTGGAACCAATCCCG-3'	4, 5
A8b	5'-CACAAAGATTTTGATACCAA-3'	4, 5
FII _{wtdel3A}	5'-TATTTTTGTGTTTCTAAAATATGGTTCCCAATAA-3'	4, 5, 6
FII _{del3A}	5'-TATTTTTGTGTTTCTACTATGGTTCCCAATAA-3'	4, 5, 6
Pt1 FAM	5'-FAM-GGATGGGAAATATGGCTTCTAC-3'	7
Pt2 FAM	5'-AGTTACGAGGGTCACGATAAG-FAM-3'	7

1-PCR-RFLP, 2- Sekvenciranje DNK, 3- PCR u realnom vremenu, 4-DNK-protein interakcije, 5-DNK-RNK interakcije, 6- *In situ* mutagenaza, 7- Fragment analiza

3.3 Metode

3.3.1 Metode za detekciju FIIC.1787G>A i FIIC.*64_*66del varijanti

Genske varijante FIIC.1787G>A i FIIC.*64_*66del su kod pacijenata i ispitanika kontrolne grupe detektovane korišćenjem PCR-RFLP metode (engl. *Polimerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) i sekvenciranjem DNK.

Izolacija DNK iz periferne krvi

[protokol za *QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN*]

U mikrotube je najpre dodavano 200 µL uzorka periferne krvi, zatim 20 µL *QIAGEN* proteinaze K i 200 µL pufera AL koji omogućava liziranje ćelija. Smeša je vorteksovana 15 s, a potom inkubirana 10 min na 56°C kako bi došlo do lize ćelija i oslobađanja DNK od proteina. Nakon toga, dodavano je 200 µL etanola, smeša je vorteksovana 15 s, a zatim nanošena na *QIAamp* kolonu i centrifugirana 1 min na 8000 rpm. Dodavanjem 500 µL pufera AW1 i centrifugiranjem 1 min na 8000 rpm, prečišćavana je DNK koja se vezala za kolonu. U sledećem koraku, nastavljeno je prečišćavanje dodavanjem pufera AW2 i centrifugiranjem 3 min na 13000 rpm. Nakon toga, kolona je prebacivana u novu mikrotubu i ponovo centrifugirana 1 min na istoj brzini, kako bi se uklonili tragovi pufera. U poslednjem koraku kolona je prebacivana u novu mikrotubu. Dodavanjem 200 µL sterilne vode, inkubiranjem 1 min na sobnoj temperaturi i centrifugiranjem 1 min na 8000 rpm DNK je spirana sa kolone.

Izolacija DNK iz ćelija bukalne sluzokože

[protokol za *QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN*]

Deo štapića za uzimanje bukalnog brisa sa vaticom, na kojoj se nalaze ćelije bukalne sluzokože, stavljan je u mikrotubu. U nju je dodavano najpre 400 µL 1xPBS pufera (137 mM NaCl; 3,375 mM KCl; 1,76 mM KH₂PO₄; 10 mM Na₂HPO₄; pH 7,5), a potom 20 µL *QIAGEN* proteinaze K i 400 µL AL pufera za lizu. Smeša je vorteksovana 15 s, potom inkubirana 10 min na 56°C i nakon dodavanja 400 µL etanola ponovo vorteksovana. Na kolonu je naneta maksimalna zapremina smeše i ona je centrifugirana 1 min na 8000 rpm. Eluat je uklonjen i ostatak smeše je nanošen na istu kolonu uz ponovno centrifugiranje. U sledećem koraku je dodavano 500 µL pufera AW1 i kolona je centrifugirana 1 min na 8000 rpm. Nakon odbacivanja eluata, dodavano je 500 µL

pufera AW2 uz ponovno centrifugiranje 3 min na 13000 rpm. Višak pufera je uklonjen prebacivanjem kolone u sterilnu mikrotubu i ponovnim centrifugiranjem 1 min na istoj brzini. Kolona je prebacivana u novu mikrotubu i nakon dodavanja 200 μ L sterilne vode inkubirana 1 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana 1 min na 8000 rpm, čime je DNK sprana sa kolone.

PCR-RFLP metoda

Prema referencama [181,182]

PCR-RFLP (engl. *Polimerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) je metoda koja se koristi za detekciju genskih varijanti. Zasniva se na tome da postojanje promene u sekvenci kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja od strane nekog restrikcionog enzima. Na taj način, umnoženi DNK fragmenti nakon delovanja restrikcionog enzima imaju različite dužine u zavisnosti od prisustva/odsustva genske varijante. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*), omogućava umnožavanje željenog fragmenta DNK definisanog graničnicima koji su komplementarni krajevima tog fragmenta. Metoda PCR-PSM (engl. *Polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis*) se zasniva na mogućnosti *Taq* polimeraze da uvede promenu u sekvenci DNK tokom reakcije lančanog umnožavanja usled nepotpune komplementarnosti jednog od graničnika sa DNK matricom. Time je omogućeno stvaranje novog restrikcionog mesta u umnoženom fragmentu, koje je zavisno od prisustva/odsustva genske varijante koja se analizira. PCR smeše u finalnoj zapremini od 25 μ L , sadržale su:

200-500ng DNK ili 1 μ L pune krvi	
10xPCR pufer (<i>Qiagen</i>)	2,5 μ L
25mM MgCl ₂	2,5 μ L
2mM dNTP-ovi	2,5 μ L
graničnici (10pmol/ μ L svaki)	0,5 μ L
5 U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza (<i>Qiagen</i>)	0,2 μ L

U Tabeli 3 navedeni su parovi graničnika i temperature vezivanja graničnika korišćenih u detekciji FIIC.1787G>A i FIIC.*64_*66del varijanti.

Tabela 3 Parovi graničnika i temperature vezivanja graničnika u PCR reakciji za detekciju FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti

genska varijanta	naziv graničnika	temperatura vezivanja graničnika (T _{VG})
c.1787G>A	FII _s	56°C
	FII _{sb}	
c.*64_*66del	FII _{psm3}	58°C
	Pt2	

Temperaturni profil PCR reakcije iz DNK:

95°C/5 min

(94°C/30 s, T_{VG}/30 s, 72°C/30 s) x 35 ciklusa

72°C/10 min

Temperaturni profil PCR reakcije, direktno iz pune krvi, bio je:

(97°C/2 min, 55°C/3 min) x 3 ciklusa

95°C/5 min

(94°C/30 s, T_{VG}/30 s, 72°C/30 s) x 35 ciklusa

72°C/10 min

Umnoženi PCR fragmenti su proveravani na 2% agaroznom gelu, a potom podvrgnuti digestiji odgovarajućim restrikcionim enzimima. Sastavi smeša za digestiju, finalne zapremine 25 µL, i uslovi digestija dati su u Tabeli 4.

Tabela 4 Sastavi reakcionih smeša i uslovi digestije restrikcionim enzimima

	Genska varijanta	
	c.1787G>A	c.*64_*66del
PCR produkt	15 µL	15 µL
10x pufer	Tango (<i>Fermentas</i>) 2,5 µL	Tango (<i>Fermentas</i>) 2,5 µL
restrikcioni enzim	<i>HpaII</i> 10 U/µL (<i>Fermentas</i>) 0,5 µL	<i>RsaI</i> 10 U/µL (<i>Fermentas</i>) 0,5 µL
uslovi digestije	37°C/16 h	37°C/16 h

Produkti digestije DNK razdvajani su na osnovu veličine fragmenata vertikalnom elektroforezom na 10% poliakrilamidnim gelovima. DNK je vizuelizovana bojenjem gelova solima srebra.

Analiza DNK na agaroznom gelu

Prema referenci [183]

Analiza prinosa PCR reakcije je vršena na 2% agaroznom gelu horizontalnom elektroforezom. Vizuelizacija DNK omogućena je dodavanjem etidijum bromida (5 µg/mL) u gel pre polimerizacije. Elektroforeza je vršena u TAE puferu (40 mM Tris; 20 mM sirćetna kiselina; 1 mM Na₂EDTA), pri naponu od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom na CCD kameri sa *BioDocAnalyze* sistemom. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni DNK markeri (*NE BioLabs*).

Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

Prema referenci [183]

Fragmenti DNK su razdvajani na nedenaturišućim 10% poliakrilamidnim gelovima (9,7% akrilamid; 0,3% N,N-metilenbisakrilamid; 100 mM Tris; 83 mM borna kiselina; 1 mM EDTA pH 8; 0,1% amonijumpersulfat; 0,01% TEMED). Elektroforeza je vršena pri naponu od 10 V/cm u 1xTBE puferu (100 mM Tris; 83 mM borna kiselina; 1 mM EDTA pH 8). Poliakrilamidni gelovi su nakon elektroforeze bojeni solima srebra.

Vizuelizacija DNK u poliakrilamidnim gelovima srebro-nitratom

Prema referenci [184]

Vizuelizacija DNK fragmenata u poliakrilamidnim gelovima omogućena je bojenjem srebro-nitratom, usled interkaliranja soli srebra u molekul DNK. Poliakrilamidni gelovi su po završetku elektroforeze fiksirani 20 min u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su inkubirani 10 min u 0,1% rastvoru srebro-nitrata. Višak rastvora srebro-nitrata uklanja se ispiranjem u destilovanoj vodi dva puta. Vizuelizacija dobijenih traka je vršena inkubiranjem gelova 20 min u rastvoru 1,5% natrijumhidroksida, 0,01% natrijumborhidrida i 0,048% formaldehida.

Sekvenciranje DNK

[protokol za *BigDye Terminator Ready Reaction Kit- Applied Biosystems*]

Metoda sekvenciranja omogućava određivanje redosleda nukleotida u DNK sekvenci. Automatsko direktno sekvenciranje rađeno je po Sangerovoj metodi [185] koja se zasniva na umnožavanju ciljnog DNK fragmenta u prisustvu jednog graničnika i smeše dezoksiribonukleotida i didezoksiribonukleotida. Reakcija sinteze se zaustavlja ugrađivanjem didezoksiribonukleotida koji ne poseduju 3'-OH grupu u molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK, tako da se kao produkt reakcije sekvenciranja dobija niz jednolančanih fragmenata čija se dužina razlikuje za jedan nukleotid. Svaki od četiri didezoksiribonukleotida je obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime se reakcija sekvenciranja i detekcija produkata vrše u jednoj reakciji. Produkti reakcije sekvenciranja su analizirani kapilarnom elektroforezom na aparatu *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

Fragment dužine 715 bp koji obuhvata poslednji intron, poslednji egzon, 3' UTR i 3' FR gena za protrombin je umnožavan PCR metodom, pomoću graničnika FII13a i A6b. PCR smeša finalne zapremine 25 μ L sadržala je:

200-500ng DNK ili 1 μ L pune krvi	
10x PCR pufer (<i>Qiagen</i>)	2,5 μ L
25 mM MgCl ₂	2,5 μ L
2 mM dNTP-ovi	2,5 μ L
10 pmol/ μ L FII13a	0,5 μ L
10 pmol/ μ L A6b	0,5 μ L
5 U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza (<i>Qiagen</i>)	0,2 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije, iz DNK, bio je:

94°C/5 min

(94°C/45 s, 61°C/45 s, 72°C/45 s) x 35 ciklusa

72°C/10 min

Temperaturni profil PCR reakcije, iz pune krvi, bio je:

(97°C/2 min, 55°C/3 min) x 3 ciklusa

95°C/5 min

(94°C/1 min, 61°C/1 min, 72°C/1 min) x 30 ciklusa

72°C/10 min

Nakon provere PCR produkata na 2% agaroznom gelu, vršena je reakcija sekvenciranja pomoću komercijalnog *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*. Kao matrica u reakciji sekvenciranja korišćen je dvolančani PCR produkt dobijen u prethodnoj reakciji umnožavanja. Smeša za sekvenciranje, finalne zapremine 8 µL, sadržala je:

10 ng PCR produkta

3,2 pmol D3/Pt2 graničnika

2 µL *Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)*

Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje:

96°C/1 min

(96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min) x25 ciklusa

4°C/ ∞

Produkti reakcije sekvenciranja su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U 8 µL smeše dodavano je po 40 µL 0,1 M Na-acetata pH 5,2 rastvorenog u etanolu i centrifugirano 10 min na 13000 rpm, nakon čega je uklonjen supernatant. Talog je zatim ispiran dva puta sa po 200 µL 70% etanola, uz centrifugiranje 10 min na 13000 rpm i odlivanje supernatanta, a potom osušen. Pre nanošenja na sekvencer, talog je rastvaran u 25 µL *HiDi Formamide (Applied Biosystems)* i celokupna zapremina je naneta na aparat za kapilarnu elektroforezu *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems)*.

Statistička obrada podataka

[SPSS 13.0]

Za statističku obradu podataka korišćeni su: za diskontinuirane varijable *Fisher's exact test*, za kontinuirane varijable sa normalnom distribucijom *Student t-test*, a za kontinuirane varijable bez normalne distribucije *Mann Whitney U test*. *Shapiro-Wilk test* je korišćen za ispitivanje normalnosti distribucije kontinuiranih varijabli. U studiji asocijacije ispitivanih genskih varijanti sa trombotičkim fenotipom određivani su OR (engl. *Odds Ratio*) i 95%CI (engl. *Confidence Interval*). Kao mera statističke značajnosti uzimana je P vrednost manja od 0,05. Statistička obrada podataka urađena je programskim paketom *SPSS*, verzija 13.0 (IBM SPSS Statistics, Chicago, USA). Za određivanje Hardi-Vajnbergove ravnoteže korišćen je Hi-kvadrat test nezavisnosti (χ^2 test) u programu *Hardy-Weinberg equilibrium calculator*.

3.3.2 Metode za *ex vivo* analizu genskih varijanti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del

Ex vivo analize su korišćenje za ispitivanje uticaja FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti na promene u aktivnosti, količini i funkcionalnosti protrombina u plazmi ispitanika. Promene u funkcionalnosti protrombina ispitivane su korišćenjem testa generacije trombina i testova rezistencije trombina na antitrombin i trombomodulin.

Test aktivnosti protrombina u humanoj plazmi

[protokol za *HemosIL PT-Fibrinogen HS Plus test- Instrumentation Laboratory*]

Aktivnost protrombina je ispitivana korišćenjem jednostepenog koagulacionog testa. Princip ove metode se zasniva na poređenju vremena potrebnog ispitivanoj i standardnoj plazmi da dovedu do stvaranja fibrina u smeši sa plazmom deficijentnom za protrombin (*HemosIL Factor II Deficient Plasma*) [186]. Kao agens za aktiviranje protrombina u trombin korišćen je tromboplastin sa kalcijum hloridom (*HemosIL PT-Fibrinogen HS Plus*). Aktivnost protrombina je merena na aparatu *IL Coagulometer ACL 7000 (Instrumentation Laboratory)*. Test aktivnosti protrombina je rađen u saradnji sa Klinikom za hematologiju, Kliničkog centra Srbije.

Kvantifikacija količine protrombina u humanoj plazmi

Prema referenci [187]

Western blot metoda obuhvata: razdvajanje proteina na osnovu njihove molekulske mase na denaturišućem dvokomponentnom poliakrilamidnom gelu-SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), transfer razdvojenih proteina sa gela na membranu i imunodetekciju proteina na membrani. Ova metoda je korišćena za relativnu kvantifikaciju količine protrombina u plazmi ispitanika.

Uzorci plazme su najpre rastvoreni u sterilnoj vodi u odnosu 1:20, pomešani sa puferom za nanošenje uzoraka (50 mM Tris, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,1% bromfenolplavo), a zatim denaturisani kuvanjem 5 min na 95°C. Pripremljeni uzorci su nanošeni na dvokomponentni gel, koji se sastoji iz gela za koncentrovanje, koji omogućava homogenizaciju uzoraka i gela za razdvajanje u kome se proteini iz uzorka razdvajaju po svojoj masi. Sastav gela za razdvajanje bio je: 12% poliakrilamid, 375 mM Tris, pH 8,8 i 0,1% SDS, 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Sastav gela za koncentrovanje bio je: 6% poliakrilamid, 0,5 M Tris HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Elektroforeza se odvijala u puferu TG (25 mM Tris, pH 8,8, 250 mM glicin, 0,1% SDS), pod konstantnim naponom od 100 V u gelu za koncentrovanje i 180 V u gelu za razdvajanje. Kao negativna kontrola korišćena je protrombin deficijentna plazma *HemosIL (Instrumentation Laboratory)*, a kao pozitivna kontrola na gel je nanošena standardna humana plazma (*Siemens*). Zajedno sa uzorcima na gel je nanošen marker odgovarajućih molekulskih težina (*Fermentas*).

U sledećem koraku, proteini su sa SDS-poliakrilamidnog gela prenošeni na *Immobilon-P* membranu od poliviniliden fluorida (*Millipor*) pomoću sistema za polusuvi transfer (*Biometra*). Gel je inkubiran u katodnom puferu (25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40 mM glicin, 20% metanol). Membrana je najpre aktivirana potapanjem u metanol 1-2s, zatim ispirana 5 min u vodi i inkubirana 5 min u anodnom puferu II (25 mM Tris/HCl pH 10,4, 20% metanol). Na anodnu ploču, nakvašenu anodnim puferom I (300 mM Tris/HCl pH 10,4, 20% metanol) stavljan je po dva sloja 3MM papira, natopljenih anodnim puferom I. Preko ovog sloja stavljan je po jedan 3MM papir natopljen anodnim puferom II. Zatim je stavljana aktivirana membrana, a preko nje gel. Kao

poslednji sloj stavljana su po tri 3MM papira natopljena katodnim puferom. Trajanje transfera bilo je 40 min pri maksimalnoj struji od 5mA/cm² membrane.

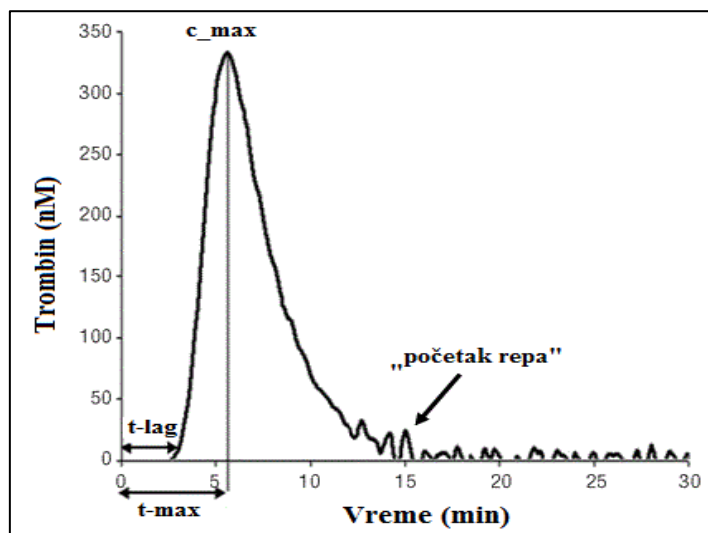
Po završetku transfera, membrana je inkubirana preko noći na +4°C u 5% BSA (albumin iz seruma govečeta, engl. *Bovine serum albumin*) rastvorenom u puferu PBST (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7,5, 0,1% Tween20) kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje antitela. Nakon toga membrana je kratko ispirana u PBST puferu i uz blago mešanje inkubirana 1 h sa primarnim poliklonalnim antitelom *Thrombin K-20* (*Santa Cruz Biotechnology*), razblaženja 1:3000 u 2% BSA rastvorenog u PBST. Membrana je potom ispirana tri puta po 10 min u PBST puferu uz blago mešanje. U sekundarnom antitelu *Anti-Goat IgG, peroxidase conjugate* (*Sigma*), razblaženja 1:80 000 u 2% BSA rastvorenog u PBST, membrana je inkubirana 1 h 15 min, takođe uz blago mešanje. Ispiranje je ponovljeno na isti način kao i nakon inkubacije sa primarnim antitelom. Za detekciju hemiluminiscentnog signala korišćen je *ImobilionTM Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (*Millipore*). Membrana je inkubirana sa ovim reagensom 5 min, a nakon toga je signal detektovan na filmovima za radiografije zaštićenim od dejstva svetlosti. Količina protrombina određivana je relativnom kvantifikacijom signala pomoću *Image Studio Lite* softvera, proizvođača *LI-COR*.

Test generacije trombina

[protokol za *INNOVANCE ETP - Instrumentation Laboratory*; i *CAT Thrombinoscope BV- Thrombinoscope BV*]

Test generacije trombina spada u globalne testove hemostaze koji omogućavaju merenje dinamičnih interakcija između različitih komponenata hemostaze [188,189]. Test generacije trombina se zasniva na kontinuiranom merenju procesa stvaranja trombina u uzorku ispitivane plazme nakon aktivacije protrombina. Ovo merenje se vrši detekcijom signala dobijenog od specifičnog hromogenog (endogeni trombin potencijal-ETP test) ili fluorescentnog supstrata (kalibrisana automatizovana trombografija- CAT) koji biva isečen nastalim trombinom [190,191]. Kao rezultat ovog testa dobija se kriva koja je definisana sa nekoliko parametara: *t_{lag}* (lag vreme) predstavlja fazu koja prethodi fazi inicijacije i definiše se kao vreme potrebno da se stvori približno jedna šestina (1/6) maksimalne koncentracije trombina; *t_{max}* je vreme proteklo do dostizanja

maksimalnog nivoa trombina (pika); c_{max} (visina pika) je maksimalni nivo stvorenog trombina u datom uzorku plazme; endogeni potencijal trombina (ETP) predstavlja površinu ispod krive (engl. *area under the curve*-AUC) [192] i „početak repa“ (engl. *start tail*) definiše vreme proteklo od početka reakcije do trenutka kada kriva generisanog trombina dostigne nultu vrednost na kraju reakcije [193]. Shematski prikaz testa generacije trombina dat je na slici 10.



Slika 10 Parametri testa generacije trombina: t_{lag} - vreme proteklo do početka stvaranja trombina; t_{max} - vreme proteklo do dostizanja maksimalnog nivoa trombina; c_{max} - maksimalni nivo stvorenog trombina; ETP - endogeni trombin potencijal; „početak repa“ - vreme proteklo od početka do kraja reakcije. Preuzeto i modifikovano iz Rugeri i saradnici, 2007 [1].

Test generacije trombina korišćen je za ispitivanje trombogenog potencijala FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti. Analize su urađene u saradnji sa Nagoja Univerzitetom u Japanu i Institutom za transfuziju krvi Srbije, korišćenjem dve komercijalno dostupne verzije ovog testa (*Thrombinoscope BV* i *INNOVANCE ETP*). U testu kalibrisane automatizovane trombografije (*Thrombinoscope BV*) kao aktivator korišćen je tkivni faktor u finalnoj koncentraciji 5 pmol/L, a standardna plazma je korišćena kao kontrola. Reakcije su praćene 2 h pomoću aparata *Fluorocan Ascent FL* (*Thermo LabSystems*) pri talasnoj dužini ekscitacije na 390 nm i emisije na 460 nm korišćenjem *Thrombinoscope* softvera (*Thrombinoscope BV*).

Esej *INNOVANCE ETP* (*Siemens Healthcare Diagnostics*) je primenjen po uputstvu proizvođača. Za normalizaciju testa korišćen je komercijalno dostupni standard (*Innovance ETP Standard*) dobijen iz citratne plazme u kojoj je vrednost svih faktora 100%. Za merenje je korišćen BCS XP analizator (*Siemens Healthcare Diagnostics*). Pri svakom merenju istovremeno je na aparat nanošen uzorak standardne i hipokoagulabilne plazme. Referentne srednje vrednosti podešene od strane proizvođača bile su: ETP (%)=100, ETP (mA)=410.3, c_max (%)=94 i c_max (mA/s)=103.2.

Test rezistencije na antitrombin

Prema referenci [194]

Za ispitivanje uticaja FIIc.1787G>A varijante na interakciju trombina sa njegovim inhibitorom antitrombinom, u saradnji sa Nagoja Univerzitetom u Japanu, korišćen je test rezistencije na antitrombin. Esej se bazira na merenju rezidualne aktivnosti trombina, koja je posledica nemogućnosti njegove inaktivacije antitrombinom. Test se sastoji iz sledećih koraka: aktivacije protrombina, inaktivacije trombina antitrombinom i merenja rezidualne aktivnosti trombina.

U prvom koraku, otrov zmije *Oxyuranus scutellatus* (*Sigma Aldrich*) je korišćen kao aktivator protrombina. Plazma pacijenta je razblažena 100 puta u puferu (50 mmol/L Tris-HCl 0,2 mol/L NaCl, pH 8.1) u zapremini od 500 μ L. Razblažena plazma je zatim pomešana sa 100 μ L smeše fosfolipida (50% PTT-Reagent RD) i CaCl₂ (15 mmol/L) i sa 100 μ L aktivatora protrombina (0,1 mg/mL). Celokupna smeša je inkubirana 2 min na 37°C. U sledećem koraku, trombin je inaktiviran dodatkom antitrombina (*Mitsubishi Tanabe Pharma*), u višku 100 μ L (75 μ g/mL), dok je u kontrolnoj reakciji umesto antitrombina dodavan fiziološki rastvor. Period praćenja inaktivacije bio je 30 min. Rezidualna aktivnost trombina je određivana dodavanjem 200 μ L hromogenog trombinskog supstrata (0,5 mmol/L) S-2238 (*Chromogenix*) i merenjem promene u apsorbanci/min ($\Delta A/\text{min}$) na talasnoj dužini 405 nm na spektrofotometru TBA-180 (*Toshiba Medical Systems*). Kao kontrola testa korišćena je standardna plazma u istom razblaženju kao i plazma ispitanika.

Test rezistencije na trombomodulin

Prema referenci [195]

Test za ispitivanje interakcija trombina i trombomodulina je za potrebe ove studije urađen u saradnji sa Nagoja Univerzitetom u Japanu. Test obuhvata najpre aktivaciju protrombina u trombin u plazmi ispitanika, a potom dodavanje rekombinantnog trombomodulina (rTM). Dodavanjem rTM formira se kompleks trombin-trombomodulin i inhibira se aktivnost trombina. Istovremeno se u odvojenoj reakciji kao kontrola, umesto rTM u plazmu pacijenta dodaje fiziološki rastvor (-rTM). Nakon toga, u obe smeše se dodaje fibrinogen i meri se vreme formiranja fibrinskog končića u obe epruvete. Vrednost rezidualne aktivnosti trombina u prisustvu trombomodulina (RRAT-tm), odnosno efikasnost trombina da prevodi fibrinogen u fibrin, izražava se kroz odnos ova dva vremena (rTM/-rTM).

Plazme pacijenta su najpre razblažene u odnosu 1:9 u puferu (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,4), a potom je 10 µL razblažene plazme pomešano sa 10 µL aktivatora protrombina (50 µg/mL) i 10 µL smeše CaCl₂ (30 mmol/L) i 25% fosfolipida (*PTT-Reagent RD*). Kao aktivator korišćen je komercijalno dostupan otrov zmijske (Sigma Aldrich). Celokupna smeša je inkubirana 2 min na 37°C kako bi došlo do konverzije protrombina u trombin. Nakon toga, u jednu smešu je dodato 10 µL rTM (20 µg/mL) (*Asahi Kasei Pharma*), a istovremeno je u drugu smešu dodat fiziološki rastvor i smeše su inkubirane 1 min na 37°C. U obe smeše je dodato 40 µL fibrinogena (420 mg/dL), nakon čega je pomoću spektrofotometra mereno vreme koagulacije, odnosno formiranja fibrinskog končića na aparatu *IL Coagulometer ACL 7000 (Instrumentation Laboratory)*.

3.3.3 Metode za *in vitro* analizu genskih varijanti FIIc.1787G>A i FIIc*64_*66del

U okviru *in vitro* funkcionalne analize FIIc.1787G>A i FIIc*64_*66del varijanti, analiziran je njihov uticaj na ekspresiju protrombinskog gena na nivou iRNK i proteina. Takođe, ispitivan je uticaj FIIc.*64_*66del varijante na protein/DNK interakcije i vezivanje miRNK.

Kultivacija bakterija

Prema referenci [183]

Bakterije soja *E. coli* DH5 α su gajene na 37°C u tečnom LB (*Luria-Bertani*) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% agar). Prilikom gajenja bakterija transformisanih plazmidom koji sadrži gen za rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u tečne i u čvrste medijume u finalnoj koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$.

In situ PCR dirigovana mutageneza

[modifikovani protokol za *Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit-STRATAGENE*]

In situ PCR dirigovana mutageneza je metoda koja omogućava uvođenje tačkaste mutacije, male delecije ili insercije u DNK sekvencu ukloniranu u dvolančani vektor. Za izvođenje ove metode korišćena je modifikacija uputstva za *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*. Kao matrica za umnožavanje koristi se vektor sa ukloniranom sekvencom u koju se uvodi genska varijanta. Kako bi se osiguralo umnožavanje kompletnog vektora, koristi se miks DNK polimeraza *Pfu* i *Vent*. Nakon umnožavanja, vrši se digestija restrikcionim enzimom koji specifično iseca samo metilovanu DNK. Na taj način, uklanja se početni vektor koji ne sadrži gensku varijantu od interesa. Novosintetisanim vektorom, vrši se transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija. Graničnici koji su korišćeni dati su u Tabeli 2.

PCR smeša finalne zapremine 50 μL , sadržala je sledeće komponente:

100 ng plazmidne DNK*	
10x reakcioni pufer (50 mM Tris-HCl pH 9; 0,1% Triton X-100)	5 μL
100 pmol/ μL graničnika	0,5 μL
25 mM dNTP mix	1 μL
5U <i>PfuI</i> polimeraze (<i>Fermentas</i>)	0,5 μL
5U <i>Vent</i> polimeraze (<i>NE BioLabs</i>)	0,5 μL

*za mutagenezu c.1787G>A: pcDNA3.1(+) sa cDNK za protrombin; za mutagenezu c.*64_*66del dva pCIneo vektora sa: 1. cDNK za protrombin i 2. cDNK za protrombin sa dodatnih 50 bp 3' FR regiona

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/1 min

(95°C/60s, 55°C/60s, 65°C/120s/1kb plazmida) x 30 ciklusa

4°C/∞

Produkti PCR reakcije podvrgavani su digestiji *DpnI* restrikcijom enzimom. U smešu je dodavano 10U *Dpn I* (*Fermentas*) enzima i reakcija digestije se odvijala 16h na 37°C. Nakon toga, digestiona smeša je korišćena za transformaciju kompetentnih bakterijskih ćelija. Iz transformanata je izolovana plazmidna DNK, a uspešnost *in situ* mutageneze proveravana je sekvenciranjem regiona u koji su uvedene genske varijante od interesa.

Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju

Prema referenci [183]

Primenom ove metode povećava se propustljivost ćelijske membrane bakterijske ćelije uz očuvanje vijabilnosti. Na taj način, omogućeno je „unošenje“ strane DNK, odnosno transformacija bakterijske ćelije odgovarajućim vektorom.

Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju podrazumevala je inokulaciju tečnog LB medijuma (10 mL) sa pojedinačnim bakterijskim kolonijama u kome su potom gajene na 37°C preko noći uz konstantno mešanje na 180 rpm. Iz ove prekonoćne kulture 2 mL je korišćeno za inokulaciju 200 mL LB medijuma. Kultura je gajena na 37°C, uz mešanje na 200 rpm. Kada je optička gustina kulture dostigla odgovarajuću vrednost $0,3 < OD_{600} < 0,5$, kultura je centrifugirana 10 min na 4°C i 2500 rpm. Dobijeni talog je resuspendovan u 10 mL 0,1 M CaCl₂ i inkubiran na ledu 15 min, a nakon toga centrifugiranje je ponovljeno pri istim uslovima. Talog je resuspendovan u 2 mL pufera RF2 (10 mM MOPS, 1 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol) i inkubiran na ledu 15 min. Po 50-200 µL smeše je alikvotirano na ledu i zamrznuto na -80°C do upotrebe.

Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija

Prema referenci [183]

Bakterije podjednako efikasno replikuju kako sopstvenu tako i unešenu plazmidnu DNK, usled čega primena ove metode obezbeđuje produkciju velike količine ciljane plazmidne DNK. U ovoj studiji korišćena je metoda transformacije toplotnim šokom (engl. *heat shock transformation*). U suspenziju svežih kompetentnih bakterijskih ćelija (200 µL) dodavano je 10 µL plazmidne DNK. Smeša je inkubirana 1h na ledu, nakon čega je izlagana toplotom šoku najpre 2 min na 42°C, a potom 5 min na ledu. Oporavak ćelija se odvijao gajenjem 1 h na 37°C, nakon dodavanja 800 µL LB medijuma bez antibiotika. Bakterijska kultura (100-500 µL) je utrljavana na LA podlogu i gajena na 37°C preko noći. Iz pojedinačnih kolonija su izolovani ciljni plazmidi.

Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

[protokol za *QIAprep Spin Miniprep Kit -QIAGEN*]

Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 5 mL tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane na 37°C preko noći, uz konstantno mešanje na 180 rpm. Prekonoćna kultura je centrifugirana 2 min na 13000 rpm i dobijeni talog je resuspendovan u 250 µL pufera P1, a zatim je dodavano 250 µL pufera za lizu P2 i 350 µL pufera N3, nakon čega su tube blago izmešane. Smeša je centrifugirana 10 min na 13000 rpm. Supernatant je prebacivan na *QIAprep* kolonu i centrifugiran 1 min na 13000 rpm. Tečnost koja je prošla kroz kolonu je odlivena, a DNK vezana na koloni je prečišćavana dodavanjem 750 µL pufera PE i centrifugiranjem 1 min na 13000 rpm. Tečnost iz epruvete za sakupljanje je uklonjena i prečišćavanje kolone je ponovljeno na isti način. Kolona je potom prenesena u sterilnu mikrotubu i DNK je sprana sa kolone dodavanjem 50 µL sterilne vode i centrifugiranjem 1 min na 13000 rpm.

Detekcija plazmida koji nosi željenu varijantu

[protokol za *BigDye Terminator Ready Reaction Kit- Applied Biosystems*]

Provera pripremljenih konstrukata na prisustvo FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti vršena je sekvenciranjem plazmidne DNK. Za detekciju FIIc.1787G>A

varijante korišćen je graničnik BGN-R, dok je za proveru prisustva FIIc.*64_*66del varijante korišćen Pt1 graničnik (Tabela 2).

Smeša za sekvenciranje, finalne zapremine 8 μL , sadržala je:

150-200 ng plazmidne DNK	
1pmol/ μL graničnika BGN-R/Pt1	3,2 μL
<i>Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)</i>	2 μL

Nakon reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom i analizirani na *3130 GeneticAnalyser* aparatu (*AppliedBiosystems*) prema već opisanom protokolu.

Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi

[protokol za *EndoFree Plasmid Mini Kit-QIAGEN*]

Za pripremu plazmidne DNK za transfekciju permanentnih ćelijskih linija korišćen je komercijalni *EndoFree Plasmid Mini Kit (Qiagen)*. Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 5 mL LB medijuma sa ampicilinom (100 mg/mL) i inkubirane 8 sati na 37°C uz mešanje na 300 rpm. Iz te kulture alikvotirano je 100 μL i zasejano u 100 mL LB medijuma, a potom su bakterije gajene 12-16 h na 37°C uz mešanje na 300 rpm. Bakterijska kultura je centrifugirana 25 min na 4°C/4700 rpm. Talog je resuspendovan u 10 mL pufera P1, zatim je dodavano 10 mL pufera P2 i smeša je blago izmešana. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, dodavano je 10 mL pufera P3 i smeša je blago izmešana invertovanjem. Dobijeni ćelijski lizat je inkubiran 10 min na sobnoj temperaturi, a potom profiltriran pomoću *QIAfilter Maxi*. U filtrirani lizat je dodato 2,5 mL pufera ER, smeša je blago izmešana i inkubirana na ledu 30 min. Za to vreme je dodavanjem 10 mL pufera QBT pripremljena kolona *QIAGEN-tip 500*. Na pripremljenu kolonu nanošen je filtrirani lizat. Nakon propuštanja smeše, DNK koja se vezala za kolonu je isprana dva puta sa 30 mL pufera QC. Kolona je nakon toga prenesena u tubu za centrifugiranje i DNK je sprana puferom QN. Precipitacija eluirane DNK je vršena dodavanjem 10,5 mL izopropanola i centrifugiranjem 30 min na 4°C i 8000 rpm. Supernatant je odliven, a talog je ispran dodavanjem 5 mL 70% etanola i centrifugiran 10 min na 4°C i 8000 rpm. Preostali talog je sušen na vazduhu 10-30 min

pri sobnoj temperaturi, a potom rastvoren u 200 μ L *endotoxin-free* pufera TE. Plazmidna DNK je čuvana na -20°C do upotrebe.

Kultivacija permanentnih ćelijskih linija

Prema referenci [196]

Ćelije su gajene u medijumu DMEM (*Dullbecco's Modified Minimum Essential Medium*) *GlutaMAX* (*Gibco*) koji sadrži L-glutamin, visoku koncentraciju glukoze (4,5 g/L) i piruvate. Medijum je obogaćen sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, *Gibco*) i dodat je antibiotik gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Prilikom gajenja HepG2 ćelija u medijum su dodavane i 1x DMEM neesencijalne aminokiseline (*Sigma*). Uslovi gajenja u inkubatoru podrazumevali su automatski protok 5% CO_2 , na temperaturi od 37°C , uz sve propisane mere sterilnog rada. Korišćene permanentne ćelijske linije Cos-7 i HepG2 spadaju u adherentne ćelijske linije. Pasažiranje ćelija je vršeno po dostizanju konfluentnosti ćelija od približno 80%. Najpre je uklanjan medijum, a potom su ćelije ispirane dva puta PBS puferom (137 mM NaCl; 3,38 mM KCl; 1,76 mM KH_2PO_4 ; 10 mM Na_2HPO_4 pH 7,5). Ćelije su odvajane od podloge inkubacijom 3-5 min sa 0,1% rastvorom tripsin-EDTA, nakon čega je delovanje enzima zaustavljeno dodatkom ekvivalentne količine medijuma u odnosu na dodatu količinu tripsina. Broj ćelija nakon pasažiranja određivan je na hemocitometru. Ćelije su pripremane za zamrzavanje centrifugiranjem 10 min na 1200 rpm i resuspendovanjem taloga ćelija u 1 mL medijuma za zamrzavanje koji sadrži krioprotektivni agens, 10% dimetilsulfoksid (DMSO) rastvoren u FBS. Suspenzija ćelija je u kriotubama čuvana u tečnom azotu.

Izolacija proteina nukleusnog i citoplazmatskog ekstrakta HepG2 ćelijske linije

Prema referenci [197]

Izolacija proteina nukleusnog (NE) i citoplazmatskog (CE) ekstrakta iz HepG2 ćelijske linije je rađena po modifikovanoj metodi Dignama i saradnika [197]. Ćelije su gajene pod standardnim uslovima u plastičnoj posudi prečnika 100 mm, do dostizanja konfluentnosti od približno 80%, a zatim ispirane i resuspendovane u 500 μ L PBS pufera. Nakon centrifugiranja 5 min/900 rpm na $+4^{\circ}\text{C}$, ćelije su resuspendovane u 200 μ L pufera A (10 mM HEPES-KOH pH 7,8; 1,5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 0,5 mM DDT; inhibitor proteaze (1:1000, 50x inhibitor proteaze). Smeša je inkubirana 10 min na ledu, nakon čega je dodat 10% Triton X-100 u količini koja odgovara 1/30 volumena pufera

A. Centrifugiranjem 1 min/11000 rpm na +4°C, razdvojeni su citoplazmatski ekstrakt (u supernatantu) i nukleusni ekstrakt (u vidu taloga). Supernatant je prenesen u novu mikrotubu i dodat je pufer B (0,3 mM Hepes-KOH pH 7,8; 30 mM MgCl₂; 1,4 mM KCl; inhibitor proteaze (1:1000, 50x inhibitor proteaze) u zapremini koja odgovara 1/10 prethodno dodate zapremine pufera A. Talog je resuspendovan u puferu C (20 mM Hepes-KOH pH 7,8; 1,5 mM MgCl₂; 0,42 mM NaCl; 25% glicerol; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; inhibitor proteaze (1:1000, 50x inhibitor proteaze) u zapremini koja odgovara 1/5 volumena dodatog pufera A. Uzorci (NE i CE) su inkubirani 15 min na 4°C uz mešanje, a zatim centrifugirani 15 min/14000 rpm, na 4°C. Iz oba uzorka je sakupljen supernatant i izmerena koncentracija proteina. Izolovani proteini su čuvani na -80°C.

Merenje koncentracije proteina

Prema referenci [198]

Koncentracija proteina je određivana metodom po Bradford-u koja se zasniva na vezivanju boje komazi plavo (engl. *Coomassie Brilliant Blue*) za proteine i poređenju intenziteta boje sa vrednostima dobijenim za uzorke BSA poznate koncentracije.

Koncentracija ukupnih proteina u ekstraktima određivana je korišćenjem komercijalnog reagensa *Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Biorad)*. U 10 µL izolovanih proteina dodavano je 200 µL reagensa. Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, očitavana je apsorbance uzorka na talasnoj dužini od 595 nm na spektrofotometru *Infinite 200 PRO multiplate reader (TECAN)*. Na osnovu očitane apsorbance, koncentracija proteina u merenim uzorcima automatski je određivana intrapolacijom sa standardne krive koja je dobijena za uzorke proteina BSA poznatih koncentracija u opsegu od 0,1 do 1 mg/mL, pri čemu je uziman u obzir faktor razblaženja uzoraka.

Izolacija celokupne RNK iz HepG2 ćelijske linije

[Modifikovani protokol za *TRI Reagent Solution-Ambion*]

HepG2 ćelije su gajene pod standardnim uslovima u plastičnoj posudi prečnika 100 mm, do dostizanja konfluentnosti od približno 80%. Iz posude je uklonjen medijum i ćelije su potom homogenizovane dodavanjem 1mL *TRI Reagent Solution (Ambion)* i mehaničkim odlepljivanjem sa posude pomoću silikonske strugalice (engl. *scraper*).

Odlepljene ćelije su resuspendovane nastavkom i smeša je prenetu u sterilnu mikrotubu. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 10 min na +4°C/12200 rpm. Supernatant je prenesen u sterilnu mikrotubu, a talog je odbacivan. U supernatant je dodavano 200 µL hladnog hloroforma i tuba je izmešana nekoliko puta, a zatim je smeša inkubirana na sobnoj temperaturi 15 min. Radi razdvajanja faze sa RNK od faza u kojima se nalaze DNK i proteini, smeša je centrifugirana 15 min na 4°C/12200 rpm. Gornja faza u kojoj se nalazi RNK je prenesena u sterilnu mikrotubu, u koju je potom dodavano 500 µL hladnog izopropanola. Smeša je vorteksovana 10 s, potom inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi i nakon toga centrifugirana 8 min na 4°C/12200 rpm. Supernatant je uklonjen, a u preostali talog je dodavano 1 mL hladnog 75% etanola rastvorenog u sterilnoj vodi koja sadrži 0,1% dietilpirokarbonat (DEPC). Tube su potom centrifugirane 10 min na 4°C/12200 rpm i etanol je uklonjen. Talog je prosušen na sobnoj temperaturi, a zatim resuspendovan u 20 µL sterilne vode. Koncentracije RNK izolata izmerene su na spektrofotometru *NanoVue*.

Transfekcija Cos-7 ćelijske linije plazmidnom DNK

[Protokol za *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent-Thermo Fisher Scientific*]

Za transfekciju permanentne ćelijske linije Cos-7 korišćen je reagens *Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)*. *Lipofectamine 2000* je pozitivno naelektrisani lipozom koji omogućava s jedne strane interakciju sa negativno naelektrisanim nukleinskim kiselinama formirajući na taj način kompleks sa plazmidnom DNK, dok s druge strane olakšava vezivanje tog kompleksa za negativno naelektrisanu membranu ćelije i ulazak plazmidne DNK u ćeliju.

Za eksperimente tranzijentne transfekcije 5×10^5 Cos-7 ćelija je zasejavano u mikrotitar ploče sa 6 bunarića i gajeno pod standardnim uslovima kultivacije u trajanju od 24 h. Nakon toga, vršena je kotransfekcija sa odgovarajućim plazmidima u *wild-type* ili mutiranoj formi i pcDNA-A1AT-wt plazmidom. Vektor pcDNA-A1AT-wt je korišćen kao kontrola, jer je alfa-1-antitripsin sekretorni protein, kao i protrombin. Ćelije su kotransfekovane sa po 1,5 µg kontrolnog plazmida i 1,5 µg plazmida sa odgovarajućim insertom koji su najpre pomešani sa 250 µL medijuma *Optimem (Invitrogen)*. U odvojenoj smeši pripremljeno je 10 µL reagensa *Lipofectamine 2000* sa

250 μL *Optimem*-a i inkubirano 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smeša sa reagensom je pomešana sa smešom koja sadrži plazmidnu DNK i inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi kako bi se formirao kompleks između *Lipofectamin 2000* i plazmidne DNK. Čelijama je uklonjen medijum u kome su gajene prethodna 24 h, isprane su PBS puferom i potom im je dodato 1,5 mL DMEM/F12 medijuma (*Gibco*). U medijum je po završetku inkubacije dodato 500 μL smeše formiranog kompleksa. Čelije su zatim gajene u takvom medijumu 24 h pri standardnim uslovima. Nakon toga, medijum je zamenjen sa 2 mL svežeg DMEM/F12 medijuma i čelije su gajene narednih 24 h. Medijum iznad transfekovanih čelija koji sadrži sekretovani protrombin i alfa-1-anitripsin je pokupljen i zamrznut na -80°C , a čelije su lizirane i iz njih je vršena izolacija celokupne RNK.

Izolacija celokupne RNK iz transfekovanih čelija u kulturi

[protokol za *RNeasy Plus Mini Kit-QIAGEN*]

Cos-7 čelije su najpre lizirane dodavanjem 350 μL pufera RTL Plus, a potom homogenizovane pomoću *QIAshredder* kolone i centrifugirane 2 min na 13000 rpm. Kako bi se sprečila potencijalna kontaminacija sa DNK, homogenizovani lizat je nanošen na *gDNA Eliminator* kolonu i centrifugiran 30 s na 13000 rpm. Nakon toga, u eluat je dodavano po 350 μL 70% etanola i celokupna zapremina je prebacivana na *RNeasy* kolonu za koju se vezuje RNK. Ova kolona je centrifugirana 15 s na 13000 rpm, a zatim je dodavano 700 μL pufera RW1 i kolona je ponovo centrifugirana pri istim uslovima. U narednom koraku, RNK koja se vezala za kolonu, ispirana je dva puta sa po 500 μL pufera RPE i centrifugirana 2 min na 13000 rpm uz odlivanje eluata. Kako bi se uklonili svi tragovi pufera, ponovljeno je centrifugiranje 1 min na 13000 rpm. Dodavanjem 50 μL sterilne vode i centrifugiranjem 1 min na 13000 rpm vršeno je spiranje RNK sa kolone u sterilnu mikrotubu. Izolati RNK su čuvani na -80°C .

Prečišćavanje RNK

[protokol za *DNA-free Kit-AMBION*]

Izolovana RNK je u još jednom koraku prečišćavana od DNK kontaminacije pomoću *DNA-free* kita (*Ambion*). U izolate RNK je dodavan DNase pufer u zapremini 10 puta manjoj u odnosu na zapreminu RNK izolata i 1 μL enzima *rDNaseI*. Smeše su

inkubirane 30 min na 37°C. Enzim je inaktiviran dodavanjem 0,1 volumena *DNaseI* inaktivirajućeg agensa u odnosu na zapreminu smeše. Nakon inkubacije 2 min na sobnoj temperaturi, smeše su centrifugirane 1,5 min na 13000 rpm. Talog je odbacivan, a prečišćena RNK koja se nalazi u supernatantu, je prebacivana u novu mikrotubu. Prinos i kvalitet izolovane RNK je proveravan horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu i merenjem koncentracije na spektrofotometru *NanoVue*.

Sinteza cDNK

[protokol za *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit- Applied Biosystems*]

Za prevođenje celokupne iRNK u cDNK korišćen je *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)* koji sadrži reverznu transkriptazu i nasumične (engl. *random*) graničnike. RNK izolovana iz tranzijentno transfekovanih Cos-7 ćelija korišćena je kao matrica u reakciji reverzne transkripcije, finalne zapremine 20 µL. Reakcija je bila sledećeg sastava:

10x <i>RT Buffer</i>	2 µL
25x dNTP mix	0,8 µL
10x <i>random</i> graničnici	2 µL
<i>MultiScribe</i> reverzna transkriptaza (50 U/µL)	1 µL
RNK	1 µg

Temperaturni profil reakcije reverzne transkripcije:

25°C/25 min

37°C/120 min

85°C/5 s

4°C/∞

Po zavšetku reakcije, uzorci cDNK su čuvani na -20°C.

Kvantifikacija iRNK metodom PCR-a u realnom vremenu

[protokol za *TaqMan Gene Expression Assays-Applied Biosystems*]

Uticaj FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti na ekspresiju gena za protrombin na nivou iRNK ispitivan je metodom PCR-a u realnom vremenu (engl. *Real time PCR*) uz korišćenje *TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)*.

Dobijeni rezultati su obrađeni primenom metode relativne kvantifikacije. Kao endogena kontrola izabran je gen za neomicin fosfotransferazu, koji se nalazi na plazmidu kojim je vršena transfekcija. Ekspresija ovog gena u svim transfekovanim ćelijama ne zavisi od prisustva ispitivanih genskih varijanti. Pored toga, količina raspoložive iRNK za neomicin fosfotransferazu je direktno srazmerna broju kopija plazmidnog vektora čime je ova endogena kontrola u isto vreme i kontrola uspešnosti transfekcije. PCR u realnom vremenu je rađen u multipleks reakciji, korišćenjem iste cDNK za detekciju signala ciljnog i referentnog gena. Reakcija finalne zapremine 10 μ L bila je sledećeg sastava:

2x Univerzalni PCR MasterMix	5 μ L
20x TaqMan Gene Expression Assays (900 nM svakog neobeležnog graničnika, 250 nM Taqman MGB proba obeležena FAM-om)	0,5 μ L
18pmol/ μ L RT418a graničnik	0,5 μ L
18pmol/ μ L RT418b graničnik	0,5 μ L
G418 proba (250 nM Taqman MGB proba obeležena VIC-om)	0,5 μ L
cDNK	1,5 μ L

Temperaturni profil reakcije:

50°C/2 min

95°C/10 min

(95°C/15s, 60°C/1 min)x 40 ciklusa.

Reakcije PCR-a u realnom vremenu rađene su na aparatu 7500 *Real-Time* PCR (*Applied Biosystems*). Dobijeni rezultati su obrađeni upotrebom *ABI Prism 7500* softvera (*Applied Biosystems*).

Koncentrovanje proteina iz medijuma transfekovanih ćelija

[protokol za *Amicon Ultra-0,5mL-Millipore*]

Medijumi u kojima su gajene transfekovane ćelije su koncentrovani približno 22 puta pomoću *Amicon Ultra 30K* kolone (*Millipore*). Medijumi iz tri nezavisne kotransfekcije su zajedno pomešani kako bi se dobila srednja vrednost za količinu sekretovanog protrombina i alfa-1-antitripsina. Nakon toga, 500 μ L smeše medijuma sa proteinima je naneto na kolonu i centrifugirano 10 min na 12300 rpm na sobnoj

temperaturi, dok na koloni ne ostane 23 μ L finalne zapremine medijuma. Potom je kolona invertovana, prenesena u mikrotubu za sakupljanje uzorka i centrifugirana 2 min na 3300 rpm. Finalna zapremina od 23 μ L ukoncentrovanog medijuma je čuvana na -80 °C.

Kvantifikacija količine protrombina u medijumu transfekovanih ćelija

Prema referenci [187]

Koncentrovani medijumi Cos-7 transfekovanih ćelija naneti su na 12% SDS-PAGE gel. Sastav gela, uslovi transfera proteina sa gela na membranu i blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela prethodno su detaljno opisani u protokolu za SDS-PAGE i Western blot. Nakon inkubacije membrane preko noći u 5% BSA rastvorenog u PBST puferu, membrana je jednom isprana sa PBST puferom. U odnosu na poziciju ciljnih proteina na membrani (protrombin-72 kDa, alfa-1-antitripsin-52 kDa), određenu na osnovu markera odgovarajuće molekulske mase, delovi membrane sa protrombinom i alfa-1-antitripsinom su razdvojeni i inkubirani sa različitim primarnim antitelima. Za detekciju protrombina membrana je inkubirana 1 h 15 min u primarnom poliklonalnom *Thrombin K-20* antitelu (*Santa Cruz Biotechnology*), razblaženog 10000 puta u PBST puferu sa 2% BSA. Za detekciju alfa-1-antitripsina korišćeno je kozje poliklonalno primarno antitelo Anti-alpha-1-Antitrypsin (*Abcam*), razblaženo pod istim uslovima i sa istim vremenom inkubacije kao i za protrombin. Nakon toga, membrane su ispirane tri puta u trajanju od 10 min sa PBST puferom uz blago mešanje. Kao sekundarno antitelo korišćeno je zečje *Anti-Goat IgG peroxidase conjugate* antitelo (*Sigma*), razblaženo 80000 puta u PBST puferu sa 2% BSA, sa kojim su membrane inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi, takođe uz blago mešanje. Višak sekundarnog antitela uklonjen je ispiranjem tri puta po 10 min u PBST puferu. Uzorci su nanošeni na gel u triplikatu u tri nezavisna eksperimenta. Hemiluminiscentni signal je detektovan na isti način kao što je opisano u protokolu za detekciju proteina iz plazme pacijenata. Relativna količina protrombina izražena je u odnosu na količinu alfa-1-antitripsina, koji je korišćen kao kontrola za normalizaciju dobijenih rezultata (engl. *loading control*). Kao negativna kontrola korišćen je medijum ćelija koje su kotransfekovane sa alfa-1-antitripsinom i odgovarajućim vektorom koji ne sadrži insert za protrombin. Za relativnu kvantifikaciju

količine protrombina i alfa-1-antitripsina u medijumima transfekovanih ćelija korišćen je softver *ImageJ 1.41* (*National Institute of Health, SAD*).

In silico analize FIIc.*64_*66del varijante

Da bi se usmerila dalja funkcionalna analiza uticaja ove genske varijante na ekspresiju protrombina, urađene su *in silico* analize uticaja FIIc.*64_*66del genske varijante na moguće protein/DNK interakcije, promene u sekundarnoj strukturi iRNK i potencijalna mesta vezivanja miRNK.

Za ispitivanje uticaja ove genske varijante na vezivanje proteina za 3' UTR gena za protrombin korišćen je program *SpliceAid* (*Polytechnic University of Marche, Italija*). Ovaj program vrši predikciju korišćenjem baza podataka proteina koji učestvuju u iskrajanju i obradi iRNK. U predikciji su korišćene i međusobno poređene nemutirana (wt) sekvenca 3' UTR gena za protrombin, dužine 97 nukleotida i mutirana sekvenca sa FIIc.*64_66del varijantom, dužine 94 nukleotida.

Predikcija sekundarne strukture urađena je pomoću dva softverska paketa: *RNAfold* (*Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna, Austrija*) i *Mfold* (*The RNA Institute, College of Arts and Sciences, SAD*). Oba programa se zasnivaju na merenju minimalne slobodne energije sparivanja (ΔG). Programi su konstruisani na osnovu polazne pretpostavke da nativna sekundarna struktura ima najmanju vrednost slobodne energije, što je čini termodinamički najstabilnijom. Algoritmi za izračunavanje ΔG uzimaju u obzir komplementarno sparivanje baza unutar linearne sekvence, kao i potencijalno nekomplementarno sparivanje baza i nekanonske sekundarne strukture poput pseudo čvorova. U predikciji je poređena sekvenca poslednjeg egzona i 3' UTR-a gena za protrombin dužine 240 bp u prisustvu i odsustvu FIIc.*64_66del varijante.

Predikcija uticaja FIIc.*64_*66del varijante na potencijalna mesta vezivanja miRNK u 3' UTR-u iRNK za protrombin procenjena je korišćenjem nekoliko programa: *miRWalk 2.0* (*Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim, Nemačka*), *miRBase* (*Faculty of Biology, Medicine and Health, The University of Manchester, Velika Britanija*), *miRmap* (*Swiss Institute of Bioinformatics, Université de Genève, Švajcarska*), *TargetScan* (*Whitehead Institute for Biomedical Research, SAD*), *miRanda* (*Memorial Sloan Kettering Cancer Center, SAD*). Za predikciju je korišćena sekvenca iRNK za trombin, dužine 2018 nukleotida

(NM_000506.3), nakon čega su poredene potencijalne razlike u mestima vezivanja određenih miRNK u 3' UTR-u u zavisnosti od prisustva FIIc.*64_*66del varijante.

Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na protein/DNK interakcije

Prema referenci [176]

Za ispitivanja protein/DNK interakcije korišćen *Footprinting Primer-PCR* (FP-PCR) esej [176]. Metoda FP-PCR se zasniva na činjenici da ukoliko postoji vezivanje proteina za ciljni DNK region, on će biti zaštićen od delovanja nukleaza i na taj način moguće je utvrditi da li postoji mesto vezivanja proteina za sekvencu od interesa. FP-PCR metoda se koristi za ispitivanje interakcije proteina sa jednolančanim DNK fragmentom. Region DNK koji je bio zaštićen od delovanja nukleaza vezanim proteinima koristi se kao jedan od graničnika u PCR reakciji. Detekcija PCR produkta odgovarajuće dužine je potvrda da je došlo do vezivanja proteina u ispitivanom regionu DNK.

Za ispitivanje potencijalnog mesta vezivanja proteina nukleusnog i citoplazmatskog ekstrakta HepG2 ćelijske linije za region u kome se nalazi FIIc.*64_*66del varijanta korišćeni su oligonukleotidi: FIIwt3A-u kome je varijanta FIIc.*64_*66del odsutna (wt) i FII3A-koji sadrži c.*64_*66del varijantu (mut) (Tabela 2). U prvom koraku, izolovani proteini su inkubirani sa wt (wt-exp) i mut (mut-exp) oligonukleotidom. Negativne kontrole su podrazumevale inkubaciju odgovarajućih oligonukleotida bez dodatka proteina (-K-wt, -K-mut).

Sastav ove *reakcione smeše 1*, finalne zapremine 32 μ L bio je:

wt-exp i mut-exp		-K-wt i -K-mut	
Proteini (2 μ g/ μ L)	10 μ L	/	
FIIwt3A/ FII3A (10 pmol/ μ L)	10 μ L	FII3A/ FII3A (10 pmol/ μ L)	10 μ L
4xpufer za vezivanje*	8 μ L	4x pufer za vezivanje*	8 μ L

Inkubacija 1 h na 37 °C/650 rpm

*Sastav pufera za vezivanje: 5 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM KCl; 1,25 mM MgCl₂; 2% glicerol; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 mM DTT i 1 μ g poly(dIdC).

Reakciona smeša 1 je tretirana *S1 nukleazom*. Reakciona smeša 2, finalne zapremine 45 μL bila je sledećeg sastava:

<i>Reakciona smeša 1</i>	32 μL
<i>S1 nukleaza</i> (2 U/ μL) (<i>Fermentas</i>)	0,5 μL
<i>7,4x pufer S1 nukleaze</i> (<i>Fermentas</i>)	6,1 μL
Inkubacija 30 min na 37 °C	
Inaktivacija S1 nukleaze 10 min na 70 °C sa dodavanjem 4 μL EDTA (2 mM)	

Kako bi se iz smeše uklonili proteini, uključujući i protein(e) koji se vezao za zaštićeni fragment DNK, u narednom koraku je u *reakcionu smešu 2* dodato 5 μL *proteinaze K* (*Fermentas*) i smeša je inkubirana 15 min na 55°C. Fragment DNK, koji je ostao zaštićen vezanim proteinima, je iz smeše prečišćavan Na-acetatnom precipitacijom po već opisanom protokolu, a potom je resuspendovan u 15 μL sterilne vode. Ovako dobijeni oligonukleotid korišćen je kao graničnik u PCR reakciji, sa drugim fluorescentno obeleženim graničnikom, na matrici koja obuhvata region FIIc.*64_*66del varijante. PCR smeša, finalne zapremine 25 μL , bila je sledećeg sastava:

Matrica (715 bp-3' kraj protrombina)	750 ng
10x PCR pufer	2,5 μL
25 mM MgCl_2	2,5 μL
2 mM dNTP-ovi	2,5 μL
10 pmol/ μL Pt2-fam	2,5 μL
graničnik*	6 μL
5 U/ μL <i>Taq</i> polimeraza	0,2 μL

*graničnik dobijen precipitacijom *reakcione smeše 2*

Temperaturni profil PCR reakcije bio je:

(97°C/2 min, 55°C/3 min) x 3 ciklusa

(94°C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/1 min) x 40 ciklusa

72°C/10 min

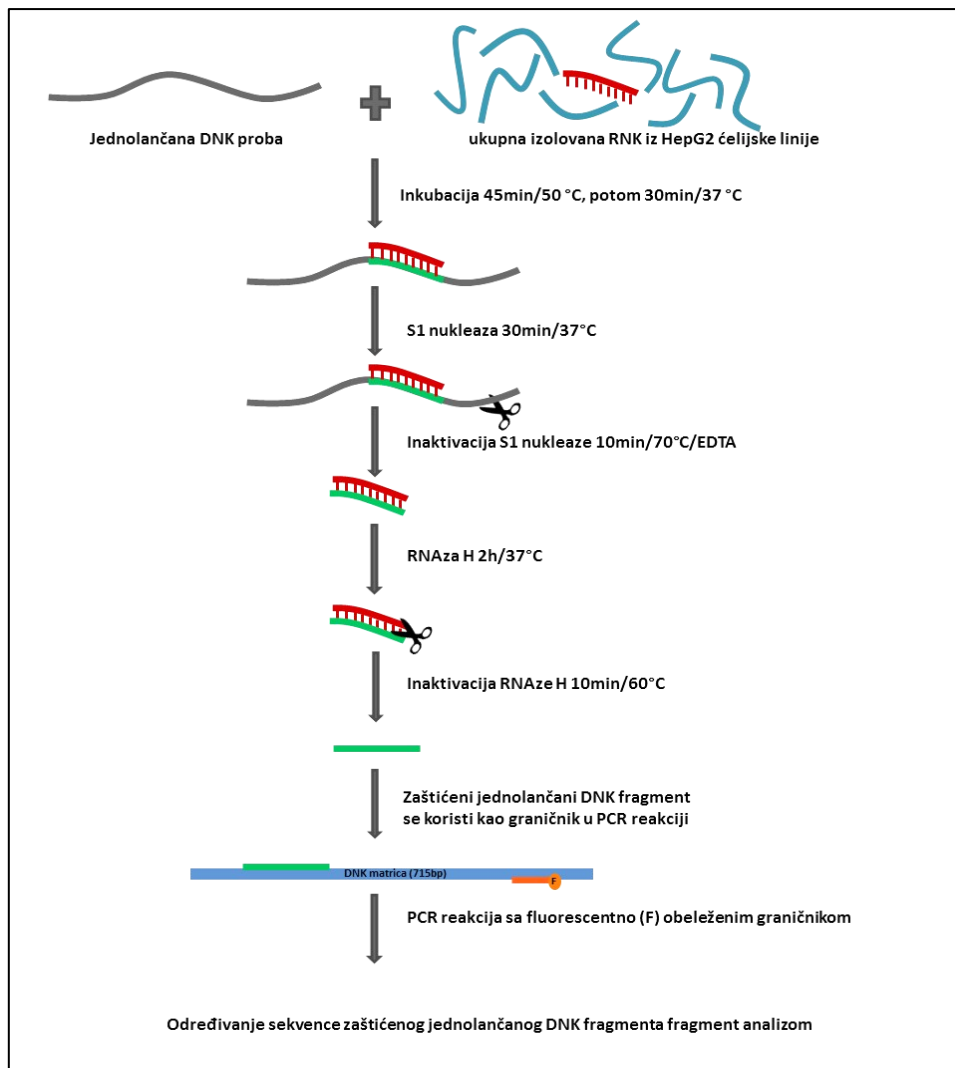
Fragment analiza na *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* korišćena je za detekciju i određivanje dužine PCR produkta, na osnovu čega je utvrđivana pozicija zaštićenog fragmenta, odnosno regiona vezivanja proteina. *LIZ500 (Applied Biosystems)* je korišćen kao standard za dužinu DNK, a za obradu rezultata je korišćen *Gene Mapper 4.0* softver (*Applied Biosystems*).

Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na vezivanje miRNK

Ova metoda ima za cilj ispitivanje vezivanja malih RNK, uključujući i miRNK za ciljnu sekvencu. Ovakav eksperimentalni pristup je prvi put dizajniran u okviru ove studije i zasniva se na sličnom principu kao FP-PCR metoda. Bazira se na činjenici da ukoliko postoji vezivanje određenih malih RNK za ciljnu sekvencu, nakon formiranja dvolančanog DNK/RNK hibrida, ta sekvenca će biti zaštićena od delovanja *S1 nukleaze* koja specifično iseca jednolančanu DNK.

U preostalom DNK/RNK hibridu se delovanjem *RNAze H*, uklanja vezana RNK, a jednolančani region DNK, koji je prethodno bio zaštićen vezanom RNK, se koristi kao graničnik u PCR reakciji. Na taj način moguće je utvrditi da li postoji mesto vezivanja malih RNK za sekvencu od interesa (Slika 11).

Eksperimentalni dizajn je podrazumevao inkubaciju celokupne RNK izolovane iz HepG2 ćelijske linije sa jednolančanim oligonukleotidima koji obuhvataju region u kome se nalazi FIIc.*64_*66del varijanta sa wt (wt-exp) i mutiranom sekvencom (mut-exp). Provera metode vršena je uz prisustvo odgovarajućih negativnih kontrola (-K-wt-exp; -K-mut-exp). Korišćeni oligonukleoti su prikazani u Tabeli 2.



Slika 11 Shematski prikaz esaja za ispitivanje interakcije vezivanja miRNK za jednonlačanu DNK

U prvom koraku, izolovana RNK je inkubirana sa wt i mut jednonlačanim DNK fragmentom. *Reakciona smeša 1*, finalne zapremine 20 μL je sadržala:

wt-exp i mut-exp		-K-wt-exp i -K-mut-exp	
RNK (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5 μL	/	
FIIwtde13A/FIIde13A (10 pmol/ μL)	10 μL	FIIwtde13A/FIIde13A (10 pmol/ μL)	10 μL
Inkubacija najpre 45 min na 50°C, potom 30 min na 37°C			

Nakon inkubacije, nevezana jednolančana DNK je uklonjena tretiranjem smeše sa S1 nukleazom. *Reakciona smeša 2*, finalne zapremine 40 μL je bila sledećeg sastava:

<i>Reakciona smeša 1</i>	20 μL
<i>S1 nukleaza (2 U/μL) (Fermentas)</i>	0,5 μL
<i>7,4x pufer S1 nukleaze (Fermentas)</i>	5,4 μL
Inkubacija 30 min na 37°C	
Inaktivacija <i>S1 nukleaze</i> 10 min na 70°C sa dodavanjem 4 μL EDTA (2 mM)	

Kako bi se uklonio EDTA iz uzoraka i omogućilo delovanje *RNAze-H*, nakon inaktivacije *S1 nukleaze*, vršena je Na-acetatna precipitacija. U 40 μL *reakcione smeše 2* dodavano je po 200 μL 0,1 M Na-acetata pH 5,2, rastvorenog u etanolu i celokupna smeša je centrifugirana 10 min/13000 rpm, nakon čega je uklonjen supernatant. Talog je zatim ispiran dva puta sa po 200 μL 70% etanola, uz centrifugiranje 10 min/13000 rpm. Supernatant je odliven i talog u potpunosti osušen. Dobijeni talog je korišćen u sledećoj *reakcionoj smeši 3*, finalne zapremine 40 μL :

Talog <i>reakcione smeše 2</i>	
<i>RNAza-H (5 U/μL) (Fermentas)</i>	1 μL
<i>10x pufer RNAze-H (Fermentas)</i>	4 μL
Inkubacija 2 h na 37°C	
Inaktivacija <i>RNAze-H</i> 10 min na 60°C	

Nakon inaktivacije *RNAze-H*, preostali jednolančani DNK fragment iz *reakcione smeše 3* je ponovo prečišćen Na-acetatnom precipitacijom na isti način, talog je prosušen, a potom resuspendovan u 3 μL sterilne vode. Sve reakcije su rađene u petoplikatu u 3 nezavisna eksperimenta. Da bi se povećao prinos ciljnog fragmenta i omogućila njegova detekcija, reakcije iz jednog eksperimenta u petoplikatu, koje su se odvijale istovremeno pod istim uslovima, su spojene u finalnu zapreminu od 15 μL . Dobijeni jednolančani fragment korišćen je u PCR reakciji, u kojoj je drugi graničnik bio fluorescentno obeležen (Pt2-fam). Na taj način, moguće je fragment analizom odrediti dužinu umnoženog PCR produkta, odnosno poziciju graničnika dobijenog u eksperimentu. Pored negativnih kontrola eksperimenta, u ovaj korak uključena je i negativna kontrola PCR reakcije (-K-PCR). Kao matrica je korišćen dvolančani

fragment koji obuhvata 715 bp 3' kraja gena za protrombin koji je umnožen po već opisanom protokolu. PCR reakciona smeša, finalne zapremine 25 µL, bila je sledećeg sastava:

wt-exp i mut-exp		-K-wt-exp i -K-mut-exp		-K-PCR	
matrica	750 ng	matrica	750 ng	matrica	750 ng
10x PCR pufer	2,5 µL	10x PCR pufer	2,5 µL	10x PCR pufer	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	2,5 µL	25 mM MgCl ₂	2,5 µL	25 mM MgCl ₂	2,5 µL
2 mM dNTP-ovi	2,5 µL	2 mM dNTP-ovi	2,5 µL	2 mM dNTP-ovi	2,5 µL
Pt2-fam [§]	0,5 µL	Pt2-fam [§]	0,5 µL	Pt2-fam [§]	0,5 µL
graničnik*	6 µL	graničnik*	6 µL	/	
5 U/µL <i>Taq</i> pol.	0,2 µL	5 U/µL <i>Taq</i> pol.	0,2 µL	5U/µL <i>Taq</i> pol.	0,2 µL

[§] koncentracija graničnika 10 pmol/µL ; *graničnik dobijen precipitacijom *reakcione smeše 3*

Temperaturni profil PCR reakcije bio je:

(97°C/2 min, 55°C/3 min) x 3 ciklusa

(94°C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/1 min) x 40 ciklusa

72°C/10 min

PCR produkti su ponovo tretirani *SI nukleazom* na opisani način i nakon toga prečišćeni Na-acetatnom precipitacijom. Ovaj dodatni tretman je urađen da bi se umanjio signal koji potiče od jednolančanih fragmeta umnoženih Pt2-fam graničnikom, kako bi detekcija specifičnog signala bila olakšana. Dužina dobijenih PCR produkata sa fluorescentim graničnikom detekovana je fragment analizom uz korišćenje LIZ500 standarda i dobijeni rezultati su obrađeni pomoću *Gene Mapper 4.0* softvera na *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

Rezultati

4.1 Određivanje učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti

Prvi deo ove studije obuhvatao je određivanje učestalosti genskih varijanti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del u grupi od 603 ispitanika (353 pacijenata i 250 zdravih ispitanika).

