

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Analiza uticaja 3' kraja humanog  
protrombinskog gena na njegovu ekspresiju i  
patogenezu trombofilije

DOKTORSKA TEZA

Valentina Dorđević

Beograd, 2010.



14 20786

Uč 3681567

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

**Analiza uticaja 3' kraja humanog  
protrombinskog gena na njegovu ekspresiju i  
patogenezu trombofilije**

DOKTORSKA TEZA

Valentina Đorđević

Beograd, 2010

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА  
"СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ"-БЕОГРАД

И. Бр. 161916



*Komisija za pregled i ocenu:*

**dr Dragica Radojković**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo, Beograd

**dr Goran Brajušković**, docent,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Snežana Kojić**, naučni saradnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo, Beograd

*Milovanki i Joletu*



Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Svim kolegama se najsrdačnije zahvaljujem na pomoći, razumevanju i atmosferi koja Vojvode Stepe 444a čini posebnim mestom u najlepšem smislu te reči.

Posebno želim da se zahvalim:

dr Dragici Radojković na dragocenoj slobodi da sama osmislim svoj eksperimentalni put, istrajnom usmeravanju ka postavljenim ciljevima i ogromnoj pomoći u pisanju, počev od prvih, nesigurnih koraka u *Respiration-u*, pa nadalje,

dr Goranu Brajuškoviću na bezrezervnoj podršci u savladavanju malih i velikih prepreka na putu završetka ove teze,

dr Snežani Kojić na kritičkoj oceni ovog rada, nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu i na tome što su njena vrata uvek bila otvorena za sve moje nedoumice,

dragoj profesorki Ani Savić na ukazanom poverenju,

mojoj prvoj mentorki, dr Nadeždi Nedeljković, na načinu na koji mi je otvorila svet nauke,

laboratoriji 03:

Lili i Kušić na savetima i pomoći u razumevanju drugih ljudi i mene same, Alex jer i dalje obavlja gomilu stvari umesto mene,

Saškici i Mili na slušanju mojih beskonačnih priča i pomoći u eksperimentalnom radu,

Maki za sve tople zagrljaje i nenametljive životne lekcije,

Branku za strpljivo podnošenje mojih deminutiva i mog karaktera, ali i na svim i sveobuhvatnim pomoćima najrazličitijih vrsta,

Aleki za sve ozbiljne razgovore tokom neozbiljnih putovanja kući,

Ivi na novim pogledima i idejama, na divnom i lekovitom entuzijazmu,

Đoletu na pozitivizmu koji je doneo sa sobom,

svim dragim ljudima (Sandri, Olji, Jeleni, Ivanu, Tamari, Milošu, Kiki..)

koji su bar na kratko bili deo laboratorije 03,

Mladenu i Aleksi na prijatnim institutskim satima,

saradnicima sa Instituta za transfuziju krvi Srbije, Instituta za hematologiju, Kliničkog centra Srbije, Centra za poremećaj hemostaze, Kliničkog centra

*Vojvodine i Instituta za majku i dete, na velikoj pomoći u izradi ove teze. Među njima posebno: Miri, Gorani, Nebojši i Peđi, na dugogodišnjem, istrajnom saputništvu putevima hemostaze, ali i na dragocenom prijateljstvu.*

*mojim dragim prijateljima jer su za sve ove godine pokazali da je prijatelj onaj sa kojim si i kad nisi,*

*Anđelu, za svu podršku ovog sveta, u malim i velikim stvarima,*



*mojoj porodici:*

*Sunčici, mojoj sestri koju mi je život podario, na tom poklonu zbog koga moj život ima sasvim drugačiju dimenziju,*

*mom bratu i snahi, na divnom osećaju pripadanja, sigurnosti i ljubavi,*

*Đorđu i Milošu jer su mi pokazali da mogu da volim do neba i dalje i učinili me bogatijom za saznanje kako je lako biti srećan,*

*najviše mojim roditeljima za toliko toga da to ne bi stalo u jednu doktorsku tezu.*



## APSTRAKT

Protrombin (Faktor II) je prekursor trombina, jednog od ključnih molekula u održanju hemostazne ravnoteže. Njegov povišeni nivo dovodi do odstupanja od hemostazne ravnoteže u smeru hiperkoagulacije i shodno tome predstavlja faktor rizika za pojavu tromboza. Kod pacijenata sa povišenim nivoom protrombina identifikovano je prisustvo G u A polimorfizma na 20210. mestu u 3' nekodirajućem regionu gena (FII G20210A). Istraživanja su pokazala da 3' kraj gena za protrombin ima nekanononsku organizaciju, a za G20210A polimorfizam je dokazano da dovodi do povišene ekspresije protrombina, što za posledicu ima pojavu tromboza. Međutim, precizan mehanizam kojim ovaj "3' gain of function" polimorfizam utiče na ekspresiju gena i dovodi do povišenog nivoa proteina još uvek nije rasvetljen. Obzirom da brojni pacijenti imaju povišeni nivo protrombina u plazmi, a ne nose G20210A polimorfizam, pretpostavlja se da u 3' kraju gena postoje i drugi polimorfizmi koji mogu da utiču na ekspresiju protrombina.

Novija istraživanja ukazuju da je učešće 3' kraja u regulaciji ekspresije gena daleko kompleksnije nego što se pretpostavljalo i da se u okviru ovog regiona nalazi veliki broj potencijalnih regulatornih elemenata.

U okviru ovog istraživanja urađena je strukturna i funkcionalna analiza 3' kraja gena za protrombin koja je imala za cilj da rasvetli mehanizme kojima 3' kraj gena za protrombin i polimorfizmi u okviru njega, utiču na ekspresiju protrombina i patogenezu trombofilije.

Strukturna analiza je obuhvatila pretraživanje 3' kraja kod pacijenata sa povišenim nivoom protrombina i identifikovana su tri nova polimorfizma: T20063C, C20068T i T20298C. Za ova tri polimorfizma kao i dva polimorfizma (A19911G i C20221T) koji su u literaturi već povezivana sa patogeneзом trombofilije, određena je učestalost u grupi od 100 pacijenata sa trombofilijom i u kontrolnoj grupi od 100 zdravih ispitanika. Za A19911G polimorfizam u homozigotnom obliku (OR 1,27,  $p=0,603$ ) i C20068T polimorfizam u heterozigotnom obliku (OR 2,14,  $p=0,687$ ) je pokazano da su

učestaliji u grupu pacijenta u odnosu na kontrolnu grupu, dok C20221T, T20063C i T20298C polimorfizmi nisu detektovani ni kod jednog od ukupno 200 ispitanika.

U ovoj studiji je po prvi put, opisan somatski mozaicizam za G20210A polimorfizam i otvoreno pitanje uloge mozaicizma u nastanku multifaktorijalnih bolesti.

Funkcionalna analiza je pokazala da konstrukat sa C20068T polimorfizmom ima 1,64 puta povećanu ekspresiju u odnosu na *wt* (*wild type*) konstrukt ( $p < 0,05$ ), dok je za konstrukt sa T20063C polimorfizmom dokazano da nema razlike u ekspresiji u odnosu na *wt*. Pokazano je da prisustvo dela 3'FR (*flanking region*) sekvence u kojoj se nalazi DSE (*downstream sequence element*) regulatorni region dovodi do smanjenja ekspresije protrombina. To smanjenje je najizraženije kada se porede dva *wt* konstrukta, a najmanje kada je u konstruktima prisutan 20068T polimorfizam. Pokazano je, da je prisustvo dela 3' FR sekvence sa DSE regionom neophodno da bi G20210A polimorfizam doveo do povećane ekspresije protrombinskog gena. Takođe, identifikovan je region u poslednjem egzonu gena za protrombin koji može biti potencijalno značajan u regulaciji ekspresije.

Na osnovu rezultata ove studije, jedan od novodetektovanih polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin-C20068T, predstavlja potencijalno značajan marker trombofilije. Dobijeni rezultati ukazuju da deo 3' FR sekvence, koja sadrži DSE element, igra važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena za protrombin i da postoji složena interakcija između ovog regulatornog elementa i polimorfizma u 3' kraju gena za protrombin, koju je potrebno dalje istraživati.

**Ključne reči:** protrombin, 3' kraj gena, regulacija ekspresije, trombofilija, G20210A, C20068T, DSE regulatorni region

## ABSTRACT

Prothrombin (Factor II) is a precursor of thrombin, and one of the key enzymes involved in blood coagulation. Hyperprothrombinemia leads to hypercoagulability and increased thrombosis risk. The G to A substitution at position 20210 of the 3' untranslated region of (UTR) the factor II gene (FII G20210A) is associated with increased prothrombin level and enhanced blood coagulation. A recent studies of 3' end of FII gene identified an unusual architecture of noncanonical sequence elements. However, the precise mechanism by which G20210A 3' gain of function polymorphism affects gene expression and leads to elevated levels of protein remains unsolved. The elevated prothrombin level is, also, present in patients, non-carriers of G20210A polymorphism, indicating the presence of additional 3' end polymorphisms in prothrombin gene. 3' end of the gene and its impact on regulation of gene expression are far less studied in relation to the 5' end and promoter, although recent research suggests that this region might have an important role in the gene expression regulation.

The aim of our study was to elucidate the mechanism by which 3' end of prothrombin gene, as well as polymorphisms in this region, affect the prothrombin gene expression and pathogenesis of thrombophilia.

Screening of 3' end of prothrombin gene in patients with thrombophilia identified three new polymorphisms: T20063C, C20068T, and T20298C. In order to examine the role of these three and two previously described polymorphisms (A19911G and C20221T) in pathogenesis of thrombophilia a case-control study was carried out in a group of 100 thrombophilic patients and 100 healthy blood donors. The homozygous carriers for A19911G polymorphism (OR 1.27,  $p = 0.603$ ) and heterozygous carriers for C20068T polymorphism (OR 2.14,  $p = 0.687$ ) were more frequent in the patient group compared to the controls, while C20221T, T20063C and T20298C polymorphisms were not detected.

For the first time, we described somatic mosaicism for G20210A polymorphism and open the question of possible role of mosaicism in the pathogenesis of multicausal diseases.

Functional assays revealed that constructs with the C20068T polymorphism increased expression level 1.64 times compared to the wild type construct ( $p < 0.05$ ), while construct with T20063C polymorphism showed no difference in expression. We have shown that the presence of 3'FR (flanking region) sequence with the DSE (downstream sequence element) in constructs leads to decreased prothrombin expression. Our results, also showed that DSE element is necessary for gain of function effect of prothrombin G20210A polymorphism. We have identified a last exon region of prothrombin gene which may play role in regulation of prothrombin expression.

Our results showed that C20068T polymorphism may be a potentially important marker for thrombophilia. Also, our findings suggest that DSE region within 3' FR sequence of prothrombin gene, might have an important role in the regulation of gene expression. It is obvious that complex interactions between polymorphisms and regulatory elements in 3' end of prothrombin gene exist, which needs further investigations.

**Keywords:** prothrombin, 3'end, gene expression regulation, thrombophilia, G20210A, C20068T, DSE region

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1 Trombofilije</b>	1
1.1.1 Hemostaza	1
1.1.2 Tromboze i trombofilija	4
1.1.3 Nasledni faktori rizika za nastanak trombofilije	5
<b>1.2 Protrombin (Faktor II)</b>	7
1.2.1 Gen za protrombin	7
1.2.2 Struktura i funkcija protrombina	8
<b>1.3 3' kraj gena i njegova uloga u regulaciji genske ekspresije kod eukariota</b>	12
1.3.1 Struktura 3' kraja gena	12
1.3.2 Uloga 3' kraja gena u regulaciji genske ekspresije	14
1.3.3 Struktura 3' kraja gena za protrombin	17
1.3.4 Polimorfizmi u 3' kraju gena za protrombin i njihov uticaj na ekspresiju protrombina	19
<b>2. CILJ</b>	22
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	24
<b>3.1 Ispitanici</b>	25
<b>3.2 Materijal</b>	26
3.2.1 Čelijske linije	26
3.2.2 Bakterijski sojevi	26
3.2.3 Plazmidni vektori	26
3.2.4 Oligonukleotidi	27
<b>3.3. Metode</b>	29
3.3.1 Metode za skining i detekciju polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin	29
Izolacija DNK iz periferne krvi	29
Izolacija DNK iz ćelija bukalne sluzokože	30
Izolacija DNK iz ćelija korena kose	30
Analiza DNK na agaroznom gelu	31

Analiza konformacionog polimorfizma jednolančane DNK	31
PCR-RFLP metoda	32
Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu	35
Vizuelizacija DNK u poliakrilamidnom gelu srebronitratom	35
Kapilarna elektroforeza na DNA <i>labchip</i> -u	35
Sekvenciranje DNK	36
Statistička obrada podataka	37
3.3.2 Metode za funkcionalnu analizu polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin	38
Kultivacija bakterija	38
<i>In situ</i> PCR dirigovana mutagenеза	38
Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju	40
Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija	41
Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali	41
Detekcija plazmida koji nosi željenu mutaciju	42
Čuvanje transformanata	42
Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi	43
Kultivacija permanentnih ćelijskih linija	43
Transfekcija Cos-7 ćelije linije plazmidnom DNK	44
Gajenje stabilnih transfektanata Cos-7 ćelijske linije	45
Izolacija celokupne RNK iz ćelija u kulturi	45
Prečišćavanje RNK	46
Sinteza cDNK	46
Kvatifikacija iRNK metodom Real-Time PCRa	47
Elektroforeza proteina u denaturišućem gelu	49
Analiza proteina Western blot metodom	49
<b>4. REZULTATI</b>	52
<b>4.1 Strukturna analiza 3' kraja gena za protrombin kod pacijenta sa trombofilijom</b>	53
4.1.1 Skrining 3' kraja gena za protrombin	53
4.1.2 Odredjivanje učestalosti polimorfizama A19911G, T20063C, C20068T, G20210A, C20221T i T20298C u gena za protrombin	56
4.1.3 Somatski mozaicizam za FII G20210A polimorfizam	59

<b>4.2 Funkcionalna analiza polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin</b>	62
4.2.1 Konstrukti korišćeni za transfekciju Cos-7 ćelijske linije	62
4.2.2 Stabilna transfekcija permanentne ćelijske linije Cos-7	63
4.2.3 Praćenje ekspresije gena za protrombin relativnom kvantifikacijom iRNK metodom Real-Time PCR	65
4.2.4 Kvantifikacija količine protrombina u plazmi pacijenata	70
<b>5. DISKUSIJA</b>	72
<b>5.1 Strukturna analiza 3' kraja gena za protrombin</b>	73
5.1.1 Analiza učestalosti polimorfizama 3' kraja gena za protrombin	74
5.1.2 3' kraj protrombinskog gena i somatski mozaicizam	77
<b>5.2 Funkcionalna analiza polimorfizama 3' kraja gena za protrombin i značaj analiziranih polimorfizama kao markera trombofilije</b>	79
<b>5.3. Analiza uticaja različitih regiona 3' kraja na ekspresiju gena za protrombin</b>	84
5.3.1 Uticaj DSE elementa na ekspresiju protrombinskog gena	84
5.3.2 Interakcija između DSE elementa i G20210A polimorfizma	85
5.3.3 Kraj poslednjeg egzona protrombinskog gena kao potencijalno značajni regulatorni region	87
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	90
<b>7. LITERATURA</b>	93

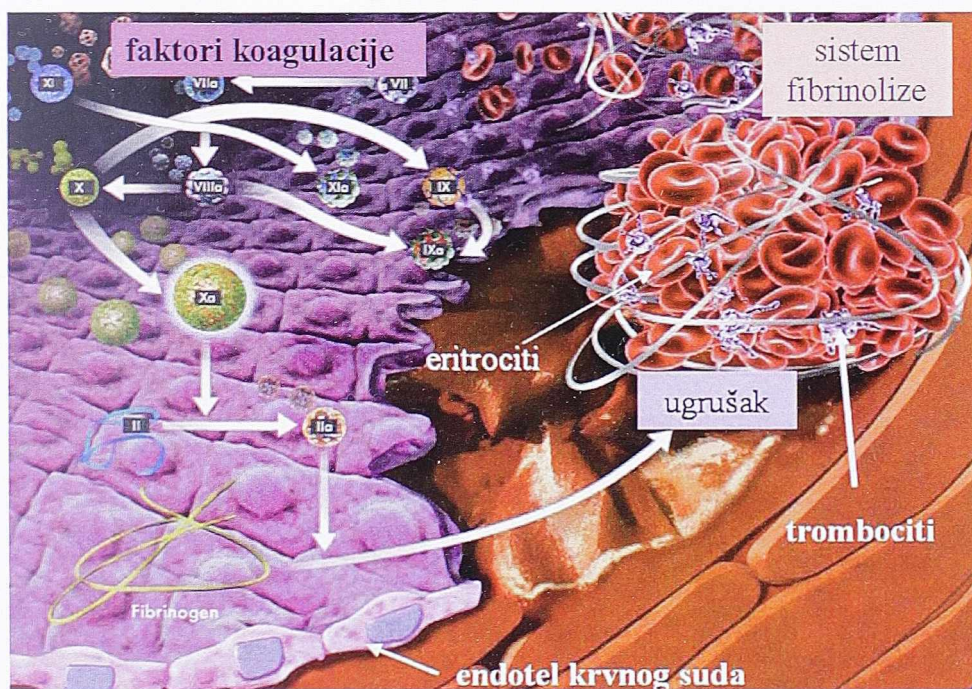
# 1. Uvod



## 1.1 TROMBOFILIJE

### 1.1.1 Hemostaza

Hemostaza predstavlja jedan od mehanizama održavanja homeostaze čitavog organizma. Njena uloga je da obezbedi tačno stanje krvi i njen nesmetani protok kroz cirkulaciju, a u slučaju oštećenja krvnog suda, da omogući stvaranje krvnog ugruška i zaustavljanje krvarenja. Radi se o veoma kompleksnoj i osetljivoj ravnoteži u čijem održavanju učestvuje više faktora: ćelije krvnih sudova, trombociti, faktori koagulacije, inhibitori koagulacije i sistem fibrinolize [1] (slika 1).

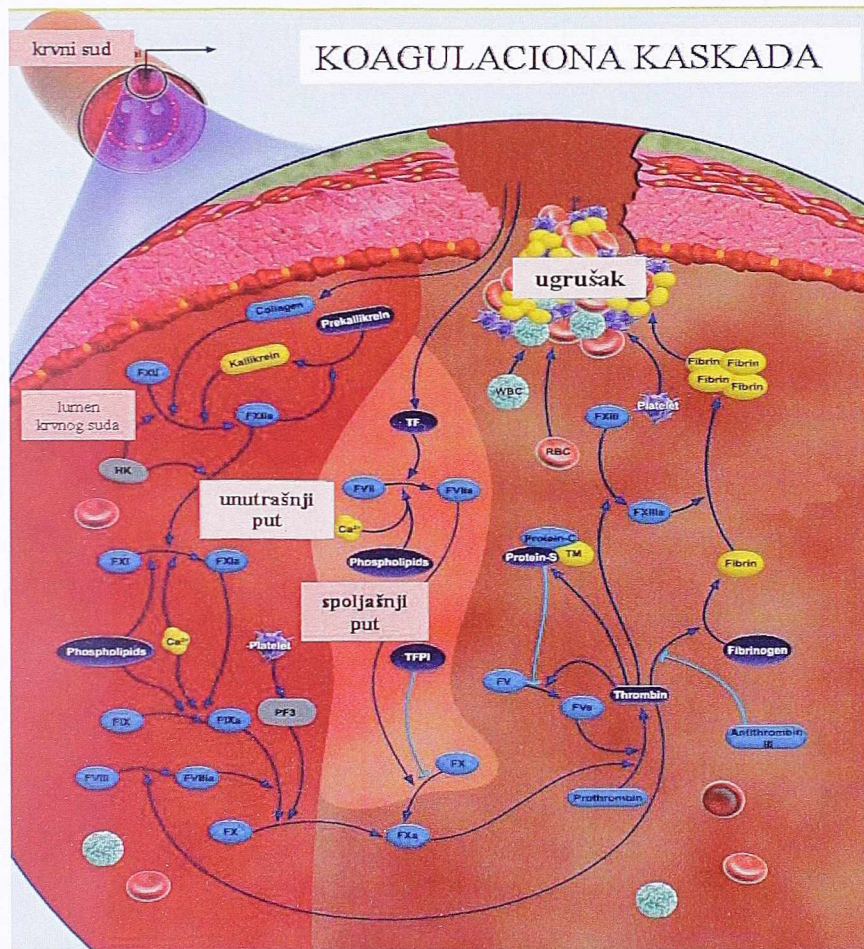


*Slika 1* Učesnici hemostaze:  
ćelije krvnih sudova, trombociti, faktori koagulacije i sistem fibrinolize  
[www.bayer.tevnouvelles.ca]

Endotel krvnih sudova odvaja lumen krvnog suda od subendotelske zone i prirodna je barijera isticanju krvi. Pri povredi krvnog suda dolazi do vazokonstrikcije, a ćelije endotela sintetišu učesnike hemostaze. Važnu ulogu ima i membrana endotelskih ćelija, koja je negativno naelektrisana, što omogućava da se u normalnim fiziološkim uslovima za nju ne vezuju trombociti i fibrin [2,3].

Trombociti se u cirkulaciji nalaze u neaktivnom obliku: pojedinačni i neadherirani. Tek nakon povrede krvnog suda dolazi do njihove transformacije koja se

odvija u četiri faze: adhezija, aktivacija, sekrecija i agregacija. Ove četiri faze dovode do slepljivanja trombocita i formiranja trombocitnog ugruška [1,3] (slika 1).



Slika 2 Koagulaciona kaskada i proces formiranja krvnog ugruška  
[[www1.qiagen.com](http://www1.qiagen.com)]

Sistem za koagulaciju ima centralnu ulogu u stvaranju fibrina koji omogućava formiranje krvnog ugruška. Ovaj proces se uobičajeno predstavlja kao niz enzimskih reakcija u kojima se aktiviraju neaktivni faktori koagulacije, po kaskadnom principu, a kao krajnji proizvod nastaje fibrin koji dalje dovodi do stvaranja ugruška. Međutim, proces koagulacije je mnogo kompleksniji i regulisan je mehanizmima pozitivne i negativne povratne sprege (slika 2).

Faktori koagulacije se u cirkulaciji nalaze u neaktivnom obliku (profaktori). Tek nakon aktivacije oni se vezuju za fosfolipide membrana trombocita i endotela, gde zajedno sa jonima kalcijuma stvaraju aktivne komplekse. Postoje dva načina aktivacije

sistema za koagulaciju: unutrašnji i spoljašnji put [4,5] (slika 2). Trombin predstavlja centralni regulatorni molekul procesa koagulacije, koji pored prevođenja fibrinogena u fibrin, mehanizmima pozitivne i negativne povratne sprege utiče na čitav proces koagulacije [6,7]. Za održavanje normalne hemostaze veoma je važna i precizna regulacija inhibicije koagulacije. Postoji veliki broj inhibitora, a najznačajniji su: antitrombin, protein C, protein S, trombomodulin (u interakciji sa trombinom), inhibitor tkivnog puta (TFPI) i drugi [1] (slika 2).

Sistem fibrinolize ima ulogu da uklanja fibrin iz cirkulacije. Centralni enzim ovog sistema je plazmin koji nastaje aktivacijom plazminogena. Aktivnost plazmina regulisana je i inhibitorima fibrinolize. Najznačajniji među njima su: inhibitori aktivatora plazminogena (PAI-1 i PAI-2) i  $\alpha_2$ -antiplazmin [8].

Poremećaji hemostaze nastaju u slučaju nedostatka ili izmenjene funkcije jednog ili više učesnika ovog procesa. Usled poremećaja dolazi do odstupanja od hemostazne ravnoteže u smeru hipo- ili hiperkoagulacije, što za posledicu ima krvarenje (hemoragija) ili začepljene krvnog suda ugruškom (tromboza).

### **1.1.2 Tromboze i trombofilija**

Tromboze predstavljaju patološko stanje kod koga dolazi do stvaranja krvnog ugruška (tromba), koji dovodi do začepljenja krvnog suda. Stvaranje tromba nastaje kao posledica poremećene ravnoteže između ćelija krvnog suda, trombocita, kogulacionog i fibrinolitičkog sistema. Tromboze se dele na arterijske i venske, a zbog razlike između venskog i arterijskog krvotoka, razlikuju se i tipovi tromba nastali u njima. U arterijama je protok krvi mnogo brži, pa je arterijski, takozvani "beli tromb", bogatiji trombocitima, a siromašniji fibrinom, dok se u venama, gde je cirkulacija mnogo sporija, formira "crveni tromb", bogatiji fibrinom i eritrocitima [9]. Najčešće posledice arterijskih tromboza su infarkt miokarda i moždani udar, dok su tromboze dubokih vena i plućni embolizam najčešće manifestacije venskih tromboza. Tromboze dubokih vena imaju učestalost od 1 na 1000 stanovnika godišnje i najčešći su uzrok smrti trudnica, porodilja i hospitalizovanih bolesnika [1,10].

Tromboze su multifaktorijalno oboljenje i nastaju u interakciji većeg broja faktora koji mogu biti nasledni ili stečeni. Kod arterijskih tromboza najznačajniji stečeni faktori

rizika su: hipertenzija, pušenje, diabetes, gojaznost, hiperholesterolemija. U slučaju venskih tromboza to su: hirurške intervencije, traume, imobilizacija, malignitet, imunizacija, trudnoća i puerperijum [10,11].

Trombofilija u najširem smislu obuhvata sva nasledna i stečena klinička stanja koja dovode do povećane sklonosti ka nastanku tromboze. U kliničkoj praksi ovaj termin se najčešće upotrebljava da označi sklonost pacijenta ka hiperkoagulaciji i ponavljanju tromboza [12].

### **1.1.3 Nasledni faktori rizika za nastanak trombofilije**

Na moguću ulogu naslednih faktora u patogenezi trombofilije ukazale su tzv. familijarne tromboze, odnosno sklonost ka trombozama kod većeg broja članova porodice. Prvi nasledni poremećaj, koji je doveden u vezu sa trombofilijom bio je nedostatak antitrombina III i opisan je od strane Edeberga 1965. godine [13]. Nedostaci druga dva inhibitora procesa koagulacije, proteina C i proteina S, koji takođe imaju naslednu osnovu, opisani su osamdesetih godina prošlog veka [14,15].

Prekretnica u istraživanju naslednih trombofilija predstavlja otkriće G1691A-Leiden mutacije u genu za faktor V (FV). FV G1691A mutacija dovodi do zamene aminokiseline arginin glutaminom na poziciji 506. Posledica ove zamene je mnogo sporija inaktivacija faktora V i njegovo produženo prokoagulantno dejstvo, čime se hemostazna ravnoteža pomera ka hiperkoagulantnom stanju [16,17]. Mutacija je prisutna u 15-50% pacijenata sa venskim trombozama i u oko 5% osoba u opštoj populaciji belaca, dok je u drugim rasama veoma retka. Heterozigotni nosioci ove mutacije imaju 3-7 puta povećani rizik za nastanak tromboza, dok je kod homozigota ovaj rizik 80-90 puta veći u odnosu na opštu populaciju [18,19]. Pored FV Leiden mutacije, značajan genetički faktor rizika za nastanak trombofilije predstavlja i polimorfizam u 3' nekodirajućem delu gena za protrombin, odnosno faktor II (FII)- FII G20210A. Ova genska varijanta je povezana sa povećanim nivoom protrombina u krvi, što dovodi do poremećaja hemostazne ravnoteže i pojave hiperkaagulacije. Kod nosilaca ovog polimorfizma rizik za pojavu tromboza je povećan 2-3 puta [20,21]. Nedostatak antitrombina, proteina S i C su veoma retki poremećaji, dok su FV Leiden i FII G20210A varijante, zbirno, pronađene kod više od dve trećine pacijenata sa trombofilijom [10].

Metilen tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim iz opšteg metaboličkog puta (prevođenje homocisteina u metionin) i ne pripada koagulacionoj kaskadi. Međutim, C677T mutacija u ovom genu dovodi do sinteze termolabilne forme enzima koja ima 64% manju aktivnost u odnosu na *wild type* (wt) protein, što dovodi do hiperhomocisteinemije. Hiperhomocisteinemija dovodi do oštećenja endotela krvnih sudova i samim tim aktivacije hemostaze i hiperkoaguabilnosti [22].

U poslednjih desetak godina opisan je veliki broj genetičkih faktora rizika koji su povezani sa trombofilijom. Iz grupe onih koji utiču na nivoe kaogulacionih faktora najznačajniji su: faktor XIII (FXIII) Val34Leu, fibrinogen  $\gamma$  C10034T, fibrinogen  $\beta$  - 455G/A. Homozigotni nosioci promene u FXIII genu imaju za ~30% smanjeni rizik od pojave tromboza, dok su genske varijante fibrinogena povezane sa 1,2 -2 puta povećanim rizikom za trombozu [23,24]. Među polimorfizmima koji dovode do poremećaja fibrinolize izdvaja se 4G/5G polimorfizam u promotoru PAI-1 gena, koji dovodi do povećane ekspresije PAI-1 proteina i samim tim povećane inhibicije fibrinolize [25].

Nedavno je objavljena studija koja je analizirala 20000 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) u okviru više od 11000 gena kod 3000 pacijenta sa trombozama i 5000 zdravih osoba. U ovoj studiji je identifikovano više polimorfizama u regionima: CYP4V2, SERPINC1, Faktor IX i Glikoprotein 6 gena, za koje je pokazano da su učestaliji kod pacijenata sa trombozama [26].

Obzirom da su tromboze multifaktorijalno oboljenje, od posebnog je značaja ispitivanje uticaja kombinacije dva i više genskih polimorfizama. Pacijenti koji su heterozigoti za FV Leiden i FII G20210A, imaju 2,6 puta povećani rizik za pojavu venskih tromboza, nego nosioci samo FV Leiden mutacije [27].

Iako je opisan veliki broj polimorfizama, njihova primena kao markera trombofilije je ograničena. Za većinu novoopisanih polimorfizama nije nedvosmisleno utvrđena udruženost sa pojavom bolesti, pa se danas u dijagnostici trombofilije najčešće koriste: utvrđivanje deficita prirodnih antikoagulanasa (antitrombina III, proteina C i S), FV Leiden i MTHFR C677T mutacija i G20210A polimorfizam u genu za protrombin [28,29].

## 1.2. PROTROMBIN (FAKTOR II)

### 1.2.1 Gen za protrombin

Gen koji kodira protrombin (*Entrez Gene* 2147), dužine 20,3 kb, nalazi se na hromozomu 11, na poziciji p11-q12 i sekvenciran je od strane Degena i saradnika 1987. godine. Sastoji se od 14 egzona dužine od 25 do 315 bp, razdvojenih sa 13 introna, čije se dužine kreću od 84 do 9447 bp. Sa njega se sintetiše iRNK dužine 2046bp [30,31]. Gen za protrombin se predominantno eksprimira u jetri. U daleko manjoj meri se eksprimira u mozgu, dijafragmi, bubrezima kao i u placentnom i adrenalnom tkivu [32,33].

Promotor gena za protrombin pripada grupi promotora koji ne sadrže konsenzusni TATA-blok [31]. U okviru promotorskog regiona identifikovana su dva regulatorna elementa. Prvi je lociran u 400 baznih parova uzvodno od starta transkripcije i za njega pokazano da je odgovoran za bazalnu aktivnost promotora [34]. Za drugi, uzvodnije postavljeni element (-922 do -845) je pokazano da ima ulogu pojačivača (*enhancer*) i da može značajno da utiče na nivo ekspresije u hepatocitima [35,36]. Potvrđeno je da se za ovaj region vezuju jedarni faktori hepatocita HNF (*hepatocyte nuclear factors*): HNF1 $\alpha$ , HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , kao i opšti transkripcioni faktori Sp (*specificity protein*) 1 i 2 [35,37].

3' kraj gena za protrombin ima nekanonsku organizaciju i detaljno je opisan u poglavlju 1.3.3.

Trombin, aktivna forma protrombina, ima veoma važnu ulogu u održavanju hemostaze i mutacije u ovom genu mogu dovesti do značajnih poremećaja hemostazne ravnoteže. Poremećaji mogu biti u smeru hipo- ili hiperkoagulacije.

Mutacije koje za posledicu imaju smanjenje količine i/ili aktivnosti protrombina dovode do **hipokoagulacije** i pojave krvarenja. Među prvim hemoragijskim sindromima koji su povezani sa protrombinom, opisan je "urođeni disfunkcionalni protrombin Quick", za koga je kasnije utvrđeno da je kombinovani heterozigot za Arg382Cys i Gly558Val zamene [38,39,40]. U kodirajućem regionu gena je opisan veći broj mutacija koje dovode do hipoprotrombinemije i kao posledica toga, povećane sklonosti ka krvarenju. Neke od najčešćih varijanti, pored Quick I (Arg382Cys) i II (Gly558Val), su: protrombin Barcelona (Arg271Cys), Denver-I (Glu300Lys) i Denver-II (Glu309Lys), Himi-I (Met337Thr) i Himi-II (Arg338His) [41,42,43].

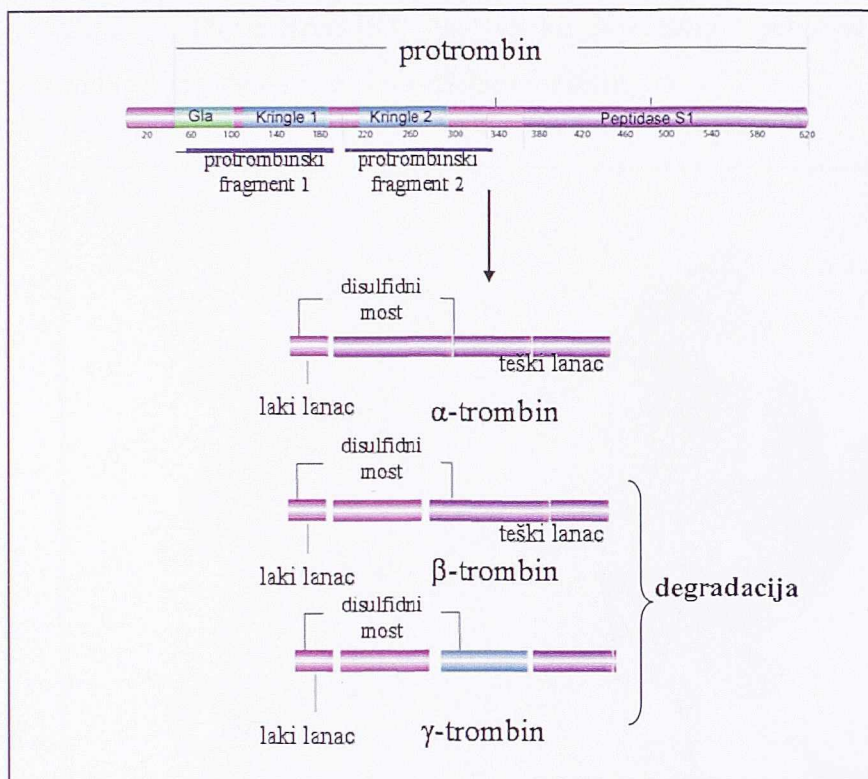


Kada je u pitanju **hiperkoaguabilnost**, u kodirajućem regionu gena do sada nisu identifikovane mutacije koje dovode do povećane aktivnosti proteina ili njegove povećane ekspresije. Sa povećanom ekspresijom protrombinskog gena povezani su polimorfizmi u 3' kraju gena. Oni su detaljno opisani u poglavlju 1.3.4.

### 1.2.2 Struktura i funkcija protrombina

Protrombin je prekursor trombina (*EC* 3.4.21.5), jednog od ključnih faktora u održavanju hemostazne ravnoteže. To je sekretorni protein od 622 amino kiseline (~72 kDa) koji se nakon sinteze u jetri izlučuje u krvotok. Pripada grupi vitamin K zavisnih enzima. U jetri dolazi do njegove postranslacione modifikacije u regionu GLA (*gamma-carboxyglutamic*) domena, gde se 10 glutaminskih kiselina gama-karboksiluje u prisustvu vitamina K [44] (slika 3). Zahvaljujući ovoj modifikaciji protrombin može da se veže za negativno naelektrisane fosfolipide membrane, što je neophodno da bi započeo proces prevođenja protrombina u trombin. Jedan od najčešće primenjivanih antikoagulantnih lekova-varfarin, deluje tako što inhibira vitamin K zavisnu karboksilaciju, što onda dovodi do sprečavanja faktora koagulacije, među kojima je i protrombin, da se vežu za membranu i aktiviraju [45].

Protrombin se prevodi u trombin najpre isecanjem protrombinskih fragmenata 1 i 2 (F1 i F2) od strane protrombinaznog kompleksa koga čine aktivirani faktora X (FXa) i aktivirani faktor V (FVa) uz prisustvo dvovalentnih kalcijumovih jona koji pospešuju vezivanje protrombina za fosfolipide membrane [46]. U okviru F1 i F2 fragmenata nalaze se dva Kringle domena (slika 3). Kringle domeni su relativno česti kod proteina koagulacione kaskade i pretpostavlja se da imaju ulogu u vezivanju za druge učesnike kaskade ili za membranu endotela [47]. Za Kringle domen u F1 se smatra da učestvuje u interakciji sa FVa u okviru protrombinaznog kompleksa, dok je za Kringle domen u F2 pokazano da inhibira interakciju trombina i antitrombina III, kao i da utiče na aktivaciju proteina C [48,49,50].