Na osnovu postavljenih kriterijuma za studiju, odabrana je grupa od 353 pacijenta (starost $38,64 \pm 11,75$ godina), koju je činilo 117 muškaraca (m) i 236 žena (ž). Među njima, kod 247 pacijenta (starost $40,32 \pm 13,26$ godina; 117m i 130ž) bile su prisutne različite trombotičke manifestacije, a 106 žena ($34,80 \pm 5,59$) je imalo spontane pobačaje nepoznate etiologije. Pacijenti uključeni u studiju su imali ukupno 851 trombotički događaj (prosečno 2,41 trombotičkih događaja po pacijentu), a njih 140 (39,66%) je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu. S ciljem da se ispita da li FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijante mogu imati značajnu ulogu u etiologiji određenog trombotičkog događaja, grupa pacijenata je stratifikovana na nekoliko podgrupa. Podgrupa pacijenata sa trombozom dubokih vena obuhvatila je 94 ispitanika (starost $38,22 \pm 12,54$ godina; 42m i 53ž), podgrupu sa izolovanim plućnim embolizmom činilo je 104 pacijenta (starost $42,30 \pm 14,40$ godina; 56m i 48ž), dok je 49 pacijenata (starost $40,13 \pm 11,52$ godina; 19m i 29ž) imalo kombinovane trombotičke poremećaje, odnosno dva ili više različitih događaja (tromboze dubokih vena, plućni embolizam, moždani udar, infarkt miokarda ili spontane pobačaje).

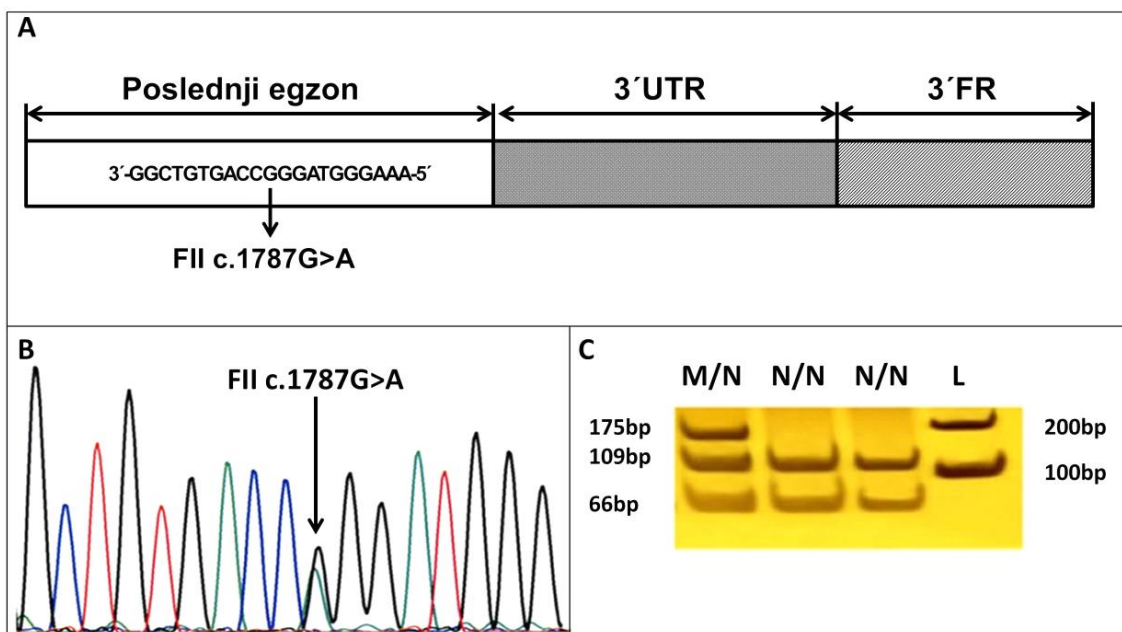
U opštu kontrolnu grupu bilo je uključeno 250 zdravih ispitanika (starost $40,37 \pm 13,78$ godina; 92m i 154ž), dok je kontrolnu grupu za grupu pacijentkinja sa spontanim pobačajima činilo 154 žene koje nisu imale spontane pobačaje (starost $38,17 \pm 12,16$ godina). Kontrolne grupe su bile formirane tako da po polu i godinama starosti odgovaraju grupama pacijenata. Karakteristike ispitanika koji su bili uključeni u studiju date su u Tabeli 5.

Tabela 5 Karakteristike učesnika u studiji

Trombotički poremećaj	n	Prosečna starost (godine ±SD)	Odnos polova		Pozitivna porodična anamneza (%)	Broj TD/SP	
			m	ž			
PACIJENTI	TDV	94	38,22±12,54	42	52	36 (37,89)	>181
	PE	104	42,30±14,40	56	48	41 (39,42)	>114
	KTP	49	40,13±11,52	19	30	22 (45,83)	106
	PTP	247	40,32±13,26	117	130	99 (40,08)	>461
	SP	106	34,80±5,59	/	106	41 (38,68)	390
	Σ	353	38,64±11,75	117	236	140 (39,66)	>851
KONTROLNA GRUPA	OKG	250	40,37±13,78	92	154	15 (6)	/
	KG-SP	154	38,17±12,16	/	154	3 (1,95)	/

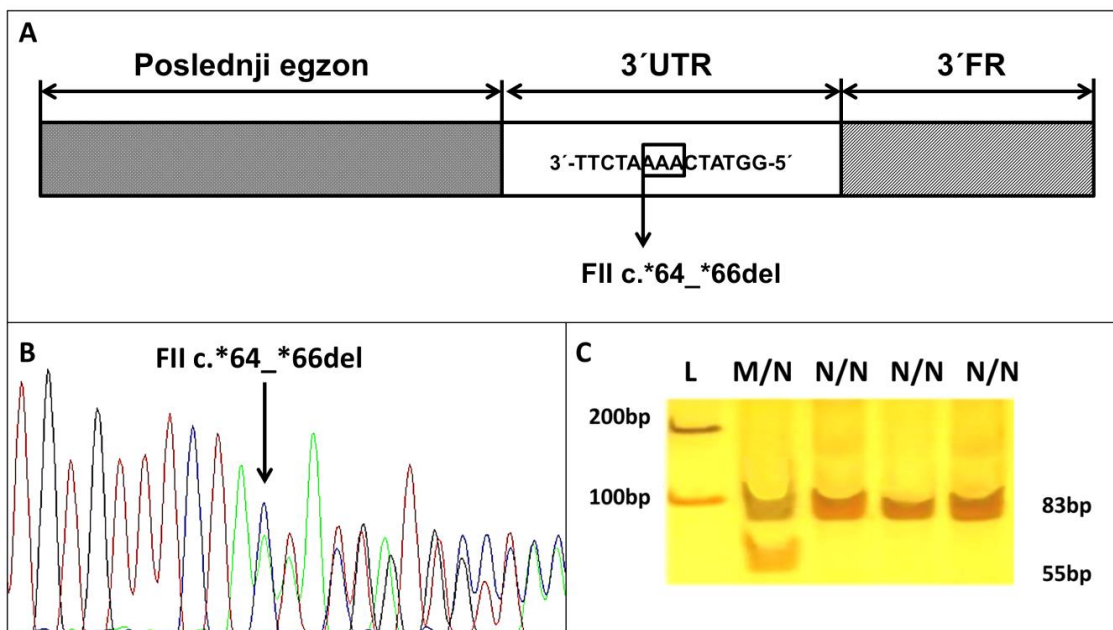
n-broj ispitanika u grupi; SD-standardna devijacija; m-muški pol; ž-ženski pol; TD/SP-trombotički događaj ili spontani pobačaj; TDV-tromboza dubokih vena; PE-plućni embolizam; KTP-kombinovani trombotički poremećaji; PTP-pacijenti sa trombotičkim poremećajima (obuhvata TDV, PE i KTP grupu); SP-spontani pobačaji; Σ-ukupan broj pacijenata; OKG-opšta kontrolna grupa; KG-SP-kontrolna grupa za spontane pobačaje

Varijanta FIIc.1787G>A se nalazi u poslednjem egzonu gena za protrombin i dovodi do aminokiselinske zamene Arg596Gln, dok je varijanta FIIc.*64_*66del pozicionirana u 3' UTR-u i predstavlja deleciju 3 nukleotida. Prisutvo ovih genskih varijanti kod ispitanika utvrđivano je metodom PCR-RFLP ili sekvenciranjem DNK. Za detekciju FIIc.1787G>A varijante PCR-RFLP metodom, umnožavan je fragment dužine 175 bp. Razdvajanjem produkata restrikcione digestije detektovano je prisustvo *wild-type* (wt) alela (109 i 66 bp) i mutiranog alela (175 bp) (Slika 12C).



Slika 12 Detekcija FIIc.1787G>A varijante **A)** Shematski prikaz pozicije FIIc.1787G>A varijante u poslednjem egzonu 3' kraja gena za protrombin; **B)** Deo sekvence 3' kraja gena za protrombin sa FIIc.1787G>A varijantom u heterozigotnom obliku; **C)** PCR-RFLP analiza FIIc.1787G>A varijante: L-marker molekularnih dužina; N-wt alel; M-mutirani alel

U slučaju FIIc.*64_*66del genske varijante, restrikcioni profili umnoženih fragmenata nakon PCR-RFLP-a bili su: za *wild type* alel-83 bp, a za mutirani alel- 55 i 25 bp (Slika 13C). Za detekciju ovih varijanti metodom sekvenciranja DNK, umnožavan je i sekvenciran region 3' kraja protrombinskog gena dužine 715 bp koji obuhvata poslednji egzon i 3' UTR (Slika 12B i 13B).



Slika 13 Detekcija FIIc.*64_*66del varijante **A)** Shematski prikaz pozicije FIIc.*64_*66del varijante u 3' UTR-u gena za protrombin; **B)** Deo sekvence 3' kraja gena za protrombin sa FIIc.*64_*66del varijantom u heterozigotnom obliku; **C)** PCR-RFLP analiza FIIc.*64_*66del varijante: L-marker molekulske dužine; N-wt alel; M-mutirani alel

Podaci o učestalosti genotipova FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genskih varijanti kod pacijenata i kontrolnih ispitanika dati su u Tabeli 6.

Tabela 6 Učestalost genotipova FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti kod pacijenata sa trombofilijom i kontrolnih ispitanika

Trombotički poremećaj		FIIc.1787G>A			FIIc.*64_*66del			P ¹ OR ¹ (95% CI)	P ² OR ² (95% CI)
		n (%)	N/N	M/N	M/M	n (%)	N/N		
PACIJENTI	TDV (n=95)	94 (100)	/	/	94 (100)	/	/	/	/
	PE (n=104)	104 (100)	/ (0,00)	/	103 (99,04)	1 (0,96)	/	/	0,29 7,26 (0,29-179,71)
	KTP (n=49)	47 (95,92)	2 (4,08)	/	49 (100)	/	/	0,03 26,37 (1,24-558,01)	/
	PTP (n=247)	245 (99,19)	2 (0,81)	/	246 (99,59)	1 (0,40)	/	0,25 5,10 (0,24-106,82)	0,50 3,05 (0,12-76,20)
	SP (n=106)	106 (100)	/ (0,00)	/	103 (97,17)	3 (2,83)	/	/	0,07* 10,45* (0,53-204,43)
	Σ (n=353)	351 (99,43)	2 (0,57)	/	349 (98,87)	4 (1,13)	/	0,51 3,56 (0,17-74,55)	0,15 6,45 0,35-120,36
KONTROLNA GRUPA	OKG (n=250)	250 (100)	/ (0,00)	/	250 (100)	/ (0,00)	/		
	KG-SP (n=154)	154 (100)	/ (0,00)	/	154 (100)	/ (0,00)	/		

n-broj pacijenata u grupi; TDV-tromboza dubokih vena; PE-plućni embolizam; KTP-kombinovani trombotički poremećaji; PTP-pacijenti sa trombotičkim poremećajima (obuhvata TDV, PE i KTP grupu); SP-spontani pobačaji; Σ-ukupan broj pacijenata; OKG-opšta kontrolna grupa; KG-SP-kontrolna grupa za spontane pobačaje; N-wt alel; M-mutirani alel; P-statistička značajnost; OR-Odds Ratio; CI-interval poverenja; za poređenje učestalosti korišćen je *Fisher's exact* test; 1-poređenje grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu za FIIc.1787G>A varijantu; 2-poređenje grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu za FIIc.*64_*66del varijantu; * poređenje SP grupe u odnosu na kontrolnu grupu KG-SP za FIIc.*64_*66del varijantu

Grupe pacijenata u kojima su detektovane ispitivane varijante bile su u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži. Za obe genske varijante detektovana je vrlo mala učestalost kod pacijenata, dok u kontrolnim grupama nije detektovan nijedan nosilac. Bez obzira na ovu činjenicu, rezultati su statistički obrađeni, imajući u vidu da su učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti prvi put određivane u ovoj studiji, te dobijeni podaci predstavljaju smernice za dalje istraživanje. Za statističku obradu je, zbog male učestalosti ispitivanih varijanti, korišćen *Fisher's exact* test.

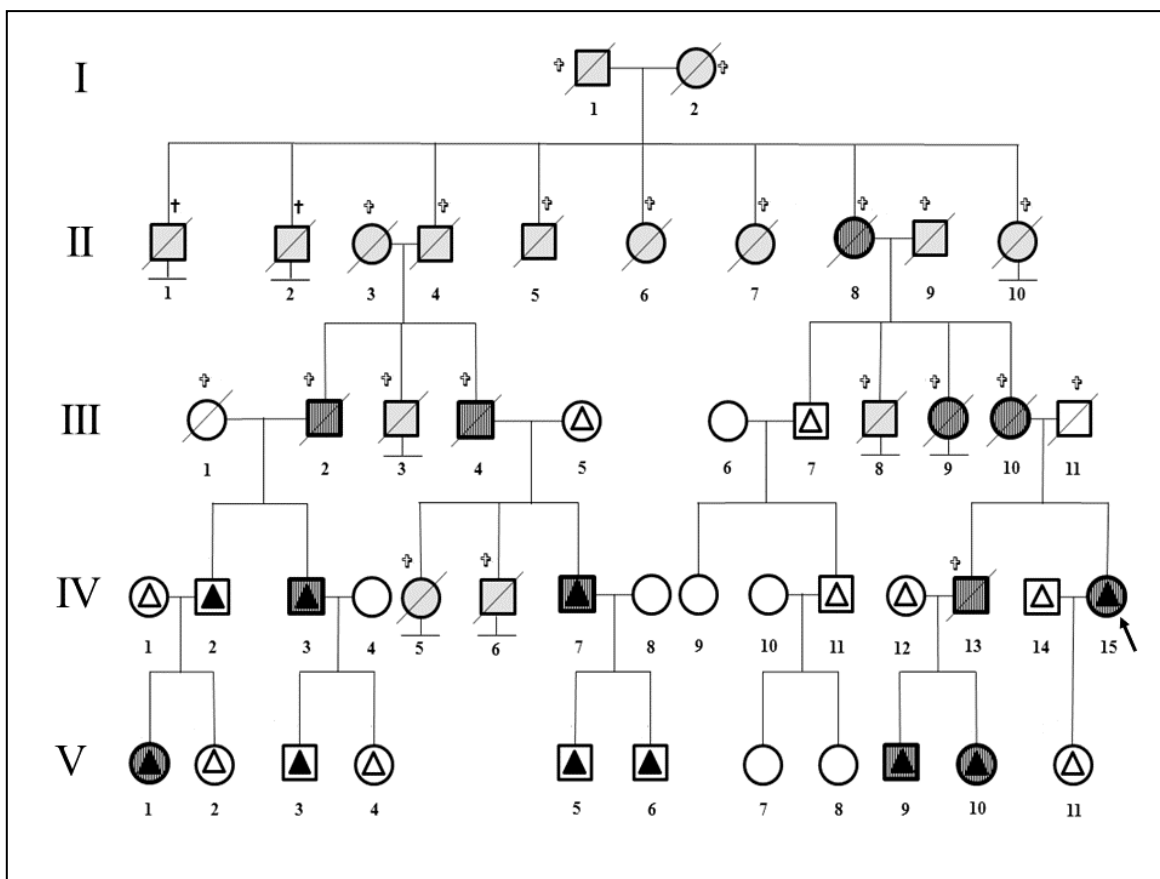
Genska varijanta FIIc.1787G>A je u heterozigotnoj formi detektovana kod dva ispitanika u grupi pacijenata. Detektovani nosioci su pripadali grupi pacijenata sa kombinovanim trombotičkim poremećajima, dok u ostalim ispitivanim grupama sa trombozom dubokih vena, izolovanim plućnim embolizmom i ženama sa spontanim pobačajima nosioci ove varijante nisu bili prisutni. Homozigotni nosioci FIIc.1787G>A nisu detektovani u ispitivanim grupama. Učestalost FIIc.1787G>A genske varijante u grupi pacijenta sa kombinovanim trombotičkim poremećajima (4,08%), bila je statistički značajno povećana ($P=0,03$) u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika.

U slučaju FIIc.*64_*66del varijante detektovana su 4 nosioca u heterozigotnom obliku, dok nijedan homozigotni nosilac nije detektovan. Sva 4 nosioca su detektovana u grupi pacijenata od kojih jedan među pacijentima sa izolovanim plućnim embolizmom, a u grupi žena sa spontanim pobačajima 3 nosioca ove varijante. Povećana učestalost ove varijante zabeležena je kod pacijenata sa izolovanim plućnim embolizmom (0,96%) i sa spontanim pobačajima (2,83%), u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (0%), ali bez statističke značajnosti.

4.1.1 Porodične studije

U cilju funkcionalne analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti, u studiju su uključeni članovi porodica detektovanih nosilaca ovih varijanti, čiji su uzorci plazme korišćeni u *ex vivo* analizama. Za dalju funkcionalnu analizu FIIc.1787G>A varijante bili su dostupni članovi porodice jednog od dva detekovana nosioca. Pored probanda (IV-15) u analizu je uključeno još 18 članova porodice (Slika 14). Proband IV-15 je imala najpre TDV u svojoj 16. godini, a potom ponovljenu trombozu tokom trudnoće u 23. godini, akutnu mezenterijalnu trombozu u 33. godini i infarkt miokarda u 45. godini starosti [199]. Dodatnih 18 članova porodice (obebeženih trouglom na slici 14) su testirani na prisustvo FIIc.1787G>A varijante, i zajedno sa probandom

detektovano je ukupno 10 nosilaca ove varijante (6 simptomatskih i 4 asimptomatska), dok 9 testiranih članova porodice nisu bili nosioci.

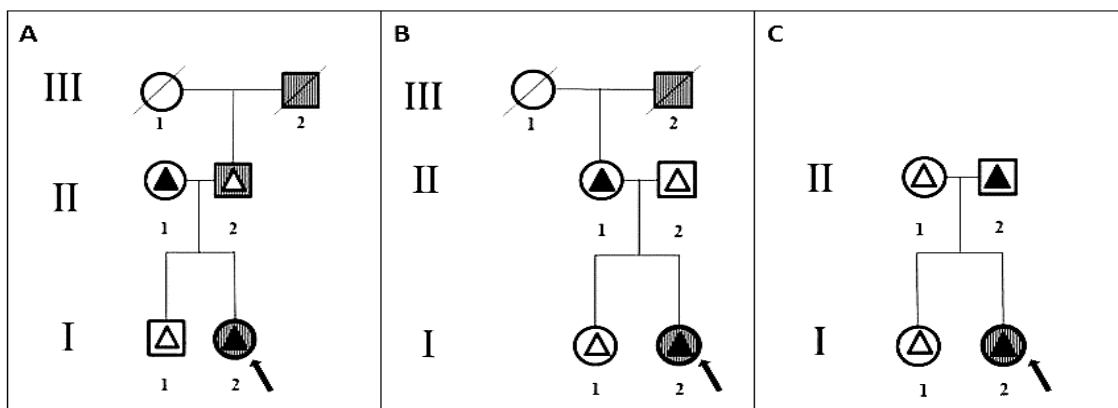


Slika 14 Porodično stablo detektovanog nosioca FIIC.1787G>A varijante. Proband (IV-15) je označen strelicom. Šrafirani objekti predstavljaju članove porodice koji su imali trombotički poremećaj; beli objekti predstavljaju članove koji nisu imali trombotički poremećaj, a sivim objektima su predstavljeni članovi porodice za koje nisu bili dostupni podaci. Trouglovima su označeni testirani članovi porodice: crnim- heterozigotni nosioci FIIC.1787G>A varijante, belim-testirani članovi koji nisu nosioci. Kosa crta označava preminule članove porodice: †-poginulih u ratu, ‡-umrlih prirodnom smrću. Slika objavljena na engleskom jeziku u Miljic, Gvozdenov i saradnici, 2017 [200]

Prosečna starost u vreme pojave prvog trombotičkog poremećaja kod simptomatskih nosilaca bila je 26,5 (12-41) godina, dok je prosečna starost asimptomatskih nosilaca u vreme uzimanja uzoraka bila 18,5 (8-62) godina. Ukupan broj trombotičkih poremećaja kod simptomatskih nosilaca bio je 12, od kojih su 8 TDV, a u jednom slučaju TDV praćene plućnim embolizmom. Kod dva nosioca ustanovljena

je dijagnoza akutne mezenterijalne tromboze. Testiranjem svih ispitanika iz ove porodice na rutinske testove za trombofiliju nije utvrđeno prisustvo drugih faktora rizika, osim kod supružnika (IV-14) i ćerke (V-11) probanda, za koje je detektovano da su asimptomatski nosioci FII G20210A mutacije u heterozigotnom obliku.

U funkcionalnu analizu FIIc.*64_*66del varijante bili su uključeni članovi porodica 3 detektovana nosioca u grupi žena koje su imale spontane pobačaje. Članovi porodice nosioca ove varijante sa izolovanim plućnim embolizmom nisu bili dostupni za dalje analize. Za sve članove porodica koji su učestvovali u studiji (ukupno 9), prikupljeni su anamnestički podaci i urađeno je testiranje na prisustvo FIIc.*64_*66del varijante. U porodici A (Slika 15), proband je u 31. i 32. godini imala dva spontana pobačaja nepoznatog uzroka, oba u šestoj nedelji trudnoće. Tome je prethodila uspešna trudnoća u 28. godini kada je na jednom jajniku detektovan tromb. Proband iz porodice B je takođe imala ponovljene spontane pobačaje do kojih je došlo u 8. i 12. nedelji trudnoće usled pojave hematoma i zastoja srčanog rada ploda. Nakon toga, imala je dva uspešna porođaja carskim rezom. Proband iz porodice C do sada nije imala uspešne trudnoće i nakon dva pokušaja *in vitro* fertilizacije došlo je do gubitka ploda u 7. i 18. nedelji trudnoće. Sistemske bolesti nisu bile prisutne kod probanda iz porodice B i C, dok je proband iz porodice A imala hipotireozu.



Slika 15 Porodična stabla detektovanih nosilaca FIIc.*64_*66del varijante. Probandi (I-2) iz 3 porodice (A, B, C) su označeni strelicom. Šrafirani objekti predstavljaju članove porodice koji su imali trombotički poremećaj; beli objekti predstavljaju članove koji nisu imali trombotički poremećaj; trouglovima su označeni testirani članovi porodice: crnim- heterozigotni nosioci FIIc.1787G>A varijante, belim-testirani članovi koji nisu nosioci. Kosa crta označava preminule članove porodice

Anamnestički podaci su ukazali da u ispitivanim porodicama nije bilo ranijih slučajeva spontanih pobačaja. U porodicama A i B, zabeležena je istorija infarkta miokarda i moždanih udara, dok je u porodici C kod oca probanda dijagnostifikovana arterijska hipertenzija. Varijanta FIIc.*64_*66del je u heterozigotnoj formi detektovana kod majke probanda u porodici A i B, za koje je pokazano da su asimptomatski nosioci ove varijante sa prethodnim uspešnim trudnoćama. U porodici C je utvrđeno da je otac probanda takođe asimptomatski nosilac FIIc.*64_*66del varijante.

4.2 Ex vivo analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti

Da bi se ispitao potencijalni uticaj FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti na aktivnost, raspoloživost protrombina i njegovu funkciju, na uzorcima plazme ispitanika su rađeni testovi koji uključuju određivanje aktivnosti protrombina, količinu protrombina i test generacije trombina. Zbog pozicije FIIc.1787G>A varijante u kodirajućem delu gena za protrombin, u regionu koji je značajan za interakcije trombina sa drugim komponentama hemostaznog sistema, korišćenjem testova rezistencije na antitrombin i trombomodulin, određivan je uticaj ove varijante na funkcionalnost trombina. FIIc.*64_*66del varijanta se nalazi u nekodirajućem regionu gena, zbog čega njen uticaj na ovu vrstu interakcija nije ispitivan.

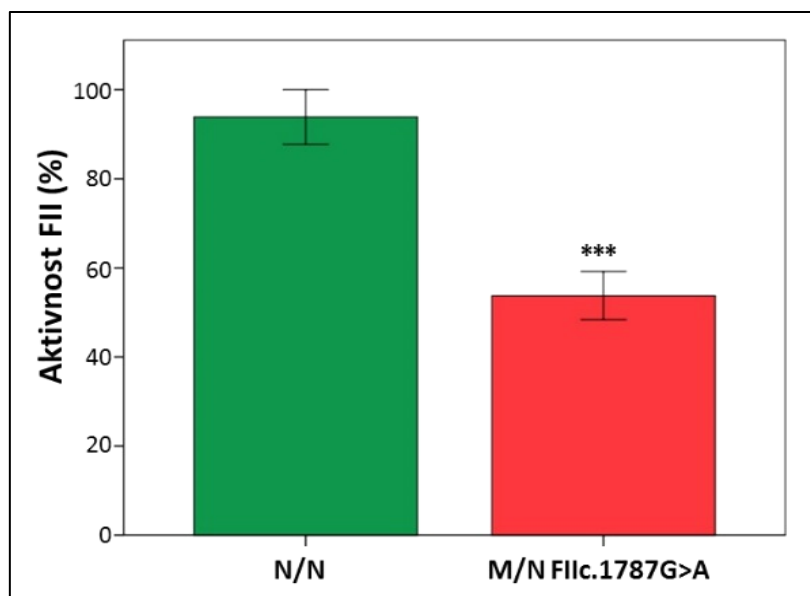
Za ispitivanje FIIc.1787G>A varijante korišćeni su uzorci plazme 19 ispitanika iz prethodno opisane porodice: proband i još 9 nosilaca ove varijante (5 simptomatskih i 4 asimptomatska) i 9 ispitanika koji nisu nosioci. U ispitivanje FIIc.*64_*66del varijante, uključeni su uzorci plazme ukupno 12 ispitanika iz 3 opisane porodice koji su obuhvatili 3 detektovana probanda, 3 asimptomatska nosioca i 6 ispitanika koji nisu bili nosioci ove varijante.

4.2.1 Određivanje aktivnosti protrombina u plazmi ispitanika

Aktivnost protrombina je merena korišćenjem standardnog komercijalnog testa, sa referentnim vrednostima u opsegu od 75 do 150%.

Detektovana aktivnost protrombina kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante bila je u opsegu od 46-70%, dok je kod članova porodice koji nemaju ovu varijantu, aktivnost protrombina bila u referentnom opsegu (84-105%) (Slika 16). Poređenjem srednjih vrednosti pokazano je da su svi nosioci ove varijante imali statistički značajno

($P < 0,001$) smanjenu aktivnost protrombina ($49\% \pm 4,1$) u poređenju sa ispitanicima koji nisu bili nosioci ove varijante ($96\% \pm 2,2$).



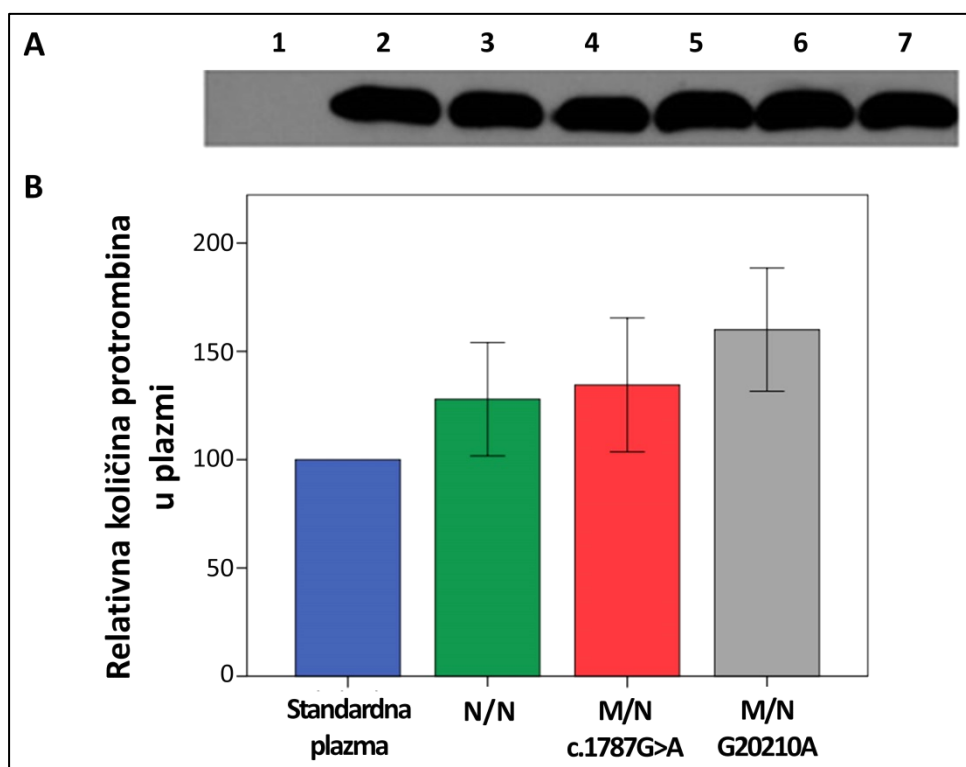
Slika 16 Aktivnosti protrombina u uzorcima plazme ispitanika porodice nosioca FIIc.1787G>A varijante. FII-faktor II; N-wt alel; M-mutirani alel; N/N- nisu nosioci FIIc.1787G>A varijante; M/N FIIc.1787G>A- heterozigotni nosioci FIIc.1787G>A varijante; Histogrami su prikazani sa jednom standardnom devijacijom (\pm SD); ***- $P < 0,001$

Kod svih 12 ispitanika iz 3 porodice uključene u studiju FIIc.*64_*66del varijante, izmerena aktivnost protrombina je bila u referentnom opsegu i nije se razlikovala između nosilaca i nenosilaca.

4.2.2 Određivanje količine protrombina u plazmi ispitanika

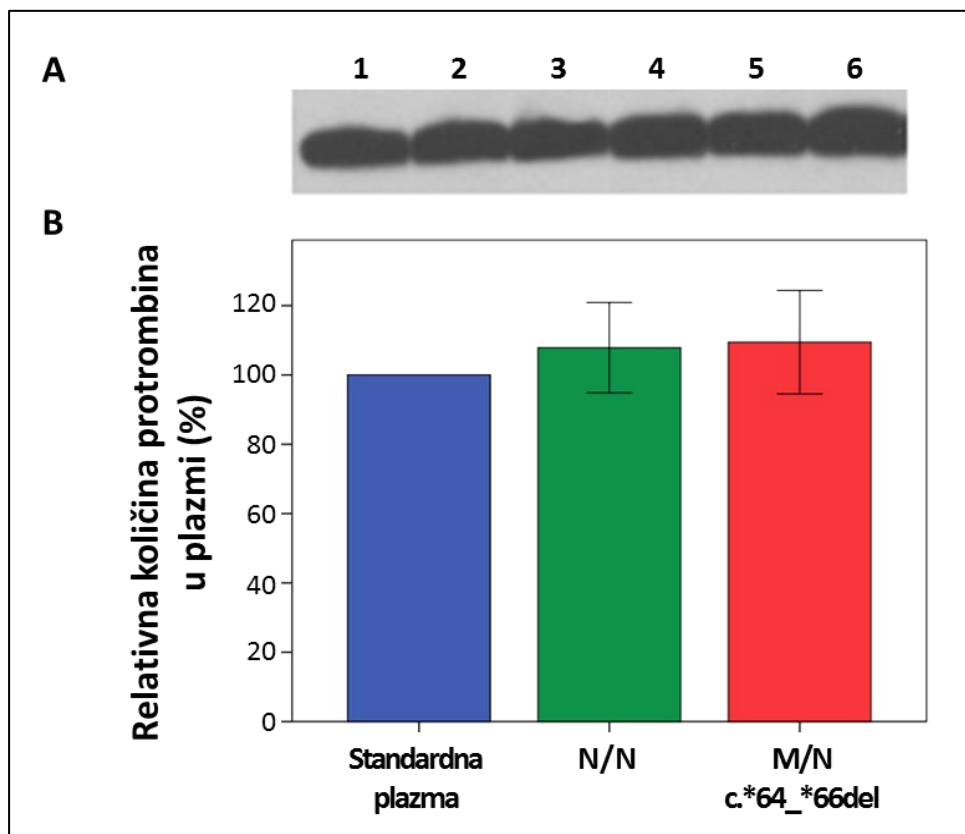
Za ispitivanje uticaja FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genskih varijanti na količinu protrombina u plazmi ispitanika uključenih u *ex vivo* analize, korišćena je metoda relativne kvantifikacije signala dobijenog Western blot analizom. Dobijene vrednosti su normalizovane u odnosu na komercijalnu standardnu humanu plazmu (*Siemens*) kao referentnu vrednost od 100%. U cilju preciznije kvantifikacije dobijenih rezultata, uzorak svakog ispitanika i standardne plazme je nanošen na SDS-poliakrilamidni gel u triplikatu u tri nezavisna eksperimenta. Relativna kvantifikacija signala koji odgovara količini protrombina vršena je pomoću softvera *Image Studio Lite (LI-COR)*.