Slika 3 Sekundarna struktura protrombina i šematski prikaz prevođenja u trombin i degradacije trombina  
[www.sigmaaldrich.com]

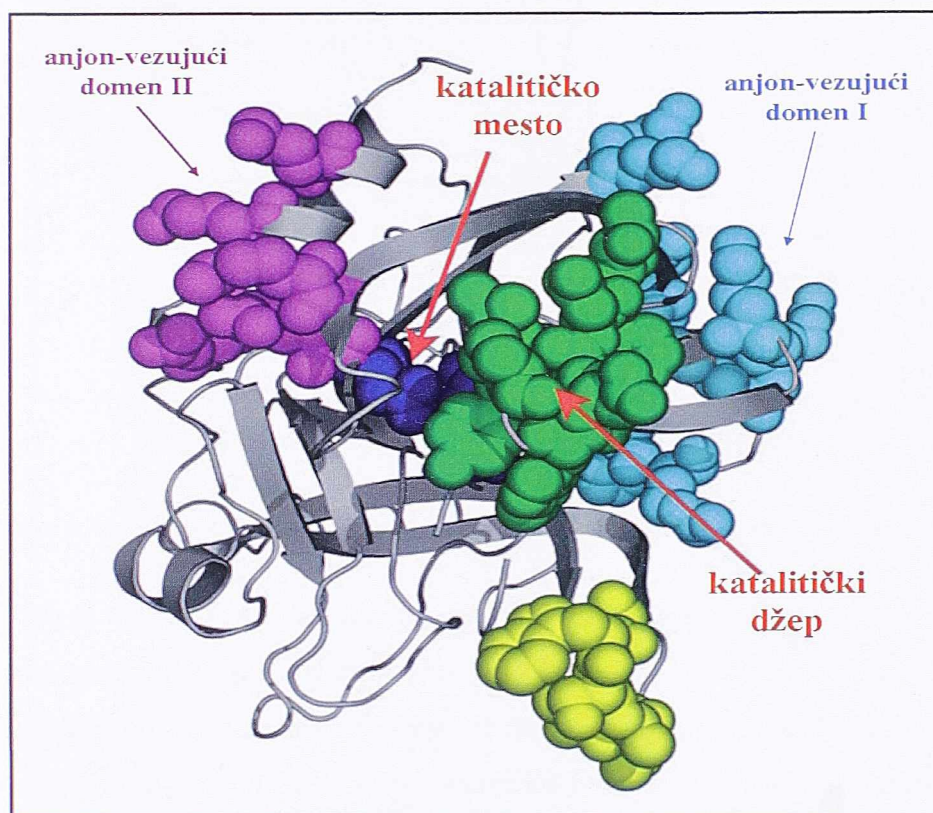
S obzirom da nastaju u procesu aktivacije protrombina, odnosno njegovog prevođenja u trombin, fragmenti F1 i F2 se koriste u dijagnostičke svrhe kao markeri aktivirane hemostaze [51]. Nakon isecanja F1 i F2 fragmenata dobija se pretrombin 2, koga FXa seče na dva lanca laki (49 amino kiselina) i teški (259 amino kiselina) i time omogućava formiranje aktivnog katalitičkog mesta. Nakon toga, trombin sam iskraja svoj laki lanac za 13 amino kiselina i na taj način formira aktivni trombin (često se susreće i naziv  $\alpha$ -trombin) [52]. Šema sekundarne strukture protrombina i proces iskrajanja trombina prikazani su na slici 3.

Degradacija trombina se delom vrši autokatalitički, pri čemu nastaju forme  $\beta$  i  $\gamma$ -trombina. Za ove forme je pokazano da zadržavaju deo kataličke aktivnosti i mogu da učestvuju u aktivaciji FXIII ili samog protrombina [53,54] (slika 3).

Trombin pripada familiji S1 proteaza i njegov S1 proteazni domen je smešten u okviru teškog lanca. Kataličko mesto je Ser525 i isecanja vrši nakon aminokiseline Arg-. Kao i svi predstavnici S1 familije, trombin formira disulfidne mostove koji u njegovom



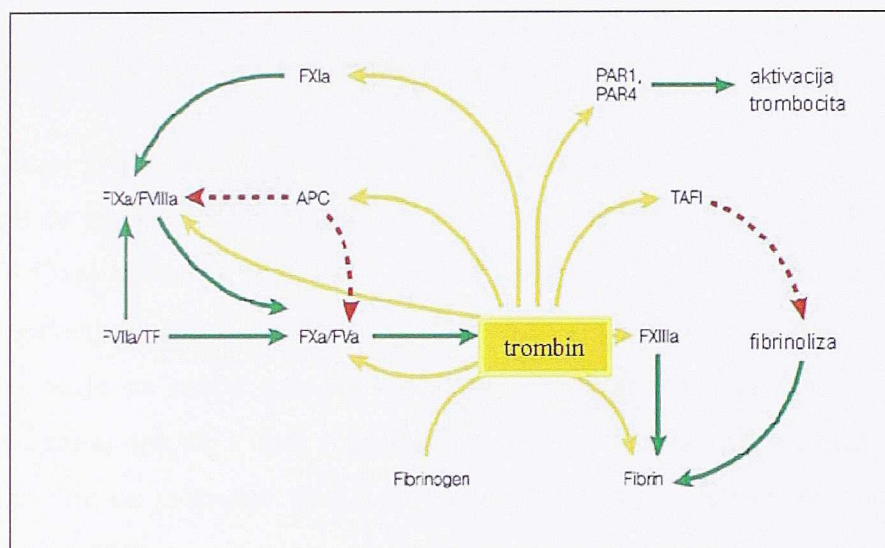
slučaju povezuju laki i teški lanac [53]. Na slici 4 je prikazana trodimenzionalna struktura humanog trombina, sa obeleženim katalitičkim mestom.



**Slika 4** 3D struktura humanog trombina sa prikazanim katalitičkim mestom. Anjon-vezujući domeni učestvuju u vezivanju trombina za membranu krvnog suda i u interakciji sa drugim faktorima koagulacije.

[Crawley JT, et al. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 5:95-101]

Trombin je jedan od centralnih molekula u koagulacionoj kaskadi (slika 5). Njegova uloga je, pre svega, u aktivaciji fibrinogena i njegovom prevođenju u fibrin. On vrši specifično isecanje Arg-Gly veza u okviru fibrinogena, pri čemu nastaje aktivni fibrin i dva fibrinopeptida A i B [55]. Takođe, on učestvuje u aktivaciji faktora V, VII, VIII, XIII kao i trombinom aktiviranog faktora fibrinolize (TAFI) [56,57]. U interakciji sa glikoproteinom  $Ib\alpha$  koji se nalazi na površini trombocita, trombin vrši njihovu aktivaciju [58]. Međutim, kada je u kompleksu sa trombomodulinom, aktivira protein C, čime negativnom povratnom spregom utiče na zaustavljanje koagulacione kaskade [59]. Svojim pro- i antikoagulantnim delovanjem protrombin ima veoma važnu regulatornu ulogu u održavanju hemostazne ravnoteže (slika 5).



Slika 5 Centra uloga trombina u procesu koagulacije

← aktivacija    ← - - - inhibicija

[Gustafsson D, et al. A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. Nature Rev Drug Discov 2004;3:649-59]

Pored uloge u procesu koagulacije, trombin učestvuje i u procesima imunog odgovora, angiogeneze, zarastanja rana kao i u diferencijaciji neurona [60,61,62]. U interakciji sa PAR (*protease-activated receptor*) receptorima, pre svega PAR-1, utiče na proliferaciju i aktivaciju endotelnih ćelija, neutrofila i monocita. Takođe, učestvuje i u procesima akutne i hronične inflamacije [60,63]. Nedavno je pokazano da je preko NFκB puta uključen i u regulaciju ekspresije matriksmetaloproteinaze 9 (MMP9) u monocitima [64].

## 1.3 3' KRAJ GENA I NJEGOVA ULOGA U REGULACIJI GENSKE EKSPRESIJE KOD EUKARIOTA

Regulacija genske ekspresije kod eukariota predstavlja veoma složen proces koji ima za zadatak da pravovremeno obezbedi svakoj ćeliji potrebnu količinu odgovarajućih proteina [65]. Ovaj proces je regulisan na više različitih nivoa i mehanizmi koji su uključeni u regulaciju ekspresije gena još uvek nisu do kraja rasvetljeni [66]. Istraživanja regulacije ekspresije na nivou primarne strukture DNK su se uglavnom odnosila na analizu 5' kraja gena, dok se 3' kraj relativno od nedavno intenzivnije proučava. Novija istraživanja ukazuju da je njegov značaj u regulaciji ekspresije daleko veći nego što se pretpostavljalo [65,67].

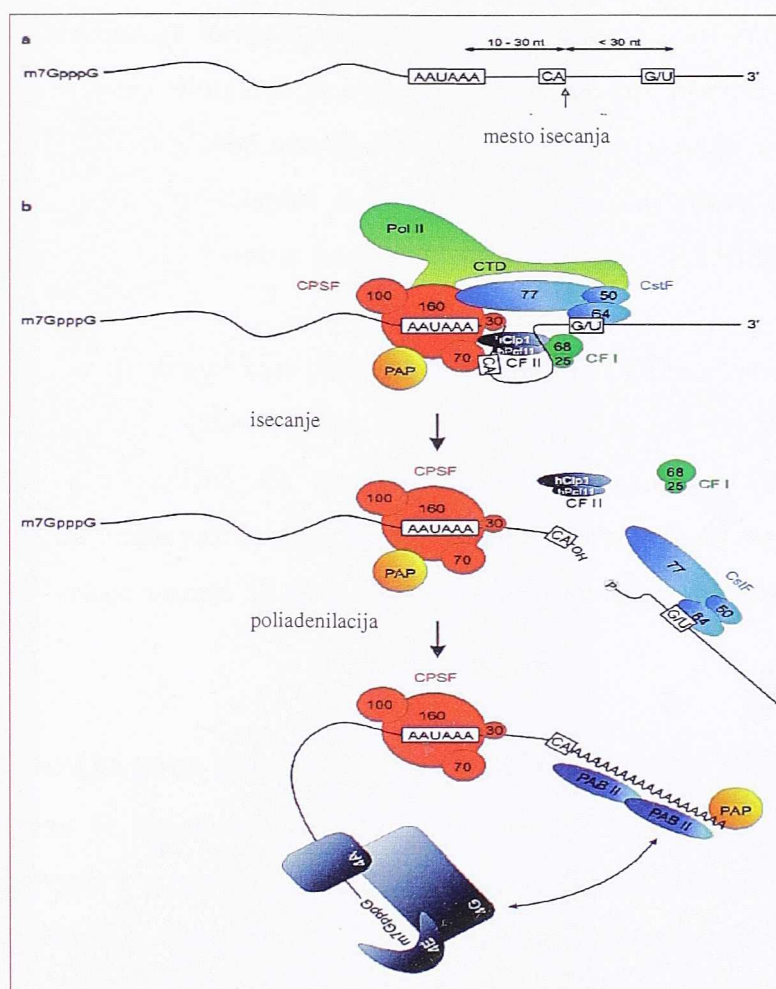
### 1.3.1 Struktura 3' kraja gena

3' kraj gena se sastoji iz dva regiona: dela sekvence koja se nakon Stop kodona prepisuje u procesu transkripcije i nakon obrade ostaje u sastavu zrele iRNK i sekvence koja se samo delom prepisuje, ali biva iskrojena u procesu obrade iRNK. Prvi deo je označen kao 3' nekodirajući region, odnosno 3' UTR (*untranslated region*), dok se drugi deo najčešće naziva 3' FR (*flanking region*).

U okviru najvećeg broja 3' nekodirajućih regiona nalaze se dva regulatorna elementa: visokokonzervisani signal za poliadenilaciju i uzvodno u odnosu na njega, manje konzervisani region, koji se najčešće označava sa USE (*upstream sequence element*) [68,69]. 3' UTR se završava nukleotidom iza koga se vrši iskrajanje pre-iRNK. Studije su pokazale da nukleotidi nisu ravnomerno raspoređeni na ovoj poziciji, odnosno da se A najčešće nalazi na mestu iskrajanja, T i C ređe, dok se G na toj poziciji nalazi daleko ređe od ostalih nukleotida [70]. Nukleotid koji prethodi mestu iskrajanja je u najvećem broju slučajeva C, tako da se iskrajanje najčešće vrši iza CA dinukleotida [71].

U okviru FR regiona 3' kraja nalazi se regulatorni element označen kao DSE (*downstream sequence element*). DSE region je bogat timinom u nekodirajućem lancu i na pre-iRNK generiše mesto vezivanja proteinskog kompleksa koji stimuliše iskrajanje [67,69]. Deo 3' FRA nizvodno od DSE elementa je daleko manje proučen, mada se pretpostavlja postojanje potencijalno značajnih regulatornih elementa i u ovom regionu [72].

Više od polovine sisarskih gena ima veći broj poliadenilacionih signala i podleže alternativnoj obradi ovog regiona [73]. Pokazano je da su poliadenilacioni signali koji su udaljeniji u odnosu na Stop signal, bogatiji AT nukleotidima i sadrže više potencijalnih regulatornih elemenata [73,74].



Slika 6 Proces 3' obrade i poliadenilacije iRNK,

a) Šematski prikaz 3' kraja pre-iRNK, b) Iskrajanje 3' kraja i poliadaenilacija iRNK, **CFST**-*cleavage and polyadenylation specificity factor*, **CstF**-*cleavage stimulation factor*, **CF**-*cleavage factor*, **PAB**-*poly(A) binding proteins*, **PAP**-*poli(A) polimeraza*.

[Danckwardt S, et al. 3' end processing of the prothrombin mRNA in thrombophilia. *Acta Haematol.* 2006;115:192-7]

Obrada 3' kraja pre-iRNK je jedan od esencijalnih procesa u sazrevanju iRNK. Pokazano je da u humanim ćelijama više od 90 proteina učestvuje u ovom složenom procesu [75]. U toku obrade, najpre se vrši iskrajanje 3' kraja pre-iRNK, a zatim i

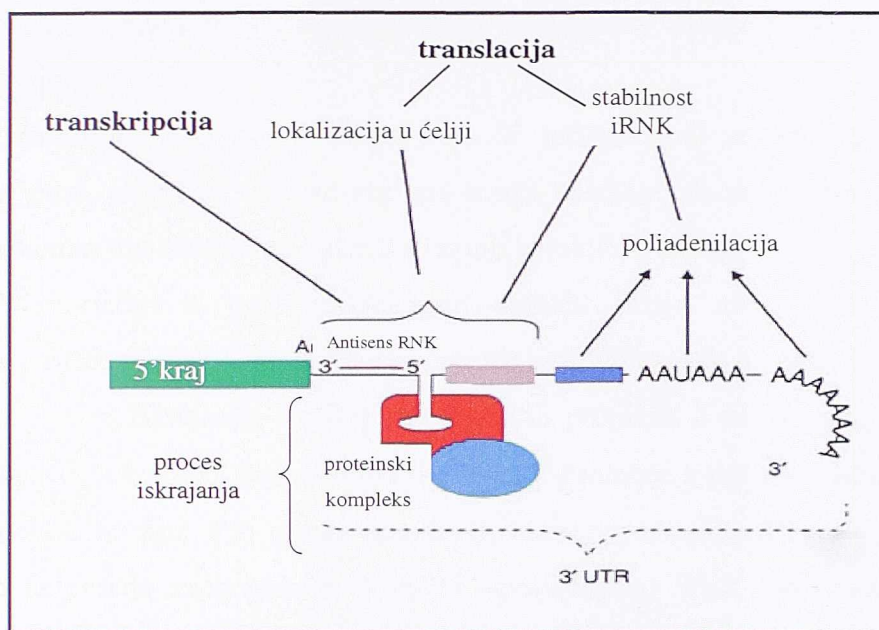
dodavanja niza adenina, takozvanog poli(A) repa. Sve iRNK, izuzev nekih histonskih, podležu dodavanju poli(A) niza koji je neophodan za njihovu dalju funkciju.

CPSF proteinski kompleks (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) se specifično vezuje za centralni strukturni element 3' UTRa, visokokonzervisani signal za poliadenilaciju, koji se nalazi 10-30bp od Stop signala (crveno obeležen na slici 6) [76]. Vezivanje CPSF predstavlja inicijalni korak koji dalje omogućava determinaciju mesta iskrajanja. Za većinu gena iskrajanje se vrši 10-30bp nizvodno, preferencijalno iza CA dinukleotida [71,76]. Na oko 30bp nizvodno od mesta iskrajanja nalazi se DSE, za koga se vezuje CstF (*cleavage stimulation factor*) (obeležen svetlo plavo na slici 6). Za optimalno vezivanje ovog kompleksa veoma je važan broj U nukleotida u okviru DSE elementa.

CstF pospešuje iskrajanje koje obavljaju proteini CFI i CFII (*cleavage factor I, II*) (obeleženi zeleno na slici 6). Odmah nakon isecanja, poli(A) polimeraza (PAP) počinje sa dodavanjem ~200 adenina [76]. Za rastuću poli(A) rep vezuju se PAB II (*poly(A) binding*) proteini, koji imaju važnu ulogu u određivanju dužine poli(A) repa, kao i kasnije u translaciji, pošto ostaju vezani za zrelu iRNK i nakon njenog transporta u citoplazmu [65,76].

### 1.3.2 Uloga 3' kraja gena u regulaciji genske ekspresije

3' kraj gena je uključen u regulaciju ekspresije na više različitih nivoa: 1) transkripcija, 2) obrada 3' kraja transkripta, 3) translacija, 4) stabilnost, transport iz jedra i lokalizacija zrele iRNK u citoplazmi [77] (slika 7). Novija istraživanja pokazuju da su proces transkripcije i obrade 3' kraja primarnog transkripta potpuno integrisani i da mogu značajno uticati jedan na drugog, kao i na regulaciju ekspresije [78]. Takođe, pokazano je da poslednji intron može značajno da utiče na ekspresiju, tako što interaguje sa poliadenilacionim signalom i pospešuje iskrajanje [79,80,81].



**Slika 7** Različiti nivoi regulacije ekspresije gena u koje je uključen 3' kraj gena  
 [Mignone F, et al. Untranslated regions of mRNAs. Genome Biol 2002;3(3):S0004]

Sam proces poliadenilacije ima veoma važnu ulogu u regulaciji ekspresije. Pre svega, očuvana arhitektura poliadenilacionog signala je esencijalna za završetak procesa obrade 3' kraja [82,83]. Postojanje više poliadenilacionih signala u jednom genu omogućava alternativnu obradu 3' kraja i pojavu više izoformi iRKN. Za ovaj proces je pokazano da može imati ulogu u regulaciji ekspresije istog gena u različitim tkivima [73,74]. Takođe, alternativna poliadenilacija može igrati veliku ulogu u procesu embriogeneze i diferencijacije ćelija [76].

Posebno važnu ulogu u stabilnosti iRKN i procesu translacije ima poli(A) rep. Poli(A) rep je neophodan za uspešni eksport iRKN iz nukleusa u citoplazmu gde se odvija proces translacije [84]. Dužina poli(A) repa i njegova „zaštićenost“ PAB proteinima utiču na poluživot iRKN [83]. Kratkoživeće iRKN imaju kraće poli(A) repove i odlikuju se AU bogatim motivima u 3' nekodirajućim regionima. Pretpostavlja se, da kod ovih iRKN, PAB proteini migriraju i vezuju se za AU bogate regione na 3' kraju ostavljajući poli(A) rep nezaštićen i podložan degradaciji [85,86].

Veoma značajna za regulaciju ekspresije je i interakcija 3' kraja sa microRKN (miRKN). miRKN su 20-30bp dugi, jednolančani molekuli RKN koji su komplementarni delovima iRKN za koje se vezuju i onemogućavaju proces translacije. Analizom 207 različitih humanih miRKN, za čak 43,5% je pokazano da su komplementarne

konzervisanim osmomerima identifikovanim uporednom studijom 3' kraja gena kod različitih sisara [72,87].

S obzirom na značajnu ulogu koju 3' nekodirajući region ima u regulaciji ekspresije gena, promene u ovom regionu mogu značajno da utiču na nivo ekspresije proteina i samim tim dovedu do nastanka raznih patoloških stanja.

Polimorfizmi u poliadenilacionom signalu imaju za posledicu smanjenje ekspresije ili čak odsustvo proteina, jer dovode do poremećaja u vezivanju kompleksa CPSF koji inicira iskrajanje. Veliki broj različitih promena u okviru poliadenilacionog signala, opisan je kod  $\alpha$ - i  $\beta$ -talasemija [88,89,90]. Promene u poliadenilacionom signalu Foxp3 (*Forkhead box P3*) gena, takođe dovode do smanjenja njegove ekspresije. Smanjena ekspresija ovog gena se klinički ispoljava kao IPEX (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) sindrom [91].

3' kraj gena za  $\alpha$ -galaktozidazu je među retkim sisarskim genima koji nemaju 3' UTR i kod koga je poliadenilacioni signal smešten u kodirajućoj sekvenci. Delecija dva adenina u poliadenilacionom signalu ovog gena onemogućava 3' obradu, a posledica je potpuno odsustvo proteina. Kod pacijenata kod kojih je delecija prisutna na oba alela dolazi do razvoja Fabry bolesti [92].

Posebnu grupu promena u 3' kraju čine *gain of function* polimorfizmi koji dovode do povećane ekspresije gena. Oni su daleko ređi i mehanizme njihovog delovanja je teže objasniti. Poort i saradnicu su opisali polimorfizam G20210A u 3' kraju gena za protrombin koji se nalazi na mestu iskrajanja preRNK i dovodi do povišene ekspresije proteina [20]. Ovaj polimorfizam je detaljno opisan u poglavlju 1.3.4. U DSE regionu 3' kraja gena za fibrinogen identifikovan je polimorfizam C10034T za koga je takođe pokazano da dovodi do povećane ekspresije proteina [93].

### 1.3.3 Struktura 3' kraja gena za protrombin

3' nekodirajući region gena za protrombin ima specifičnu, nekanonsku organizaciju. U poređenju sa "klasičnom" arhitekturom, kod 3' kraja protrombina prisutni su aktivniji USE element sa jedne strane, a sa druge strane manje efikasano mesto iskrajanja i DSE regulatorni element siromašan timinima.

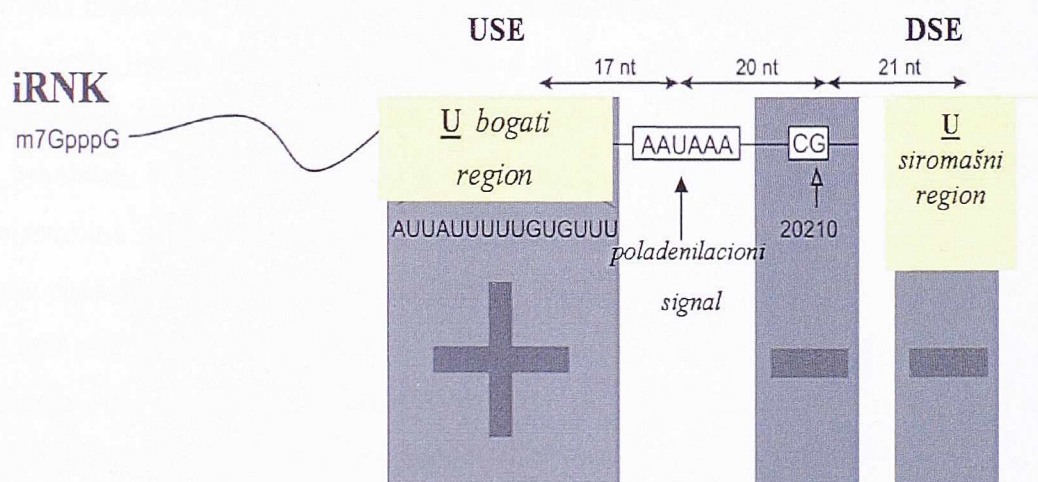
Za USE element protrombinskog gena je pokazano da igra veoma važnu ulogu u regulaciji ekspresije [94,95]. Ovaj element, dužine 15 nukleotida, smešten je 17bp uzvodno od poliadenilacionog signala i sadrži veliki procenat timina u nekodirajućem lancu (slika 8). Ovakvi USE elementi su prvo opisani kod virusnih 3' nekodirajućih regiona i pokazano je da imaju ulogu u pospešivanju obrade 3' kraja [96]. Nedavno je pokazano da i u humanom genomu, kod gena koji imaju nekanonsku organizaciju 3' kraja, postoje USE elementi sa istom ulogom. Opisani su u genima za lamin B2, kolagen, C2 komplement i ciklooksigenazu-2 [97,98,99,100]. Delecija USE element protrombinskog gen dovodi do odsustva obrade 3' kraja [94]. Njegova pozicija u odnosu na poliadenilacioni signal takođe značajno utiče na ekspresiju protrombina. Eksperimentalno postavljanje USE elementa bliže poliadenilacionom signalu dovodi do povećanja ekspresije, a ukoliko je USE element postavljen uzvodnije od 17bp dolazi do smanjenja ekspresije. Moriera i saradnici su na primeru gena za komplement C2, postavili hipotezu da je za regulatornu ulogu USE elemenata nekanonski organizovanih 3' krajeva gena, važan veliki procenat U nukleotida [99]. Međutim, za USE element protrombina je dokazano da smanjenje ili povećanje broja U nukleotida dovodi do smanjenja ekspresije. Za USE element u protrombinskoj iRNK se vezuju proteini koji učestvuju u iskrajanju: U2AF65 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein particle auxiliary factor 65 kDa subunit*), U2AF35 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein particle auxiliary factor 35 kDa subunit*) i hnRNP1/PTB (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein /polypyrimidine tract binding protein*) [95]. Za U2AF65 protein je, takođe, pokazano da interaguje sa poli(A) polimerazom i proteinom CF I [79,100]. Ovo ukazuje da su proces iskrajanja poslednjeg egzona i pospešavanja obrade 3' kraja kod protrombina kompleksno povezani sa USE regulatornim elementom [95].

Za razliku od većine eukariotskih iRNK kod kojih se isecanje vrši nakon CA dinukleotida, kod *wt* sekvence protrombina isecanje se vrši iza CG dinukleotida (slika 9).



U *in vitro* uslovima je dokazano da je isecanje iza ovog dinukleotida manje efikasno u odnosu na CA, a da se G nukleotid najređe nalazi na mestu iskrajanja [70,71]. Za protrombinski gen je pokazano da ukoliko se *wt* nukleotid (G) na mestu iskrajanja, zameni sa bilo kojim nukleotidom (A, C ili T) dolazi do povećane ekspresije gena u sva tri slučaja [94].

Suprotno od USE, DSE regulatorni element u FR 3' kraja gena za protrombin je daleko siromašniji T nukleotidima u odnosu na druge sisarske gene, čime je smanjena i njegova sposobost za vezivanje CstF proteinskog kompleksa na iRNK, pa samim tim i njegova efikasnost u procesu iskrajanja [94] (slika 8).



**Slika 8** Prikaz organizacije 3' kraja iRNK za protrombin, **nt**-nukleotid, **USE**-upstream sequence element, **DSE**-downstream sequence element, **U**-uridin

[Danckwardt S, et al. 3' end processing of the prothrombin mRNA in thrombophilia. *Acta Haematol* 2006;115:192-7]

Na osnovu ovoga postavljen je model po kome su iskrajanje i poliadenilacija kod 3' kraja gena za protrombin regulisani balansom pozitivnih i negativnih regulatora koji čine nekanonsku organizaciju ovog regiona [101] (slika 8).

### 1.3.4 Polimorfizmi u 3' kraju gena za protrombin i njihov uticaj na ekspresiju protrombina

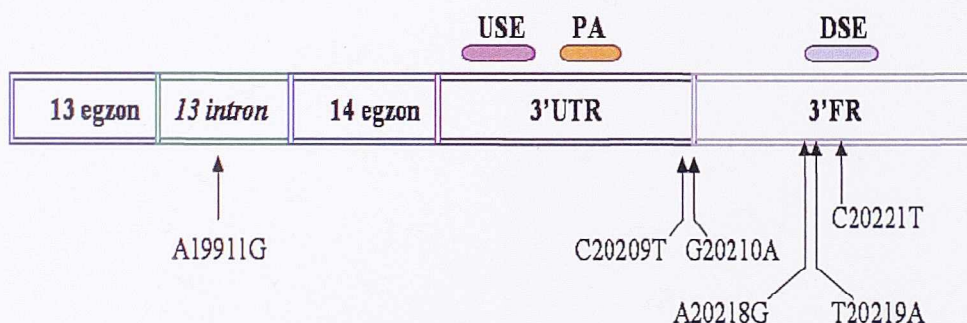
Nekanonnska organizacija 3' kraja gena za protrombin, u kome postoje regioni manje efikasni u procesu iskrajanja iRNK u poređenju sa drugim genima, čini ovaj region potencijalnim mestom za nastanak funkcionalnih polimorfizama koji dovode do povećane ekspresije gena (*gain of function*).

Među do sada opisanim polimorfizmima u 3' kraju gena za protrombin najznačajniji je G20210A (slika 9). Poort i saradnici su sekvenciranjem svih egzona, kao i 5'- i 3'- nekodirajućih regiona gena za protrombin, kod 28 pacijenata sa dokumentovanom venskom trombozom i pozitivnom porodičnom anamnezom, identifikovali samo G/A promenu i to u 3' nekodirajućem regionu gena na poziciji 20210 koja predstavlja mesto iskrajanja iRNK. Ovaj polimorfizam je bio prisutan kod 18% pacijenata, i kod 1% zdravih ispitanika, što ga čini faktorom rizika od 2,8 za nastanak venskih tromboza. Kod svih nosilaca FII G20210A polimorfizma detektovan je povišeni nivo protrombina u plazmi (>od 115 U/dL) [20]. Za ovaj polimorfizam je pokazano da predstavlja značajan faktor rizika za nastanak venskih tromboza [102,103]. To je posebno izraženo kod pacijenata sa idiopatskim trombozama portne vene, gde je frekvencija ovog polimorfizma više od osam puta povećana u odnosu na kontrolu grupu [108], kao i kod pacijentkinja u trudnoći ili na hormonskoj terapiji [104,105,106]. Takođe je pokazano da ova protrombinska varijanta može da predstavlja značaj faktor rizik za pojavu spontanih pobačaja i smrti fetusa u uterusu [107,108,109]. Uloga FII G20210A polimorfizma u nastanku arterijskih tromboza je daleko manja. META analize pokazuju da predstavlja blagi faktor rizika za pojavu infarkta miokarda i moždanog udara, naročito u slučajevima kada je udružen sa sredinskim faktorima [110,111].

Na osnovu zbirnog pregleda rezultata iz 11 centara u kojima je testirano 5527 ljudi na prisustvo ovog polimorfizma, utvrđeno je da je njegova frekvencija oko 2% u opštoj populaciji. Među osobama koji ne pripadaju populaciji belaca frekvencija FII G20210A polimorfizma je iznosila svega 0,67% [112]. Praćenjem četiri intragenska polimorfna markera, u grupi od 243 subjekta iz različitih etničkih grupa, pokazano je da FII G20210A polimorfizam kod svih ispitivanih nosilaca ima isto poreklo (*single origin*),

a kako je zastupljen u daleko većem procentu kod beleca, verovatnije je da je nastao nakon što su se rase razdvojile [113].

U regionu iskrajanja kod pripadnika crne rase opisana je C20209T varijanta [114] (slika 9). Međutim, njena učestalost iznosi svega 0,4%, dok je kod belaca opisana samo kod nekoliko pacijenata. Iako je otkrivena kod pacijenata sa trombozama, nije dokazana njena povezanost sa trombofilijom [115]. *In vitro* funkcionalni eseji su dali kontraverzne rezultate. Naime, prema rezultatima grupe iz Lajdena, 20209T varijanta ne dovodi do povećanja, već do blagog smanjenja ekspresije [116]. Sa druge strane, istraživači iz Hajdelberga su pokazali da je C20209T funkcionalni polimorfizam koji dovodi do povećane ekspresije gena [117].



**Slika 9** Polimorfizmi u 3' kraju gena za protrombin

USE- upstream sequence element; PA- poliadenilacioni signal; DSE-downstream sequence element; UTR-untranslated region; FR-flanking region

U okviru DSE regiona 3' kraja gena za protrombin opisani su A20218G, T20219A i C20221T polimorfizmi [118,119,120] (slika 9). A20218G varijanta je opisan kod svega dve pacijentkinje sa trombozama, od kojih je jedna bila nosilac FII G20210A i FV Leiden mutacija [118,119]. T20219A je otkriven kod jedne pacijentkinje sa trombozom nakon porođaja [119], dok je C20221T polimorfizam opisan kod nešto većeg broja pacijenata, ali do sada nije urađena studija o njegovoj frekvenciji, već su pacijenti sporadično opisivani [120,121,122].

Za polimorfizam A19911G, koji je lociran u poslednjem intronu gena za protrombin, takođe je pokazano da dovodi po povišenog nivoa protrombina [123] (slika 9). Studije su pokazale da je polimorfizam zastupljeniji kod pacijenata sa trombozama, ali

da sam po sebi predstavlja vrlo blagi faktor rizika za nastanak tromboza. Medjutim, u kombinaciji sa drugim polimorfizmima (FII G20210A i FV Leiden) može biti dodatni faktor rizika [123,124,125].

## 2. Cilj

Sve veći broj istraživanja poslednjih godina ima u fokusu proučavanje uloge 3' kraja gena u regulaciji ekspresije. Njihovi rezultati ukazuju da je učešće 3' kraja u regulaciji ekspresije gena daleko kompleksnije nego što se pretpostavljalo i da se u okviru ovog regiona nalazi veliki broj potencijalnih regulatornih elemenata čija se struktura i mehanizmi delovanja razlikuju od do sada opisanih.

Istraživanja su pokazala da 3' kraj gena za protrombin ima nekanonsku organizaciju. Za G20210A polimorfizam, koji se nalazi u ovom regionu, je dokazano da dovodi do povišene ekspresije protrombina, koja dalje za posledicu ima poremećaj hemostazne ravnoteže i pojavu tromboza. Međutim, precizan mehanizam kojim ovaj "3' gain of function" polimorfizam utiče na ekspresiju gena i dovodi do povišenog nivoa proteina još uvek nije rasvetljen. Veliki broj pacijenata koji nisu nosioci G20210A polimorfizma ima povišeni nivo protrombina, pa se pretpostavlja da u 3' kraju postoje i drugi polimorfizmi koji mogu da utiču na ekspresiju protrombinskog gena.

Ova studija je usmerena na strukturnu i funkcionalnu analizu 3' kraja gena za protrombin, kao i na povezanost promena u ovom regionu sa pojavom trombofilije.

Ciljevi su definisani na sledeći način:

1. Pretraživanje 3' kraja gena za protrombin kod pacijenata koji nisu nosioci FII G20210A polimorfizma, a imaju povišeni nivo protrombina, sa ciljem identifikacije novih polimorfizama.
2. Određivanje zastupljenosti polimorfizama 3' kraja gena za protrombin u grupi pacijenata sa trombofilijom, kao i u odgovarajućoj kontrolnoj grupi zdravih ispitanika.
3. Funkcionalna analiza polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin u cilju određivanja njihovog efekta na ekspresiju gena.
4. Analiza uticaja polimorfizama na ekspresiju gena u kontekstu različitih regiona 3' kraja, sa ciljem rasvetljavanja mehanizma kojim 3' kraj utiče na ekspresiju gena za protrombin.
5. Identifikovanje novih potencijalnih markera trombofilije sa ciljem njihove eventualne dijagnostičke primene.

# 3. Materijal i metode

### 3.1 ISPITANICI

Prvi deo ove studije je obuhvatio pretraživanje 3' kraja gena za protrombin sa ciljem da se identifikuju novi polimorfizmi u ovom regionu. U "skrining" je uključeno 54 pacijenata sa trombofilijom (36 žena i 18 muškaraca; starosti  $42 \pm 8,6$  godina), koji nisu nosioci FII G20210A polimorfizma, a kod kojih je prisutan povišeni nivo protrombina u plazmi, definisan kao protrombinska aktivnost  $>120\%$ . (Protrombinska aktivnost se definiše u odnosu na vrednost protrombinske aktivnosti standardnog uzorka plazme koja se iskazuje kao 100%). Obzirom da protrombin pripada proteinima akutne faze, odnosno njegov povišeni nivo može biti posledica postojanja nekog inflamatornog procesa u organizmu, kao dodatni kriterijum izabran je nivo fibrinogena u plazmi. U studiju su uključeni samo pacijenti kod kojih nivo fibrinogena nije bio povišen (referentna vrednost:  $<5$  mg/mL). Protrombinska aktivnost, kao i nivo fibrinogena, određivani su u Institutu za transfuziju krvi Srbije i Institutu za hematologiju Kliničkog centra Srbije, korišćenjem standardnih biohemijskih metoda. Sva merenja su vršena bar šest meseci nakon trombotičkog događaja. Pacijenti nisu primali antikoagulantnu terapiju.

Utvrđivanje učestalosti svih analiziranih polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin, vršeno je u grupi od 100 pacijenata sa dokumentovanom trombofilijom (18 žena i 82 muškarca; starosti  $39,4 \pm 10,4$  godina). Grupu su činili pacijenti sa trombozama dubokih vena, plućnim embolizmom i/ili ponovljenim spontanim pobačajima nepoznatog uzroka, kojima je dijagnoza postavljena u Institutu za hematologiju Kliničkog centra Srbije ili Institutu za transfuziju krvi Srbije. Kontrolnu grupu je činilo 100 zdravih, dobrovoljnih davalaca krvi, koji su po polu i godinama starosti odgovarali grupi pacijenata.

Za izolaciju DNK pacijenata korišćeni su limfociti periferne krvi, kao i ćelije bukalne sluzokože i korena dlake. Krv pacijenata uzimana je sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1. Uzorci bukalne sluzokože su uzimani sterilnim štapićem za bris, dok su ćelije korena dlake uzimane sa vlasi kose. Plazma pacijenata koja je korišćena za kvantifikaciju proteina, dobijena je centrifugiranjem pune krvi uzete sa Na-citratom kao antikoagulansom na 3000obrt/min u trajanju od 10 min.

Ovo istraživanje je odobrio Etički komitet Instituta za transfuziju krvi Srbije.



## 3.2 MATERIJAL

### 3.2.1 Ćelijske linije

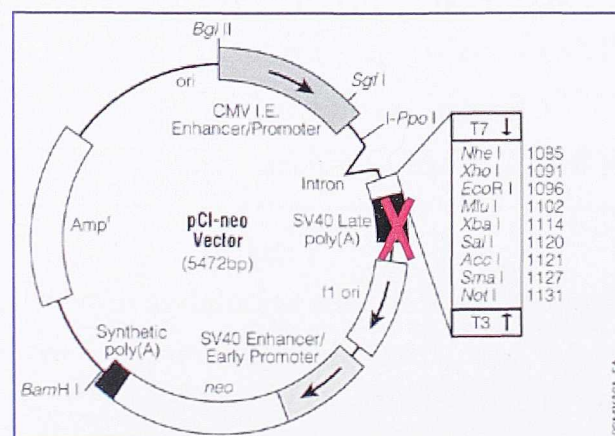
U okviru funkcionalne analize polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin korišćena je permanentna ćelijska linija: Cos-7. Ova ćelijska linija je nastala imortalizacijom ćelija bubrega afričkog zelenog majmuna virusom SV40 i komercijalno je dostupna.