U analizi FIIc.1787G>A varijante nije detektovana statistički značajna razlika ($P=0,31$) u količini protrombina u uzorcima plazme nosilaca ($137,4\% \pm 31,8$) u poređenju sa ispitanicima kod kojih ova varijanta nije prisutna ($127,9\% \pm 26,2$). Detektovana količina protrombina nije se razlikovala u uzorcima asimptomatskih i simptomatskih nosilaca. Kod dva ispitanika (IV-14; V-11) koji su heterozigotni nosioci FII G20210A varijante, nivo protrombina ($160,0\% \pm 28,5$) je bio statistički značajno povišen ($P < 0,01$) u odnosu na ispitanike koji su imali *wild-type* genotip za protrombin (Slika 17).



Slika 17 Određivanje količine protrombina u plazmi ispitanika porodice nosioca FIIc.1787G>A varijante. **A)** Western blot analiza nivoa protrombina u plazmi ispitanika: 1-protrombin deficijentna plazma; 2,3,4-standardna plazma; 5,6,7- heterozigotni nosioci FII c.1787G>A varijante **B)** Relativna kvantifikacija količine protrombina u uzorcima plazme. N-wt alel; M-mutirani alel; N/N- nisu nosioci FIIc.1787G>A varijante; M/N FIIc.1787G>A- heterozigotni nosioci FIIc.1787G>A varijante; M/N FII G20210A- heterozigotni nosioci FII G20210A varijante; Histogrami su prikazani sa jednom standardnom devijacijom (\pm SD); **- $P < 0,01$; Slika objavljena na engleskom jeziku u Miljic, Gvozdenov i saradnici, 2017 [200]

Detektovan nivo protrombina u plazmi nosilaca FIIc.*64_*66del varijante (109,4%±14,9) nije se statistički značajno razlikovao ($P=0,676$) u odnosu na nivo protrombina u uzorcima ispitanika koji nisu nosioci ove varijante (107,8%±13,0) (Slika 18).



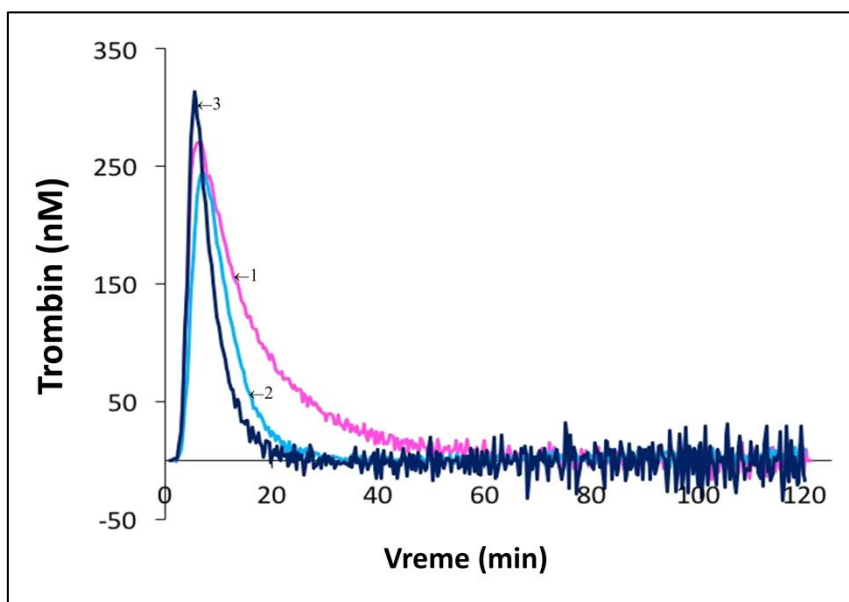
Slika 18 Određivanje količine protrombina u plazmi ispitanika iz porodica nosilaca FIIc.*64_*66del varijante. **A)** Western blot analiza nivoa protrombina u plazmi ispitanika: 1,2,3-standardna plazma; 5,6- heterozigotni nosioci FIIc.*64_*66del varijante **B)** Relativna kvantifikacija količine protrombina u uzorcima plazme. N-wt alel; M-mutirani alel; N/N- nisu nosioci FIIc.*64_*66del varijante; M/N FIIc.*64_*66del- heterozigotni nosioci FIIc.*64_*66del varijante; Histogrami su prikazani sa jednom standardnom devijacijom (\pm SD)

4.2.3 Određivanje endogenog potencijala trombina u plazmi ispitanika

Za određivanje trombogenog potencijala FIIc.1787G>A i FII c.*64_*66del varijanti korišćen je test generacije trombina koji spada u globalne testove hemostaze. Na osnovu parametara testa koji su opisani u delu Metode, praćene su sve tri faze u procesu stvaranja trombina i poređene su dobijene vrednosti endogenog potencijala

trombina kod nosilaca sa ispitanicima koji nisu nosioci FIIc.1787G>A, odnosno FII c.*64_*66del varijante.

Dobijene vrednosti površine grafika ispod krive (ETP-a) bile su statistički značajno povećane ($P<0,001$) kod svih nosilaca FIIc.1787G>A varijante (simptomatskih i asimptomatskih) u poređenju sa ispitanicima koji nisu nosioci. Do povećanja ETP je došlo usled statistički značajne razlike ($P<0,001$) u vremenu proteklom od početka reakcije do terminalne faze kada vrednost krive dostigne nultu vrednost („početak repa“) kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante u poređenju sa nenosiocima. Prisustvo FIIc.1787G>A varijante nije statistički značajno uticalo na vreme početka reakcije (lag vreme, $P=0,93$) i količinu stvorenog trombina (visina pika, $P=0,05$) (Slika 19 i Tabela 7).



Slika 19 Test generacije trombina sa krivama koje predstavljaju srednje vrednosti endogenog potencijala trombina u plazmi: nosilaca FIIc.1787G>A varijante-roze linija (1); nenosilaca FIIc.1787G>A varijante-svetloplava linija (2); standardnoj plazmi-tamnoplava linija (3); Grafik objavljen na engleskom jeziku u Miljic, Gvozdenov i saradnici, 2017 [200]

Tabela 7 Određivanje endogenog potencijala trombina u plazmi ispitanika porodice nosioca FIIc.1787G>A varijante

	Heterozigotni nosioci FIIc.1787G>A medijana (opseg)	Nisu nosioci FIIc.1787G>A medijana (opseg)	Standardna plazma	P
Lag vreme (min)	3,1 (2,6-3,6)	3,2 (2,7-4,2)	2,5	0,93
Visina pika (nM)	301(273-373)	283 (246-310)	309	0,05
ETP (nM/min)	3645 (3105-4233)	1653 (1482-2025)	1408	<0,001
Početak repa (min)	60,0 (51,0-78,7)	24,0 (22,0-25,7)	21	<0,001

lag vreme-vreme proteklo do faze inicijacije; ETP- površina ispod krive; visina pika- maksimalni nivo stvorenog trombina; početak repa-vreme proteklo od početka reakcije do dostizanja nulte vrednosti krive generisanog trombina; P-statistička značajnost; Poređenje nosioci vs. nenosioci je vršeno *Mann-Whitney U* testom. Tabela objavljena na engleskom jeziku u Miljic, Gvozdenov i saradnici, 2017 [200]

Ispitivanje trombogenog potencijala FIIc.*64_*66del varijante rađeno je u uzorcima plazme 6 nosilaca (3 simptomatska i 3 asimptomatska), a kao kontrola je korišćena standardna plazma. Praćeni su parametri: t_lag- vreme proteklo do faze inicijacije (lag vreme), c_max- maksimalni nivo stvorenog trombina (visina pika), AUC-površina ispod krive (ETP). Test generacije trombina je pokazao da je kod nosilaca u odnosu na standardnu plazmu povećana visina pika (112,1 mA/s vs 94,36 mA/s; P=0,286) i ETP (388,9 mA vs 351,54 mA; P=0,256), ali razlike nisu statistički značajne. Izmerena vrednost za lag vreme bila je skoro identična kod nosilaca FIIc.*64_*66del varijante (21,4 s) i standardne plazme (19,1 s) (Tabela 8).

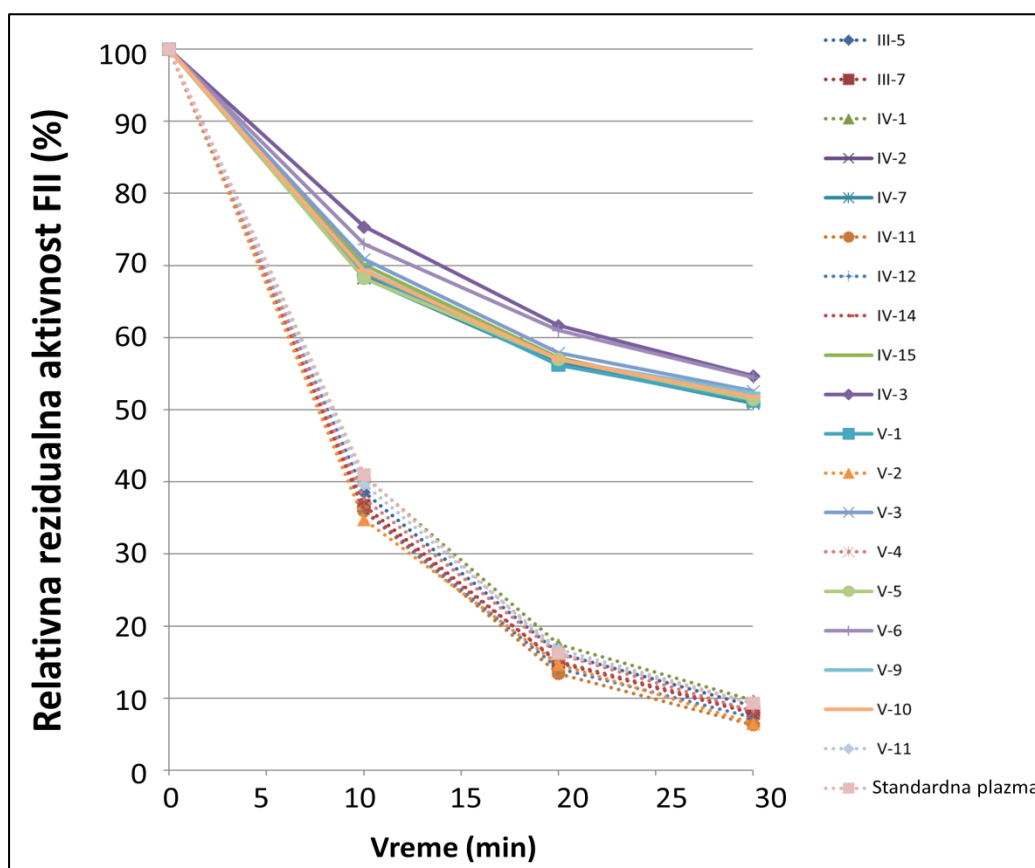
Tabela 8 Određivanje endogenog potencijala trombina u plazmi nosilaca FIIc.*64_*66del varijante

	Nosioci FIIc.*64_*66del medijana (opseg)	Standardna plazma	P
Lag vreme (t_lag) (s)	21,4 (18,1-25,2)	19,1	0,517
Visina pika (c_max) (mA/s)	112,1 (96,5-133,0)	94,4	0,286
ETP (AUC) (mA)	388,9 (349,6-432,1)	351,5	0,256

t_lag-vreme proteklo do faze inicijacije; t_max-period vremena do dostizanja maksimalnog nivoa nastalog trombina; c_max-maksimalni nivo nastalog trombina; ETP-površina ispod krive; P-statistička značajnost; Poređenje nosioci vs. standardna plazma je vršeno *Mann-Whitney U* testom

4.2.4 Određivanje rezistencije na antitrombin u plazmi ispitanika

Prethodni rezultati predikcije i pilot studije su pokazali da prisustvo FIIc.1787G>A varijante remeti vezivanje trombina i njegovog inhibitora antitrombina, usled čega je inaktivacija trombina onemogućena [199]. U ovoj studiji, za ispitivanje uticaja FIIc.1787G>A varijante na inaktivaciju trombina korišćen je test rezistencije na antitrombin. Test se sastojao iz tri koraka: 1. aktivacije trombina u uzorcima plazme ispitanika; 2. inaktivacije trombina dodatkom antitrombina u višku i 3. praćenja relativne rezidualne aktivnosti trombina (RRAT) koji nije inaktiviran antitrombinom, pomoću hromogenog supstrata.

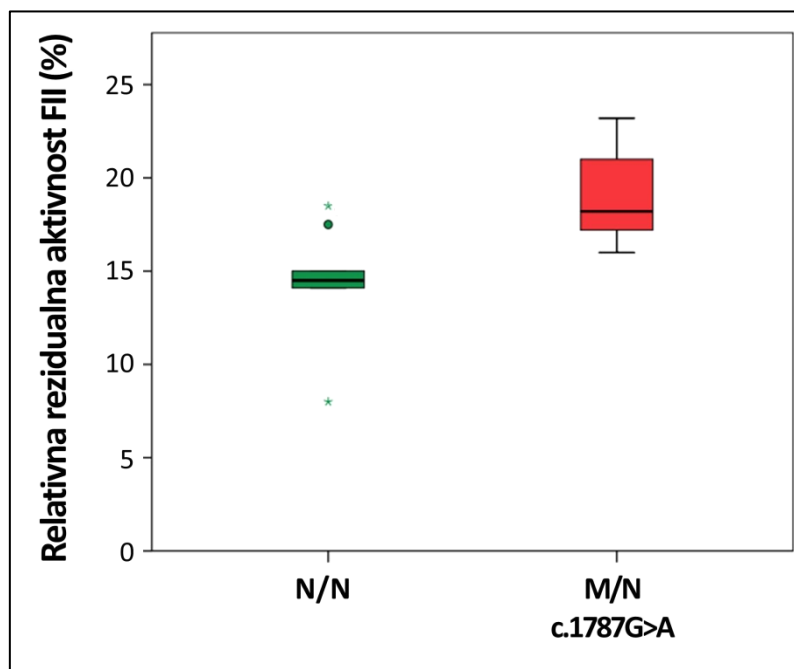


Slika 20 Određivanje rezistencije na antitrombin u plazmi ispitanika porodice nosioca FIIc.1787G>A varijante. Brojevi uzoraka prikazani na desnoj strani grafika odgovaraju brojevima prikazanim u porodičnom stablu ispitivane porodice uključene u *ex vivo* analizu FIIc.1787G>A varijante (Slika 16). Punim linijama su predstavljeni heterozigotni nosioci FIIc.1787G>A varijante; isprekidanim linijama su predstavljeni ispitanici koji nisu nosioci FIIc.1787G>A varijante i uzorak standardne plazme; Grafik objavljen na engleskom jeziku u Miljic, Gvozdencov i saradnici, 2017 [200]

U analizu je bilo uključeno ukupno 19 uzoraka porodice u kojoj je detektovana FIIc.1787G>A varijanta: 10 uzoraka plazme nosilaca i 9 uzoraka plazme ispitanika koji nisu nosioci ove varijante. U svim tačkama merenja (0-30 min) dobijene vrednosti RRAT nosilaca su bile značajno povećane u poređenju sa kontrolnom plazmom i plazmom nenosilaca (Slika 20). Nakon 30 min od početka testa, RRAT kod svih nosilaca (simptomatskih i asimptomatskih) su bile 50,9-54,7%, dok su detektovane vrednosti u kontrolnoj plazmi i kod nenosilaca bile ispod 10%.

4.2.5 Određivanje rezistencije na trombomodulin u plazmi ispitanika

Uticao FIIc.1787G>A varijante na potencijal trombina da izvrši svoju antikoagulantnu funkciju ispitan je testom rezistencije na trombomodulin. Test se sastoji u aktivaciji trombina u plazmi ispitanika, koji se u narednom koraku inaktivira trombomodulinom, dok se istovremeno u paralelnoj kontrolnoj reakciji umesto trombomodulina dodaje pufer. Rezidualna aktivnost trombina, koji nije inaktiviran u prethodnoj reakciji, meri se nakon dodatka fibrinogena i izražava se kroz odnos vremena potrebnog da se izvrši konverzija fibrinogena u fibrin u reakcijama sa i bez dodatka trombomodulina [201].



Slika 21 Određivanje rezistencije na trombomodulin u plazmi ispitanika porodice nosioca FIIc.1787G>A varijante. N/N- nisu nosioci FIIc.1787G>A varijante; M/N FIIc.1787G>A-heterozigotni nosioci FIIc.1787G>A varijante; ***-P<0,001

Primenom opisanog testa na uzorcima plazme ispitanika uključenih u *ex vivo* analizu FIIc.1787G>A varijante, pokazano je da prisustvo ove varijante dovodi do statistički značajno ($P < 0,001$) povećane relativne rezidualne aktivnosti trombina u prisustvu trombomodulina (RRAT-tm) ($18,9 \pm 2,3$) u poređenju sa dobijenim vrednostima u uzorcima ispitanika kod kojih ova varijanta nije prisutna ($14,5 \pm 2,9$) (Slika 21). Dobijene RRAT-tm vrednosti kod simptomatskih i asimptomatskih nosilaca su bile veoma slične.

4.3 *In vitro* analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti

Uticaj FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti na ekspresiju gena za protrombin praćen je na nivou iRNK i na nivou proteina. Najpre su konstruisani ekspresioni vektori koji sadrže cDNK za protrombin sa varijantama FIIc.1787G>A ili FIIc.*64_*66del i njima je vršena tranzijentna transfekcija permanentne ćelijske linije Cos-7. Iz transfekovanih ćelija je izolovana RNK, koja je korišćena za relativnu kvantifikaciju ekspresije protrombina primenom PCR-a u realnom vremenu. Imajući u vidu da je protrombin sekretorni protein, za određivanje uticaja ispitivanih genskih varijanti na nivo ekspresije proteina korišćeni su medijumi u kojima su gajene transfekovane Cos-7 ćelije. Količina protrombina u medijumu određivana je relativnom kvantifikacijom signala dobijenih Western blot analizom.

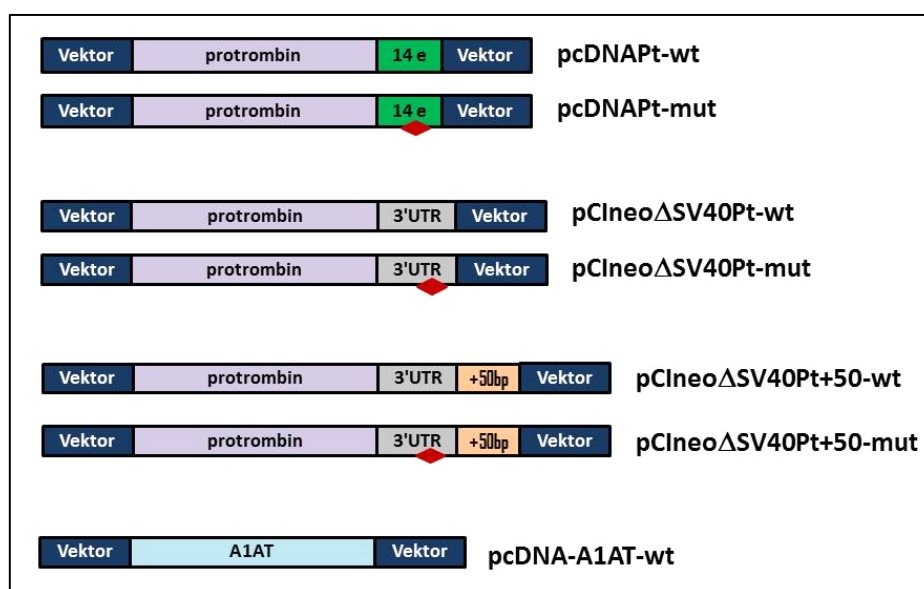
4.3.1 Ekspresioni konstrukti

Za funkcionalnu analizu FIIc.1787G>A varijante korišćen je pcDNA3.1(+) vektor u koji je uklonirana celokupna *wild-type* cDNK za protrombin koja je sadržala signalnu sekvencu i svih 14 egzona (**pcDNAPt-wt**) [177], a *in-situ* mutagenезom je uvedena FIIc.1787G>A varijanta i dobijen je **pcDNAPt-mut** konstrukt. Sekvenciranjem konstrukta potvrđeno je prisustvo zamene G u A na 1787. mestu. Kao kontrola korišćen je **pcDNA3.1(+)** vektor bez inserta (Slika 22).

U funkcionalnoj analizi FIIc.*64_*66del varijante korišćen je vektor pCIneo iz koga je uklonjen SV40 poliadenilacioni signal dužine 226 bp (pCIneoΔSV40) [202], kako bi se sprečio njegov uticaj na ekspresiju kloniranog gena. Korišćena su dva tipa konstrukta pCIneoΔSV40 vektora: prvi **pCIneoΔSV40Pt-wt**, koji je sadržao celokupnu cDNK za protrombin (signalnu sekvencu, 14 egzona, 3' UTR) i drugi **pCIneoΔSV40Pt+50-wt** koji je sadržao i dodatnih 50 bp 3' FR regiona. U oba tipa

konstrukta je metodom *in-situ* mutageneze uvedena FIIc.*64_*66del varijanta i formirani su odgovarajući konstrukti u mutiranoj formi (**pCIneoΔSV40Pt-mut** i **pCIneoΔSV40Pt+50-mut**). Prisustvo FIIc.*64_*66del u konstruktima potvrđeno je sekvenciranjem plazmida. Kao kontrola korišćen je **pCIneoΔSV40** vektor bez inserta.

Vektor pcDNA3.1(+) u koji je uklonirana celokupna cDNK za alfa-1-antitripsin (**pcDNA-A1AT-wt**) je korišćen u kotransfekcijama kako bi omogućio sa jedne strane kontrolu transfekcije, a sa druge strane odgovarajuću *loading* kontrolu za Western blot analizu [203]. Shematski prikazi korišćenih konstrukata dati su na slici 22.



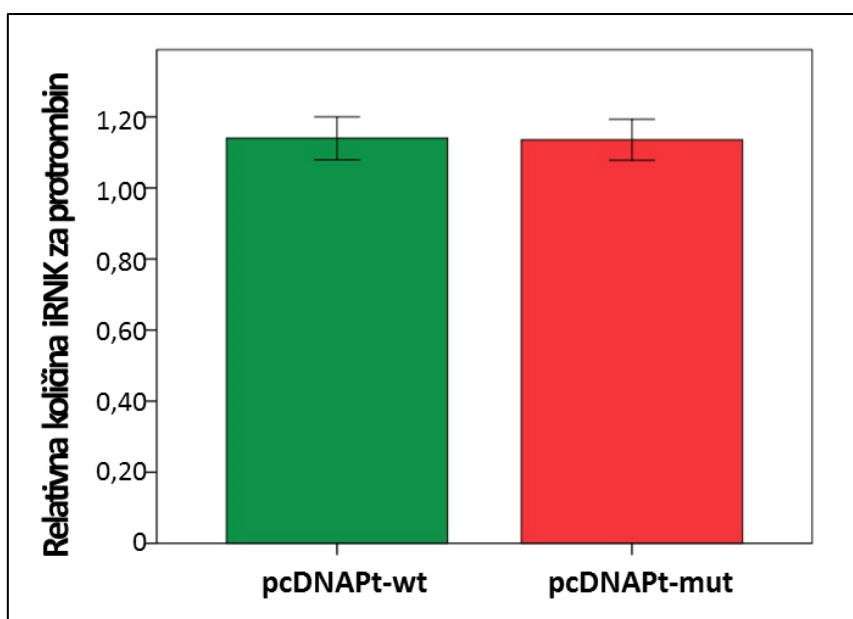
Slika 22 Shematski prikaz konstrukata korišćenih u transfekciji Cos-7 permanentne ćelijske linije. e-egzon; UTR-netranslatirajući region; ◆ pozicija genske varijante

4.3.2 Određivanje uticaja na ekspresiju gena za protrombin na nivou iRNK

U cilju ispitivanja potencijalnog uticaja FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti na ekspresiju protrombina na nivou iRNK, iz tranzijentno transfekovanih Cos-7 ćelija je najpre izolovana celokupna RNK, koja je dalje korišćena kao matrica za sintezu cDNK. Dobijena cDNK je zatim analizirana PCR-om u realnom vremenu metodom relativne kvantifikacije (RQ, engl. *relative quantification*). Reakcije su rađene u multipleksu, čime je omogućena istovremena detekcija signala za protrombin i endogenu kontrolu (neomicin-fosfotransferazu) sa iste matrice. Kao negativna kontrola

su korišćeni uzorci cDNK poreklom iz ćelija transfekovanih odgovarajućim plazmidom bez inserta (pcDNA3.1(+) ili pCIneoΔSV40).

Uticaj FIIc.1787G>A varijante na nivo iRNK praćen je poređenjem rezultata za wt konstrukt (pcDNAPt-wt) sa odgovarajućim mutiranim konstruktom koji sadrži ovu varijantu (pcDNAPt-mut). Na osnovu dobijenih rezultata, nema razlike u nivou ekspresije između pcDNAPt-wt i pcDNAPt-mut konstrukta (za oba RQ $1,14 \pm 0,06$) (Slika 23).



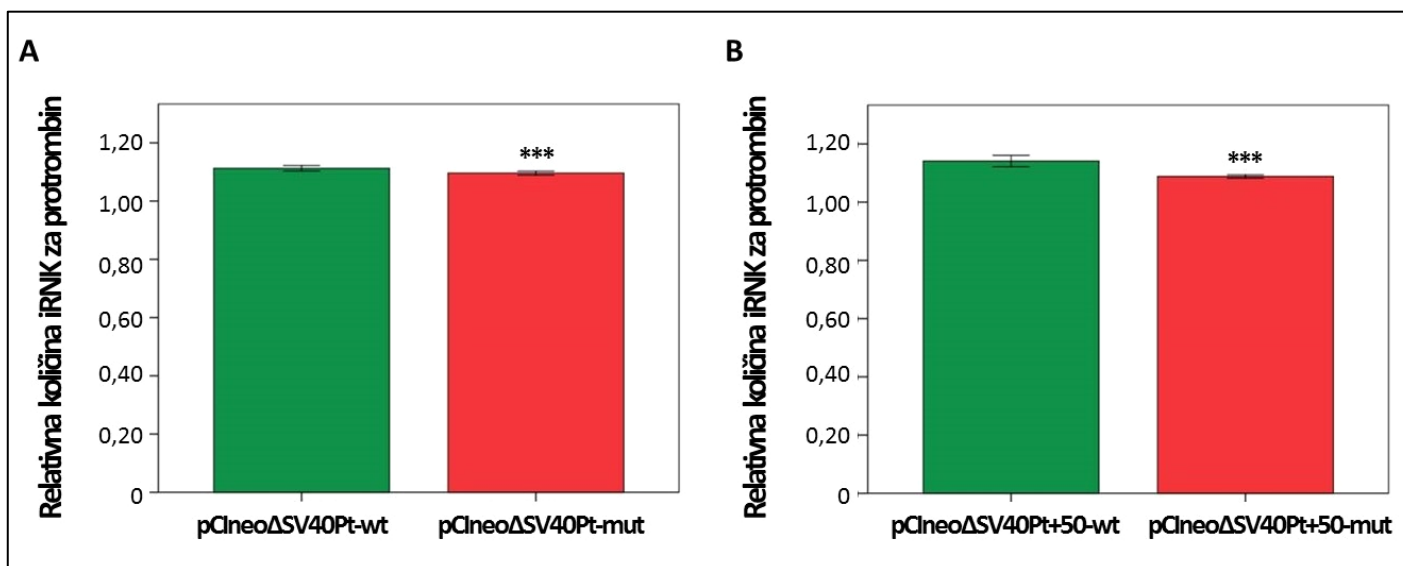
Slika 23 Relativna kvantifikacija ekspresije gena za protrombin metodom PCR-a u realnom vremenu za pcDNAPt konstrukte; Histogrami su prikazani sa jednom standardnom devijacijom (\pm SD)

Imajući u vidu da se FIIc.*64_*66del varijanta nalazu u 3' UTR-u gena, njen uticaj na ekspresiju gena za protrombin praćen je u prisustvu i odsustvu nizvodnog DSE regulatornog elementa. Korišćena su dva para konstrukta: 1. pCIneoΔSV40Pt-wt i pCIneoΔSV40Pt-mut koji sadrže „samo“ 3' UTR i 2. pCIneoΔSV40Pt+50-wt i pCIneoΔSV40Pt+50-mut koji sadrže i dodatnih 50 bp 3' FR regiona u okviru kojih je DSE element.

Poređenjem prvog para konstrukata koji sadrže „samo“ 3' UTR (Slika 24A) pokazano je da FII c.*64_*66del varijanta dovodi do statistički značajnog ($P=0,001$)

smanjenja nivoa iRNK (RQmut $1,09 \pm 0,01$) u poređenju sa *wild-type* konstruktom (RQwt $1,11 \pm 0,01$).

Poređenjem konstrukata kod kojih je prisutan region od 50 bp 3' FR-a, detektovano je statistički značajno ($P < 0,001$) smanjenje nivoa iRNK za protrombin (RQ+50mut $1,09 \pm 0,01$ vs. RQ+50wt $1,14 \pm 0,02$) (Slika 24B).



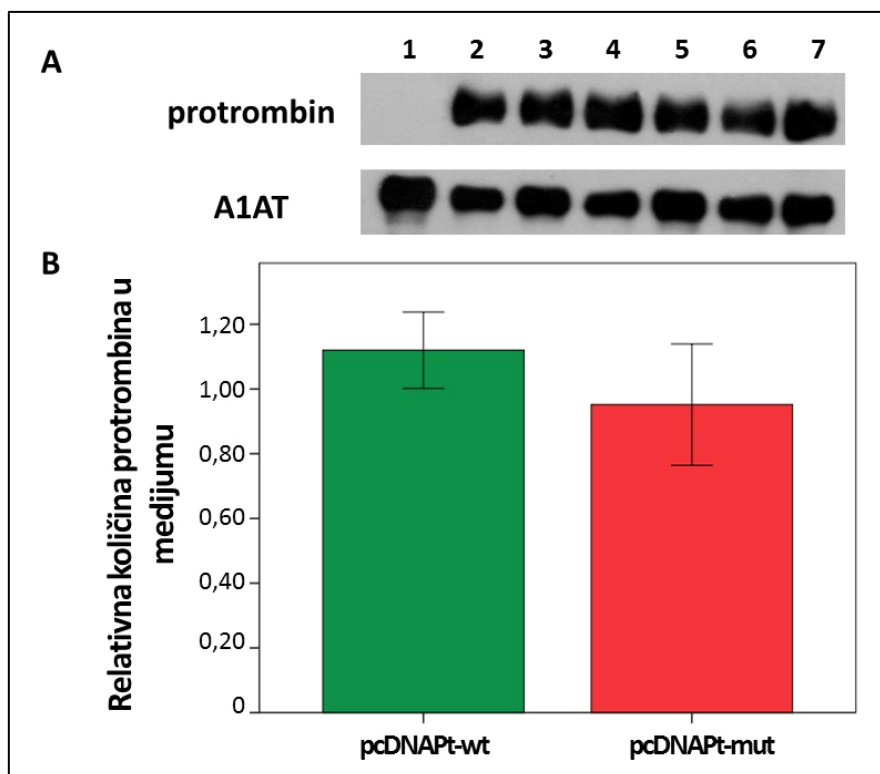
Slika 24 Relativna kvantifikacija ekspresije gena za protrombin metodom PCR-a u realnom vremenu za **A)** pCIneoΔSV40Pt-wt i pCIneoΔSV40Pt-mut konstrukte; **B)** pCIneoΔSV40Pt+50-wt i pCIneoΔSV40Pt+50-mut konstrukte; Histogrami su prikazani sa jednom standardnom devijacijom (\pm SD); ***- $P < 0,001$

4.3.3 Određivanje uticaja na ekspresiju gena za protrombin na nivou proteina

Potencijalni efekat FIIc.1787G>A i FII c.*64_*66del varijanti na ekspresiju gena za protrombin ispitivan je na nivou proteina primenom Western blot analize. S obzirom da je protrombin sekretorni protein, analiza je rađena u uzorcima medijuma u kojima su transfekovane Cos-7 ćelije gajene tokom 24h. Dobijene vrednosti za protrombin, normalizovane su u odnosu na vrednosti dobijene za alfa-1-antitripsin (A1AT). Alfa-1-antitripsin je takođe sekretorni protein, a eksprimiran je sa ekspresionog vektora kojim su Cos-7 ćelije kontrtransfekovane sa ciljem da se na taj način obezbedi odgovarajuća kontrola Western blot analize. Kao negativna kontrola za oba proteina (protrombin i A1AT) korišćen je medijum netransfekovanih ćelija. Medijumi iz tri nezavisne kotransfekcije su sakupljeni i zajedno ukoncentrovani kako bi

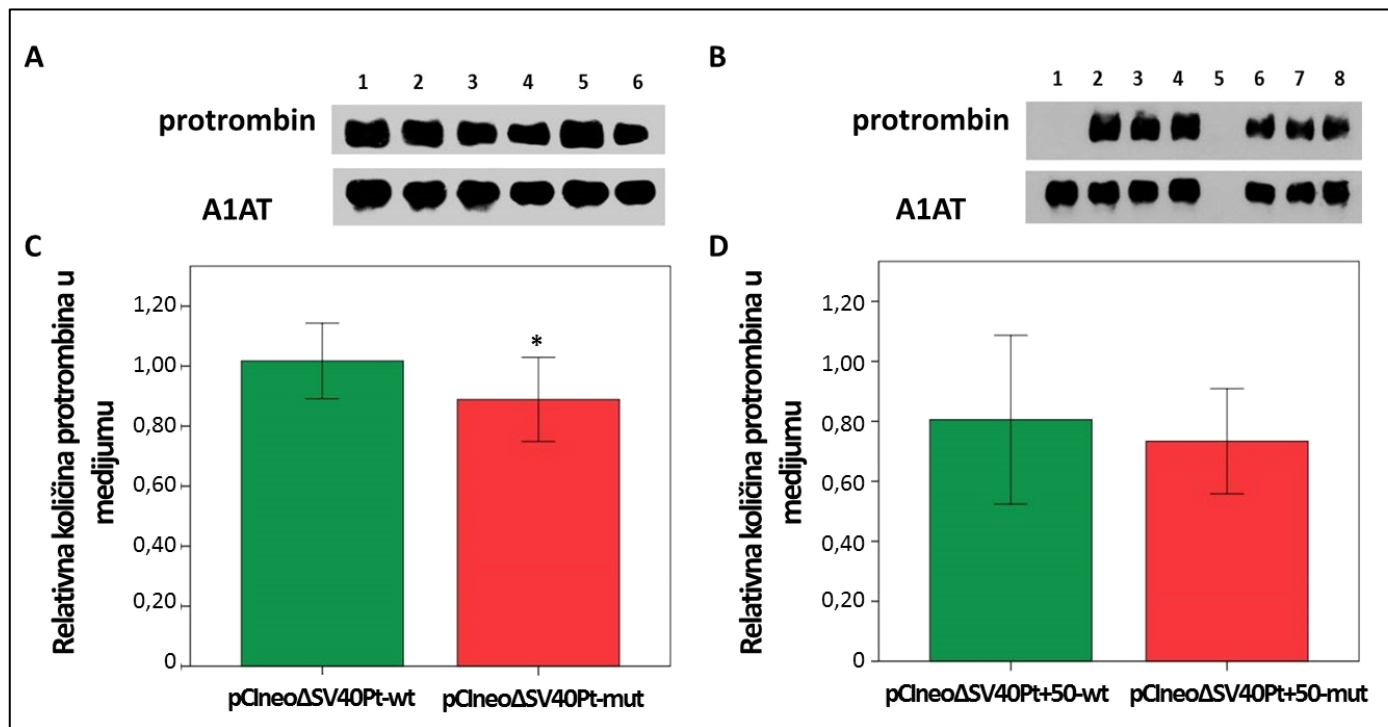
se povećala koncentracija ciljnih proteina i omogućila njihova detekcija Western blot analizom. Dobijeni rezultati Western blot analize su obrađeni relativnom kvantifikacijom signala koji odgovaraju količini protrombina i A1AT.