### 3.2.2 Bakterijski sojevi

U studiji funkcionalne analize korišćeni su sojevi *E. coli*: **XL1-Blue** (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lacF*<sup>-</sup>[*proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>f</sup> *lacZ*ΔM15 Tn10(*tet*<sup>r</sup>)]) i **DH5α** (*supE44 ΔlacU169 (φ80lacZ*ΔM15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*).

### 3.2.3 Plazmidni vektori

U ovom radu je korišćen ekspresioni vektor pCI-neo (Promega) veličine 5472bp, koji nosi citomegalovirusni enhenser/promotor koji omogućava konstitutivnu ekspresiju kloniranog fragmenta u sisarskim ćelijama (slika 10).



Slika 10 Cirkularna mapa pCI-neo vektora  
[www.promega.com]

Vektor sadrži gen za neomicin fosfotransferazu koja omogućava rezistenciju sisarskih ćelija na antibiotik G-418. Za propagaciju u prokariotskim ćelijama vektor poseduje fl "origin" replikacije i ampicilinsku rezistenciju. Da bi se obezbedila efikasna ekspresija u

sisarskim ćelijama vektor sadrži citomegalovirusni enhensersko/promotorski region i poliadenilacion signal iz SV40 virusa za koji je pokazano da ima visoku efikasnost.

### 3.2.4 Oligonukleotidi

U različitim PCR reakcijama korišćeni su odgovarajući specifični oligonukleotidi, čiji su nazivi i sekvence navedeni u Tabeli 1. Za umnožavanje fragmenta analiziranog SSCP metodom korišćeni su prajmeri Pt1 i Pt2.

Fragment 3' kraja gena za protrombin koji je sekvenciran umnožavan je prajmerima FIII3a i A6b, dok je u reakciji sekvenciranja korišćen FIII3a prajmer.

**Tabela 1.** Prajmeri korišćeni za SSCP, PCR-RFLP analizu i sekvenciranje odgovarajućih regiona 3' kraja gena za protrombin

naziv prajmera	sekvenca prajmera
FIII3a	5'-GGAAACGAGGGGATGCCTGT-3'
Pt1	5'-GGATGGGAAATATGGCTTCTAC-3'
FIIpsm	5'-GCTTCTACACACATGTGTTGC-3'
FIIpsm2	5'-TGGCTTCTACACACATGAG-3'
FII 1	5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'
FII 2	5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'
Pt2	5'-TCAATGCTCCCAGTGCTATTC-3'
A5b	5'-GGCTGAGGTGGGAGGAT-3'
A6b	5'-GTGAGAGGAAAGATGGCAGG-3'

**Tabela 2.** Prajmeri korišćeni za reakcije *in situ* dirigovane mutageneze

naziv prajmera	sekvenca prajmera
mut20063	5'-TCTACACACATGTGCTCCGCCTGAAGAAGTGGAT-3'
mut20068	5'-ACACATGTGTTCCGTCTGAAGAAGTGGATACAG-3'

U Tabeli 2 dati su prajmeri korišćeni za *in situ* dirigovanu mutagenezu plazmida, dok su prajmeri i probe korišćeni u Real-time PCRu predstavljeni u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Prajmeri i obeležene probe korišćeni u reakcijama Real-Time PCRa.  
*MGBNFQ*-Minor groove binder/Non-fluorescent quencher, *VIC*- boja kojom je obeležena proba

<b>naziv prajmera</b>	<b>sekvenca prajmera</b>
RT418a	5'-CCGGTCTTGTCGATCAG-3'
RT418b	5'-TGAGCCTGGCGAACAGTTC-3'
G418-proba	<i>VIC</i> -ATG CTC TTC GTC CAG AT- <i>MGBNFQ</i>

### 3.3. METODE

#### 3.3.1 Metode za "skrining" i detekciju polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin

Za "skrining" je korišćen metod konformacionog polimorfizma jednolančane DNK (SSCP-*Single Strand Conformation Polymorphism*), dok su za detekciju polimorfizama korišćene PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) i sekvenciranje.

##### *Izolacija DNK iz periferne krvi*

*[referenca 126, protokol za QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN]*

##### ▪ Izolacija cetiltrimetilamonium bromidom (CTAB)- *referenca 126*

U 200  $\mu$ l periferne krvi dodavano je 400 $\mu$ l pufera za lizu (8% CTAB, 1,5M NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 8,5, 50mM EDTA, pH 8) koji je prethodno zagrejan na 68°C. Smeša je inkubirana 20min na 68°C. Zatim je dodavana jedna zapremina hloroforma (600 $\mu$ l) i smeša centrifugirana 10min na 12000obrt/min. Po centrifugiranju, gornja faza, koja sadrži DNK, je prebacivana u drugu mikrocentrifušku epruvetu, u koju je dodavan 5%CTAB; 0,1M NaCl do finalne koncentracije 0,1% i jedna zapremina sterilne vode. Smeša je centrifugirana na 12000obrt/min u trajanju od 10min. Talog je resuspendovan u 300 $\mu$ l 1,2M NaCl, a zatim je dodavano 2,5 zapremine apsolutnog etanola i smeša centrifugirana na 12000obrt/min u trajanju od 10min. Po centrifugiranju, talog DNK je ispiran 70% etanolom i ponovo centrifugiran na 12000 obrt/min u trajanju od 10min. Talog je sušen u vakuum centrifugi, a zatim rastvaran u 30 $\mu$ l sterilne vode.

##### ▪ Izolacija DNK komercijanim kitom-*protokol za QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN*

U mikrocentrifušku epruvetu sa 200 $\mu$ l uzorka krvi je dodavano po 20 $\mu$ l QIAGEN proteaze i 200 $\mu$ l pufera AL. Smeša je vorteksovana 15sek i zatim inkubirana na 56°C 10min, da bi ćelije lizirale i DNK oslobodila od proteina. Nakon toga je dodavano 200 $\mu$ l apsolutnog etanola i smeša ponovo vorteksovana 15sek. Smeša je nanošena na QIAamp kolonu i centrifugirana na 8000obrt/min u toku 1min. Nakon odbacivanja eluata (DNK se vezuje za kolonu), dodavano je 500 $\mu$ l pufera AW1 i kolona centrifugirana na 8000 obrtmin u toku 1min. Eluat je odbacivan, a kolona prebacivana u epruvetu za sakupljanje

eluata. U sledećem koraku, dodavan je pufer AW2 koji dodatno oslobađa DNK od nečistoća i kolona centrifugirana na 13000obr/min u toku 3 min. Nakon toga kolona je prebacivana u novu epruvetu i ponovo centrifugirana na istoj brzini u toku 1min kako bi se uklonili tragovi pufera. U poslednjem koraku kolona je prebacivana u čistu mikrocentrifušku epruvetu. DNK je spirana sa kolone dodavanjem 200 $\mu$ l sterilne vode. Nakon dodavanja vode kolona je 1min inkubirana na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana na 6000 obrt/min u toku 1min.

*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 je smeštan u epruvetu zapremine 2mL. U nju je dodavano 400 $\mu$ L 1xPBS pufera (137mM NaCl, 3,375mM KCl, 1,76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5) i 20 $\mu$ L QIAGEN Protease. Zatim je dodavano još 400 $\mu$ L pufera AL i smeša odmah vorteksovana 15sek. Nakon toga, smeša je inkubirana 10min na 56°C, dodavano po 400 $\mu$ L etanola (96%-100%) i cela smeša izvorteksovana. 700 $\mu$ L smeše je nanošeno na kolonu i ona je centrifugirana na 8000obr/min u toku 1min. Eluat je odbacivan i još 700  $\mu$ L smeše je nanošeno na istu kolonu uz ponovljeno centrifugiranje. U sledećem koraku je dodavano 500 $\mu$ L pufera AW1 i kolona centrifugirana na 8000obr/min u toku 1min. Nakon odbacivanja eluata, dodavano je 500 $\mu$ L pufera AW2. Kolona je centrifugirana 14000obr/min u toku 3min. Nakon toga kolona je prebacivana u novu epruvetu i ponovo centrifugirana na istoj brzini u toku 1min kako bi se uklonili tragovi pufera. Po završetku centrifugiranja, kolona je prebacivana u čistu epruvetu. Na kolonu je dodavano po 200 $\mu$ l sterilne vode. Kolona je 1min inkubirana na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana na 6000obr/min u toku 1min, čime je DNK eluirana sa kolone.

*Izolacija DNK iz ćelija korena kose*  
*[modifikovani protokol za QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN]*

Pri izolaciji DNK iz ćelija korena kose, dlake sa očuvanim korenom su najpre potapane u 400 $\mu$ L 1xPBS pufera (137mM NaCl, 3,375mM KCl, 1,76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5). Pufer sa ćelijama korena dlake je premeštan u mikrocentrifušku epruvetu i dodavano je 20μL QIAGEN Protease. Postupak je dalje nastavljan po protokolu za izolaciju DNK iz ćelija bukalne sluzokože.

*Analiza DNK na agaroznom gelu*

[referenca 127]

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (0,8- 2%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5μg/ml). Elektroforeza je tekla u TAE puferu (40mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA), pri naponu od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm. Nakon elektroforeze gelovi su dokumentovani CCD kamerom sa BioDocAnalyze sistemom. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni DNK markeri (NE BioLabs).

*Analiza konformacionog polimorfizma jednolančane DNK*

[referenca 128]

Metoda konformacionog polimorfizma jednolančane DNK (SSCP) se koristi za detekciju promena u sekvenci kraćih fragmenata DNK, dužine 150-250bp. Metoda se zasniva na principu da sekundarna struktura jednolančane DNK zavisi od njene sekvence. Jednolančani fragmenti iste dužine, ali različite primarne strukture, imaće različitu sekundarnu strukturu, a samim tim će i drugačije putovati tokom elektroforeze. SSCP je indirektna metoda, njome se može utvrditi postojanje promene u analiziranom fragmentu, ali da bi se ona tačno odredila potrebno je sekvencirati fragmenat u kome je uočena promena. Za "skrinig" 3' kraja gena za protrombin SSCP metodom najpre je PCR reakcijom umnožavan fragment 3' kraja gena dužine 204bp.

PCR reakcije su rađene u finalnoj zapremini od 25 $\mu$ l sadržavale su:

- 200-500ng DNK
- PCR pufer (50 mM Tris-HCl pH 9; 0,1% Triton X-100)
- MgCl<sub>2</sub> (5mM)
- dNTPovi (100 $\mu$ M svaki)
- prajmeri (10pmol svaki)
- Taq polimeraza (1U)

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/5min

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

72°C/10min

Da bi se DNK denaturisala, produkti PCR reakcije su kuvani sa formamidom 10min na 95°C i nakon toga držani na ledu do nanošenja na gel. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata vršeno je na 10% gelu od poliakrilamida sa 5%(w/v) glicerolom. Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 120V, u trajanju od 18 sati na +4°C. Po završetku elektroforeze DNK je vizuelizivana bojenjem gelova solima srebra.

PCR-RFLP metoda  
[reference 129 i 130]

**PCR-RFLP** (*Polimerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism*) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju mutacija i polimorfizama. Zasniva se na tome da postojanje promene u sekvenci kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja nekog restriktionog enzima. Na taj način, umnoženi fragment DNK će nakon obrade restriktionim enzimom imati različite dužine u zavisnosti od prisustva/odsustva polimorfizma. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (*PCR-Polymerase Chain Reaction*), omogućava umnožavanje željenog fragmenta DNK iz minimalne količine početnog materijala, korišćenjem termostabilne *Taq* polimeraze.

Ukoliko se reakcija lančanog umnožavanja odvija direktno iz pune krvi, bez prethodne izolacije DNK, na početku se koristi "hot start", odnosno nekoliko ciklusa grejanja i hlađenja, kako bi se omogućila liza ćelija i oslobađanje DNK.

Metoda PSM (*Polymerase chain reaction-mediated site-directed Mutagenesis*) se zasniva na mogućnost Taq polimeraze da uvede promenu u sekvenci DNK tokom reakcije lančanog umnožavanja i to na taj način što jedan od prajmer koji se koristi nije potpuno komplementaran DNK matrici. Ta se razlika ogleda u jednom nukleotidu na kraju sekvence koja se umnožava. Na taj način omogućava se stvaranje novog restriktionog mesta u umnoženom segmentu čije će postojanje zavisiti od prisustva ili odsustva mutacije koja se analizira. PSM metoda je korišćena za detekciju FII G20210A, FII T20063C i FII C20068T polimorfizama.

PCR reakcije, rađene u finalnoj zapremini od 25 $\mu$ l sadržale su:

- 200-500ng DNK ili 1 $\mu$ l pune krvi
- PCR pufer (50 mM Tris-HCl pH 9; 0,1% Triton X-100)
- MgCl<sub>2</sub> (5mM)
- dNTPovi (100 $\mu$ M svaki)
- prajmeri (10pmol svaki)
- Taq polimeraza (1U)

Temperaturni profil PCR reakcije kada je umnožavanje rađeno iz DNK:

95°C/5min

(94°C/1min, T<sub>A</sub>/1min, 72°C/1min) 30 ciklusa

72°C/10min

a kada je umnožavanje vršeno direkto iz pune krvi:

(98°C/3min, 55°C/3min) 5 ciklusa

95°C/5min

(94°C/1min, T<sub>A</sub>/1min, 72°C/1min) 30 ciklusa

72°C/10min

(T<sub>A</sub>-temperatura vezivanja prajmera, navedena u Tabeli 4)



U Tabeli 4 navedeni su odgovarajući parovi prajmera i temperature vezivanja prajmera korišćene u detekciji polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin.

**Tabela 4** Parovi prajmera i odgovarajuće temperature vezivanja prajmera korišćeni u detekciji polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin

polimorfizam	naziv prajmera	sekvenca prajmera	temperatura anilinga
A19911G	FII 1	TCTAGAAACAGTTGCCTGGC	56°C
	FII 2	TCTAGAAACAGTTGCCTGGC	
T20063C	FIIpsm2	TGGCTTCTACACACATGAG	55°C
	Pt2	TCAATGCTCCCAGTGCTATTC	
T20068T	FIIpsm	GCTTCTACACACATGTGTTGC	61°C
	Pt2	TCAATGCTCCCAGTGCTATTC	
G20210A	FII 1	TCTAGAAACAGTTGCCTGGC	56°C
	FII 2	TCTAGAAACAGTTGCCTGGC	
C20221T	Pt1	GGATGGGAAATATGGCTTCTAC	60°C
	A5b	GGCTGAGGTGGGAGGAT	
T20298C	Pt1	GGATGGGAAATATGGCTTCTAC	61°C
	A5b	GGCTGAGGTGGGAGGAT	

Produkti PCR reakcije su proveravani na 2% agaroznom gelu, a zatim su digerirani odgovarajućim restrikcionim enzimima. Sastavi smeša za digestiju restrikcionim enzimima kao i uslovi digestaja dati su u Tabeli 5.

**Tabela 5** Sastavi reakcionih smeša i uslovi digestije restrikcionim enzimima

polimorfizam	A19911G	T20063C	C20068T	G20210A	C20221T	T20298T
PCR produkt	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl
10x pufer	Neb4	Neb1	Neb4	Neb2	Neb3	Neb2
restrikcioni enzim	<i>EcoNI</i>	<i>SacI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HindIII</i>	<i>MwoI</i>	<i>HinfI</i>
BSA	-	1µg/mL	1µg/mL	-	-	-
finalna zapremina	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
uslovi digestije	37°C/16h	37°C/16h	37°C/16h	37°C/16h	60°C/16h	37°C/16h

Produkti digestije DNK restrikcionim enzimima analizirani su vertikalnom elektroforezom na 10% poliakriamidnim gelovima. DNK je vizuelizovana bojenjem gelova solima srebra.

*Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu*  
*[referenca 131]*

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

*Vizuelizacija DNK u poliakrilamidnim gelovima srebronitratom*  
*[referenca 132]*

Vizuelizacija DNK u poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebronitratom. Poliakrilamidni gelovi su, nakon elektroforeze, najpre fiksirani 30 minuta u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su bojeni u 0,1% rastvoru srebronitrata 10 min. Višak srebra je uklanjan ispiranjem najpre u redestilovanoj vodi, a zatim u razvijaču, koji je bio sledećeg sastava: 1,5% natrijumhidroksid, 0,01% natrijumborhidrid i 0,048% formaldehid. Gelovi su u razvijaču inkubirani 20 minuta. Fiksiranje dobijenih traka vršeno je potapanjem gelova u 0,75% rastvor natrijumbikarbonata u trajanju od 20min.

*Kapilarna elektroforeza na DNA Labchip-u*  
*[protokol za DNA 500 Assay kit-AGILENT TECHNOLOGY]*

Elektroforetsko razdvajanje fragmenta nakon digestije restrikcionim enzimima vršeno je i na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer, metodom kapilarne elektroforeze. U prvom koraku pripreman je čip na koji su zatim nanošeni uzorci. Po 9 $\mu$ L Gel-Dye miksa nanošeno je u odgovarajuće obeležena ležišta na čipu. Koristeći *Chip Priming Station* Gel-Dye miks je razliven u kapilare čipa. Na ovako pripremljeni čip, po 5 $\mu$ L markera je nanošeno u ležišta namenjena za uzorke i lestvicu. Zatim je 1 $\mu$ L lestvice nanošeno u odgovarajuće obeleženo mesto. Uzorci su nanošeni u zapremini od 1 $\mu$ L. Nakon

nanošenja uzoraka, čip je vorteksovan jedan minut na 2400obr/min. Tako pripremljeni čip je analiziran je na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer. Rezultati su obrađivani korišćenjem 2100 Expert Software.

### Sekvenciranje DNK

*[protokol za BigDye Terminator Ready Reaction Kita- APPLIED BIOSYSTEMS]*

Za sekvenciranje DNK korišćen je kit BigDye™ Terminator Version 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems). Metoda se bazira na umnožavanju DNK u prisustvu jednog prajmera i dideoksinukleotida, tako da se dobija serija jednolančanih fragmenata čija se dužina razlikuje za jedan bazni par. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom čime se reakcija sekvenciranja i detekcija produkata vrše u jednoj reakciji (umesto četiri odvojene, kada su svi dideoksinukleotidi obeleženi istom bojom). Produkti reakcije sekvenciranja su analizirani kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Fragment 3' kraja gena za protrombin dužine 715bp najpre je umnožavan metodom PCR-RFLP, prajmerima FII13a i A6b.

PCR smeša finalne zapremine 50 µl sadržala je sledeće komponente:

- 200-500 ng DNK
- PCR pufer (50 mM Tris-HCl pH 9; 0,1% Triton X-100)
- MgCl<sub>2</sub> (5 mM)
- dNTPovi (finalna koncentracija svakog 100 µM)
- prajmeri (10 pmol)
- Taq polimeraza (1U)

Temperaturni profil PCR reakcije:

94°C/5min

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

72°C/10min

Nakon provere PCR produkta na 2% agaroznom gelu, vršeno je prečišćavanje DNK na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača.

Smeša za reakciju sekvenciranja, finalne zapremine 8 $\mu$ l, sadržala je sledeće komponente:

- 10 ng prečišćenog PCR produkta
- prajmer za sekvenciranje FII13a (3,2 pmol)
- 3 $\mu$ l Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

96°C/1min

(96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min) 25 ciklusa

4°C/  $\infty$

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U 8 $\mu$ L smeše je dodavano po 40 $\mu$ L 0,1M Na-acetata pH 5,2, rastvorenog u etanolu. Zatim je vršeno centrifugiranje na 13000obr/min u toku 10min, uz odlivanje supernatana. Talog je ispiran dva puta sa po 200 $\mu$ L 70% etanola, uz centrifugiranje 13000obr/min/10min i odlivanje supernatanta. Nakon toga je u potpunosti osušen. Osušeni talog je rastvaran u 25 $\mu$ l *HiDi Formamide* (Applied Biosystems) i celokupna zapremina je nanošena na aparat za automatsko sekvenciranje.

#### Statistička obrada podataka [*Statistical Package for Social Sciences*]

Za statističku obradu podataka korišćeni su:  $\chi^2$  test i Studentov t-test, sa nivoom statističke značajnosti od 0,05. Određivani su p vrednost, OR (Odds Ratio) i 95%CI (Confidence Interval). Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), verzija 10.

### **3.3.2 Metode za funkcionalnu analizu polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin**

U okviru funkcionalne analize polimorfizama 3' kraja gena za protrombin, najpre su metodama kloniranja i PCR-dirigovane mutageneze dizajnirani konstrukti koji su obuhvatili različite dužine 3' kraja gena i u okviru njih identifikovane polimorfizme. Sa ovim konstruktima urađene su stabilne transfekcije Cos-7 ćelijske linije i izolovana je RNK. Uticaj 3' kraja na ekspresiju protrombinskog gena je praćen preko relativne kvantifikacije RNK metodom Real-Time PCRa.

#### Kultivacija bakterija [referenca 133]

Bakterije soja *E. coli* DH5 $\alpha$  i XL1-blue su gajene u tečnom LB (*Luria-Bertani*) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LB podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% bacto-agar). Svi korišćeni medijumi su sterilisani autoklaviranjem.

Bakterije su gajene na temperaturi od 37°C. U tečne i u čvrste medijume dodavan je ampicilin u finalnoj koncentraciji od 100 $\mu$ g/ml.

#### In situ PCR dirigovana mutageneza [modifikovani protokol za *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit-STRATAGENE*]

*In situ* PCR dirigovana mutageneza je metoda koja omogućava uvođenje tačkaste mutacija, 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). Metoda obuhvata: PCR reakciju u kojoj se koristi prajmer koji nosi mutaciju, digestiju dobijnog PCR produkta *Dpn I* enzimom i transformaciju kompetentnih bakterijskih ćelija digestionom smešom. Prajmeri moraju biti fosforilisani na 5'OH i poželjno je da budu dugi 25-45 nukleotida. Mutacija koja se uvodi trebalo bi da bude pozicionirana u sredini prajmera. Kao matrice za umnožavanje koristi se vektor

sa ukloniranom sekvencom u koju se uvodi mutacija. Kako bi se osiguralo umnožavanje kompletnog vektora, koristi se miks DNK polimeraza *Pfu* i *Vent*. Nakon umnožavanja, vrši se digestija *Dpn I* enzimom (ciljna sekvenca: 5'Gm<sup>6</sup>ATC-3') koji digerira samo metilovanu DNK. To omogućava uklanjanje DNK matrice, odnosno početnog vektora koji ne sadrži željenu mutaciju, dok se novosintetisanim vektorom koji nosi mutaciju vrši transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija.

U okviru ove studije metodom *in situ* dirigovane mutageneze uvedene su T20063C i C20068T zamene. Prajmeri koji su korišćeni dati su u Tabeli 3.

PCR smeša finalne zapremine 50  $\mu$ l, sadržala je sledeće komponente:

- 100 ng plazmidne DNK
- 1x reakciji pufer (50 mM Tris-HCl pH 9; 0,1% Triton X-100)
- 100 ng prajmera
- dNTP mix (0,5 mM svaki)
- 1U *PfuI* polimeraze (Fermentas)
- 1U *Vent* polimeraze (NE BioLabs)

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/1min

(95°C/60s, 55°C/60s, 65°C/15min) 30 ciklusa

4°C/  $\infty$

Produkti PCR reakcije podvrgavani su digestiji *Dpn I* restrikcionim enzimom. U smešu je dodavano 10U *Dpn I* enzima i reakcija digestije se odvijala 16 sati 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 mutacije. U reakciji sekvenciranja korišćen je FII13a prajmer.

Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju  
[referenca 134]

Ova metoda ima za cilj da se ćelijska membrana bakterija učini propustljivijom, kako bi se omogućilo „ubacivanje“ strane DNK, odnosno transformisale bakterijske ćelije odgovarajućim vektorom.

- Pripremanje kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju toplotnim šokom: Sveže, pojedinačne bakterijske kolonije, korišćene su za inokulisanje 10mL medijuma LB u kome su zatim gajene preko noći na 37°C na 180obr/min. Sa 2mL ove prekonoćne kulture inokulisano je 200mL LB medijuma. Kultura je gajena na 37°C na 200 obrt/min dok nije dostigla  $OD_{600} > 0,3$ . Po dostizanju odgovarajućeg  $OD_{600}$  kultura je centrifugirana 10min na 4°C i 2500 obrt/min. Dobijeni talog je resuspendovan u 10mL 0,1M  $CaCl_2$  i inkubiran na ledu 15min. Nakon toga je suspenzija ponovo centrifugirana 10min na 4°C i 2500obr/min. Talog je resuspendovana u 2mL rastvora RF2 (10mM MOPS, 1 mM RbCl, 75mM  $CaCl_2$ , 15% glicerol), i inkubiran na ledu 15min. Po 50-200 $\mu$ L smeše je alikvotirano hladnim nastavcima u hladne epruvete na ledu i zamrznuto na -80°C.
- Pripremanje kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju elektroporacijom: Po 10 $\mu$ L gliceroskog bakterijskog stoka korišćeno je za inokulaciju 10mL LB medijuma. Prekonoćna kultura je gajena na 37°C na 180obr/min. Sa 5 mL prekonoćne kulture inokulirano je 500mL LB medijuma i kultura je gajena na 37°C/220obr/min do dostizanja  $OD_{600}$  0,5-0,7. Nakon toga kultura je podeljena u dva dela i centrifugirana 15min na 5000rpm/4°C. Dobijeni talog je rastvoren u 250mL hladne sterilne vode. Posle ponovljenog centrifugiranja (15min/4°C /5000obr/min), talozi su rastvarani u 125 mL hladne vode. Nakon rastvaranja, smeše su centrifugirane 15min na 4°C i 4000obr/min. Taloci su resuspendovani u 10mL 10% hladnog glicerola i spojeni u jednu epruvetu. Zatim su centrifugirani 15min na 7000obr/min/4°C. Po završetku centrifugiranja talog je resuspendovan u 1,25mL hladnog 10% glicerola. Tako dobijene ćelije su razdeljivane u alikvotima od 50 $\mu$ L i zamrzavane na -80°C.

*Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija*  
*[referenca 134]*

Ovom metodom se u bakterijske ćelije ubacuje strana DNK. Zahvaljujući činjenici da bakterije replikuju podjednako efikasno kako sopstvenu tako i ubačanu plazmidnu DNK, ova metoda obezbeđuje velike količine plazmidne DNK. U okviru ove studije korišćene su metode transformacije toplotnim šokom i elektroporacijom.

▪ Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija toplotnim šokom:

U smešu kompetentnih bakterijskih ćelija (200 $\mu$ l) dodavano je 10 $\mu$ l plazmidne DNK. Smeša je inkubirana jedan sat na ledu, a zatim izlagana toplotom šoku: 42°C (2min), led (5min). Ovako transformisanim ćelijama dodavano je po 800 $\mu$ l LB medijuma bez antibiotika i njihov oporavak je favorizovan gajenjem na 37°C u toku jednog sata. Nakon toga 100-500 $\mu$ l bakterijske kulture je utrljavano na čvrstu LB podlogu. Bakterijske ćelije su gajene na čvrstoj podlozi preko noći na 37°C. Iz pojedinačnih kolonija su izolovani ciljani plazmidi.

▪ Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija elektroporacijom:

Smeši kompetentnih bakterijskih ćelija dodavano je 1-2 $\mu$ L plazmidne DNK. Smeša je inkubirana na ledu 1min, a zatim prebacivana u kivete za Gene Pulsar elektroporator (Bio Rad). Elektroporacija je vršena na 1,25kV. Odmah po transformaciji u smešu je dodavano 1ml SOC medijuma (972 $\mu$ l LB, 5 $\mu$ L 0,5M KCl, 10 $\mu$ L 1M MgSO<sub>4</sub>, 3,3 $\mu$ L 3M MgCl<sub>2</sub>, 10 $\mu$ L 2M glukoze) i bakterije su inkubirane jedan sat na 37°C/225obr/min. Po 100-500 $\mu$ l bakterijske kulture je potom utrljavano na čvrstu LB podlogu. Bakterije gajene preko noći na 37°C. Ciljni plazmidi su izolovani iz pojedinačnih kolonija koje su izrasle na petri šoljama.

*Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali*  
*[protokol za QIAprep Spin Miniprep Kit -QIAGEN]*

Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 5ml tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane preko noći na 37°C/180obr/min. Prekonoćna kultura je



centrifugirana 2min na 13000obrt/min, i dobijeni bakterijski talog je resuspendovan vorteksovanjem u 250 $\mu$ l pufera P1. U resuspendovani talog dodavano je 250 $\mu$ l pufera P2 i 350 $\mu$ l pufera N3 uz mešanje invertovanjem. Nakon toga je smeša centrifugira na 13000obrt/min u trajanju od 10min. Supernatan je prebacivan na QIAprep kolonu, koja je centrifugirana na 13000obrt/min u toku 1min. Na ovaj način je DNK vezana za kolonu, i u naredna dva koraka prečišćavana dodavanjem 0,75mL pufera PE i centrifugiranjem na 13000obrt/min u trajanju od 1 minuta. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona je ponovo centrifugirana na 13000obrt/min u trajanju od 1 min. DNK je eluirana sa kolone dodavanjem 100 $\mu$ l sterilne vode i centrifugiranjem na 13000obrt/min u trajanju od 1 minuta.

#### Detekcija plazmida koji nosi željenu mutaciju

Prisustvo željene mutacije potvrđivano je reakcijom sekvenciranja. Nakon izolacije plazmidna DNK je sekvencirana korišćenjem prajmera FII13a. Sekvenciranjem je proveravano ne samo da li je željena mutacija prisutna u sekvenci plazmida, već i da prilikom replikacije u bakterijskim ćelijama nije došlo do dodatnih, neželjenih promena u sekvenci.

#### Čuvanje transformanata [referenca 134]

Dobijeni transformanti su vijabilni na čvrstim LB podlogama svega nekoliko nedelja, tako da su za duže čuvanje pripremani i zamrzavani glicerolski stokovi. U ependorf epruvetu sa 150 $\mu$ l sterilnog 100% glicerola dodavano je po 850 $\mu$ l tečne prekonoćne bakterijske kulture i smeša je zamrzavana u tečnom azotu. Glicerolski stokovi koji se čuvaju na -80°C su vijabilni duži niz godina.

Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi  
[protokol za EndoFree Plasmid Maxi Kit-QIAGEN]

Sa čvrste selektivne podloge su zasejavane pojedinačne bakterijske kolonije u 5mL LB medijuma i inkubirane 8 sati na 37°C/300obrt/min. 100µL ove kulture je zasejavano u 100mL LB medijuma i inkubirano 12-16 sati na 37°C/300obrt/min. Bakterijske ćelije su taložene centrifugiranjem na 4700obrt/min/ 4°C /25 min. Talog je resuspendovan u 10mL pufera P1, zatim je dodavano po 10mL pufera P2, uz mešanje invertovanjem. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 5min. Nakon toga dodavano je 10mL pufera P3 i smeša invertovana 4-6 puta. Dobijeni ćeliski lizat je nanošen na QIAfilter Maxi, inkubiran 10min na sobnoj temperaturi, a zatim profiltriran. U filtrirani lizat je dodavano 2,5mL pufera ER, smeša promešana invertovanjem i inkubirana na ledu 30min. Za to vreme je kolona QIAGEN-tip 500 ekvilibrisana dodavanjem 10mL pufera QBT. Na ekvilibrisanu kolonu nanošen je filtrirani lizat. DNK vezana za kolonu je dva puta ispirana sa 30mL pufera QC i eluirana puferom QN. Eluirana DNK je precipitirana dodavanjem 10,5mL izopropanola i centrifugiranjem na 8000obrt/min, 30min na 4°C. Nakon toga u talog je dodavano 5mL 70% etanola i smeša centrifugirana 10 min na 8000obrt/min/4°C. Talog je sušen na vazduhu 10-30min, rastvoren u 200µL endotoxin-free pufera TE i nakon merenja koncentracije plazmidna DNK je čuvana na -20°C.

Kultivacija permanentnih ćelijskih linija  
[referenca 135]

Permanetna ćelijska linija Cos-7 pripada grupi adherentnih ćelijskih linija i gajena je u odgovarajućim sterilnim sudovima u inkubatoru sa automatskim protokom 5%CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37°C, uz sve propisane mere sterilnog rada. Ćelije su gajene u medijumu DMEM (*Dullbecco's Modified Minimum Essential Medium*) uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma i 50µg/mL gentamicina.

Zasejavanje ćelija vršeno je brzim otapanjem ćelija čuvanih u tečnom azotu i njihovim resuspendovanjem u zagrejanom kompletnom ćelijskom medijumu.

Zamena medijuma vršena je po potrebi, aspiriranjem postojećeg i dodavanjem svežeg medijuma zagrejanog na 37°C.

Pasažiranje ćelija vršeno je na svaka 3-4 dana, odnosno kada dostignu približno 80% konfluentnosti. Step en konfluentnosti je proveravan pod mikroskopom. Najpre je aspiriran postojeći medijum i ćelije su dva puta prane PBS puferom (137mM NaCl, 3,375mM KCl, 1,76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5). Nakon toga ćelije su tretirane 0,1% rastvorom tripsinaEDTA u PBS-u, do potpunog odvajanja od podloge. Tripsin je inhibiran dodavanjem svežeg medijuma, a ćelije su zasejavane u odnosu 1:3, ili 1:5.

Broj ćelija nakon pasažiranja je određivan na hemocitometru.

Zamrzavanje ćelija je vršeno u medijumu za zamrzavanje koji sadrži krioprotektivni agens-dimetilsulfoksid (DMSO) i fetalni teleći serum u odnosu 1:9. Nakon tripsinizacije, ćelije su resuspendovane u svežem medijumu, prebacivane u epruvetu i centrifugirane na 1200obr/min, 2 minuta na sobnoj temperaturi. Talog od  $1-2 \times 10^6$  ćelija je rastvaran u 1mL medijuma za zamrzavanje i prebacivan u epruvete za zamrzavanje. Samo zamrzavanje je obavljano postepeno. Tek nakon toga, epruvete sa zamrznutim ćelijama su skladištene u tečnom azotu (-196 °C).

### *Transfekcija Cos-7 ćelijske linije plazmidnom DNK [protokol za PolyFect Transfection Reagent-QIAGEN]*

Za transfekciju permanentne ćelijske linije Cos-7 korišćen je reagens Polyfect (Qiagen). Polyfect je molekul sferične arhitekture sa "granama" koje se radijalno pružaju iz centralnog dela sfere i završavaju naelektrisanim aminogrupama za koji se vezuje DNK. Ovako nastali, pozitivno naelektrisani kompleks se vezuje za negativno naelektrisane receptore na membrani ćelije, čime se omogućava ulazak plazmidne DNK u ćeliju.

Za eksperimente transfekcije  $4 \times 10^5$  Cos-7 ćelija je zasejavano u T-25 flask i gajeno pod standardnim uslovima 24h. Odgovarajući plazmidi, koji su izolovani po protokolu za *EndoFree* izolaciju, su najpre podvrgnuti digestiji restrikcionim enzimom *NotI* u trajanju od 16h. Linearizacija plazmida je vršena da bi se omogućila lakša

integracija plazmidne DNK u genom ćelija. Linearizovani plazmidi su prečišćavani na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) i rastvarani u puferu TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0). 2,5µg plazmidne DNK je rastvoreno u 150µL medijuma DMEM (bez seruma i antibiotika jer oni ometaju stvaranje kompleksa). Po dodavanju 15µL PolyFect reagensa i vorteksovanja, smeša je inkubirana 5-10min na sobnoj temperaturi kako bi se oformili kompleksi između Polyfect-a i plazmidne DNK. Zatim su kompleksi pomešani sa 1mL kompletnog medijuma i celokupna smeša je prebacivana u flask sa ćelijama, kojima je pre toga dodato 3mL svežeg kompletnog medijuma. Ćelije su zatim gajene pod standardnim uslovima 48h.

### *Gajenje stabilnih transformanata Cos-7 ćelijske linije*

Četrdeset osam sati nakon transfekcije odgovarajućim plazmidnim vektorom, ćelije su pasažirane, prebacivane u novi flask sud sa 10 puta većom zapreminom (T-175) i gajene u standardnom kompletnom medijumu kome je dodavan antibiotik G418 u finalnoj koncentraciji 1mg/mL. Paralelno sa transfekovanim ćelijama, pod istim uslovima su gajene i kontrolne ćelije, kojima je u procesu transfekcije dodat samo medijum, bez plazmidne DNK. Ćelijama je po porebi menjan medijum ili su pasažirane. Nakon prve nedelje, pod ovim uslovima gajenja, kontrolne ćelije nisu preživljavale, dok su transfekovane ćelije formirale ostrvca deljenjem ćelija koje su rezistentne na antibiotik. Ćelije su gajene 4-5 nedelja u prisustvu antibiotika, do postizanja fluktuentnog rasta, nakon čega je po  $2 \times 10^5$  ćelija zasejavano za izolaciju RNK, a ostatak ćelija zamrzavan.

### *Izolacija celokupne RNK iz ćelija u kulturi [protokol za RNeasy Plus Mini Kit-QIAGEN]*

Po  $2 \times 10^5$  stabilno transfekovanih Cos-7 ćelija, zasejavano je u 1ml standardnog kompletnog medijuma uz dodatak 1mg/mL antibiotika G418. Ćelije su gajene na 5%CO<sub>2</sub>/37°C 48 sati, a zatim su lizirane dodavanjem 350µL pufera RTL Plus. Lizat je homogenizovan na QIAshredder koloni i centrifugiranjem 2min na 13000obrt/min. Da bi

se izbegla DNK kontaminacija, homogenizovani lizat je nanošen na gDNA Elimintor kolonu i centrifugiran 0,5min na 13000obrt/min. Nakon toga je u eluat dodavano po 350 $\mu$ L 70% etanola i celokupna zapremina prebacivana na Rneasy kolonu za koju se vezuje RNK. Ova kolona je centrifugirana 15sek na 13000obrt/min, a zatim je dodavano 70 $\mu$ L pufera RW1 i kolona ponovo centrifugirana 15sek na 13000obrt/min. U narednom koraku je RNK ispirana dva puta sa po 500 $\mu$ L pufera RPE. Kolona je centrifugirana 2min na 13000obrt/min, a nakon toga još jednom 1 min, kako bi se uklonili svi tragovi pufera. RNK je sa kolone eluirana sa 50 $\mu$ L sterilne vode, centrifugiranjem 1min na 13000obrt/min. Prinos i kvalitet izolata RNK je proveravan horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu i merenjem koncentracije na spektrofotometru. Izolati RNK su čuvani na -20°C.