Nakon normalizacije količine protrombina u odnosu na količinu A1AT, detektovan je sličan nivo *wild-type* protrombina ($1,12 \pm 0,16$) u poređenju sa c.1787A mutiranim protrombinom ($0,97 \pm 0,24$), što je grafički prikazano na slici 25.



Slika 25 Western blot analiza i relativna kvantifikacija protrombina u medijumu za pcDNAPt konstrukte. **A)** Western blot analiza. protrombin: 1-pcDNA3.1(+) vektor bez inserta; 2,3,4-pcDNAPt-wt; 5,6,7-pcDNAPt-mut; alfa-1-antitripsin: 1-7 pcDNA-A1AT-wt; **B)** Relativna kvantifikacija nivoa pcDNAPt-wt i pcDNAPt-mut protrombina; A1AT-alfa-1-antitripsin; Histogrami su prikazani sa jednom standardnom devijacijom (\pm SD); Slika objavljena na engleskom jeziku u Gvozdenov i saradnici, 2017 [204]

U poređenju sa nivoom ekspresije kod wt konstrukata bez ($1,02 \pm 0,13$) i sa DSE elementom ($0,81 \pm 0,28$), varijanta FIIc.*64_*66del dovodi do sniženog nivoa protrombina u oba slučaja (bez DSE: $0,89 \pm 0,14$; sa DSE: $0,73 \pm 0,17$), ali je to smanjenje statistički značajno ($P=0,028$) samo za konstrukt bez DSE elementa (Slika 26C).



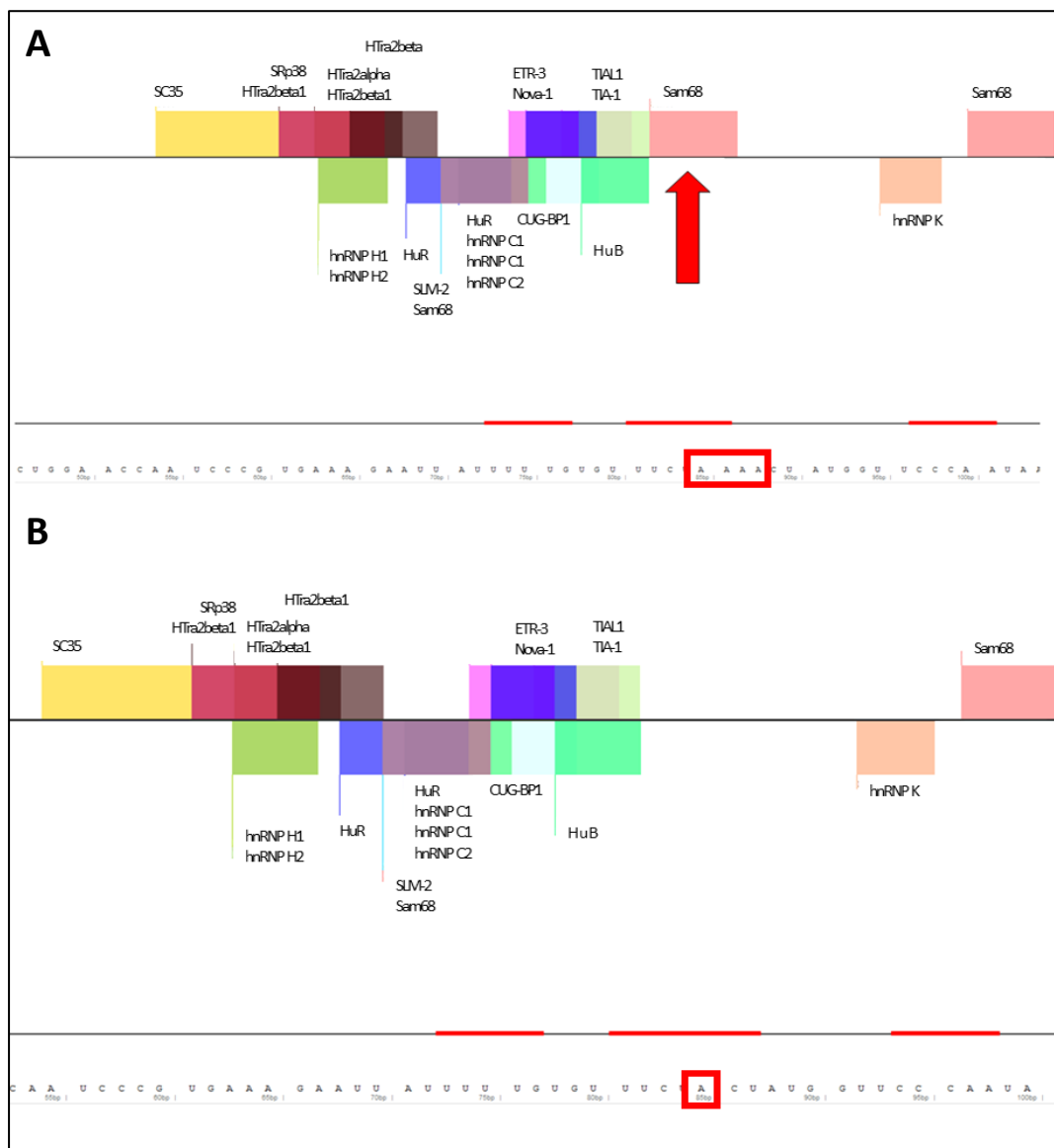
Slika 26 Western blot analiza i relativna kvantifikacija protrombina u medijumu za pCIneoΔSV40Pt i pCIneoΔSV40Pt+50 konstrukte. **A)** Western blot analiza za pCIneoΔSV40Pt konstrukte. protrombin: 1,2,3- pCIneoΔSV40Pt-wt; 4,5,6- pCIneoΔSV40Pt-mut; alfa-1-antitripsin: 1-6 pcDNA-A1AT-wt; **B)** Western blot analiza za pCIneoΔSV40Pt+50 konstrukte. protrombin: 1-pCIneoΔSV40 vektor bez inserta; 2,3,4- pCIneoΔSV40Pt+50-wt; 5- netransfekovane Cos-7 ćelije; 6,7,8- pCIneoΔSV40Pt+50-mut; alfa-1-antitripsin: 1-4 i 6-8- pcDNA-A1AT-wt; 5- netransfekovane Cos-7 ćelije; **C)** Relativna kvantifikacija nivoa pCIneoΔSV40Pt-wt i pCIneoΔSV40Pt-mut protrombina; **D)** Relativna kvantifikacija nivoa pCIneoΔSV40Pt+50-wt i pCIneoΔSV40Pt+50-mut protrombina; Histogrami su prikazani sa jednom standardnom devijacijom (\pm SD); *- $P < 0,05$

4.3.4 *In silico* analize FIIc.*64_*66del varijante

Zbog specifične pozicije FIIc.*64_*66del varijante u 3' UTR-u gena za protrombin, dalje smernice za ispitivanje mehanizma dobijene su uz pomoć *in silico*

predikcije uticaja FIIc.*64_*66del varijante na moguće protein/DNK interakcije, promene u sekundarnoj strukturi iRNK i potencijalna mesta vezivanja miRNK.

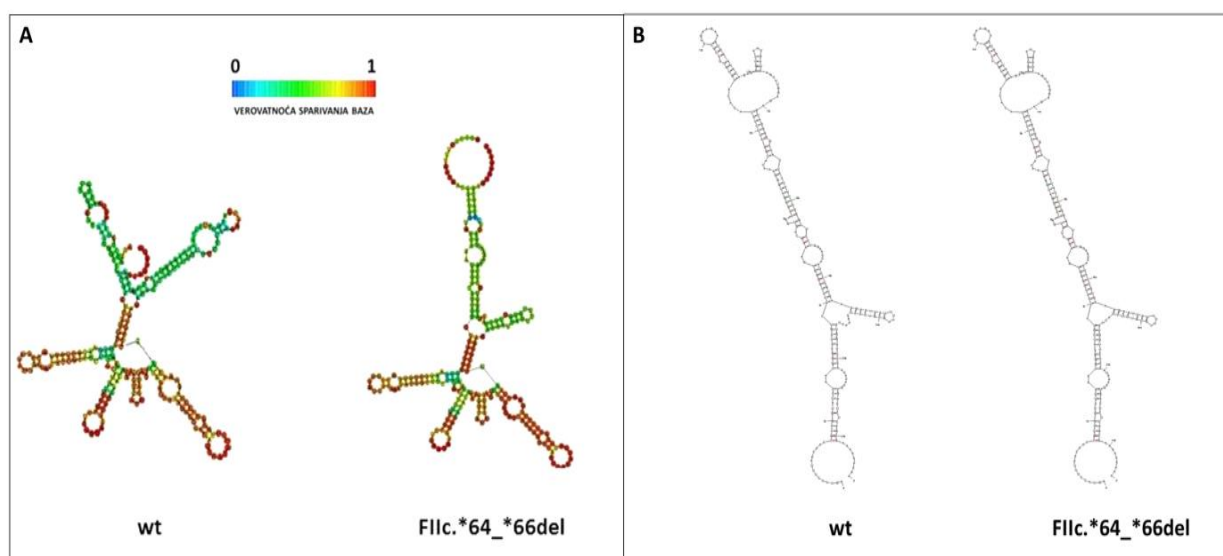
Predikcija vezivanja proteina za 3' UTR sekvencu gena za protrombin urađena je u *SpliceAid* programu koji koristi bazu podataka proteina koji učestvuju u iskrajanju i obradi iRNK. Rezultati analize su pokazali da prisustvo FIIc.*64_*66del varijante dovodi do razlike u vezivanju proteina (Slika 27).



Slika 27 Predikcija vezivanja proteina za sekvencu 3' UTR gena za protrombin: **A)** wt sekvencu, **B)** mutirana sekvencu, koja sadrži FIIc.*64_*66del gensku varijantu. Pozicija proteina Sam68 koji se po predikciji vezuje za wt sekvencu, a čije mesto vezivanja je ukinuto kod mutirane sekvence (crvena strelica). Pozicija genske varijante FIIc.*64_*66del (crveni pravougaonik)

Protein Sam68 se, prema predikciji, vezuje za wt sekvencu, dok u slučaju mutirane sekvence, dolazi do gubitka njegovog mesta vezivanja u regionu u kome se nalazi FIIc.*64_*66del varijanta.

Predikcijom sekundarne strukture u *RNAfold* i *Mfold* softveru analizirana je sekvenca koja je obuhvatila poslednji egzon i 3' UTR-a gena za protrombin. Rezultati predikcije *RNAfold* softvera pokazali su da FIIc.*64_*66del varijanta uzrokuje promene u sekundarnoj strukturi (Slika 28A). Minimalna slobodna energija wt sekvence iznosila je -52,40 kcal/mol, dok je u slučaju kada je prisutna FIIc.*64_*66del varijanta minimalna slobodna energija iznosila -59,90 kcal/mol. Predikcija urađena pomoću *Mfold* softvera je pokazala da prisustvo FIIc.*64_*66del varijante ne menja nivo minimalne slobodne energije (-65,70kcal/mol) i ne utiče na značajne promene u sekundarnoj strukturi (Slika 28B).



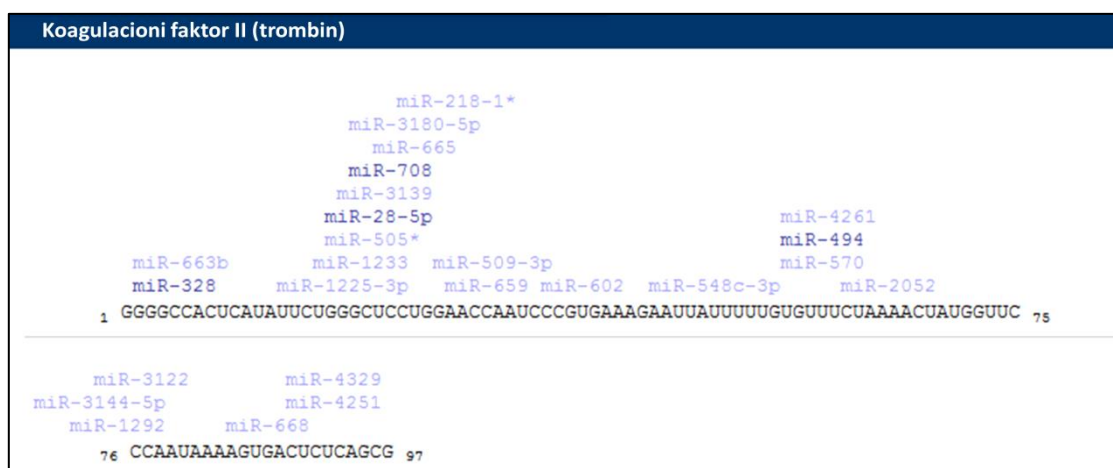
Slika 28 Predikcija sekundarne strukture poslednjeg egzona i 3' UTR-a iRNK za protrombin pomoću: **A)** *RNAfold* softvera; **B)** *Mfold* softvera

Predikcija vezivanja humanih miRNK za 3' UTR iRNK za protrombin, u okviru koga se nalazi FIIc.*64_*66del varijanta, urađena je primenom nekoliko algoritama: *miRWalk 2.0*, *miRmap*, *TargetScan* i *miRanda*. Lista miRNK koje se u najvećem broju primenjenih algoritama vezuju za 3'UTR region i za region FIIc.*64_*66del varijante data je u tabeli 9.

Tabela 9 Lista miRNK koje se prema rezultatima *in silico* analize sa najvećom verovatnoćom vezuju za 3' UTR u iRNK protrombina (*) i za region FIIc.*64_*66del varijante (♦)

miRNK	miRWalk	miRmap	TargetScan	miRanda
hsa-miR-1292	*	*	*	*
hsa-miR-509-1	*		*	*
hsa-miR-659	*	*	*	*
hsa-miR-509-2	*		*	*
hsa-miR-665	*	*	*	*
hsa-miR-509-3	*	*	*	*
hsa-miR-663b	*		*	*
hsa-miR-548c	*			*
hsa-miR-218-1	*	*		*
hsa-miR-2052				♦

Uz pomoć predikcije urađene u *miRanda* programu, određene su pozicije vezivanja ovih miRNK za 3' UTR gena za protrombin. Na slici 29 su prikazane miRNK čiji je *mirSVR* rezultat manji ili jednak -1,2, što je postavljeno kao granična (*cut-off*) vrednost. Ovaj parametar je značajan u predikciji, jer se pomoću njega određuje efekat miRNK na regulaciju ciljane iRNK. Drugi parametar je *PhastCons*, čija vrednost može biti od 0 do 1, kojim se detektuje stepen konzervisanosti željene sekvence. Dobijeni rezultati su pokazali da se za region FIIc.*64_*66del varijante vezuje hsa-miR-2052, sa *mirSVR* rezultatom -1,05 i *PhastCons* rezultatom 0,56.



Slika 29 Predikcija vezivanja miRNK u 3' UTR-u iRNK za protrombin sa *mirSVR* rezultatom $\leq -1,2$. Strelicom je označen region FIIc.*64_*66del varijante

4.3.5 Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na protein/DNK interakcije

Prisutvo potencijalnog mesta vezivanja proteina za region u okviru koga se nalazi FIIc.*64_*66del varijanta ispitivano je FP-PCR metodom. Ova metoda omogućava ispitivanje vezivanja proteina za jednolančani DNK fragment od interesa. Metoda se zasniva na činjenici da interakcija proteina i DNK fragmenta omogućava zaštitu mesta vezivanja od delovanja nukleaza. Zaštićeni DNK fragment se u daljoj analizi koristi kao graničnik u PCR reakciji, tako da je detekcija PCR produkta odgovarajuće dužine potvrda postojanja protein/DNK interakcije.

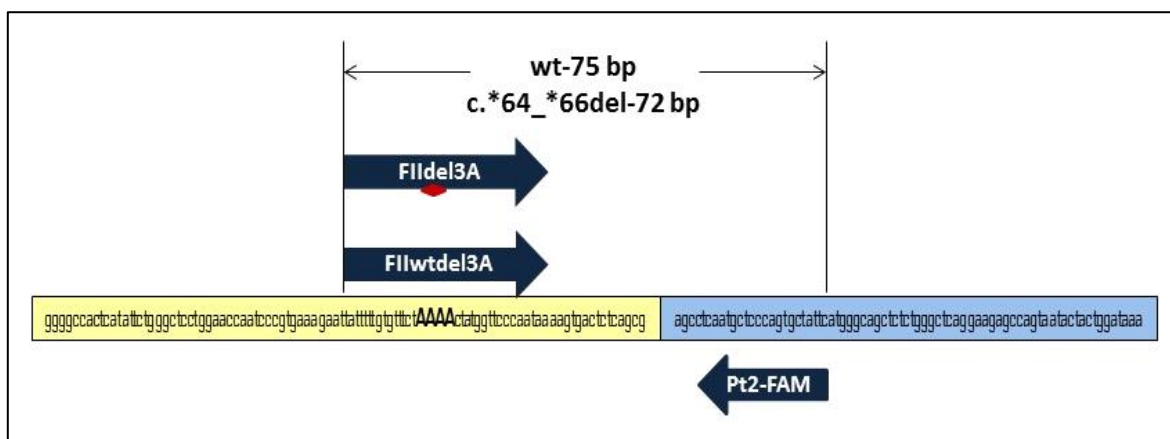
Ova metoda je primenjena za ispitivanje mesta vezivanja proteina nukleusnog i citoplazmatskog ekstrakta HepG2 ćelijske linije u regionu FIIc.*64_*66del varijante. Pri uslovima koji su detaljno opisani u delu Materijal i metode, nisu detektovani odgovarajući PCR produkti, što ukazuje da za ispitivane ekstrakte proteina HepG2 ćelijske linije nije detektovano mesto vezivanja ni u *wild-type* niti u mutiranoj sekvenci.

4.3.6 Ispitivanje uticaja FIIc.*64_*66del varijante na miRNK/iRNK interakcije

Na osnovu dobijene predikcije za vezivanje miRNK u 3' UTR-u gena za protrombin, dalje *in vitro* funkcionalne analize su bile usmerene ka određivanju uticaja FIIc.*64_*66del varijante na interakciju miRNK/iRNK. Kao eksperimentalni pristup odabrana je metoda bazirana na principu FP-PCR metode. Ona omogućava ispitivanje vezivanja malih RNK, uključujući i miRNK za jednolančanu DNK sekvencu od interesa. Analogno FP-PCR metodi, ukoliko postoji interakcija, nastali DNK/RNK hibrid će biti zaštićen od dejstva S1 nukleaze, dok njegovo izlaganje *RNAzi H* omogućava dobijanje ciljnog DNK fragmenta koji se dalje koristi kao graničnik u PCR reakciji. Detekcija PCR produkta odgovarajuće dužine je potvrda postojanja interakcije malih RNK sa sekvencom od interesa.

Za proveru mesta vezivanja miRNK u regionu FIIc.*64_*66del varijante korišćena su dva različita oligonukleotida od kojih je jedan imao *wild-type* sekvencu (FIIwtde13A-35 nukleotida), dok je u drugom bila prisutna FIIc.*64_*66del varijanta (FIIde13A-33 nukleotida). Fragmenti su inkubirani sa ukupnom RNK izolovanom iz HepG2 ćelijske linije.

Uz odgovarajuće negativne kontrole eksperimenta, opisane u poglavlju Metode, jednolančani fragmenti preostali nakon tretmana sa *RNAzom H* su korišćeni u PCR reakciji sa fluorescentno obeleženim graničnikom. Očekivane dužine umnoženog PCR produkta bile su do 75 bp za wt, odnosno 72 bp za c.*64_*66del mutirani fragment (Slika 30).

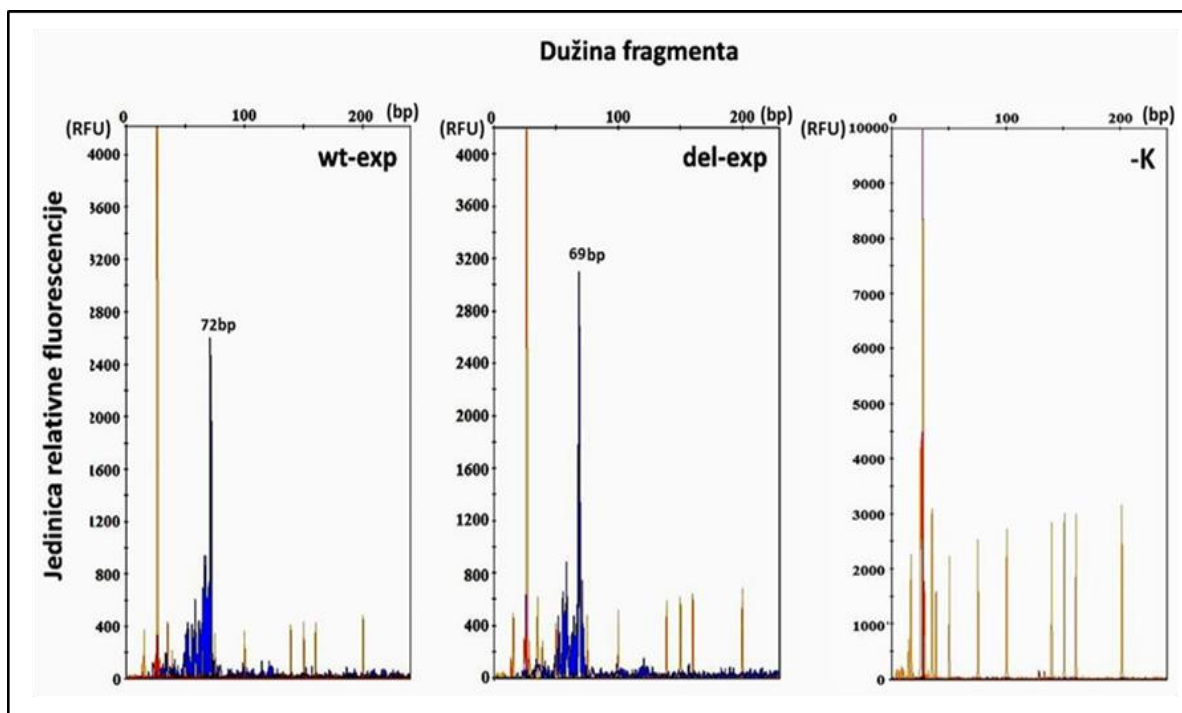


Slika 30 Šematski prikaz 3' kraja gena za protrombin sa graničnicima korišćenim u eksperimentu vezivanja miRNK za jednolančani DNK fragment. Na slici je žutim označen 3' UTR gena za protrombin, plavim-deo sekvence 3' FR regiona. Plavim strelicama predstavljeni su graničnici korišćeni u eksperimentu, sa odgovarajućim usmerenjem, dužine strelica su proporcionalne broju nukleotida u graničniku. Očekivane dužine PCR produkata označene su na slici za svaki par graničnika (FIIwtDel3A i Pt2-FAM; FIIIdel3A i Pt2-FAM); ◆ pozicija genske varijante

Dobijene dužine PCR produkta iznosile su 72 bp za FIIwtDel3A fragment i 69 bp za FIIIdel3A fragment, dok PCR produkt nije detektovan u negativnim kontrolama (Slika 31).

Na osnovu ovih rezultata, pokazano je da u regionu FIIc.*64_*66del varijante dolazi do vezivanja neke od malih RNK. Rezultati takođe upućuju da se ta mala RNK vezuje za ciljni region i u prisutvu i u odsustvu FIIc.*64_*66del varijante, s obzirom da se dužina wt i mutiranog fragmenata razlikuje za 3 bp koji odgovaraju dužini delecije. Poređenjem maksimalne dužine očekivanih PCR produkata (wt-75 bp, mut-72 bp) sa dužinama dobijenim u eksperimentu (wt-72 bp, mut-69 bp), pokazano je da 3 nukleotida sa 5' kraja ispitivanog fragmenta nije bilo zaštićeno vezivanjem male RNK.

Ova metode ne omogućava određivanje regiona zaštite na 3' kraju ispitivanog fragmenta, tako da nije bilo moguće precizno identifikovati dužinu i sekvencu male RNK koja se vezala.



Slika 31 Dužine PCR produkata nastalih PCR reakcijom u kojoj je kao jedan od graničnika korišćen fragment zaštićen od dejstva *RNAze H* vezivanjem male RNK; Plavi pik: protrombinski fragment; Narandžasti pik: marker dužine; wt-exp- za vezivanje korišćen wt oligonukleotid; del-exp- za vezivanje korišćen oligonukleotid koji sadrži deleciju; -K- negativna kontrola eksperimenta

Na osnovu ovoga, pozicioniran je deo sekvence potencijalno zaštićenog regiona DNK koji je prikazan na slici 32A. Poređenjem predikcije vezivanja hsa-miR-2052 za iRNK protrombina (Slika 32B), sa rezultatima eksperimenta, utvrđen je region preklapanja što ukazuje na moguće mesto vezivanja ove miRNK. Region preklapanja označen je na slici 32 crvenim pravougaonikom. U okviru ovog fragmenta, crvenim slovima je obeležen region delecije.



Slika 32 Određivanje potencijalnog mesta vezivanja miRNK za region FIIc.*64_*66del varijante **A)** Zaštićena DNK sekvenca dobijena u eksperimentu vezivanja miRNK za oligonukleotid i odgovarajuća iRNK sekvenca; **B)** Predikcija vezivanja hsa-miR-2052 za iRNK protrombina dobijena pomoću *miRBase* programa; Crveni pravougaonik označava poklapanje u sekvenci;

Diskusija

Prvi deo ovog istraživanja imao je za cilj određivanje učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genskih varijanti kod pacijenata sa različitim trombotičkim manifestacijama, pacijentkinja sa spontanim pobačajima kao i u zdravoj srpskoj populaciji.

Drugi deo studije obuhvatio je *ex vivo* analize u uzorcima plazme u okviru kojih je ispitivan uticaj navedenih genskih varijanti na aktivnost, količinu i funkciju protrombina.

Treći deo istraživanja obuhvatio je funkcionalne *in vitro* analize ispitivanih genskih varijanti, s ciljem detaljnijeg rasvetljavanja njihovih mehanizama. U okviru ovog dela studije, na model sistemu permanentnih ćelijskih linija, ispitivan je uticaj na profil ekspresije protrombina na nivou iRNK i proteina, kao i potencijalni efekat na interakcije proteina i miRNK sa 3' krajem gena za protrombin.

5.1 Učestalost FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genskih varijanti

Analiza učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del genskih varijanti kod pacijenata sa trombotičkim događajima urađena je na odabranoj, homogenoj grupi pacijenata iz repozitorijuma za trombofiliju, Laboratorije za molekularnu biologiju, IMGGI, koja sadrži više od 4500 uzoraka. Da bi se ispitala učestalost ovih varijanti u grupi pacijenata sa različitim trombotičkim poremećajima i njihov značaj kao potencijalnih faktora rizika za određeni tip trombotičkog događaja, u ovu studiju je bilo uključeno 603 ispitanika, od toga 353 pacijenata i 250 zdravih ispitanika kontrolne grupe. S obzirom da su FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijante nedavno opisane [179,180], u okviru ove studije su dati prvi podaci o učestalostima ovih varijanti u različitim grupama ispitanika.

Grupe su formirane imajući u vidu učestalost i specifičnost ovih tipova trombotičkih poremećaja. Tromboze dubokih vena predstavljaju najčešću trombotičku manifestaciju i njihova povezanost sa genetičkim faktorima rizika je do sada najviše izučavana [205]. U približno jednoj trećini slučajeva, tromboza dubokih vena može biti praćena plućnim embolizmom koji nastaje kada se tromb „otkine“ sa mesta nastanka i cirkulacijom dospe do pluća. Ovakav tip kombinovanog trombotičkog poremećaja se označava kao venski tromboembolizam [206]. Takođe, deo pacijenata koji su imali trombozu dubokih vena tokom života razvije i arterijsku trombozu (srčani udar, moždani udar) ili ima spontani pobačaj. Imajući u vidu da kod ovih pacijenata postoji

sklonost ka različitim trombotičkim događajima izdvojeni su u posebnu grupu- sa kombinovanim trombotičkim poremećajima. Novija istraživanja su ukazala da tromboze dubokih vena i plućni embolizam ne moraju uvek biti povezani trombotički događaji i da se genetički faktori rizika za ove dve trombotičke manifestacije mogu razlikovati. Pokazano je da je mutacija FV Leiden učestalija kod pacijenata sa trombozom dubokih vena u odnosu na pacijente sa izolovanim plućnim embolizmom, što je u literaturi poznato kao FV Leiden paradoks [207,208]. Iz tog razloga smo odlučili da u okviru ove studije izdvojimo posebnu grupu pacijenata sa izolovanim plućnim embolizmom. Trombofilne mutacije predstavljaju značajne faktore rizika za pojavu spontanog pobačaja. Tokom trudnoće ravnoteža hemostaznog sistema je fiziološki pomerena ka stanju hiperkoagulacije [158]. Prisutvo trombofilnih mutacija, uzrokuje još veći otklon od hemostazne ravnoteže u smeru hiperkoagulacije, usled čega dolazi do poremećaja u uteroplacentalnom protoku krvi. To dalje može dovesti do zastoja u rastu fetusa, preeklampsije i spontanog pobačaja [209,210]. Iz tog razloga, kao četvrta grupa pacijenata odabrane su žene sa spontanim pobačajima, s ciljem da se ispita povezanost FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti sa etiologijom ovog poremećaja.

5.1.1 Učestalost FIIc.1787G>A varijante

Varijanta FIIc.1787G>A (protrombin Beograd) je prvi put opisana u Laboratoriji za molekularnu biologiju, IMGGI, 2012. godine. Nalazi se u poslednjem egzonu gena za protrombin i dovodi do aminokiselinske zamene Arg596Gln u proteinu [179]. Pripada grupi varijanti koje dovode do rezistencije na antitrombin među koje, osim FIIc.1787G>A, spadaju i protrombin Yukuhashi (FIIc.1787G>T, p.Arg596Leu) i protrombin Padua 2 (FIIc.1786C>T, p.Arg596Trp) [177,211].

U okviru ove studije učestalost FIIc.1787G>A varijante je određivana u kontrolnoj grupi od 250 zdravih ispitanika, među kojima nije detektovan nijedan nosilac, što znači da je učestalost FIIc.1787G>A varijante u zdravoj srpskoj populaciji manja od 0,4%. Na osnovu pretraživanja ExAC (*Exome Aggregation Consortium*), NCBI/SNP (*National Center for Biotechnology Information/Single Nucleotide Polymorphism*) baza, za sada nema podataka o učestalosti ove varijante kod zdravih ispitanika u drugim populacijama. Učestalosti protrombin Yukuhashi i Padua 2 varijante određivane su u grupama od po 100 zdravih ispitanika iz japanske i italijanske populacije, ali nijedan nosilac nije detektovan. Na osnovu toga, pretpostavlja se da je

učestalost do sad opisanih genskih varijanti koje dovode do rezistencije na antitrombin u opštoj zdravoj populaciji manja od 1%, što bi trebalo potvrditi u budućim studijama u koje će biti uključen veći broj ispitanika iz različitih etničkih grupa.

U okviru ove studije u ukupnoj grupi od 353 pacijenta, detektovana su 2 heterozigotna nosioca, dok homozigotni nosioci nisu detektovani. Naši rezultati pokazuju da je učestalost FIIc.1787G>A varijante povećana kod pacijenata sa trombotičkim poremećajima (0,57%) u poređenju sa kontrolnom grupom (0%). Takođe, rezultati studije ukazuju da prisustvo FIIc.1787G>A varijante potencijalno povećava rizik za pojavu trombotičkih poremećaja. Međutim, zbog niske učestalosti ove varijante, rezultati nisu dostigli nivo statističke značajnosti ($P=0,51$). U japanskoj i indijskoj populaciji do sada su opisani samo pojedinačni slučajevi heterozigotnih nosilaca FIIc.1787G>A varijante među pacijentima [212,213]. Takođe, nema podataka o učestalosti za protrombin Yukuhashi varijantu kod pacijenata sa trombotičkim poremećajima [177]. U svojoj studiji, Bulato i saradnici su pokazali da je učestalost protrombin Padua 2 varijante oko 0,5%. U grupi od 400 pacijenata sa trombozama, detektovana su dva heterozigotna nosioca ove varijante [211].

Učestalost FIIc.1787G>A varijante je takođe analizirana i u podgrupama pacijenata koje su formirane na osnovu tipa trombotičkog poremećaja. Kod pacijenata sa trombozom dubokih vena, izolovanim plućnim embolizmom i spontanim pobačajima nije detektovan nijedan nosilac FIIc.1787G>A varijante. Među pacijentima koji su imali dva ili više kombinovanih trombotičkih događaja, detektovana su dva heterozigotna nosioca FIIc.1787G>A varijante. Jedan od nosilaca je kao trombotičke manifestacije imao ponovljeni venski tromboembolizam i spontane pobačaje, dok je drugi nosilac imao ponovljene tromboze dubokih vena, akutne mezenterijalne tromboze i infarkt miokarda. Kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante nisu detektovani drugi protrombotički faktori rizika, što dodatno ukazuje na njenu ulogu u etiologiji tromboze kod ovih pacijenata. Naši rezultati su pokazali da FIIc.1787G>A varijanta predstavlja značajan faktor rizika za nastanak kombinovanog trombotičkog poremećaja, čak i uz ograničenje koje potiče od malog broja pacijenata u ovoj grupi.

Kod oba nosioca ove varijante prvi trombotički događaj je zabeležen tokom perioda adolescencije (16 i 17 godina starosti). Kod nosioca FIIc.1787G>A varijante u japanskoj populaciji, takođe je zabeležen trend pojave prvog trombotičkog događaja u

ranog mladoći i retromboziranje pacijenta uprkos antikoagulantnoj terapiji [213]. U indijskoj populaciji ova varijanta je detektovana kod šezdesetogodišnjeg muškarca sa trombozom dubokih vena, ali klinički podaci o vremenu pojave tromboze i mogućim prethodnim trombotičkim poremećajima nisu opisani [212]. Prisustvo protrombin Yukahasni i protrombin Padua 2 varijante takođe je povezano sa pojavnom kombinovanih trombotičkih događaja, razvojem prve tromboze u ranog starosnoj dobi i pojavom retromboza [177,211].