#### Prečišćavanje RNK

[protokol za DNA-free Kit-AMBION]

Za analizu RNK metodom Real-time PCRa, veoma je važno da izolovana RNK nije kontaminirana sa DNK. Iz tog razloga su RNK izolati prečišćavani DNA-free kitom. U izolate je dodavan DNase pufer i 1 $\mu$ L enzima *rDNaseI*. Smeše su inkubirane 20-30min na 37°C. Zatim je enzim inaktiviran dodavanjem 0,1 volumena *DNase I* inaktivirajućeg agensa. Nakon 2min na sobnoj temperaturu, smeše su centrifugirane na 13000obrt/min/1,5min. Prečišćena RNK, koja se nalazi u supernatanu, je prebacivana u novu epruvetu.

#### Sinteza cDNK

[protokol za High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit- APPLIED BIOSYSTEMS]

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit sadrži reverznu transkriptazu i nasumične (*random*) prajmere i omogućava prevođenje celokupne iRNK u cDNK. Ovako dobijena cDNK se može dalje koristiti za kvantifikaciju metodom Real-time PCRa.

Kao matrica za reakcije reverzne transkripcije korišćeni su uzorci RNK izolovani iz stabilnih ćelijskih transfektanata Cos-7 ćelijske linije.

Reakcije reverzne transkripcije rađene su u zapremini od 20 $\mu$ L, su bile sledećeg sastava:

10x RT Buffer	2 $\mu$ L
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 $\mu$ L
10x <i>Random</i> prajmeri	2 $\mu$ L
MultiScribe reverzna transkriptaza	1 $\mu$ L
RNK	10 $\mu$ L

Temeraturni profil reakcije reverzne transkripcije:

25°C	25 minuta
37°C	120 minuta
85°C	5 sekundi
4°C	$\infty$

Uzorci cDNK su čuvani na -20°C.

#### Kvantifikacija iRNK metodom Real-Time PCRa

[protokol za *TaqMan Gene Expression Assays-APPLIED BIOSYSTEMS* i referenca 136]

Metoda Real-time PCRa se zasniva na reakciji lančanog umnožavanja polimerazom (PCR), pri čemu je zahvaljujući reagensima koji se koriste i optičkim karakteristikama aparata omogućeno praćenje kinetike ove reakcije. Detektovanjem količine produkta koji je nastao PCR reakcijom, moguće je kvantifikovati količinu početne matrice (DNK, cDNK, RNK) sa koje je umnožavanje vršeno. Dva osnovna pristupa za detekciju su: 1) korišćenje reagensa (fluorescentne boje) koji emituje fluorescentni signal nakon vezivanja za molekul dvolančene DNK. Signal koji se dobija je srazmeran količini dvolančanog produkta PCR reakcije i nije zavisen od primarne sekvence umnoženog DNK fragmenta. Najčešće korišćeni reagens iz ove grupe je SYBERGreen, 2) korišćenjem oligonukleotidnih proba koje su obeležene fluorescentnom bojom, a komplementarne su delu sekvence koja se umnožava. Na taj način se signal detektuje samo pri specifičnom umnožavanju. Najčešće se koriste Taq Man probe obeležene sa

FAM ili VIC bojom. U kvantifikaciji (DNK, RNK, cDNK) metodom Real-time PCRa postoje dva pristupa: 1) apsolutna kvantifikacija, gde se dobijani fluorescentni signal poredi sa signalima dobijenim od seta standarda poznatih koncentracija i 2) relativna kvantifikacija, gde se rezultat iskazuje u odnosu na vrednosti dobijene za uzorak odabran kao kalibrator. Kako je količina dobijenih PCR produkata direktno zavisna od količine matrice, da bi se obezbedila normalizacija, uporedo sa umnožavanjem sa sekvence target gena vrši se i umnožavanje takozvane endogene kontrole. Endogena kontrola je gen koji se bira po kriterijumu da njegova ekspresija ne zavisi od tretmana u toku eksperimenta.

Reakcije Real-time PCRa rađene su na aparatu 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Za praćenje uticaja polimorfizama u 3' kraju na ekspresiju gena za protrombin korišćen je Taq Man prisutop uz metod relativne kvantifikacije. Za detekciju target molekula-protrombina korišćen je TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Kao endogena kontrola izabran je gen za neomicinN-transferazu, koji omogućava rezistenciju na G418 antibiotik.

Real-time PCR je rađen je u multipleks reakciji, ukupne zapremine 10 $\mu$ L sladećeg sastava:

2xUniverzalni PCR MasterMix	5 $\mu$ L
20xTaqMan Gene Expression Assays	0,5 $\mu$ L
<i>(2 neobeležena prajmera, 900nM finalno svaki, FAM/MGB proba, finalno 250nM)</i>	
RT418a prajmer (18pmol/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
RT418b prajmer (18pmol/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
G418 proba	0,5 $\mu$ L
cDNK	1,5 $\mu$ L

Temperaturni profil reakcije:

50°C            2 minuta

95°C            10 minuta

(95°C 15 sekundi, 60°C 1 minit) 40 ciklusa.

Za obradu dobijenih rezultata korišćen je 7500 System Software (Applied Biosystems).

Elektroforeza proteina u denaturišućem gelu  
[referenca 137]

**SDS-PAGE** (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) je metoda koja omogućava razdvajanje proteina prema molekularnoj težini.

Ova metoda je korišćena za razdvajanje proteina plazme pacijenata kod kojih su detektovani polimorfizmi u 3' kraju gena za protrombin. Za njihovo razdvajanje je korišćen diskontinuirani SDS poliakrilamidni gel koji se sastoji se iz gela za koncentrovanje (*stacking gel*) koji omogućava homogenizaciju uzoraka i gela za razdvajanje (*running gel*) u kome se proteini iz uzorka razdvajaju po svojoj masi.

Gel za razdvajanje je bio sledećeg sastava: 12% poliakrilamid, 375mM Tris, pH8,8 i 0,1% SDS, 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Sastav gela za koncentrovanje je bio: 6% poliakrilamid, 0,5M Tris HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Proteini plazme su najpre rastvarani u puferu za uzorak (50mM Tris, pH 6,8, 2%SDS, 10%glicerol, 0,1% bromfenolplavo) i denaturisani kuvanjem 5min na 95°C. Uzorci su zatim nanošeni na gel, a elektroforeza se odvijala u puferu TG (25mM Tris, pH 8,8, 250mM glicin, 0,1% SDS), pod konstantnim naponom od 100V u gelu za koncentrovanje i 180V u gelu za razdvajanje. Zajedno sa uzorcima na gel je nanošen marker odgovarajućih molekularskih težina (Fremetas), Po završetku elektroforeze proteini razdvojeni na gelu su dalje analizirani metodom Western blota.

Analiza proteina Western blot metodom  
[referenca 138]

Western blot je metoda koja omogućava imunodetekciju ciljnog proteina u uzorku. Metoda se sastoji iz: razdvajanje proteina elektroforezom, transfera razdvojenih proteina na membranu i imunodetekcije proteina na mebrani. Detekcija target proteina se najčešće vrši u dve faze – korišćenjem primarnog i sekundarnog antitela. Primarno antitelo (I Ab) je specifično za određeni epitop target proteina, dok sekundarno antitelo (II Ab) "prepoznaje" primarno antitelo i najčešće je specifičano za epitop imonoglobulina životinje iz koje je izolovano I Ab. Sekundarno antitelo je konjugovano sa molekulom



pomoću kojeg se može izvršiti detekcija signala (biotin, alkalna fosfataza, peroksidaza rena, itd).

Proteini plazme pacijenata su nakon razdvajanja elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu prenošeni PVDF Immobilon membranu (Millipor) na korišćenjem sistema za polusubi transfer (Biometra). Gel je inkubiran u katodnom puferu (25mM Tris/HCl pH 9,4, 40mM glicin, 20% metanol). Membrana je aktivirana potapanjem u metanol 1-2s, zatim ispirana u vodi 5min i inkubirana u anodnom puferu II (25mM Tris/HCl pH 10,4, 20% metanol) 5min. Na anodnu ploču, koja je najpre nakvašena anodnim puferom I (300 mM Tris/HCl pH 10,4, 20% metanol) stavljan je po 2 sloja 3 MM papira, nakvašenih u anodni pufer I. Preko ovog sloja stavljan je po 1 3MM papir natopljen u anodni pufer II. Zatim je stavljan aktivirana membrana, preko nje gel. Kao poslednji sloj stavljan su po 3 3MM papira natopljena u katodni pufer. Transfer je trajao 40 min pri maksimalnoj struji od 5mA po 1cm<sup>2</sup> membrane.

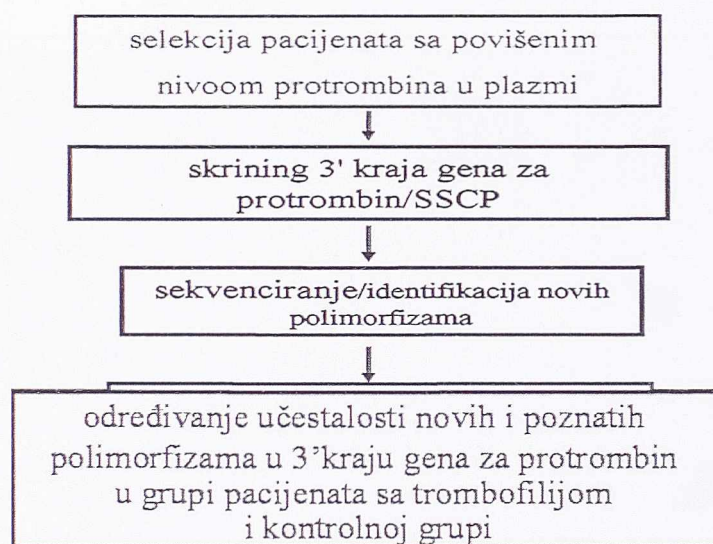
Po završetku transfera membrane je inkubirana u 10% nemasnom mleku rastvorenom u puferu PBST (80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl, pH 7,5, 0,1% Tween20) preko noći, da bi se blokiralo nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon toga membrana je kratko ispirana u puferu PBST i inkubirana sa primarnim antitelom Thrombin K-20- goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), jedan sat, uz šejkiranje, Ovo primarno antitelo prepoznaje središnji region humanog trombina i može se koristiti za detekciju kako trombina tako i protrombina. Primarno antitelo je korišćeno i razblaženju 1:1000 u 5% mleku rastvorenom u PBST puferu. Nakon inkubiranja, primarno antitelo je ispirano prvo 15min, a zatim 3x5min u PBST puferu, uz neprestano šejkiranje. Membrana je zatim inkubirana jedan sat u sekundarnom antitelu Anti-Goat IgG, peroxidase conjugate (Sigma), razblaženom 1:80 000 u 5% mleku rastvorenom u PBST puferu, takođe uz šejkiranje. Sekundarno antitelo je ispirano kao i primarno 15 min i 3 x5 min u PBST puferu. Peroksidaza rena sa kojom je konjugovano sekundarno antitelo katalizuje reakciju peroksidacije odgovarajućeg supstrata pri čemu nastaje hemiluminiscentni signal. Membrana je najpre 5 minuta inkubirana sa supstratom - Immobilon Western (Millipor).

Detekcija signala je vršena na fotosenzitivnom filmu. Relativna kvantifikacija signala, koji odgovara količini protrombina vršena je na CCD kameri uz korišćenje softvera BioDocAnalyze (Biometra).

## 4. Rezultati

## 4.1 STRUKTURNA ANALIZA 3' KRAJA GENA ZA PROTROMBIN KOD PACIJENTA SA TROMBOFILIJOM

Strukturna analiza je obuhvatila pretraživanje 3' kraja gena za protrombin metodom SSCP i sekvenciranja, sa ciljem da se identifikuju novi polimorfizmi u ovom regionu. Nakon toga, određivana je učestalost ovih polimorfizama u grupi pacijenata sa trombofilijom i u kontrolnoj grupi koju su činili dobrovoljni davaoci krvi. Određivana je i učestalost ranije opisanih polimorfizma u 3' kraju gena za protrombin: G20210A, A19911G i T20221C.



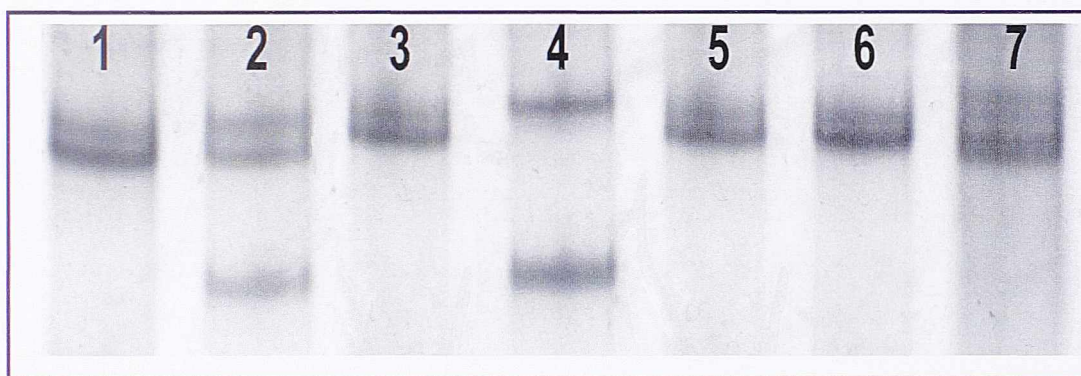
Slika 11 Šematski prikaz eksperimenata strukturne analize 3' kraja gena za protrombin

### 4.1.1 Skrining 3' kraja gena za protrombin

Kod 54 pacijenta sa trombofilijom koji nisu nosioci FII G20210A polimorfizma, a kod kojih je prisutan povišeni nivo protrombina u plazmi (izmerena protrombinska aktivnost >120%) urađeno je pretraživanje regiona dužine 715bp 3' kraja gena za protrombin. Ovaj region je obuhvatao deo egzona 13, poslednji intron, egzon 14, 3' UTR, kao i 235bp 3' FR sekvence.

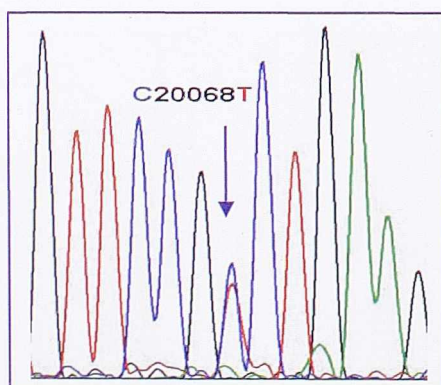
Kod 43 pacijenta skrining 3' kraja je urađen metodom SSCP, a zatim su sekvenciranjem identifikovane promene u uzorcima DNK pacijenta kod kojih je uočen različit obrazac traka. Kod preostalih 11 pacijenata direktno je sekvenciran analizirani region dužine 715bp.

U prvom koraku standardizovani su uslovi za izvođenje SSCP metode. Kao pozitivna kontrola korišćeni su uzorci koji su heterozigoti ili homozigoti za FII G20210A polimorfizam koji se nalazi u ovom regionu. Genotip uzoraka koji su korišćeni kao pozitivne kontrole je najpre određen PCR-RFLP metodom, a zatim su ovi uzorci sekvencirani kako bi se isključilo postojanje dodatnih polimorfizama, koji bi mogli da utiču na konformaciju analizirnog fragmenta u SSCP metodi. Uslovi elektroforeze, kao i sastav gelova su standardizovani tako da su omogućavali detekciju razlike između heterozigota i homozigota za FII G20210A polimorfizam i *wt* sekvence.



*Slika 12* Skrining 3' kraja gena za protrombin metodom SSCP  
1,3,5,6-homozigot za *wt* alel; 2-hetrezigot za FII G20210A polimorfizam; 4-homozigot za FII G20210A polimorfizam; 7-nosilac polimorfizma koji nije FIIG20210A

Od testirana 43 pacijenta samo je kod jednog uočen obrazac traka koji se razlikovao od kontrolnog uzorka sa *wt* alelom (slika 12, uzorak 7). Sekvenciranjem je utvrđeno da se radi o heterozigotu za **C20068T** polimorfizam (slika 13).

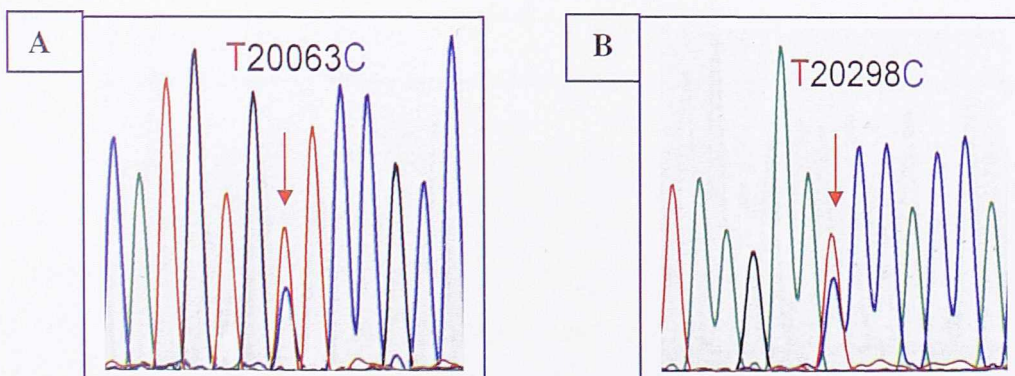


*Slika 13* Deo sekvence 3' kraja gena za protrombin sa C20068T polimorfizmom

Ovaj polimorfizam je lociran u poslednjem egzonu gena za protrombin i dovodi do zamene treće baze u kodonu koji kodira aminokiselinu arginin na poziciji 607 u proteinu. Polimorfizam dovodi do zamene CGC u CGT, što je takođe kodon za arginin, tako da ne dovodi do aminokiselinske zamene na nivou proteina. Polimorfizam je detektovan kod pacijentkinje koja je razvila masovnu trombozu noge nakon prvog porođaja, bez predhodnih trombotičkih manifestacija. Izmerena protrombinska aktivnost je iznosila 136%. Sekvencirani su i uzorci DNK oba roditelja pacijentkinje. Majka je takođe heterozigotni nosilac C20068T polimorfizma i kod nje je izmerena protrombinska aktivnost od 113%.

Kod 11 pacijenata sa povišenom protrombinskom aktivnošću direktno je sekvenciran region dužine 715bp u 3' kraju gena za protrombin. Kod jedne pacijentkinje su detektovana dva polimorfizma koja nisu do sada opisana: **T20063C** i **T20298C** (slika 14). Pacijentkinja je imala dva idiopatska spontana pobačaja u razmaku od 6 godina i nakon toga jednu uspešnu trudnoću. Nije imala drugih trombotičkih manifestacija. Izmerena aktivnost protrombina je iznosila 123%. Uzorci njenih roditelja i deteta su takođe sekvencirani, međutim ni jedan od polimorfizama nije detektovan.