Detektovana učestalost FIIc.1787G>A varijante u našoj studiji je slična učestalostima publikovanim za deficijencije prirodnih antikoagulanasa koje predstavljaju retke, ali veoma snažne protrombotičke faktore rizika. Deficijencija antitrombina ima učestalost ispod 0,2% [214], ali je pokazano da čak 70% pacijenata razvije neki trombotički poremećaj pre pedesete godine starosti [215]. Deficijencija proteina C sa učestalosti 0,2-0,5% u opštoj populaciji, povećava rizik za pojavu tromboze 8 do 10 puta [215,216]. Slično tome, mutacije u genu koji kodira protein S, čija je učestalost niža od 0,2%, povećavaju rizik za trombofiliju od 7 do 8,5 puta [215,217,218]. Godišnja učestalost pojave tromboza kod pacijenata sa deficijencijom prirodnih antikoagulanasa je 0,55% na osnovu rezultata retrospektivnih, odnosno 0,92% kod prospektivnih studija [219]. U našoj retrospektivnoj studiji, godišnja učestalost za pojavu prvog trombotičkog događaja kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante bila je 2,2%, ali imajući u vidu da je prosečna starost asimptomatskih nosilaca u trenutku analize bila manja od godina pojave prve tromboze kod simptomatskih, ova učestalost je verovatno veća.

Naši rezultati pokazuju da je učestalost FIIc.1787G>A varijante u srpskoj populaciji niža od 1%, ali da njeno prisustvo povećava rizik za pojavu kombinovanih trombotičkih poremećaja. Kao takva, FIIc.1787G>A varijanta predstavlja značajan trombofilni marker kod pacijenata koji imaju izraženu tendenciju pojave prvog trombotičkog događaja u ranom životnom dobu i sklonost ka njegovom ponavljanju. Na osnovu rezultata ove studije može se zaključiti da je dijagnostički značaj FIIc.1787G>A varijante u istom rangu sa deficijencijama prirodnih antikoagulanasa koji predstavljaju retke, ali veoma potentne trombofilne faktore rizika.

5.1.2 Učestalost FIIc.*64_*66del varijante

Varijanta FIIc.*64_*66del predstavlja deleciju tri bazna para u 3' UTR-u gena za protrombin. Pretraživanjem ExAC i NCBI/SNP baza podataka utvrđeno je da u 3' UTR-u gena za protrombin nije prijavljena nijedna varijanta tipa delecije ili insercije. FIIc.*64_*66del varijanta je prvi put opisana u Laboratoriji za molekularnu biologiju, IMGGI, u pilot studiji koja je obuhvatila sekvenciranje 3' kraja gena za protrombin kod pacijenata sa izolovanim plućnim embolizmom [180].

U okviru ove studije, u grupi od 250 zdravih ispitanika nije detektovan nijedan nosilac FIIc.*64_*66del varijante. Na osnovu tih podataka učestalost ove varijante kod zdravih ispitanika je manja od 0,4% u srpskoj populaciji, dok u drugim populacijama do sada nije ispitivana.

U grupi pacijenata ova varijanta je detektovana u heterozigotnoj formi kod 4 ispitanika (1,13%), jednog iz grupe sa izolovanim plućnim embolizmom i tri iz grupe sa spontanim pobačajima. Rezultati naše asocijativne studije ukazuju da FIIc.*64_*66del varijanta može biti povezana sa etiologijom izolovanog plućnog embolizma, ali imajući u vidu nisku učestalost, njen značaj kao faktora rizika treba potvrditi u studijama sa većim brojem ispitanika. Ovo je posebno značajno zbog činjenice da je kod 20% pacijenata nepoznat uzrok nastanka ovog trombotičkog događaja [220]. S obzirom da je FIIc.*64_*66del varijanta detektovana samo kod pacijenata sa izolovanim plućnim embolizmom, a ne i u grupi sa trombozama dubokih vena, naši rezultati idu u prilog hipotezi da je etiologija ova dva poremećaja različita.

U grupi od 106 pacijentkinja koje su imale spontane pobačaje, detektovana su 3 heterozigotna nosioca FIIc.*64_*66del varijante (2,83%), dok u kontrolnoj grupi od 154 žene bez istorije spontanih pobačaja nije detektovan nijedan nosilac. Najčešće trombofilne mutacije koje predstavljaju značajne faktore rizika za pojavu spontanog pobačaja su FV Leiden i FII G20210A. Učestalost FIIc.*64_*66del varijante koju smo detektovali kod pacijentkinja u našoj studiji je niža od učestalosti za FV Leiden (oko 30%) i FII G20210A (4-9%) mutacije [102]. Rezultati ukazuju da bi ova varijanta mogla biti potencijalni faktor rizika za pojavu spontanih pobačaja, ali zbog niske učestalosti nije dostignuta statistička značajnost u našoj asocijativnoj studiji koja je obuhvatila ukupno 260 ispitanica.

FIIc.*64_*66del varijanta je do sada detektovana samo u srpskoj populaciji i na osnovu prvih podataka o njenoj učestalosti radi se o retkoj varijanti. Naši rezultati ukazuju da bi ova varijanta mogla biti faktor rizika za pojavu izolovanog plućnog embolizma i spontanih pobačaja, ali je neophodno uraditi studije sa većim brojem ispitanika i u drugim populacijama. Dosadašnji rezultati upućuju da FIIc.*64_*66del varijanta najverovatnije ne predstavlja značajni trombofilni marker.

5.2 *Ex vivo* analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti

5.2.1 *Ex vivo* analize FIIc.1787G>A varijante

U okviru ove studije, jedan od početnih koraka u rasvetljavanju mehanizma FIIc.1787G>A varijante bile su *ex vivo* analize u uzorcima plazme ispitanika. Analizama je obuhvaćeno ispitivanje aktivnosti i nivoa protrombina, endogenog trombinskog potencijala kao i utvrđivanje interakcije sa antitrombinom i trombomodulinom. U ovu studiju je uključeno 19 članova porodice jednog od ukupno dva detektovana nosioca ove varijante. Pored probanda, FIIc.1787G>A varijanta je detektovana kod još 9 članova porodice- ukupno 10 (6 simptomatskih i 4 asimptomatska), dok 9 ispitanika nisu bili nosioci testirane varijante i nisu imali trombotičke događaje. Da bi se ispitaio uticaj drugih faktora na rezultate *ex vivo* analiza, svim ispitanicima koji su uključeni u studiju prethodno su urađeni rutinski testovi trombofilije. Dobijene vrednosti ovih testova su za sve ispitanike bile u referentnom opsegu.

Rezultati su pokazali da je aktivnost protrombina bila statistički značajno smanjena ($P < 0,001$) kod svih nosilaca FIIc.1787G>A varijante na približno 50%, dok je kod ispitanika koji nisu nosioci iznosila oko 96%. Kod detektovanih nosilaca FIIc.1787G>A varijante u japanskoj i indijskoj populaciji, aktivnost protrombina nije određivana [212,213]. Rezultati studije Bulato i saradnika su pokazali da je kod nosilaca Padua 2 varijante aktivnost protrombina smanjena na 60-70% referentne vrednosti [211]. Poređenjem rezultata naše studije sa Padua 2 varijantom, uočava se da je smanjenje u aktivnosti izraženije u slučaju FIIc.1787G>A varijante. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da zamena arginina na poziciji 596 glutaminom (protrombin Beograd), remeti prokoagulantnu aktivnost trombina u većoj meri nego zamena triptofanom (protrombin Padua 2). Rezultati dobijeni na rekombinantnim protrombin

Yukuhashi, Beograd i Padua 2 su pokazali da svaka od ovih varijanti dovodi do smanjene protrombinske aktivnosti. Međutim, na osnovu ovih rezultata, rekombinantni Padua 2 protein ima veći efekat na smanjenje prokoagulantne aktivnosti nego protrombin Beograd [195]. Uticaj svake od ovih aminokiselinskih zamena na elektrostatičke interakcije, vodonične i disulfidne veze unutar Na⁺ vezujućeg mesta i posledično različitu protrombinsku aktivnost mutiranih proteina je potrebno dalje ispitati.

Do sada opisane varijante u genu za protrombin koje su povezane sa smanjenom aktivnosti protrombina u plazmi dovode do krvarenja kao kliničke manifestacije [86]. Kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante, pojava krvarenja nije zabeležena čak ni u prisustvu provokativnih faktora kao što su operacija i porođaj, bez obzira na detektovanu smanjenu aktivnost protrombina.

Da bi se utvrdilo da li smanjena aktivnost protrombina potiče od njegove smanjene raspoloživosti, relativnom kvantifikacijom signala dobijenih Western blot analizom određivana je količina protrombina u plazmi ispitanika. Naši rezultati su pokazali da se detektovana količina protrombina kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante (137,4±31,8) ne razlikuje u odnosu na ispitanike koji nemaju ovu varijantu (127,9±26,2). Slični rezultati su dobijeni i za Padua 2 varijantu za koju je nivo protrombina bio u referentnom opsegu i kod nosilaca i kod nenosilaca [211]. U okviru naše studije, značajno povećanje u nivou protrombina (160,0±28,5; P<0,01) detektovano je samo kod dva člana porodice koji su bili heterozigotni nosioci FII G20210A varijante, što je u skladu sa literaturnim podacima [106].

Dobijeni rezultati ukazuju da FIIc.1787G>A varijanta s jedne strane utiče na značajno smanjenje aktivnosti protrombina, dok s druge, ne utiče na promenu u njegovoj količini. Na osnovu toga, može se zaključiti da se uticaj FIIc.1787G>A varijante odražava na poremećaj prokoagulantne funkcije, uz održanje normalnog nivoa raspoloživog protrombina u plazmi. Ovakvi rezultati mogu se objasniti pozicijom FIIc.1787G>A varijante koja uzrokuje zamenu na mestu Arg596, u regionu značajnom za vezivanje Na⁺ [178,221]. Interakcija trombina sa Na⁺ je ključna za alosteričnu regulaciju njegove pro- i antikoagulantne aktivnosti. Dang i saradnici su metodom *in situ* dirigovane mutageneze ukazali da promene koje onemogućavaju vezivanje Na⁺ remete prelazak trombina iz antikoagulantne u prokoagulantnu formu [222]. Na osnovu

toga i dobijenih rezultata u okviru ove studije, najverovatnije je da FIIc.1787G>A varijanta izaziva sličan efekat, odnosno da onemogućava adekvatno vezivanje Na^+ i time utiče na stvaranje protrombina čija je prokoagulantna aktivnost poremećena.

Primenom testa generacije trombina određivan je trombogeni potencijal FIIc.1787G>A varijante. On pripada grupi globalnih testova hemostaze i omogućava procenu koagulacionog potencijala [223]. Standardni koagulacioni testovi, kao što su protrombinsko vreme ili aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme, ne daju celokupan uvid u stanje hemostaznog sistema. Ovim testovima se meri vreme potrebno da u *ex vivo* uslovima nastane fibrinski ugrušak, za šta je dovoljan nivo stvorenog trombina od svega 5% ukupne količine [224]. U tom trenutku, usled male količine trombina, sistem proteina C još uvek nije aktiviran i antitrombin još uvek u potpunosti ne ispoljava svoje inhibitorno dejstvo. Test generacije trombina je osetljivija metoda kojom je moguće pratiti dinamiku stvaranja trombina i nakon započetog procesa formiranja fibrinskog ugruška, kao i interakcije sa antitrombinom i proteinom C [225]. Kao rezultat ovog testa dobija se kriva koja omogućava očitavanje više parametara. Praćenjem uticaja koagulacionih, antikoagulacionih faktora i tkivnog faktora (TF) na parametre testa generacije trombina, pokazano je da su površina ispod krive i visina pika direktno srazmerni količini stvorenog trombina. U odsustvu FVIII i FIX ovi parametri su značajno smanjeni. Sa povećanjem nivoa fibrinogena srazmerno se povećavaju i površina ispod krive i visina pika, a smanjenjem njegove koncentracije produžava se vreme do pojave pika. Povećana koncentracija proteina S produžava ovo vreme. Ukoliko se smanji koncentracija antitrombina, nivoi svih parametara testa se povećavaju, jer se povećava količina raspoloživog trombina [226]. Na taj način, moguće je pratiti dinamiku kompleksnih interakcija u okviru hemostaznog sistema.

Rezultati naše studije su pokazali da varijanta FIIc.1787G>A utiče na statistički značajno ($P < 0,001$) povećanje površine ispod krive (ETP) kod nosilaca (3645 nM/min) u odnosu na ispitanike koji nisu nosioci ove varijante (1653 nM/min) i standardnu plazmu kao kontrolu (1408 nM/min). Period vremena proteklog od početka reakcije do nulte vrednosti krive, odnosno parametar „početak repa“ („*start tail*“) kod nosilaca FIIc.1787G>A varijante iznosi 60 min, što je statistički značajno povećanje ($P < 0,001$) u poređenju sa vrednostima za ispitanike koji nisu nosioci i standardnu plazmu (24 i 21 min). Rezultati su takođe pokazali da prisustvo navedene varijante ne utiče značajno na

lag vreme i ne dovodi do promena u maksimalnoj količini stvorenog trombina (visini pika). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da FIIc.1787G>A varijanta ne utiče na inicijalni korak prevođenja protrombina u trombin. S druge strane, veće vrednosti za parametar „*start tail*“ ukazuju da ona značajno utiče na sporiju inaktivaciju trombina. Pretpostavlja se da upravo na taj način, FIIc.1787G>A varijanta ispoljava svoj trombogeni potencijal, jer su povišene vrednosti za ETP odraz povećanog „*start tail*“ parametra. Ovi rezultati su potvrđeni i u studiji sa rekombinantnim protrombin Beograd proteinom [195]. Kod Padua 2 varijante vrednosti „*start tail*“ su takođe bile značajno povišene kod nosilaca (33-40 min), u odnosu na zdrave ispitanike (18,3-23,7 min) i standardnu plazmu (18,7 min), ali nije postojala razlika u ETP vrednostima [211]. Povećanje ETP-a i „*start tail-a*“ za protrombin Yukuhashi i Padua 2 je detektovano za heterozigotnu formu rekombinantnih proteina, dok je visina pika bila smanjena u poređenju sa standardnom plazmom i *wild-type* rekombinantnim proteinom. U slučaju homozigotnih formi razlike u nivoima svih parametara su bile još izraženije za obe varijante [177,211]. U studiji Tagaki i saradnika, gde su uporedno analizirani rekombinantni protrombin Yukuhashi, Beograd i Padua 2, „*start tail*“ parametar je bio povišen kod svih varijanti. Međutim, vrednost ETP-a je bila povišena samo za protrombin Beograd varijantu, jer je visina pika za druge dve bila značajno smanjena [195]. Ovo upućuje da, u poređenju sa Yukuhashi i Padua 2, protrombin Beograd varijanta ima najizraženiji trombogeni potencijal.

Da bi se ispitao mehanizam kojim FIIc.1787G>A varijanta dovodi do sporije inaktivacije trombina, dalje *ex vivo* analize su podrazumevale određivanje uticaja ove varijante na interakciju trombina sa njegovim inhibitorom antitrombinom. U fiziološkim uslovima, antitrombin se u cirkulaciji nalazi u formi koja ima slabu inhibitornu aktivnost. U prisutvu heparina i heparan-sulfata potencijal antitrombina da izvrši svoju inhibitornu aktivnost uvećan je do 1000 puta. Slobodni heparin se ne nalazi u cirkulaciji već se koristi u terapeutske svrhe, dok je endogeni heparan-sulfat vezan za membranu endotelnih ćelija [214]. Antitrombin se u prvom koraku aktivira kroz interakciju sa pentasaharidnom sekvencom heparina, što indukuje konformacionu promenu u antitrombinu i izlaganje tzv. „zglobnog regiona“ reaktivne centralne petlje (RCL, engl. *reactive central loop*). U narednom koraku, aktivirani antitrombin preko RCL petlje ostvaruje interakciju sa aktivnim katalitičkim mestom, γ -petljom i sa Na⁺ vezujućim

mestom trombina na pozicijama Arg221a i Lys224 [83]. Za ireverzibilnu inhibiciju trombina, neophodna je i njegova interakcija sa heparinom vezanim za antitrombin, čime se formira stabilan tercijarni kompleks koji se brzo uklanja iz cirkulacije [214]. U studiji u kojoj je vršena mutageneza 79 aminokiselina u trombinu pokazano je da, izmenom u kodonu za aminokiseline u okviru antitrombin vezujućih mesta na pozicijama Trp50, Glu229 i Arg233, dolazi do smanjene osetljivosti trombina za inhibiciju antitrombinom. Ukoliko su mutirani kodoni za Arg89, Arg93, Glu94, Arg98, Arg245, Lys248, Lys252, Asp255, Glu256 u prisustvu heparina dolazi do rezistencije na antitrombin, dok su treću grupu obuhvatile izmene na pozicijama Glu25, Arg178, Arg180, Asp183, Glu202, koje su uzrokovale povećanu osetljivost na inhibiciju antitrombinom [227].

Saradnici sa Nagoja Univerziteta u Japanu su pokazali da osim protrombina Yukuhashi, genske varijante u kodonu za Arg na poziciji 596 (Arg221a po himotripsinogen nomenklaturi), koje bi dovele do aminokiselinske zamene 596Gln, 596Trp ili 596Gly, takođe uzrokuju rezistenciju mutiranog trombina na antitrombin [195]. Prisustvo izmene na ovoj poziciji odražava se na gubitak vodoničnih veza između Arg596 u trombinu i Asn265 u antitrombinu, koje su ključne za formiranje trombin-antitrombin kompleksa [177]. Test rezistencije na antitrombin je pokazao da je relativna rezidualna aktivnost trombina (RRAT) nakon 30 min za *wild-type* rekombinantni trombin bila 11-19%, dok je za sve četiri varijante ova vrednost bila iznad 80% [195]. Primenom istog testa, Murata i saradnici su pokazali da je kod nosilaca protrombin Yukuhashi varijante, RRAT nakon 30 min iznosila više od 48%, dok je kod zdravih ispitanika ta vrednost bila značajno smanjena (do 16%) [194]. Slični rezultati su dobijeni za protrombin Padua 2 varijantu. Opseg zabeleženih vrednosti RRAT u uzorcima plazme nosilaca ove varijante bio je viši (34-45%) u poređenju sa rezultatima dobijenim za nenosice (23-29%) [211]. U okviru naše studije dobijene vrednosti RRAT, nakon 30 min merenja, kod simptomatskih i asimptomatskih nosilaca FIIc.1787G>A varijante (50,9%-54,7%) bile su značajno povećane u poređenju sa rezultatima za ispitanike koji nemaju ovu varijantu, u kojima je RRAT bila manja od 10%. Dobijeni rezultati potvrđuju prethodnu pilot studiju koja je ukazala da FIIc.1787G>A varijanta može dovesti do rezistencije na antitrombin [179].

Uticaj FIIc.1787G>A varijante na funkcionalnost protrombina ispitan je i na nivou interakcije sa trombomodulinom. U kompleksu sa trombomodulinom, trombin aktivira protein C, koji potom zajedno sa proteinom S inaktivira FVa i FVIIIa čime se zaustavlja koagulaciona kaskada [74]. Pored toga, formiranjem kompleksa trombin-trombomodulin, onemogućena je interakcija trombina sa PAR-1 receptorom trombocita, kao i proteolitičko isecanje fibrinogena [82]. Poremećaji u funkciji trombina ili trombomodulina mogu se odraziti na formiranje kompleksa, čime se višestruko remeti antikoagulantni efekat trombina u hemostazi. U genu koji kodira trombomodulin do sada je opisan veći broj varijanti koje su povezane sa pojavom arterijskih i venskih tromboza kod pacijenata [228]. Za interakciju sa trombinom značajni su EGF-slični (engl. *Epidermal growth factor-like*) domeni 5 i 6 [77], što ukazuje da bi prisustvo mutacija u tom regionu narušilo stabilnost ili mogućnost formiranja trombin-trombomodulin kompleksa [229]. Mutacije u okviru EGF-sličnog domena 4, koji je ključan za interakciju trombomodulina sa proteinom C, takođe remete strukturu aktivnog mesta za koje se vezuje trombin [230]. Postojanje varijanti u protrombinu koje bi mogle da remete formiranje kompleksa trombin-trombomodulin do skoro nisu bile opisane. Tek nedavno, u studiji Takagi i saradnika je pokazano da protrombin Yukahasni varijanta, osim rezistencije na antitrombin, dovodi i do rezistencije na trombomodulin. Dizajniranjem testa, koji se zasniva na sličnom principu kao i test za određivanje rezistencija na antitrombin, određivana je relativna rezidualna aktivnost trombina u prisustvu trombomodulina (RRAT-tm). Rezultati su pokazali da je RRAT-tm rekombinantnog protrombina Yukahasni 44%, dok je ta vrednost za *wild type* 8,4%, što ukazuje da protrombin Yukahasni varijanta ometa efikasno formiranje trombin-trombomodulin kompleksa [201]. Grupa saradnika iz Japana je takođe pokazala da rekombinantni protrombin Yukuhashi, Beograd i Padua 2 ispoljavaju trombomodulin rezistenciju. Rezultati ove studije su pokazali da je mehanizam FIIc.1787G>A varijante udružen sa rezistencijom na trombomodulin. RRAT-tm je kod nosilaca ove varijante ($18,9 \pm 2,3$) bila statistički značajno povećana u odnosu na vrednosti kod ispitanika koji nisu nosioci ($14,5 \pm 2,9$), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za rekombinantni protrombin Beograd [195].

Sagledavanjem svih dobijenih rezultata, može se zaključiti da je trombofilni mehanizam FIIc.1787G>A varijante veoma kompleksan. Smanjena prokoagulantna

aktivnost nadomešćuje se: dužom perzistencijom mutiranog trombina u cirkulaciji zbog njegove onemogućene inaktivacije antitrombinom i smanjenom antikoagulatnom funkcijom usled rezistencije na trombomodulin. Izraženi trombogeni potencijal ove varijante „otvara vrata“ hipotezi da se smanjena prokoagulantna aktivnost nadomešćuje još nekim trombofilnim mehanizmom koji nije obuhvaćen ovim *ex vivo* analizama. U prilog tome je i činjenica da se u svim primenjenim testovima, dobijene vrednosti nisu razlikovale između asimptomatskih i simptomatskih nosilaca FIIc.1787G>A varijante. To upućuje da trombofilni mehanizam koji je odgovoran za razlike u fenotipu kod ispitanika, nije obuhvaćen ovim testovima. Jedna od hipoteza je da ova varijanta utiče na interakciju trombina sa trombocitima tako što produženom perzistencijom mutiranog trombina dovodi do veće aktivacije i agregacije trombocita, što bi trebalo eksperimentalno potvrditi.

Na osnovu urađenih *ex vivo* analiza, FIIc.1787G>A varijanta predstavlja značajan novi trombofilni marker koga treba uključiti u panel testova za trombofilije kod pacijenata koji imaju izraženu sklonost ka trombozama, smanjenu aktivnost protrombina, a vrednosti ostalih faktora koagulacije u referentnom opsegu.

5.2.2 *Ex vivo* analize FIIc.*64_*66del varijante

U cilju ispitivanja mehanizma ove varijante urađene su *ex vivo* analize koje su obuhvatile određivanje aktivnosti i količine protrombina, kao i trombogenog potencijala FIIc.*64_*66del varijante. Analize su rađene na ukupno 12 uzoraka plazme, prikupljenih iz 3 porodice simptomatskih nosilaca FIIc.*64_*66del varijante (3 probanda i po 3 člana iz svake porodice). Od 9 članova porodica, detektovana su 3 asimptomatska nosioca, dok 6 ispitanika nisu bili nosioci ove varijante.

Brojne studije su do sada potvrdile da nivo sintetisanog proteina umnogome zavisi od 3' UTR regiona koji je uključen u različite nivoe regulacije genske ekspresije [231]. Genske varijante koje dovode do nukleotidne zamene, delecije ili insercije koje remete arhitekturu 3' UTR regiona, mogu značajno da utiču na količinu sintetisanog proteina i pojavu različitih patologija. U 3' UTR regionu gena za protrombin opisana je G20210A varijanta koja utiče na povećanu količinu protrombina u plazmi i predstavlja faktor rizika za trombotičke poremećaje i spontane pobačaje [106,232].

Prvi korak u *ex vivo* analizama FIIc.*64_*66del varijante obuhvatio je određivanje njenog uticaja na raspoloživu količinu i aktivnost protrombina u plazmi

ispitanika. Uticaj FIIc.*64_*66del varijante na količinu protrombina je određivan relativnom kvantifikacijom signala Western blot analize. Nivo protrombina se nije značajno razlikovao u prisustvu ($109,44\% \pm 14,93$) i odsustvu FII c.*64_*66del varijante ($107,84\% \pm 13,03$), na osnovu čega se zaključuje da ova varijanta ne utiče na količinu protrombina u plazmi. Saglasno sa tim, izmerene vrednosti za aktivnost protrombina bile su u referentnom opsegu kod svih 12 ispitanika, odnosno nije detektovana razlika između nosilaca i nenosilaca FIIc.*64_*66del varijante. Naša studija ukazuje da mehanizam FIIc.*64_*66del varijante u heterozigotnom obliku ne uključuje promenu u količini protrombina u plazmi i samim tim njegove aktivnosti. Ove rezultate treba razmatrati uzimajući u obzir da je u ove analize bilo uključeno ukupno 12 ispitanika.

U cilju dalje analize uticaja FII c.*64_*66del varijante na funkciju protrombina, određivan je njen trombogeni potencijal. Test generacije trombina je primenjen na sličan način kao i za FIIc.1787G>A varijantu i praćeni su lag vreme, visina pika i ETP. Rezultati su pokazali da FIIc.*64_*66del varijanta dovodi do blagog povećanja visine pika (112,1 vs. 94,4; $P=0,286$) i ETP-a (388,9 vs. 351,5; $P=0,256$) u odnosu na standardnu plazmu, ali ta razlika nije statistički značajna. U poređenju sa jasno izraženim trombogenim potencijalom, koji je u ranijim studijama pokazan za FII G20210A [233] i za FIIc.1787G>A varijantu, u ovoj studiji FII c.*64_*66del varijanta ima vrlo blago povećani trombogeni potencijal.

Rezultati *ex vivo* analize su pokazali da mehanizam FII c.*64_*66del varijante ne utiče na promene u nivou i aktivnosti protrombina u plazmi nosilaca i ima blago izraženi trombogeni potencijal. Za razliku od kodirajućeg regiona, čija očuvanost je ključna za funkcionalnost proteina, i 5' UTR-a koji je značajan za vezivanje kompleksa translacione mašinerije, 3' UTR je manje rigidna struktura. Ovaj region, usled manje izloženosti evolutivnom pritisku, poseduje veći stepen slobode da reguliše „sudbinu“ iRNK što može biti osnova za razvoj potencijalno novih mehanizama regulacije ekspresije gena [234]. Zbog toga je dalje rasvetljavanje mehanizma FIIc.*64_*66del varijante bilo usmereno ka *in vitro* analizama.

5.3 *In vitro* analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti

Da bi se detaljnije rasvetlili mehanizmi FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti, ovom studijom su bile obuhvaćene *in vitro* analize njihovog uticaja na ekspresiju gena za protrombin na nivou iRNK i proteina. Kao model sistem korišćena je tranzijentno transfekovana Cos-7 ćelijska linija. Za obe ispitivane varijante odabrani su plazmidni vektori u kojima je uklonirana cDNK za protrombin pod kontrolom citomegalovirusnog promotora koji obezbeđuje efikasnu ekspresiju. Prilikom stabilne transfekcije gen od interesa se integriše u genom određene ćelijske linije, čime je omogućeno praćenje ekspresije željenog gena nakon replikacije ćelije, što je značajna prednost u odnosu na tranzijentnu transfekciju [235]. Međutim, u mnogim sisarskim ćelijskim linijama je pokazano da prilikom stabilne transfekcije dolazi do metilacije CMV promotora, kao imuni odgovor ćelije na prisustvo virusa, usled čega gen od interesa biva utišan [236-238]. S obzirom da su u našem radu korišćeni vektori u kojima je gen od interesa pod kontrolom ovog promotora opredelili smo se za tranzijentnu transfekciju.

5.3.1 *In vitro* analize FIIc.1787G>A varijante

Iskrcavanje poslednjeg egzona je značajno za proces obrade i poliadenilacije 3' kraja pre-iRNK za protrombin i genske varijante u ovom egzonu mogu značajno uticati na regulaciju njegove ekspresije [158]. U okviru ove studije, *in vitro* analize su obuhvatile ispitivanje uticaja FIIc.1787G>A varijante iz poslednjeg egzona na ekspresiju gena za protrombin na nivou iRNK i proteina.

Uticaj ove varijante na nivo iRNK određivan je PCR-om u realnom vremenu. Prilikom odabira ove metode za praćenje nivoa ekspresije gena od interesa, važan je izbor odgovarajuće endogene kontrole u odnosu na koju se vrši normalizacija dobijenih rezultata. U ovoj studiji, odabran je gen za neomicin-fosfotransferazu koji se eksprimira sa konstrukata kojima je vršena transfekcija. Iako ovakav pristup nije uobičajen, profil ekspresije gena za neomicin-fosfotransferazu ne zavisi od tipa ćelijske linije ili samog tretmana, čime je ispunjen najvažniji kriterijum za pravilno odabranu endogenu kontrolu [239]. Prednost ovakvog pristupa je, takođe, što odabrana endogena kontrola ujedno predstavlja i kontrolu uspešnosti transfekcije, jer je odnos gena za neomicin-fosfotransferazu i gena od interesa u okviru konstrukta 1:1. Time je eliminisan uticaj

potencijalne razlike u efikasnosti transfekcije vektora sa *wild-type* i mutiranom sekvencom protrombina na dobijene rezultate.

U studijama koje su ispitivale mehanizam protrombin Yukuhashi i protrombin Padua 2 nije određivan uticaj ovih varijanti na nivo iRNK [177,211]. U našoj studiji, najpre su formirani konstrukti koji sadrže ukloniranu cDNK za protrombin sa *wild-type* sekvencom i sekvencom koja sadrži FIIc.1787G>A varijantu. Rezultati su pokazali da ova varijanta ne dovodi do promene u nivou ekspresije, jer je detektovani nivo iRNK bio identičan kod wt i mutiranog konstrukta.

Količina protrombina određivana je relativnom kvantifikacijom signala dobijenih Western blot analizom. S obzirom da je protrombin sekretorni protein, za određivanje količine proteina *in vitro*, korišćeni su medijumi u kojima su gajene transfekovane ćelije. Za pravilnu interpretaciju dobijenih rezultata Western blot metode, neophodno je korišćenje odgovarajuće kontrole (engl. *loading control*) u odnosu na koju se normalizuje količina proteina od interesa. Iz tog razloga, odlučili smo se za kontransfekciju Cos-7 permanentne ćelijske linije sa odgovarajućim protrombinskim vektorima i vektorom koji sadrži cDNK za alfa-1-antitripsin. Alfa-1-antitripsin je takođe sekretorni protein i korišćen je kao kontrola u odnosu na koju je vršena normalizacija količine protrombina.

Rezultati Western blot analize su pokazali da su relativne vrednosti za količinu *wild-type* protrombina ($1,12 \pm 0,16$) vrlo slične vrednostima za količinu mutiranog protrombina ($0,97 \pm 0,24$). Miyawaki i Bulato su u svojim studijama takođe koristili pcDNA3.1(+) vektor za dizajniranje konstrukata sa protrombin Yukuhashi i protrombin Padua 2 varijantom. Razlike u odnosu na naš dizajn studije obuhvatile su korišćenje: stabilne transfekcije HEK293 permanentne ćelijske linije i ELISA testa kao metode za kvantifikaciju količine rekombinantnog protrombina. Bez obzira na razlike u eksperimentalnom pristupu, dobijeni rezultati za rekombinanti protrombin Yukuhashi i protrombin Padua 2 bili su slični kao i za FIIc.1787G>A varijantu [177,211].

Rezultati *in vitro* analiza FIIc.1787G>A varijante su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim nakon *ex vivo* analiza u uzorcima plazme. S obzirom da su među ispitanicima detektovani samo heterozigotni nosioci FIIc.1787G>A varijante, rekombinantni mutirani c.1787A protrombin bi mogao da oponaša homozigotnu formu ove varijante.

Budući da ni u tom slučaju nismo detektovali promenu u nivou protrombina, može se zaključiti da FIIc.1787G>A varijanta ne utiče na nivo ekspresije.

5.3.2 *In vitro* analize FIIc.*64_*66del varijante

Zbog nekanonske organizacije, 3' UTR i DSE regulatorni element imaju značajnu ulogu u regulaciji ekspresije protrombina. Pozicija FIIc.*64_*66del varijante u okviru 3' UTR-a čini je interesantnom za ispitivanje njenog uticaja na ekspresiju gena za protrombin.

U okviru ove studije, efekat FIIc.*64_*66del varijante na profil ekspresije protrombina ispitivan je na nivou iRNK i proteina. Korišćenjem pCIneoΔSV40 vektora formirani su konstrukti sa celokupnom cDNK za protrombin u *wild-type* i FIIc.*64_*66del mutiranoj formi. Da bi se ispitalo da li DSE element moduliše ekspresioni profil FIIc.*64_*66del varijante, formirani su *wild-type* i mutirani konstrukti koji sadrže 50 bp 3' FR regiona, u okviru koga se nalazi ovaj element.

Uticaj FIIc.*64_*66del varijante na nivo iRNK u prisustvu/odsustvu DSE elementa određivan je relativnom kvantifikacijom rezultata dobijenih PCR-om u realnom vremenu. Naši rezultati su pokazali da je kod konstrukata koji ne sadrže DSE element, relativni nivo iRNK statistički značajno ($P=0,001$) smanjen kod mutiranog (RQmut $1,09 \pm 0,01$) u odnosu na *wild-type* konstrukt (RQwt $1,11 \pm 0,01$). Razlika je bila još izraženija ($P < 0,001$) među konstruktima sa DSE elementom (RQwt $1,14 \pm 0,02$ vs. RQmut $1,09 \pm 0,01$). Time je pokazano da FIIc.*64_*66del varijanta dovodi do smanjenja ekspresije protrombina na nivou iRNK i da je ta razlika u ekspresiji veća ukoliko je prisutan DSE regulatorni element. Ovo upućuje da DSE potencijalno ima ulogu u modulaciji efekta FIIc.*64_*66del varijante i dodatno doprinosi smanjenju ekspresije protrombina. To bi se delimično moglo objasniti prethodno opisanim modelom nekanonske organizacije 3' kraja gena za protrombin koja se odlikuje manje efikasnim DSE usled njegove smanjene sposobnosti za veže CstF kompleks [158].

Značaj DSE elementa za ispoljavanje efekta genskih varijanti u 3' kraju gena za protrombin dokazan je za FII G20210A varijantu. Primenom eksperimentalnog pristupa koji je sličan našoj studiji, pokazano je da se nivo ekspresije protrombina ne razlikuje između wt i mutiranog 20210A konstrukata u odsustvu DSE. U daljim analizama je pokazano da je za ispoljavanje efekta FII G20210A varijante neophodno prisustvo ovog elementa. Poređenjem wt i mutiranog konstrukata koji su imali DSE element,

zabeleženo je povećanje ekspresije protrombina od 1,65 puta kod mutiranog konstrukta. DSE element može da moduliše ekspresiju gena za protrombin u interakciji sa FIIC20068T varijantom. FIIC20068T varijanta dovodi do smanjenja ekspresije kada su korišćeni konstrukti koji nemaju DSE element, dok prisustvo ovog elementa menja efekat varijante i za te konstrukte je detektovana povećana ekspresija [240].

Za određivanje uticaja FIIC.*64_*66del varijante na nivo proteina korišćen je isti eksperimentalni pristup kao za FIIC.1787G>A varijantu. Količina protrombina detektovana za mutiranu formu bila je smanjena u odnosu na *wild-type* kod oba tipa konstrukta, ali je razlika bila statistički značajna samo između konstrukata koji ne sadrže DSE element ($P=0,028$). Ovo može biti posledica veće osetljivosti i preciznosti PCR-a u realnom vremenu u odnosu na relativnu kvantifikaciju Western blot analize.

U *in vitro* analizama je detektovano smanjenje količine protrombina kada su korišćeni mutirani konstrukti. Suprotno tome, nivo protrombina je bio sličan u plazmi svih ispitanika nezavisno od FIIC.*64_*66del varijante. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da mutirani konstrukt u našem *in vitro* eksperimentu oponaša homozigotno stanje za FIIC.*64_*66del varijantu, koje samim tim može imati veći uticaj na profil ekspresije protrombina u odnosu na efekat koji detektujemo u heterozigotnoj formi kod pacijenata.

U cilju daljeg rasvetljavanja mehanizma, urađene su *in silico* analize. Korišćeni su softveri za određivanje uticaja FIIC.*64_*66del varijante na promene sekundarne strukture iRNK, protein/DNK interakcije i postojanje mesta vezivanja miRNK u regionu ove varijante.

Prema *RNAfold* softveru FIIC.*64_*66del varijanta izaziva određeni stepen promena u sekundarnoj strukturi iRNK i količini slobodne energije, dok prema *Mfold* programu nema značajnih razlika. Na osnovu predikcija, ispitivanje uticaja FIIC.*64_*66del varijante na sekundarnu strukturu iRNK nije uvršteno u dalje eksperimentalne analize.

In silico analizom je ispitivano da li FIIC.*64_*66del varijanta može uticati na mesto vezivanja proteina koji učestvuju u iskrajanju i obradi iRNK. Rezultati predikcije su pokazali da se za *wild-type* sekvencu vezuje protein Sam68 (engl. *Src-associated in mitosis 68 kD*), dok prisustvo FIIC.*64_*66del varijante ukida mesto vezivanja ovog proteina. Literaturni podaci upućuju da protein Sam68 ima značajnu ulogu u post-

transkripcionoj regulaciji brojnih gena i da se u većini slučajeva vezuje za UAAAA motiv u okviru 3' UTR regiona iRNK. Pored toga, Sam68 učestvuje u regulaciji signalne transdukcije i ćelijskog ciklusa u fiziološkim uslovima, a takođe ima i značajnu ulogu u procesu tumorogeneze [241,242]. Prema najnovijim literaturnim podacima, protein SLM-2 (engl. *Sam68-like mammalian protein 2*) se vezuje za motiv UAAA koji je skoro identičan motivu vezivanja Sam68. Oba proteina pripadaju familiji STAR RNK vezujućih proteina i mogu da dimerizuju na način netipičan za ovu familiju. Njihova interakcija prilikom dimerizacije je neophodna za odabir specifičnih targeta i regulaciju obrade iRNK. Međutim, potencijalna uloga ova dva proteina u regulaciji ekspresije gena za protrombin i povezanost sa trombofilijom do sada nije opisana [243].

U okviru ove studije, korišćena je FP-PCR metoda za ispitivanje protein/DNK interakcija. Uzevši u obzir da se regulacija ekspresije protrombina odvija u hepatocitima, u studiji su za ispitivanje protein/DNK interakcije korišćeni proteini izolovani iz HepG2 permanentne ćelijske linije. Kao ciljni jednolančani DNK fragment korišćen je oligonukleotid koji obuhvata sekvencu u okviru koje se nalazi FIIc.*64_*66del varijanta. Primenom ove metode, u našoj studiji nije detektovano vezivanje proteina ni za *wild-type*, ni za mutiranu sekvencu. Zastupljenost frakcije Sam 68/SLM-2 proteina u odnosu na ukupne proteine nije poznata tako da ne možemo isključiti mogućnost da vezivanje nije detektovano zbog premale koncentracije proteina. Takođe, u ovoj analizi protein/DNK interakcije su ispitivane samo sa proteinima izolovanim iz HepG2 ćelija koja ima profil ekspresije maligne ćelije.

Imajući u vidu poziciju FIIc.*64_*66del varijante u 3' UTR-u, jedna od hipoteza je da ova varijanta ostvaruje svoj uticaj na ekspresiju gena za protrombin preko modulacije vezivanja miRNK. Uloga miRNK u regulaciji ekspresije protrombina do sada nije analizirana. Povezanost miRNK sa hemostazom i trombozama je delimično rasvetljena i dosadašnja istraživanja predstavljaju samo „vrh ledenog brega“ [244]. *In vitro* studijama je potvrđeno da iRNK za tkivni faktor, koji predstavlja glavni inicijator koagulacione kaskade, u svom 3' UTR regionu sadrži mesto vezivanja za miR-19b [245]. Nivo FXI u jetri obrnuto je proporcionalan nivou miR-181a-5p koja se takođe vezuje za njegov 3' UTR i utiče na smanjenje ekspresije [246]. Na modelu miša je pokazano da određene miRNK mogu predstavljati modulatore hemostaznog sistema tokom razvića. Primer toga je regulacija antitrombina čiji nivo tokom razvića raste, dok

nivoi miR-18a i miR-19b opadaju [247]. Slični rezultati su pokazani i za druge faktore koagulacije (FVII, FIX, FXII i FXIII), kao i za faktore fibrinolize (plazminogen, PAI-1) čiji nivoi ekspresije su takođe regulisani vezivanjem određenih miRNK koje se eksprimiraju u jetri [247,248].

U okviru naše studije, *in silico* analize su pokazale da se u 3' UTR-u iRNK za protrombin vezuje veći broj miRNK, od kojih se hsa-mir-2052 vezuje za region u kome se nalazi FIIc.*64_*66del varijanta. Da bi se rezultati predikcije potvrdili *in vitro* analizama, u ovoj studiji je dizajnirana metoda koja omogućava ispitivanje vezivanja malih RNK. Princip metode podrazumeva upotrebu jednolančanog DNK fragmenta kojim se oponaša željeni fragment iRNK u okviru koga se ispituje potencijalno vezivanje sa određenom malom RNK. Primenom ove metode, naši rezultati su pokazali da u regionu FIIc.*64_*66del varijante postoji mesto vezivanja za male RNK, čija sekvenca odgovara rezultatima predikcije za mesto vezivanja hsa-miR-2052. Ovo su prvi rezultati koji ukazuju na potencijalnu ulogu miRNK u regulaciji ekspresije protrombina. Međutim, mehanizam kojim bi FIIc.*64_*66del varijanta mogla da utiče na miRNK/iRNK interakcije i ekspresiju protrombina još uvek nije poznat. Takođe, treba imati u vidu da primenom ove metode nije moguće dobiti informaciju o vrsti RNK molekula koji se vezuje i precizna pozicija vezivanja. Veliko ograničenje metode je što fragment koji se ispituje mora biti u formi oligonukleotida kako bi nastao DNK/RNK hibrid, tako da nije moguće isključiti uticaj komponenti koje razlikuju DNK i RNK molekul na sam rezultat.

Naši rezultati upućuju da bi hsa-miR-2052 mogla biti jedan od kandidata za ispitivanje interakcije sa iRNK za protrombin u daljim *in vitro* analizama. Literaturni podaci o hsa-miR-2052 su oskudni, ali je poznato da se gen koji kodira ovu miRNK nalazi na hromozomu 8 i da se ona najverovatnije eksprimira u plućima i placenti [249]. Zanimljivo je istaći da su u našoj studiji detekovani nosioci FIIc.*64_*66del varijante bili iz grupa pacijenata sa izolovanim plućnim embolizmom i spontanim pobačajima. Međutim, za sada nema literaturnih podataka koji bi mogli da potkrepe povezanost hsa-miR-2052 sa ovim tipovima trombotičkih događaja.

Do sada su među cirkulišućim miRNK kao potencijalni biomarkeri akutnog plućnog embolizma detektovani miR-1233 u serumu [250] i miR-134 u plazmi pacijenata [251]. Tokom trudnoće, određene miRNK, čija ekspresija zavisi od nivoa

estrogena, tzv. estrogen-zavisne miRNK, učestvuju u regulaciji hemostaznog sistema. Ukoliko je nivo estrogena tokom trudnoće viši nego što bi trebalo, može doći do poremećaja u nivou ekspresije estrogen-zavisnih miRNK, koje potom snižavaju nivo određenih inhibitora koagulacione kaskade i povećavaju rizik za pojavu tromboze tokom trudnoće [252]. Na osnovu *in silico* analiza, protrombin i tkivni faktor bi potencijalno mogli da budu kandidati čija bi ekspresija bila regulisana estrogen zavisnom miR-1912, ali ova predikcija još uvek nije potvrđena funkcionalnim analizama [252]. Osim estrogen zavisnih, opisano je više od 500 miRNK koje se eksprimiraju u placenti i koje imaju značajnu ulogu u regulaciji njenog razvoja tokom trudnoće [253]. Brojne miRNK poreklom od placentе imaju drugačiji profil ekspresije kod pacijentkinja koje su imale spontani pobačaj u poređenju sa kontrolnom grupom žena [254-256]. Međutim, još uvek nema literaturnih podataka o ulozi ove grupe miRNK u regulaciji ekspresije protrombina i povezanosti sa spontanim pobačajima.

Na osnovu naših rezultata može se postaviti hipoteza da mehanizam FIIc.*64_*66del varijante može u određenim fiziološkim uslovima uticati na interakciju miRNK sa iRNK za protrombin i time doprineti pojavi izolovanog plućnog embolizma ili spontanog pobačaja, ali to je potrebno ispitati daljim analizama.

5.4 Smernice za dalje funkcionalne analize FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti

Zbog svoje nekanonske organizacije, 3' kraj gena za protrombin je predmet istraživanja velikog broja studija, ali regulacija njegove ekspresije malim nekodirajućim RNK nije bila u fokusu. Po prvi put, u ovoj studiji eksperimentalno je utvrđeno vezivanje malih RNK za region 3' UTR-a u genu za protrombin i hsa-miR-2052 je označena kao jedan od kandidata. To otvara novo polje istraživanja o ulozi 3' kraja gena za protrombin na regulaciju njegove ekspresije. U daljim analizama prvo bi trebalo utvrditi da li ova miRNK utiče na ekspresiju gena za protrombin i da li FIIc.*64_*66del varijanta moduliše tu interakciju. Imajući u vidu moguću povezanost FIIc.*64_*66del varijante sa patologijom spontanih pobačaja, u narednim *in vitro* analizama trebalo bi ispitati potencijalne interakcije ovog dela gena za protrombin sa malim RNK izolovanim iz ćelija placentе.

Ozbirom da naši rezultati pokazuju da FIIc.1787G>A varijanta dovodi do poremećaja i u smeru hipo- i hiperkoagulacije, a izraziti trombotički fenotip je prisutan kod nosilaca, bez pojave krvarenja, postavlja se pitanje da li je mehanizam u potpunosti rasvetljen ili nedostaje „deo slagalice“ koji doprinosi trombogenosti. Na osnovu dobijenih rezultata, dalje analize bi trebalo usmeriti ka rasvetljavanju mehanizma trombomodulin rezistencije i njenog uticaja na inhibiciju koagulacione kaskade aktiviranim proteinom C. Takođe, trebalo bi ispitati hipotezu po kojoj bi duža perzistencija mutiranog trombina u cirkulaciji mogla da dovede do produženog perioda aktivacije trombocita kroz direktnu interakciju trombina sa trombocitnim receptorima i intenzivnijeg stvaranja ugruška.

Imajući u vidu kompleksnost hemostaznog sistema postavlja se pitanje učešća drugih činilaca koji bi mogli dodatno da modulišu efekat FIIc.1787G>A varijante. U našoj studiji detektovali smo 4 asimptomatska nosioca ove varijante čiji su rezultati *ex vivo* analiza bili u istom opsegu kao i kod simptomatskih nosilaca. Ovo je ukazivalo da u nastanku fenotipskih razlika kod ovih ispitanika verovatno učestvuju dodatni činioci, uključujući i moguće genetičke modifikatore. Da bismo ovo ispitali, odabrana su tri člana iz ispitivane porodice i u saradnji sa kompanijom *Complete Genomics* (Kalifornija, SAD), urađeno je sekvenciranje celokupnog genoma (WGS, engl. *whole genome sequencing*). S obzirom da je prosečna starost za pojavu prve tromboze u ovoj porodici 26,5 godina, za dalju analizu izabran je asimptomatski nosilac koji je stariji od ovog proseka (IV-2; 62 godine). Osim njega, u analizu je uključen njegov rođeni brat (IV-3; 58 godina) koji je simptomatski nosilac FIIc.1787G>A varijante i ćerka (V-1; 38 godina) koja je takođe simptomatski nosilac (Slika 16). Od kompletnih rezultata, za pilot analizu je odabrano 53 gena koji su značajni za održanje hemostazne ravnoteže.

Analizirani su geni čiji produkti učestvuju u koagulacionoj kaskadi, inhibiciji koagulacije, aktivaciji trombocita i fibrinolitičkom sistemu. Od 53 analizirana gena, varijante u kodirajućim regionima su pronađene u 24 gena koji su prikazani u tabeli 10 (pobrojani su abecednim redom): α -2A-adrenergički receptor (*ADRA2A*), trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize-TAFI (*CPB2*), FX (*F10*), A lanac FXIII (*F13A1*), B lanac FXIII (*F13B*), protrombin (*F2*), proteazom aktivirani receptor 2-PAR-2 (*F2RL1*), FV (*F5*), FVII (*F7*), Fc fragment IgG receptora IIa (*FCGR2A*), β lanac fibrinogena (*FGB*), α Z subjedinica G proteina (*GNAZ*), β 3 subjedinica G proteina (*GNB3*), glikoprotein VI

trombocita (*GP6*), α IIb subjedinica integrina (*ITGA2B*), β 3 subjedinica integrina (*ITGB3*), Janus kinaza 2 (*JAK2*), endotelni trombocitni agregacioni receptor (*PEAR1*), urokinaza-tip aktivatora plazminogena- u-PA (*PLAU*), receptor u-PA (*PLAUR*), plazminogen (*PLG*), ciklooksigenaza-1-COX-1 (*PTGSI*), receptor za tromboksan A2 (*TBXA2R*), Vav guanidin nukleotidni izmenjujući faktor 3 (*VAV3*).

Plavom bojom su označeni geni čije su varijante bile prisutne kod simptomatskih nosilaca, a ne kod asimptomatskog, dok su narandžastom bojom označeni geni čije su varijante detektovane samo kod asimptomatskog nosioca.

Tabela 10. Detektovane varijante u odabranim genima uključenih u održanje hemostazne ravnoteže

gen	Asimptomatski (IV-2)		Simptomatski (IV-3)		Ćerka asimptomatskog (V-1)	
	genska varijanta	alel	genska varijanta	alel	genska varijanta	alel
ADRA2A	NP_000672.3 (Gly37Arg)	M/N	/		/	
	NP_000672.3 (Ala38Pro)	M/N	/		/	
CPB2	rs3742264	M/N	rs3742264	M/N	rs3742264	M/M
F10	/		/		NP_000495.1 (S23K)	M/N
F13A1	/		/		rs5985	M/N
F13B	rs6003	M/M	rs6003	M/M	rs6003	M/M
F2	Protrombin Beograd Arg596Gln	M/N	Protrombin Beograd Arg596Gln	M/N	Protrombin Beograd Arg596Gln	M/N
F2RL1	/		/		rs2243072	M/N
F5	/		rs9332695	M/N	rs6032	M/N
	/		/		rs4524	M/N
	/		/		rs4525	M/N
	/		/		rs6030	M/N
F7	/		NP_000122.1 (G215R)	M/N	/	

■- geni u kojima su varijante detektovane samo kod simptomatskih nosilaca; ■- geni u kojima su varijante detektovane samo kod asimptomatskog nosioca; M/N-heterozigot; M/M-homozigot; /-varijante nisu detektovane

gen	Asimptomatski (IV-2)		Simptomatski (IV-3)		Ćerka asimptomatskog (V-1)	
	genska varijanta	alel	genska varijanta	alel	genska varijanta	alel
FCGR2A	rs1801274	M/N	rs1801274	M/N	rs1801274	M/N
	rs201218628	M/N	/		rs201218628	
	rs9427397	M/N	/		rs9427397	
	rs9427398	M/N	/		rs9427398	M/N
FGB	rs4220	M/N	/		rs4220	M/N
GNB3	rs5442	M/N	/		rs5442	M/N
GNAZ	/		NP_002064.1 (Lys117Gln)	M/N	NP_002064.1 (Glu150Gly)	M/N
GP6	rs2304166	M/N	/		rs2304166	M/N
	rs2304167	M/M	rs2304167	M/M	rs2304167	M/M
	rs1613662	M/M	rs1613662	M/M	rs1613662	M/M
	rs1654412	M/M	rs1654412	M/M	rs1654412	M/M
	rs1654416	M/M	rs1654416	M/M	rs1654416	M/M
	rs1671150	M/M	rs1671150	M/M	rs1671150	M/M
	/		/	rs10418074	M/N	
ITGA2B	rs5911	M/N	/		rs5911	M/N
ITGB3	rs5918	M/N	rs5918	M/N	/	
JAK2	rs41316003	M/N	rs41316003	M/N	rs41316003	M/N
PEAR1	rs1952294	M/M	rs1952294	M/M	rs1952294	M/M
	rs12137505	M/N	rs12137505	M/N	/	
	/		rs11264581	M/N	rs822442	M/N
	/		/	rs41299597	M/N	
PLAU	/		NP_001138503.1 (P124L)	M/N	/	
PLAUR	/		/		rs4760	M/N
PLG	/		/		rs4220	M/N
PTGS1	rs1236913	M/M	rs1236913	M/M	rs1236913	M/M
	rs3842788	M/N	rs3842788	M/N	rs3842788	M/N
TBXA2R	NP_963998.2 (Arg350Cys)	M/N	/		/	
VAV3	rs12410676	M/N	/		rs12410676	M/M
	rs12403266	M/N	/		rs12403266	M/M
	rs7528153	M/N	rs7528153	M/M	rs7528153	M/M

■- geni u kojima su varijante detektovane samo kod simptomatskih nosilaca; ■- geni u kojima su varijante detektovane samo kod asimptomatskog nosioca; M/N-heterozigot; M/M-homozigot; /-varijante nisu detektovane

U genima koji kodiraju za FV, αZ subjedinicu G proteina i endotelni trombocitni agregacioni receptor detektovano je 10 varijanti koje su bile prisutne samo kod simptomatskih nosilaca, ali nijedna od njih nije detektovana kod oba. Osim rs4524 (Lys858Arg) varijante u FV koja je okarakterisana kao potencijalni faktor rizika za pojavu tromboze u više studija [257], za sve ostale varijante nema podataka da su jasno povezane sa trombotičkim fenotipom ili su okarakterisane kao benigne [257-262].

U genima koji kodiraju za α -2A-adrenergički receptor i receptor za tromboksan A2 detektovane su varijante koje su bile prisutne samo kod asimptomatskog nosioca. Pored ostalih uloga, α -2A-adrenergički receptor je eksprimiran na površini trombocita i kuplovan je sa proteinima iz G familije sa kojima sinergistički utiče na aktivaciju i agregaciju trombocita [262]. U našoj studiji detektovane su dve varijante, Gly37Arg i Ala38Pro, koje do sada nisu opisane. Ove dve varijante se nalaze u prvom transmembranskom domenu (TM1) koji je najvarijabilniji sa svega 30% konzervisanih aminokiselina, dok je u drugim transmembranskim domenima taj procenat skoro 80. S obzirom da je TM1 udaljen od mesta vezivanja liganda, ne učestvuje u interakciji receptor-ligand, ali može biti indirektno uključen u formiranje ovog mesta i samim tim uticati na funkciju α -2A-adrenergičkog receptora [263].

Receptor za tromboksan A2 se sintetiše sa gena *TBXA2R* i pripada familiji prostaglandinskih G protein kuplovanih receptora. Aktivira se vezivanjem tromboksana A2 i preko aktivacije više signalnih puteva dovodi do agregacije trombocita. Ovaj receptor kod čoveka ima dve izoforme (α i β) koje nastaju alternativnom obradom primarnog transkripta i razlikuju se u dužini C-kraja (α izoforma ima 343, a β 407 aminokiselina). C-kraj receptora za tromboksan A2 pripada citoplazmatskom domenu i veoma je značajan za pravilno kuplovanje G proteina [264,265]. U našoj studiji, kod asimptomatskog nosioca FIIc.1787G>A varijante detektovana je nova Arg350Cys varijanta, koja se nalazi u citoplazmatskom domenu β izoforme. S obzirom da se novodetektovana Arg350Cys varijanta nalazi u citoplazmatskom domenu receptora, možemo pretpostaviti da bi ova zamena mogla da se odrazi na poremećaj u transdukciji signala i posledično smanjenu agregaciju trombocita.

Uporedna analiza detektovanih varijanti kod asimptomatskog i simptomatskih nosilaca FIIc.1787G>A varijante pružila je širu sliku o drugim učesnicima hemostaze koji mogu doprineti različitom trombotičkom fenotipu. Dobijeni rezultati dodatno

potkrepljuju našu hipotezu o mogućoj ulozi trombocita u trombogenom mehanizmu FIIc.1787G>A varijante. Promene u ADRA2A i TBXA2R genima detektovane su samo kod asimptomatskog nosioca. Ranije opisane varijante u ovim genima povezivane su sa smanjenom aktivacijom i agregacijom trombocita. Imajući u vidu potencijalni efekat novodetektovanih varijanti, aktivacija i agregacija trombocita bi kod asimptomatskog nosioca mogle biti smanjene. U tom slučaju, smanjena funkcija trombocita bi imala zaštitni efekat kojim bi se kompenzovala intenzivnija aktivacija trombocita uzrokovana dužim poluživotom mutiranog trombina. Na ovaj način bi se mogao objasniti asimptomatski status ispitanika IV-2, a detektovane varijante u ovim genima bi predstavljale modifikatore mehanizma protrombin Beograd varijante. Da bi se ova hipoteza potvrdila, potrebno je ispitati uticaj mutiranog trombina na funkciju trombocita, kao i efekat detektovanih varijanti u receptoru za tromboksan A2 i α -2A-adrenergičkom receptoru, na aktivaciju i agregaciju trombocita. Dalja analiza kompletnih rezultata WGS-a će omogućiti identifikovanje eventualnih dodatnih faktora koji mogu biti povezani sa mehanizmom FIIc.1787G>A varijante i učestvovati u ispoljavanju trombogenog fenotipa.

Zaključci

1. U grupi pacijenata sa trombofilijom i u grupi zdravih ispitanika određene su učestalosti FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti u srpskoj populaciji:
 - U grupi zdravih ispitanika FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijante nisu detektovane.
 - Učestalost FIIc.1787G>A varijante u celokupnoj grupi pacijenata iznosi 0,57%; u grupi pacijenata sa kombinovanim trombotičkim poremećajima 4,08%, dok u ostalim grupama nosioci nisu detektovani.
 - Učestalost FIIc.*64_*66del varijante u celokupnoj grupi pacijenata iznosi 1,13%; u grupi pacijenata sa izolovanim plućnim embolizmom 0,96%, u grupi pacijentkinja sa spontanim pobačajima 2,83%, dok u ostalim grupama nisu detektovani nosioci ove varijante.
 - Povećana učestalost FIIc.1787G>A i FIIc.*64_*66del varijanti je detektovana kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, ali je to povećanje statistički značajno samo za FIIc.1787G>A varijantu u grupi pacijenata sa kombinovanim trombotičkim poremećajima (P= 0,03).
2. *Ex vivo* analize su pokazale da FIIc.1787G>A varijanta ima kompleksni protrombogeni mehanizam. U plazmi nosilaca ove varijante, u odnosu na nenosioce, detektovano je statistički značajno (P<0,001):
 - smanjenje protrombinske aktivnosti, bez uticaja na nivo protrombina
 - povećanje endogenog potencijala trombina
 - smanjenje inaktivacije trombina- rezistencija na antitrombin
 - smanjenje interakcije sa trombomodulinom- rezistencija na trombomodulin
3. *Ex vivo* analize u plazmi ispitanika su pokazale da FIIc.*64_*66del varijanta nema izraženi protrombogeni mehanizam, jer ne utiče na promene u aktivnosti i nivou protrombina i dovodi do blago povećanog endogenog potencijala u odnosu na nenosice ove varijante.
4. *In vitro* analizama na sistemu tranzijentno transfekovanih Cos-7 ćelija pokazano je da FIIc.1787G>A varijanta ne dovodi do promene u ekspresiji gena za protrombin.

5. *In vitro* analizama na sistemu tranzijentno transfekovane Cos-7 permanentne ćelijske linije je pokazano da FIIc.*64_*66del varijanta utiče na statistički značajno smanjenje ekspresije gena za protrombin na nivou iRNK (P=0,001) i proteina (P=0,028).
6. Prisustvo nizvodnog regulatornog elementa (DSE) moduliše efekat FIIc.*64_*66del varijante i doprinosi dodatnom smanjenju ekspresije protrombina na nivou iRNK.
7. U ovoj studiji je po prvi put primenjena modifikovana FP-PCR metoda, za ispitivanje vezivanja malih RNK za jednolančani oligonukleotid. Pokazano je da u regionu FIIc.*64_*66del varijante postoji mesto vezivanja male RNK koje se preklapa sa predikovanim mestom vezivanja za hsa-mir-2052.
8. FIIc.1787G>A varijanta predstavlja značajni trombofilni marker, dok FIIc.*64_*66del varijanta ne predstavlja marker trombofilije.
9. FIIc.1787G>A varijantu treba uključiti u panel trombofilnih testova kod pacijenata koji imaju izraženu sklonost ka trombozama, uprkos smanjenoj prokoagulantnoj aktivnosti protrombina.

Literatura

- 1 Rugeri L, Beguin S, Hemker C, Bordet JC, Fleury R, Chatard B, Negrier C, Dargaud Y: Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica* 2007;92:1639-1646.
- 2 Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL: Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 1987;13:285-292.
- 3 Degen SJ, Davie EW: Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987;26:6165-6177.
- 4 Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S: Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, ed fifth. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- 5 Yanai I, Benjamin H, Shmoish M, Chalifa-Caspi V, Shklar M, Ophir R, Bar-Even A, Horn-Saban S, Safran M, Domany E, Lancet D, Shmueli O: Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics* 2005;21:650-659.
- 6 Itsekson-Hayosh Z, Shavit-Stein E, Last D, Goetz D, Daniels D, Bushi D, Gera O, Zibly Z, Mardor Y, Chapman J, Harnof S: Thrombin Activity and Thrombin Receptor in Rat Glioblastoma Model: Possible Markers and Targets for Intervention? *J Mol Neurosci* 2015;56:644-651.
- 7 Radjabi AR, Sawada K, Jagadeeswaran S, Eichbichler A, Kenny HA, Montag A, Bruno K, Lengyel E: Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface. *J Biol Chem* 2008;283:2822-2834.
- 8 Ceelie H, Spaargaren-Van Riel CC, De Jong M, Bertina RM, Vos HL: Functional characterization of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer. *J Thromb Haemost* 2003;1:1688-1698.
- 9 Bancroft JD, McDowell SA, Degen SJ: The human prothrombin gene: transcriptional regulation in HepG2 cells. *Biochemistry* 1992;31:12469-12476.
- 10 Kingsley C, Winoto A: Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 1992;12:4251-4261.
- 11 Tarumi T, Kravtsov DV, Zhao M, Williams SM, Gailani D: Cloning and characterization of the human factor XI gene promoter: transcription factor hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF-4alpha) is required for hepatocyte-specific expression of factor XI. *J Biol Chem* 2002;277:18510-18516.
- 12 Kavlie A, Hiltunen L, Rasi V, Prydz H: Two novel mutations in the human coagulation factor VII promoter. *Thromb Haemost* 2003;90:194-205.
- 13 Carew JA, Pollak ES, High KA, Bauer KA: Severe factor VII deficiency due to a mutation disrupting an Sp1 binding site in the factor VII promoter. *Blood* 1998;92:1639-1645.
- 14 Picketts DJ, Mueller CR, Lillicrap D: Transcriptional control of the factor IX gene: analysis of five cis-acting elements and the deleterious effects of naturally occurring hemophilia B Leyden mutations. *Blood* 1994;84:2992-3000.
- 15 Jayandharan G, Viswabandya A, Baidya S, Nair SC, Shaji RV, Chandy M, Srivastava A: Molecular genetics of hereditary prothrombin deficiency in Indian patients: identification of a novel Ala362 --> Thr (Prothrombin Vellore 1) mutation. *J Thromb Haemost* 2005;3:1446-1453.

- 16 Sanford DG, Kanagy C, Sudmeier JL, Furie BC, Furie B, Bachovchin WW: Structure of the propeptide of prothrombin containing the gamma-carboxylation recognition site determined by two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1991;30:9835-9841.
- 17 Presnell SR, Stafford DW: The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb Haemost* 2002;87:937-946.
- 18 Hubbard BR, Ulrich MM, Jacobs M, Vermeer C, Walsh C, Furie B, Furie BC: Vitamin K-dependent carboxylase: affinity purification from bovine liver by using a synthetic propeptide containing the gamma-carboxylation recognition site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6893-6897.
- 19 Nelsestuen GL: Role of gamma-carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *J Biol Chem* 1976;251:5648-5656.
- 20 Blostein MD, Rigby AC, Jacobs M, Furie B, Furie BC: The Gla domain of human prothrombin has a binding site for factor Va. *J Biol Chem* 2000;275:38120-38126.
- 21 Nemerson Y, Esnouf MP: Activation of a proteolytic system by a membrane lipoprotein: mechanism of action of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:310-314.
- 22 Deguchi H, Takeya H, Gabazza EC, Nishioka J, Suzuki K: Prothrombin kringle 1 domain interacts with factor Va during the assembly of prothrombinase complex. *Biochem J* 1997;321 (Pt 3):729-735.
- 23 Kotkow KJ, Deitcher SR, Furie B, Furie BC: The second kringle domain of prothrombin promotes factor Va-mediated prothrombin activation by prothrombinase. *J Biol Chem* 1995;270:4551-4557.
- 24 Wu W, Suttie JW: N-glycosylation contributes to the intracellular stability of prothrombin precursors in the endoplasmic reticulum. *Thromb Res* 1999;96:91-98.
- 25 Dasgupta SK, Thiagarajan P: Inhibition of thrombin activity by prothrombin activation fragment 1.2. *J Thromb Thrombolysis* 2007;24:157-162.
- 26 Walker FJ, Esmon CT: The effects of phospholipid and factor Va on the inhibition of factor Xa by antithrombin III. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;90:641-647.
- 27 Liu LW, Rezaie AR, Carson CW, Esmon NL, Esmon CT: Occupancy of anion binding exosite 2 on thrombin determines Ca²⁺ dependence of protein C activation. *J Biol Chem* 1994;269:11807-11812.
- 28 Baglia FA, Badellino KO, Ho DH, Dasari VR, Walsh PN: A binding site for the kringle II domain of prothrombin in the apple 1 domain of factor XI. *J Biol Chem* 2000;275:31954-31962.
- 29 Rajesh Singh R, Chang JY: Structural stability of human alpha-thrombin studied by disulfide reduction and scrambling. *Biochim Biophys Acta* 2003;1651:85-92.
- 30 Rezaie AR, Yang L: Deletion of the 60-loop provides new insights into the substrate and inhibitor specificity of thrombin. *Thromb Haemost* 2005;93:1047-1054.
- 31 Parry MA, Stone SR, Hofsteenge J, Jackman MP: Evidence for common structural changes in thrombin induced by active-site or exosite binding. *Biochem J* 1993;290 (Pt 3):665-670.
- 32 Adams TE, Huntington JA: Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1738-1745.
- 33 Mutch NJ, Myles T, Leung LL, Morrissey JH: Polyphosphate binds with high affinity to exosite II of thrombin. *J Thromb Haemost* 2010;8:548-555.

- 34 Adams TE, Huntington JA: Structural transitions during prothrombin activation: On the importance of fragment 2. *Biochimie* 2016;122:235-242.
- 35 Esmon CT, Lollar P: Involvement of thrombin anion-binding exosites 1 and 2 in the activation of factor V and factor VIII. *J Biol Chem* 1996;271:13882-13887.
- 36 Li CQ, Vindigni A, Sadler JE, Wardell MR: Platelet glycoprotein Ib alpha binds to thrombin anion-binding exosite II inducing allosteric changes in the activity of thrombin. *J Biol Chem* 2001;276:6161-6168.
- 37 Carter WJ, Cama E, Huntington JA: Crystal structure of thrombin bound to heparin. *J Biol Chem* 2005;280:2745-2749.
- 38 Chen Z, Pelc LA, Di Cera E: Crystal structure of prethrombin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19278-19283.
- 39 Bradford HN, Krishnaswamy S: Meizothrombin is an unexpectedly zymogen-like variant of thrombin. *J Biol Chem* 2012;287:30414-30425.
- 40 Morris R, Winyard PG, Blake DR, Morris CJ: Thrombin in inflammation and healing: relevance to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:72-79.
- 41 Stiernberg J, Redin WR, Warner WS, Carney DH: The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thromb Haemost* 1993;70:158-162.
- 42 Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA: Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin Thromb Hemost* 1996;22:267-271.
- 43 Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME: Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:63-69.
- 44 Tarzami ST, Wang G, Li W, Green L, Singh JP: Thrombin and PAR-1 stimulate differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 2006;4:656-663.
- 45 Rohatgi T, Sedehizade F, Reymann KG, Reiser G: Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain. *Neuroscientist* 2004;10:501-512.
- 46 Ebrahimi S, Jaber N, Avan A, Ryzhikov M, Keramati MR, Parizadeh MR, Hassanian SM: Role of thrombin in the pathogenesis of central nervous system inflammatory diseases. *J Cell Physiol* 2016
- 47 Artuc M, Hermes B, Algermissen B, Henz BM: Expression of prothrombin, thrombin and its receptors in human scars. *Exp Dermatol* 2006;15:523-529.
- 48 Kalz J, ten Cate H, Spronk HM: Thrombin generation and atherosclerosis. *J Thromb Thrombolysis* 2014;37:45-55.
- 49 Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER: Thrombin and vascular inflammation. *Mol Cell Biochem* 2012;359:301-313.
- 50 Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M: Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 2008;632:71-79.
- 51 Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F, Karpatkin S: Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J Clin Invest* 1991;87:229-236.
- 52 Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM: Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest* 2003;124:58S-68S.
- 53 Green D, Karpatkin S: Role of thrombin as a tumor growth factor. *Cell Cycle* 2010;9:656-661.

-
- 54 Franchini M, Mannucci PM: Thrombin and cancer: from molecular basis to therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:95-101.
- 55 Nierodzik ML, Karpatkin S: Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 2006;10:355-362.
- 56 Di Cera E, Guinto ER, Vindigni A, Dang QD, Ayala YM, Wuyi M, Tulinsky A: The Na⁺ binding site of thrombin. *J Biol Chem* 1995;270:22089-22092.
- 57 Wolberg AS: Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev* 2007;21:131-142.
- 58 Côté HC, Lord ST, Pratt KP: gamma-Chain dysfibrinogenemias: molecular structure-function relationships of naturally occurring mutations in the gamma chain of human fibrinogen. *Blood* 1998;92:2195-2212.
- 59 Wolberg AS, Campbell RA: Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci* 2008;38:15-23.
- 60 Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005;3:1894-1904.
- 61 Bouma BN, Mosnier LO: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med* 2006;38:378-388.
- 62 Lijnen HR: Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:226-236.
- 63 Christensen U: C-terminal lysine residues of fibrinogen fragments essential for binding to plasminogen. *FEBS Lett* 1985;182:43-46.
- 64 Bajzar L, Morser J, Nesheim M: TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996;271:16603-16608.
- 65 Wang W, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME: A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1998;273:27176-27181.
- 66 Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ: Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 2002;100:743-754.
- 67 Lorand L: Sol Sherry Lecture in Thrombosis : research on clot stabilization provides clues for improving thrombolytic therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2-9.
- 68 Coughlin SR: Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258-264.
- 69 Lova P, Canobbio I, Guidetti GF, Balduini C, Torti M: Thrombin induces platelet activation in the absence of functional protease activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V. *Cell Signal* 2010;22:1681-1687.
- 70 Canobbio I, Balduini C, Torti M: Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal* 2004;16:1329-1344.
- 71 Yun TH, Baglia FA, Myles T, Navaneetham D, López JA, Walsh PN, Leung LL: Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. *J Biol Chem* 2003;278:48112-48119.
- 72 Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR: Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1381-1389.
- 73 Fay PJ: Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev* 2004;18:1-15.

-
- 74 Esmon CT: Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993;70:29-35.
- 75 Sadler JE: Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost* 1997;78:392-395.
- 76 Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W: Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 2000;404:518-525.
- 77 Sadler JE, Lentz SR, Sheehan JP, Tsiang M, Wu Q: Structure-function relationships of the thrombin-thrombomodulin interaction. *Haemostasis* 1993;23 Suppl 1:183-193.
- 78 Mann KG, Hockin MF, Begin KJ, Kalafatis M: Activated protein C cleavage of factor Va leads to dissociation of the A2 domain. *J Biol Chem* 1997;272:20678-20683.
- 79 Andersson HM, Arantes MJ, Crawley JT, Luken BM, Tran S, Dahlbäck B, Lane DA, Rezende SM: Activated protein C cofactor function of protein S: a critical role for Asp95 in the EGF1-like domain. *Blood* 2010;115:4878-4885.
- 80 O'Brien LM, Mastro M, Fay PJ: Regulation of factor VIIIa by human activated protein C and protein S: inactivation of cofactor in the intrinsic factor Xase. *Blood* 2000;95:1714-1720.
- 81 Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN: Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost* 2001;85:5-11.
- 82 Weiler H, Isermann BH: Thrombomodulin. *J Thromb Haemost* 2003;1:1515-1524.
- 83 Li W, Johnson DJ, Esmon CT, Huntington JA: Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:857-862.
- 84 Di Cera E: Thrombin interactions. *Chest* 2003;124:11S-17S.
- 85 Tollefsen DM: Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:454-460.
- 86 Meeks SL, Abshire TC: Abnormalities of prothrombin: a review of the pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Haemophilia* 2008;14:1159-1163.
- 87 Akhavan S, De Cristofaro R, Peyvandi F, Lavoretano S, Landolfi R, Mannucci PM: Molecular and functional characterization of a natural homozygous Arg67His mutation in the prothrombin gene of a patient with a severe procoagulant defect contrasting with a mild hemorrhagic phenotype. *Blood* 2002;100:1347-1353.
- 88 Mannucci PM, Duga S, Peyvandi F: Recessively inherited coagulation disorders. *Blood* 2004;104:1243-1252.
- 89 Akhavan S, Mannucci PM, Lak M, Mancuso G, Mazzucconi MG, Rocino A, Jenkins PV, Perkins SJ: Identification and three-dimensional structural analysis of nine novel mutations in patients with prothrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2000;84:989-997.
- 90 Wang W, Fu Q, Zhou R, Wu W, Ding Q, Hu Y, Wang X, Wang H, Wang Z: Prothrombin Shanghai: hypoprothrombinaemia caused by substitution of Gla29 by Gly. *Haemophilia* 2004;10:94-97.
- 91 Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A: Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9:557-569.
- 92 Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD: The rare coagulation disorders--

- review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 2004;10:593-628.
- 93 Henriksen RA, Owen WG: Characterization of the catalytic defect in the dysthrombin, Thrombin Quick. *J Biol Chem* 1987;262:4664-4669.
- 94 Henriksen RA, Mann KG: Identification of the primary structural defect in the dysthrombin thrombin Quick I: substitution of cysteine for arginine-382. *Biochemistry* 1988;27:9160-9165.
- 95 Henriksen RA, Mann KG: Substitution of valine for glycine-558 in the congenital dysthrombin thrombin Quick II alters primary substrate specificity. *Biochemistry* 1989;28:2078-2082.
- 96 Henriksen RA, Dunham CK, Miller LD, Casey JT, Menke JB, Knupp CL, Usala SJ: Prothrombin Greenville, Arg517-->Gln, identified in an individual heterozygous for dysprothrombinemia. *Blood* 1998;91:2026-2031.
- 97 Rouy S, Vidaud D, Alessandri JL, Dautzenberg MD, Venisse L, Guillin MC, Bezeaud A: Prothrombin Saint-Denis: a natural variant with a point mutation resulting in Asp to Glu substitution at position 552 in prothrombin. *Br J Haematol* 2006;132:770-773.
- 98 Sun WY, Smirnow D, Jenkins ML, Degen SJ: Prothrombin Scranton: substitution of an amino acid residue involved in the binding of Na⁺ (LYS-556 to THR) leads to dysprothrombinemia. *Thromb Haemost* 2001;85:651-654.
- 99 Lancellotti S, De Cristofaro R: Congenital prothrombin deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:367-381.
- 100 Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernández JA: Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993;82:1989-1993.
- 101 März W, Nauck M, Wieland H: The molecular mechanisms of inherited thrombophilia. *Z Kardiol* 2000;89:575-586.
- 102 Kujovich JL: Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:412-424.
- 103 Elezović I: Urođene i stečene trombofilije. *Bilten za transfuziologiju* 2000;Suppl:16-25.
- 104 Egeberg O: Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:516-530.
- 105 Djordjevic V, Pruner I, Radojkovic D: Molecular Basis of Thrombophilia. 2014;33:22-27.
- 106 Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-3703.
- 107 Franchini M: The utility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med* 2013;1-3.
- 108 Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE: Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 2001;28:389-392.
- 109 Djordjević V, Rakićević L, Radojković D: An overview of genetic risk factors in thrombophilia. *Srp Arh Celok Lek* 2010;138 Suppl 1:79-81.
- 110 de Moerloose P, Boehlen F: Inherited thrombophilia in arterial disease: a selective review. *Semin Hematol* 2007;44:106-113.
- 111 Boekholdt SM, Kramer MH: Arterial thrombosis and the role of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:588-596.

- 112 Brenner B, Aharon A: Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Clin Perinatol* 2007;34:527-541, v.
- 113 Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH: Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706-708.
- 114 Zivelin A, Mor-Cohen R, Kovalsky V, Kornbrot N, Conard J, Peyvandi F, Kyrle PA, Bertina R, Emmerich J, Seligsohn U: Prothrombin 20210G>A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24,000 years ago. *Blood* 2006;107:4666-4668.
- 115 Krauss G: *The Regulation of Gene Expression; Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, pp 1-87.
- 116 Chen JM, Férec C, Cooper DN: A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet* 2006;120:1-21.
- 117 Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G: Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 2002;3:REVIEWS0004.
- 118 Zhao J, Hyman L, Moore C: Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:405-445.
- 119 Darmon SK, Lutz CS: Novel upstream and downstream sequence elements contribute to polyadenylation efficiency. *RNA Biol* 2012;9:1255-1265.
- 120 Hollerer I, Grund K, Hentze MW, Kulozik AE: mRNA 3'end processing: A tale of the tail reaches the clinic. *EMBO Mol Med* 2014;6:16-26.
- 121 Dávila López M, Samuelsson T: Early evolution of histone mRNA 3' end processing. *RNA* 2008;14:1-10.
- 122 Gil A, Proudfoot NJ: Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit beta-globin mRNA 3' end formation. *Cell* 1987;49:399-406.
- 123 MacDonald CC, Wilusz J, Shenk T: The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Mol Cell Biol* 1994;14:6647-6654.
- 124 Chen F, MacDonald CC, Wilusz J: Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2614-2620.
- 125 Sheets MD, Ogg SC, Wickens MP: Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5799-5805.
- 126 Graveley BR, Fleming ES, Gilmartin GM: RNA structure is a critical determinant of poly(A) site recognition by cleavage and polyadenylation specificity factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:4942-4951.
- 127 Moreira A, Takagaki Y, Brackenridge S, Wollerton M, Manley JL, Proudfoot NJ: The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms. *Genes Dev* 1998;12:2522-2534.
- 128 Hall-Pogar T, Zhang H, Tian B, Lutz CS: Alternative polyadenylation of cyclooxygenase-2. *Nucleic Acids Res* 2005;33:2565-2579.

- 129 Brackenridge S, Proudfoot NJ: Recruitment of a basal polyadenylation factor by the upstream sequence element of the human lamin B2 polyadenylation signal. *Mol Cell Biol* 2000;20:2660-2669.
- 130 Natalizio BJ, Muniz LC, Arhin GK, Wilusz J, Lutz CS: Upstream elements present in the 3'-untranslated region of collagen genes influence the processing efficiency of overlapping polyadenylation signals. *J Biol Chem* 2002;277:42733-42740.
- 131 Aissouni Y, Perez C, Calmels B, Benech PD: The cleavage/polyadenylation activity triggered by a U-rich motif sequence is differently required depending on the poly(A) site location at either the first or last 3'-terminal exon of the 2'-5' oligo(A) synthetase gene. *J Biol Chem* 2002;277:35808-35814.
- 132 Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE: 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO J* 2008;27:482-498.
- 133 Yang Q, Gilmartin GM, Doublé S: The structure of human cleavage factor I(m) hints at functions beyond UGUA-specific RNA binding: a role in alternative polyadenylation and a potential link to 5' capping and splicing. *RNA Biol* 2011;8:748-753.
- 134 Chen F, Wilusz J: Auxiliary downstream elements are required for efficient polyadenylation of mammalian pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1998;26:2891-2898.
- 135 Keene JD: RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 2007;8:533-543.
- 136 Wu X, Brewer G: The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* 2012;500:10-21.
- 137 Mazumder B, Seshadri V, Fox PL: Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 2003;28:91-98.
- 138 Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM: Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005;123:1133-1146.
- 139 Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB: Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 2008;320:1643-1647.
- 140 An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, Torre ER, Jones KR, Feng Y, Lu B, Xu B: Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 2008;134:175-187.
- 141 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9:102-114.
- 142 Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C: microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* 2010;14:236-240.
- 143 Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA: Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:457-467.
- 144 Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA: Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931-1934.
- 145 Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA: Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 2008;7:1545-1549.
- 146 Doran G: The short and the long of UTRs. *J RNAi Gene Silencing* 2008;4:264-265.
- 147 Chatterjee S, Pal JK: Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 2009;101:251-262.

- 148 Chao LY, Mishra R, Strong LC, Saunders GF: Missense mutations in the DNA-binding region and termination codon in PAX6. *Hum Mutat* 2003;21:138-145.
- 149 Chao LY, Huff V, Strong LC, Saunders GF: Mutation in the PAX6 gene in twenty patients with aniridia. *Hum Mutat* 2000;15:332-339.
- 150 Gu LH, Kim SC, Ichiki Y, Park J, Nagai M, Kitajima Y: A usual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. *J Invest Dermatol* 2003;121:482-485.
- 151 Gu LH, Ichiki Y, Sato M, Kitajima Y: A novel nonsense mutation at E106 of the 2B rod domain of keratin 14 causes dominant epidermolysis bullosa simplex. *J Dermatol* 2002;29:136-145.
- 152 Higgs DR, Goodbourn SE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Proudfoot NJ: Alpha-thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 1983;306:398-400.
- 153 Orkin SH, Cheng TC, Antonarakis SE, Kazazian HH: Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human beta-globin gene. *EMBO J* 1985;4:453-456.
- 154 van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE: IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol* 2007;2007:89017.
- 155 Reamon-Buettner SM, Cho SH, Borlak J: Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD). *BMC Med Genet* 2007;8:38.
- 156 Haas U, Sczakiel G, Laufer SD: MicroRNA-mediated regulation of gene expression is affected by disease-associated SNPs within the 3'-UTR via altered RNA structure. *RNA Biol* 2012;9:924-937.
- 157 Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE: The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 2004;104:428-435.
- 158 Danckwardt S, Kaufmann I, Gentzel M, Foerstner KU, Gantzert AS, Gehring NH, Neu-Yilik G, Bork P, Keller W, Wilm M, Hentze MW, Kulozik AE: Splicing factors stimulate polyadenylation via USEs at non-canonical 3' end formation signals. *EMBO J* 2007;26:2658-2669.
- 159 Danckwardt S, Gantzert AS, Macher-Goeppinger S, Probst HC, Gentzel M, Wilm M, Gröne HJ, Schirmacher P, Hentze MW, Kulozik AE: p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing. *Mol Cell* 2011;41:298-310.
- 160 Danckwardt S, Hartmann K, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE: 3' end processing of the prothrombin mRNA in thrombophilia. *Acta Haematol* 2006;115:192-197.
- 161 Warshawsky I, Hren C, Sercia L, Shadrach B, Deitcher SR, Newton E, Kottke-Marchant K: Detection of a novel point mutation of the prothrombin gene at position 20209. *Diagn Mol Pathol* 2002;11:152-156.
- 162 Prat M, Morales-Indiano C, Jimenez C, Mas V, Besses C, Checa MA, Carreras R: "20209C-T" a variant mutation of prothrombin gene mutation in a patient with recurrent pregnancy loss. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44:334-336.

- 163 Hooper WC, Roberts S, Dowling N, Austin H, Lally C, Whitsett C: The prevalence of the prothrombin gene variant C20209T in African-Americans and Caucasians and lack of association with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2006;118:767-768.
- 164 van der Putten HH, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL: Functional analysis of two prothrombin 3'-untranslated region variants: the C20209T variant, mainly found among African-Americans, and the C20209A variant. *J Thromb Haemost* 2006;4:2285-2287; author reply 2288-2289.
- 165 Danckwardt S, Hartmann K, Katz B, Hentze MW, Levy Y, Eichele R, Deutsch V, Kulozik AE, Ben-Tal O: The prothrombin 20209 C->T mutation in Jewish-Moroccan Caucasians: molecular analysis of gain-of-function of 3' end processing. *J Thromb Haemost* 2006;4:1078-1085.
- 166 Tag CG, Schifflers MC, Mohnen M, Gressner AM, Weiskirchen R: Atypical melting curve resulting from genetic variation in the 3' untranslated region at position 20218 in the prothrombin gene analyzed with the LightCycler factor II (prothrombin) G20210A assay. *Clin Chem* 2005;51:1560-1561.
- 167 Flaujac C, Conard J, Horellou MH, Le Flem L, Samama MM: Atypical mutations of the prothrombin gene at positions 20,209 and 20,218, and a novel mutation at position 20,219. Report on 10 patients. *J Thromb Haemost* 2007;5:1064-1068.
- 168 Wylenzek M, Geisen C, Stapenhorst L, Wielckens K, Klingler KR: A novel point mutation in the 3' region of the prothrombin gene at position 20221 in a Lebanese/Syrian family. *Thromb Haemost* 2001;85:943-944.
- 169 Schrijver I, Lenzi TJ, Jones CD, Lay MJ, Druzin ML, Zehnder JL: Prothrombin gene variants in non-Caucasians with fetal loss and intrauterine growth retardation. *J Mol Diagn* 2003;5:250-253.
- 170 Balim Z, Kosova B, Falzon K, Bezzina Wettinger S, Colak Y: Budd-Chiari syndrome in a patient heterozygous for the point mutation C20221T of the prothrombin gene. *J Thromb Haemost* 2003;1:852-853.
- 171 Ceelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL: Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost* 2001;85:1066-1070.
- 172 Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vayá A, Llamas P, Montes R, González-Conejero R, Vicente V: Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol* 2002;118:610-614.
- 173 Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, Mannucci PM: Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2006;4:2582-2586.
- 174 Rigo F, Martinson HG: Functional coupling of last-intron splicing and 3'-end processing to transcription in vitro: the poly(A) signal couples to splicing before committing to cleavage. *Mol Cell Biol* 2008;28:849-862.
- 175 McCullough AJ, Berget SM: G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection. *Mol Cell Biol* 1997;17:4562-4571.
- 176 Pruner I: The functional analysis of the C20068T gene variant in the 3'end of the prothrombin gene and its role in the pathogenesis of thrombophilia: Faculty of biology. Belgrade, Serbia, University of Belgrade, 2014,
- 177 Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima T:

- Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med* 2012;366:2390-2396.
- 178 Bode W, Turk D, Karshikov A: The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci* 1992;1:426-471.
- 179 Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, Pruner I, Francuski D, Kojima T, Radojkovic D: A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia - the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost* 2013;11:1936-1939.
- 180 Gvozdenov M, Pruner I, Tomic B, Aradjanski M, Antonijevic N, Radojkovic D, Djordjevic V: Prothrombin 3'end gene variants in isolated pulmonary embolism--the first report of FIIc.*64_*66del and FIIc.*303T>C variants. *Acta Cardiol* 2015;70:177-182.
- 181 Dieffenbach CW, Dveksler GS: *PCR Primer: A Laboratory Manual*, ed Second. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- 182 Bartlett JMS, Stirling D: *PCR Protocols*. Springer, 2003.
- 183 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed 2nd. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 184 Radojkovic D, Kusic J: Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem* 2000;46:883-884.
- 185 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-5467.
- 186 Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M: *Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders: A laboratory manual* ed 2nd. Montreal, World Federation of Hemophilia 2010.
- 187 Burnette WN: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203.
- 188 Nair SC, Dargaud Y, Chitlur M, Srivastava A: Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders. *Haemophilia* 2010;16 Suppl 5:85-92.
- 189 Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C: Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia* 2012;18 Suppl 4:81-88.
- 190 Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S: Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006;96:553-561.
- 191 Wolberg AS: Thrombin generation assays: understanding how the method influences the results. *Thromb Res* 2007;119:663-665.
- 192 Castoldi E, Rosing J: Thrombin generation tests. *Thromb Res* 2011;127 Suppl 3:S21-25.
- 193 Zekavat OR, Haghpanah S, Dehghani J, Afrasiabi A, Peyvandi F, Karimi M: Comparison of thrombin generation assay with conventional coagulation tests in evaluation of bleeding risk in patients with rare bleeding disorders. *Clin Appl Thromb Hemost* 2014;20:637-644.
- 194 Murata M, Takagi A, Suzuki A, Okuyama E, Takagi Y, Ando Y, Kato I, Nakamura Y, Murate T, Matsushita T, Saito H, Kojima T: Development of a new laboratory test to evaluate antithrombin resistance in plasma. *Thromb Res* 2014;133:293-298.

-
- 195 Takagi Y, Murata M, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Tamura S, Takagi A, Matsushita T, Saito H, Kojima T: Missense mutations in the gene encoding prothrombin corresponding to Arg596 cause antithrombin resistance and thrombomodulin resistance. *Thromb Haemost* 2016;116:1022-1031.
- 196 Davis JM: *Basic Cell Culture: A Practical Approach*, ed Second. Oxford University Press, Incorporated, 2002.
- 197 Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983;11:1475-1489.
- 198 Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- 199 Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, Pruner I, Francuski D, Kojima T, Radojkovic D: A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia- the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost* 2013
- 200 Miljic P, Gvozdenov M, Takagi Y, Takagi A, Pruner I, Dragojevic M, Tomic B, Bodrozcic J, Kojima T, Radojkovic D, Djordjevic V: Clinical and biochemical characterization of the Prothrombin Belgrade mutation in a large Serbian pedigree: new insights into antithrombin resistance mechanism. *J Thromb Haemost* 2017
- 201 Takagi Y, Kato I, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Kojima T: Antithrombin-resistant prothrombin Yukuhashi mutation also causes thrombomodulin resistance in fibrinogen clotting but not in protein C activation. *Thromb Res* 2014;134:914-917.
- 202 Sachchithanathan M, Stasinopoulos SJ, Wilusz J, Medcalf RL: The relationship between the prothrombin upstream sequence element and the G20210A polymorphism: the influence of a competitive environment for mRNA 3'-end formation. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1010-1020.
- 203 Ljubic M, Divac Rankov A, Kojic S, Miranda E, Radojkovic D: Functional analysis of novel alpha-1 antitrypsin variants G320R and V321F. *Mol Biol Rep* 2014;41:6133-6141.
- 204 Gvozdenov M, Pruner I, Tomic B, Kovac M, Radojkovic D, Djordjevic V: The effect of FIIc.1787G>A (prothrombin Belgrade) mutation on prothrombin gene expression in vitro. *Molecular Biology* 2017;51:49-52.
- 205 Rosendaal FR, Reitsma PH: Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7 Suppl 1:301-304.
- 206 Kroegel C, Reissig A: Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Respiration* 2003;70:7-30.
- 207 van Langevelde K, Flinterman LE, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Cannegieter SC: Broadening the factor V Leiden paradox: pulmonary embolism and deep-vein thrombosis as 2 sides of the spectrum. *Blood* 2012;120:933-946.
- 208 Gadelha T, Roldán V, Lecumberri R, Trujillo-Santos J, del Campo R, Poggio R, Monreal M, Investigators R: Clinical characteristics of patients with factor V Leiden or prothrombin G20210A and a first episode of venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thromb Res* 2010;126:283-286.
- 209 Simcox LE, Ormsher L, Tower C, Greer IA: Thrombophilia and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci* 2015;16:28418-28428.

- 210 Kinzler WL, Prasad V, Ananth CV, Investigators NJ-PAS: The effect of maternal thrombophilia on placental abruption: Histologic correlates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:243-248.
- 211 Bulato C, Radu CM, Campello E, Gavasso S, Spiezia L, Tormene D, Simioni P: New Prothrombin Mutation (Arg596Trp, Prothrombin Padua 2) Associated With Venous Thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:1022-1029.
- 212 Sivasundar S, Oommen AT, Prakash O, Baskaran S, Biswas R, Nair S, Mohan CG, Biswas L: Molecular defect of 'Prothrombin Amrita': substitution of arginine by glutamine (Arg553 to Gln) near the Na(+) binding loop of prothrombin. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50:182-183.
- 213 Kishimoto M, Suzuki N, Murata M, Ogawa M, Kanematsu T, Takagi A, Kiyoi H, Kojima T, Matsushita T: The first case of antithrombin-resistant prothrombin Belgrade mutation in Japanese. *Ann Hematol* 2016;95:541-542.
- 214 Patnaik MM, Moll S: Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008;14:1229-1239.
- 215 Khan S, Dickerman JD: Hereditary thrombophilia. *Thromb J* 2006;4:15.
- 216 Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM: Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995;73:87-93.
- 217 Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J: Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* 1997;77:444-451.
- 218 Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F, Paciaroni K, Leone G, Faioni EM: Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998;92:2353-2358.
- 219 Tormene D, Fortuna S, Tognin G, Gavasso S, Pagnan A, Prandoni P, Simioni P: The incidence of venous thromboembolism in carriers of antithrombin, protein C or protein S deficiency associated with the HR2 haplotype of factor V: a family cohort study. *J Thromb Haemost* 2005;3:1414-1420.
- 220 Caldera A, Mora J, Kotler M, Eiger G: Pulmonary embolism in a patient with pernicious anemia and hyperhomocysteinemia. *Chest* 2002;122:1487-1488.
- 221 Pineda AO, Carrell CJ, Bush LA, Prasad S, Caccia S, Chen ZW, Mathews FS, Di Cera E: Molecular dissection of Na⁺ binding to thrombin. *J Biol Chem* 2004;279:31842-31853.
- 222 Dang QD, Guinto ER, di Cera E: Rational engineering of activity and specificity in a serine protease. *Nat Biotechnol* 1997;15:146-149.
- 223 Ay C, Haselböck J, Laczkovics C, Koder S, Pabinger I: Thrombin generation in patients with a bleeding tendency of unknown origin. *Ann Hematol* 2011;90:1099-1104.
- 224 van Veen JJ, Gatt A, Makris M: Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol* 2008;142:889-903.
- 225 Chaireti R: Thrombin generation in different cohorts Evaluation of the haemostatic potential Department of Clinical and Experimental Medicine. Sweden, Linköping University, 2013,

- 226 Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF: Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost* 2008;99:767-773.
- 227 Tsiang M, Jain AK, Gibbs CS: Functional requirements for inhibition of thrombin by antithrombin III in the presence and absence of heparin. *J Biol Chem* 1997;272:12024-12029.
- 228 Kunz G, Ohlin AK, Adami A, Zöller B, Svensson P, Lane DA: Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function. *Blood* 2002;99:3646-3653.
- 229 Nagashima M, Lundh E, Leonard JC, Morser J, Parkinson JF: Alanine-scanning mutagenesis of the epidermal growth factor-like domains of human thrombomodulin identifies critical residues for its cofactor activity. *J Biol Chem* 1993;268:2888-2892.
- 230 Koeppel JR, Beach MA, Baerga-Ortiz A, Kerns SJ, Komives EA: Mutations in the fourth EGF-like domain affect thrombomodulin-induced changes in the active site of thrombin. *Biochemistry* 2008;47:10933-10939.
- 231 Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B, Hrstka R: The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol* 2012;9:563-576.
- 232 Pabinger I: Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Thromb Res* 2009;123 Suppl 3:S16-21.
- 233 Hézard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P: Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem* 2006;52:665-670.
- 234 Conne B, Stutz A, Vassalli JD: The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med* 2000;6:637-641.
- 235 Kim TK, Eberwine JH: Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:3173-3178.
- 236 Löser P, Jennings GS, Strauss M, Sandig V: Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J Virol* 1998;72:180-190.
- 237 Grassi G, Maccaroni P, Meyer R, Kaiser H, D'Ambrosio E, Pascale E, Grassi M, Kuhn A, Di Nardo P, Kandolf R, Küpper JH: Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis* 2003;24:1625-1635.
- 238 Verma M: Viral genes and methylation. *Ann N Y Acad Sci* 2003;983:170-180.
- 239 Wong ML, Medrano JF: Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39:75-85.
- 240 Đorđević V: Analiza uticaja 3' kraja humanog protrombinskog gena na njegovu ekspresiju i patogenezu trombofilije. Beograd, Univerzitet u Beogradu, 2010, PhD,
- 241 Elliott DJ, Rajan P: The role of the RNA-binding protein Sam68 in mammary tumourigenesis. *J Pathol* 2010;222:223-226.
- 242 Itoh M, Haga I, Li QH, Fujisawa J: Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res* 2002;30:5452-5464.
- 243 Feracci M, Foot JN, Greltscheid SN, Danilenko M, Stehle R, Gonchar O, Kang HS, Dalgliesh C, Meyer NH, Liu Y, Lahat A, Sattler M, Eperon IC, Elliott DJ, Dominguez C: Structural basis of RNA recognition and dimerization by the STAR proteins T-STAR and Sam68. *Nat Commun* 2016;7:10355.

- 244 Teruel-Montoya R, Rosendaal FR, Martínez C: MicroRNAs in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2015;13:170-181.
- 245 Teruel R, Pérez-Sánchez C, Corral J, Herranz MT, Pérez-Andreu V, Saiz E, García-Barberá N, Martínez-Martínez I, Roldán V, Vicente V, López-Pedreira C, Martínez C: Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2011;9:1985-1992.
- 246 Salloum-Asfar S, Teruel-Montoya R, Arroyo AB, García-Barberá N, Chaudhry A, Schuetz E, Luengo-Gil G, Vicente V, González-Conejero R, Martínez C: Regulation of coagulation factor XI expression by microRNAs in the human liver. *PLoS One* 2014;9:e111713.
- 247 Teruel R, Corral J, Pérez-Andreu V, Martínez-Martínez I, Vicente V, Martínez C: Potential role of miRNAs in developmental haemostasis. *PLoS One* 2011;6:e17648.
- 248 Marchand A, Proust C, Morange PE, Lompré AM, Trégouët DA: miR-421 and miR-30c inhibit SERPINE 1 gene expression in human endothelial cells. *PLoS One* 2012;7:e44532.
- 249 Chang YM, Juan HF, Lee TY, Chang YY, Yeh YM, Li WH, Shih AC: Prediction of human miRNAs using tissue-selective motifs in 3' UTRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17061-17066.
- 250 Kessler T, Erdmann J, Vilne B, Bruse P, Kurowski V, Diemert P, Schunkert H, Sager HB: Serum microRNA-1233 is a specific biomarker for diagnosing acute pulmonary embolism. *J Transl Med* 2016;14:120.
- 251 Xiao J, Jing ZC, Ellinor PT, Liang D, Zhang H, Liu Y, Chen X, Pan L, Lyon R, Peng LY, Liang X, Sun Y, Popescu LM, Condorelli G, Chen YH: MicroRNA-134 as a potential plasma biomarker for the diagnosis of acute pulmonary embolism. *J Transl Med* 2011;9:159.
- 252 Tay J, James I, Hughes Q, Baker R, I: Identification of oestrogen responsive mirnas associated with the regulation of coagulation and the increased thrombotic risk in pregnant women. *Journal of Thrombosis Haemostasis* 2015;13:946.
- 253 Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Schmidt A, Chaiwangyen W, Markert UR: Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta* 2014;35 Suppl:S39-45.
- 254 Kotlabova K, Doucha J, Hromadnikova I: Placental-specific microRNA in maternal circulation--identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol* 2011;89:185-191.
- 255 El-Shorafa HM, Sharif FA: Dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology* 2013;2:330-335.
- 256 Tsochandaridis M, Nasca L, Toga C, Levy-Mozziconacci A: Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. *Biomed Res Int* 2015;2015:294954.
- 257 Smith NL, Wiggins KL, Reiner AP, Lange LA, Cushman M, Heckbert SR, Lumley T, Rice KM, Folsom AR, Psaty BM: Replication of findings on the association of genetic variation in 24 hemostasis genes and risk of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7:1743-1746.
- 258 Heit JA, Cunningham JM, Petterson TM, Armasu SM, Rider DN, DE Andrade M: Genetic variation within the anticoagulant, procoagulant, fibrinolytic and innate

- immunity pathways as risk factors for venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2011;9:1133-1142.
- 259 Allon M, Zhang L, Maya ID, Bray MS, Fernandez JR, Investigators DACDS: Association of factor V gene polymorphism with arteriovenous graft failure. *Am J Kidney Dis* 2012;59:682-688.
- 260 Fu Y, Sun S, Liang J, Liu S, Jiang Y, Xu L, Mei J: PEAR1 gene polymorphism in a Chinese pedigree with pulmonary thromboembolism. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e5687.
- 261 Olivi L, Vandenbrielle C, Gu YM, Salvi E, Carpini SD, Liu YP, Jacobs L, Jin Y, Thijs L, Citterio L, Cusi D, Verhamme P, Staessen JA: PEAR1 is not a human hypertension-susceptibility gene. *Blood Press* 2015;24:61-64.
- 262 Ho MK, Wong YH: G(z) signaling: emerging divergence from G(i) signaling. *Oncogene* 2001;20:1615-1625.
- 263 Laurila JM, Wissel G, Xhaard H, Ruuskanen JO, Johnson MS, Scheinin M: Involvement of the first transmembrane segment of human $\alpha(2)$ -adrenoceptors in the subtype-selective binding of chlorpromazine, spiperone and spiroxatrine. *Br J Pharmacol* 2011;164:1558-1572.
- 264 Kinsella BT: Thromboxane A2 signalling in humans: a 'Tail' of two receptors. *Biochem Soc Trans* 2001;29:641-654.
- 265 Powell KL, Stevens V, Upton DH, McCracken SA, Simpson AM, Cheng Y, Tasevski V, Morris JM, Ashton AW: Role for the thromboxane A2 receptor β -isoform in the pathogenesis of intrauterine growth restriction. *Sci Rep* 2016;6:28811.

Elektronske baze podataka

1. *NCBI/SNP*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
2. *SpliceAid*: <http://www.introni.it/splicing.html>
3. *RNAfold*: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>
4. *Mfold*: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>
5. *miRBase*: <http://www.mirbase.org/>
6. *miRWalk 2.0*: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/custom.html>
7. *miRmap*: <http://mirmap.ezlab.org/>
8. *TargetScan*: http://www.targetscan.org/vert_71/
9. *miRanda*: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>
10. *ExAC*: <http://exac.broadinstitute.org/>
11. *Hardy-Weinberg equilibrium*: <http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>

Prilozi

BIOGRAFIJA

Maja Ž. Gvozdenov je rođena 22. aprila 1988. godine u Beogradu, Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija upisala je 2007. godine, a osnovne akademske studije završila je 2010. godine. Master akademske studije upisala je iste godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija. Master rad pod nazivom „Antihipertenzivni potencijal ekstrakta lista masline kod pacova sa urođenom hipertenzijom u uslovima normalne i blokirane sinteze azotnog monoksida“ uradila je u Laboratoriji za kardiovaskularnu fiziologiju, Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu. Godine 2012. upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija, smer Molekularna biologija eukariota. Iste godine je otpočela izradu eksperimentalnog dela doktorske teze u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Učesnik je nacionalnog projekta “Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturalna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera” (MPNTR Republike Srbije, 173008). Tokom svog rada, bila je učesnik četiri međunarodna projekta: 1) FP7-REGPOT-2012-2013-1 project No316088 "*Strengthening the Research Potential of IMGGE through Reinforcement of Biomedical Science of Rare Diseases in Serbia—in route for innovation*"- SERBORDISin, 2013-2016; 2) "*The role of prothrombin in colon cancer*", research project within scientific and technological cooperation between Republic of Serbia and Republic of Croatia, 2016-2017; 3) CA15120 "*Open Multiscale Systems Medicine (OpenMultiMed)*", 2016-2020; 4) CA15205 "*Gene Regulation Ensemble Effort for the Knowledge Commons*", 2016-2020. Član je Društva genetičara Srbije i Internacionalnog društva za trombozu i hemostazu (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*). U toku dosadašnjeg naučnog rada Maja Gvozdenov je objavila 10 radova u časopisima međunarodnog značaja, 2 rada u časopisima nacionalnog značaja i ima 19 kongresnih saopštenja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Маја Гвозденов

Број индекса M3001/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Функционална анализа генских варијанти Fllc.1787G>A (протромбин Београд) и

Fllc.*64_*66del и њихова повезаност са тромбофилијом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 20.02.2017.

Гвозденов Маја

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора __ Маја Гвозденов _____

Број индекса _____ M3001/2012 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада __ Функционална анализа генских варијанти F11c.1787G>A
(протромбин Београд) и F11c.*64_*66del и њихова повезаност са тромбофилијом

Ментор _____ др Валентина Ђорђевић и др Драгица Радојковић _____

Потписани/а _____ Маја Ж. Гвозденов _____

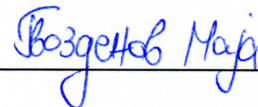
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 20.02.2017.

 _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Функционална анализа генских варијанти Fllc.1787G>A (протромбин Београд) и Fllc.*64_*66del и њихова повезаност са тромбофилијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

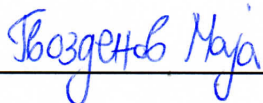
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 20.02.2017.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.