**T20063C** polimorfizam se nalazi u poslednjem egzonu gena za protrombin i dovodi do zamene fenilalanina izoleucinom (TTC/CTC) na mestu 606 u proteinu. Drugi polimorfizam **T20298C** se nalazi u 3' FR regionu, tako da ne dovodi do aminokiselinske zamene. U ovom delu 3' kraja protrombinskog gena još uvek nisu opisani regulatorni elementi koji bi mogli da utiču na ekspresiju.



Slika 14 Deo sekvence 3' kraja gena za protrombin sa:  
A) T20063C i B) T20298C polimorfizmima

#### 4.1.2 Određivanje učestalosti polimorfizama A19911G, T20063C, C20086T, G20210A, C20221T i T20298C u genu za protrombin

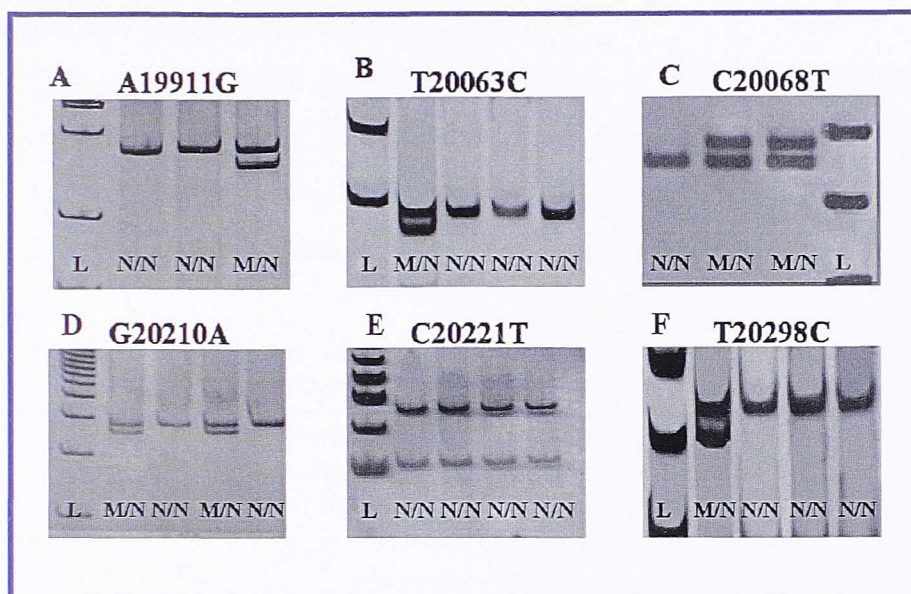
Učestalost polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin određivana je u kontrolnoj grupi od 100 dobrovoljnih davalaca krvi i kod pacijenta sa trombofilijom (100 ispitanika). Grupe su formirane tako da odgovaraju po polu ( $p=0,62$ ) i godinama starosti ispitanika ( $p=0,72$ ).

Detekcija polimorfizama je vršena PCR-RFLP metodom. Za detekciju A19911G i G20210A polimorfizama korišćeni su ranije opisani prajmeri (20,139), dok su za detekciju T20063C, C20068T, C20221T i T20298C polimorfizama najpre dizajnirani prajmeri i standardizovana metoda za njihovu detekciju. U tabeli 6 date su dužine umnožavanih PCR produkata, kao i odgovarajuće dužine fragmenta DNK nakon digestija restrikcionim enzimima zavisno od prisustva polimorfizama.

**Tabela 6** Dužine fragmenata DNK nakon digestije restrikcionim enzimima za analizirane polimorfizme u 3' kraju gena za protrombin

	dužina PCR produkta (bp)	dužine fragmenata (bp)	
		<i>polimorfizam</i>	
		<i>prisutan</i>	<i>nije prisutan</i>
A19918A	345	345	326+19
T20063C	192	171+21	192
C20068T	190	190	170+20
G20210A	345	322+23	345
C20221T	323	215+108	195+108+20
T20298C	325	171+154	171+96+58

Na slici 15 prikazani su restrikcioni profili analiziranih polimorfizama. Kao kontrolni uzorci korišćeni su heterozigoti za odgovarajući polimorfizam, izuzev kod detekcije C20221T polimorfizma, gde je uzorak sa *wt* sekvencom korišćen kao kontrolni. Za sve kontrolne uzorke odgovarajući genotip je predhodno potvrđen metodom sekvenciranja.



**Slika 15** Detekcija polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin  
L-standard molekulske dužina, M-mutirani alel, N- wt alel

Podaci o učestalosti analiziranih polimorfizama prikazani su u tabeli 7. T20063C, C20221T i T20298C varijante nisu detektovane ni kod jednog ispitanika. G20210A varijanta je u heterozigotnom obliku detektovana kod 11% pacijenata i 3% ispitanika iz kontrolne grupe (OR=3,99, p=0,047).

**Tabela 7** Učestalost detektovanih polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin  
OR-Odds Ratio, p-statistička značajnost

genotip	pacijenti sa trombofilijom (n=100), %	kontrolna grupa, (n=100), %	OR (95%CI)	p
FII 19911AG	51	51	–	–
FII 19911GG	23	19	1,27 (0,64-2,52)	0,603
FII 20063TC/CC	0	0	–	–
FII 20068TC	3	1	2,14 (0,64-7,32)	0,687
FII 20068TT	0	0	–	–
FII 20210GA	11	3	3,99 (1,08-14,79)	0,047
FII 20210AA	0	0	–	–
FII 20221CT/TT	0	0	–	–
FII 20298TC/CC	0	0	–	–



Genotipovi 19911GG i 20068CT su takođe učestaliji u grupi pacijenata, ali ta razlika nije stastički značajna ( $p=0,603$  i  $p=0,687$ ).

Alelske frekvence testiranih polimorfizama date su u Tabeli 8. Statistička značajnost detektovana je samo kod G20210A polimorfizma (OR=3,03, 95%CI 1,05-13,91,  $p=0,04$ ). OR vrednost za T alel kod C20068T polimorfizma iznosi takođe 3,03 (95%CI 0,31-29,38), međutim nije dostignuta statistička značajnost ( $p=0,34$ ).

**Tabela 8** Alelska učestalost polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin  
OR-Odds Ratio, p-statistička značajnost

polimorfizam	alel	pacijenti sa trombofilijom (n=100)	kontrolna grupa (n=100)	OR (95%CI)	P
FII A19911AG	A	0,52	0,56	1,17 (0,79-1,74)	0,42
	G	0,48	0,44		
FII T20063C	T	1	1	-	1
	C	0	0		
FII C20068T	C	0,98	0,99	3,03 (0,31-29,38)	0,34
	T	0,02	0,01		
FII G20210A	G	0,95	0,98	3,03 (1,05-13,91)	0,04
	A	0,05	0,02		
FII C20221T	C	1	1	-	1
	T	0	0		
FII T20298C	T	1	1	-	1
	C	0	0		

Kombinacija dva polimorfizma detektovana je kod ukupno 18 ispitanika: 14 pacijenata i 4 ispitanika iz kontrolne grupe. Svi detektovani haplotipovi su bili kombinacija heterozigotnih genotipova. Statistička značajnost nije zabeležena ni za jednu kombinaciju. Nijedan ispitanik nije bio nosilac tri polimorfizma (tabela 9).

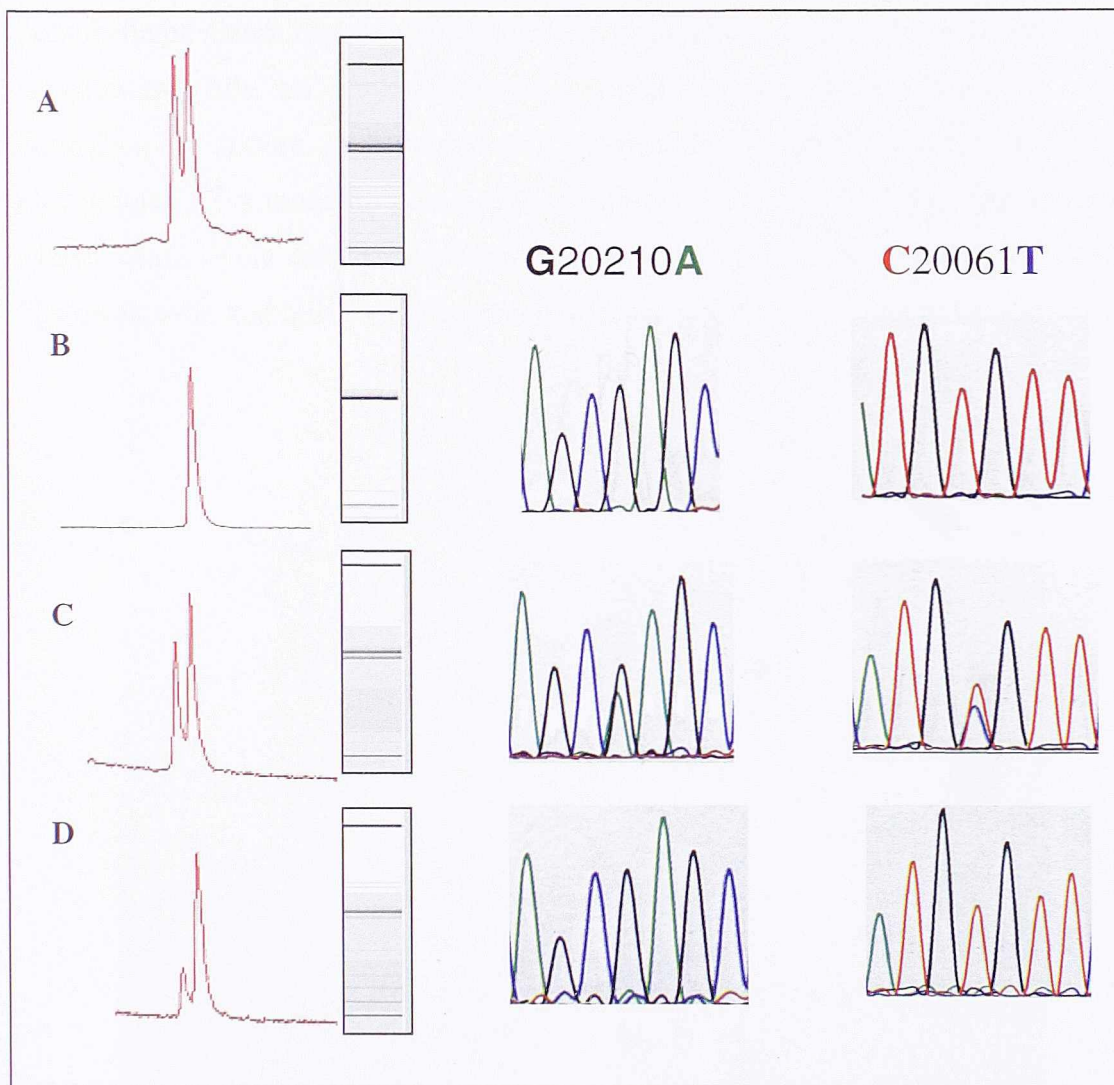
**Tabela 9** Učestalost kombinacija FII G20210A, A19911G i C20068T polimorfizama u grupi pacijenata sa trombofilijom i u kontrolnoj grupi  
OR-Odds Ratio, p-statistička značajnost

genotip	pacijenti sa trombofilijom (n=100) (%)	kontrolna grupa (n=100) (%)	OR (95%CI)	P
FII20210GA FII19911AA	4	0	–	0,12
FII 20210GA FII 19911AG	7	3	<b>2,43</b> (0,61-9.69)	0,33
FII 20210GA FII19911GG	0	0	–	–
FII20068CT FII19911AA	1	0	–	0,50
FII20068CT FII 19911AG	2	1	<b>2,02</b> (0,18-22,64)	
FII20068CT FII19911GG	0	0	–	–
sva tri polimorfizma	0	0	–	–

#### 4.1.3 Somatski mozaicizam za FII G20210A polimorfizam

Prilikom testiranja na prisustvo G20210A polimorfizma pacijentkinje stare 48 godina, koja je nakon početka uzimanja hormonske terapije razvila rekurentni plućni embolizam, dobijena su dva različita rezultata na uzorcima DNK izolovanim iz različitih tkiva. U uzorku iz periferne krvi detektovan je homozigot za *wt* alel, dok je u uzorku iz bukalne sluzokože detektovan G20210A polimorfizam u heterozigotnoj varijanti. Nakon što je ponovljeno testiranje potvrdilo ovu razliku, uzeti su i analizirani novi uzorci periferne krvi i bukalne sluzokože, kao i uzorak korena kose. Izabrani uzorci su različitog embionalnog porekla i testiranje je imalo za cilj da se utvrdi da li je polimorfizam bio prisutan na stadijumu blastule, kada diferencijacija nije još započela, ili je nastao u nekom kasnijem stadijumu razvića. Iz sva tri uzorka je izolovna DNK i urađena detekcija G20210A. Nakon digestije restrikcionim enzimom (*HindIII*) detekcija fragmenata je vršena kaplarnom elektroforezom na čipu DNA 500, na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) (slika 16). Fragment 3' kraja gena za protrombin, veličine 715bp je sekvenciran kod sva tri uzorka. U uzorku periferne krvi, G20210A polimorfizam nije detektovan ni PCR-RFLP metodom ni metodom sekvenciranja. U ćelijama bukalne

sluzokože polimorfizam je detektovan sa obe metode, dok je kod ćelija korena kose, traka koja odgovara mutiranom alelu detektovana u minimalnoj količini PCR-RFLP metodom, a u dobijenoj sekvenci signal koji bi odgovarao mutiranom alelu je na nivou *background*-a (šuma) (slika 16).



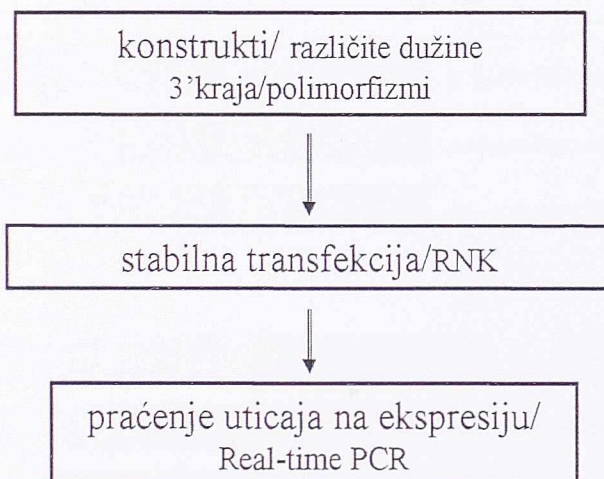
**Slika 16** Prikaz somatskog mozaicizma za G20210A polimorfizam u 3' kraju gena za protrombin: elektroforetska analiza na čipu DNA 500 (Agilent) i delovi sekvence u kojima se nalaze FII G20210A i C20061T polimorfizam.

- A) kontrolni uzorak, heterozigotni nosilac G20210A polimorfizma
- B) uzorak izolovan iz ćelija periferni krvi pacijenta
- C) uzorak izolovan iz ćelija bukalne sluzokože pacijenta
- D) uzorak izolovan iz ćelija korena dlake pacijenta

Analizom sekvenci utvrđeno je i prisustvo novog polimorfizma C20061T, koji je detektovan u uzorku bukalne sluzokože (slika 16). Ovaj polimorfizam do sada nije opisan, i nalazi se u poslednjem egzonu gena za protrombin, gde zamenom GTG u GCG, dovodi do zamene valina alaninom na mestu 605 u proteinu. Kloniranjem PCR produkta u pGEM-T Easy vektor i sekvenciranjem dobijenih klonova, pokazano je da se oba polimorfizma nalaze na istom lancu DNK. Protrombinska aktivnost nije određivana jer je pacijentkinja bila na antikoagulantnoj terapiji varfarinom koji utiče na aktivnost koagulacionih faktora. Deda, otac i stric pacijentkinje su umrli od infarkta miokarda, a otac je imao i dva moždana udara, tako da njihovi uzorci nisu bili dostupni za testiranje. Majka, brat i dvoje dece pacijentkinje su testirani i ni jedan od ova dva polimorfizama nije detektovan kod njih, ni u uzorcima periferne krvi, ni u uzorcima bukalnog brisa.

## 4.2 FUNKCIONALNA ANALIZA POLIMORFIZAMA U 3' KRAJU GENA ZA PROTROMBIN

Uticaj detektovanih polimorfizama na ekspresiju gena za protrombin praćen je na nivou iRNK korišćenjem metode Real-Time PCRa. Šematski prikaz eksperimenata je dat na slici 17. Najpre su napravljeni konstrukti sa odgovarajućim polimorfizmima i njima stabilno transfekovane ćelije permanentne ćelijske linije Cos-7. Iz njih je izolovana celokupna RNK, koja je poslužila kao matrica za sintezu cDNK. Dobijena cDNK je korišćena za relativnu kvantifikaciju ekspresije, metodom Real-Time PCRa. Plazma pacijenata sa detektovanim polimorfizmima je korišćena za relativnu kvantifikaciju količine protrombina u plazmi.



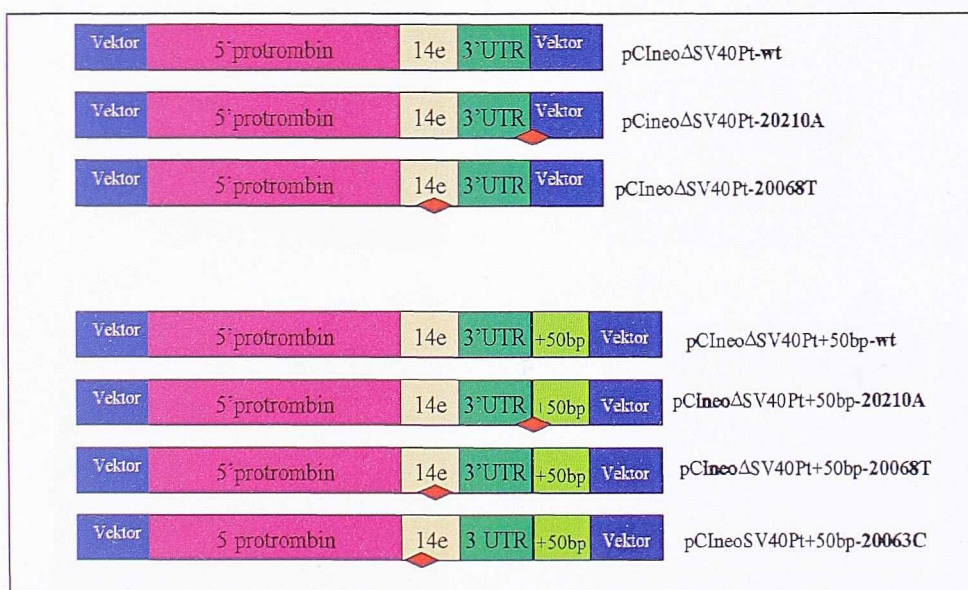
*Slika 17* Šematski prikaz eksperimenata funkcionalne analize 3' kraja gena za protrombin

### 4.2.1 Pripremanje konstrukata

Za funkcionalu analizu 3' kraja gena za protrombin korišćen je vektor pCIneo (Promega) kome je deletiran region dužine 226bp sa SV40 poliadenilacionim signalom- pCIneo $\Delta$ SV40. Uklanjanjem virusnog poliadenilacionog signala sprečen je njegov uticaj na ekspresiju kloniranog gena. U ovoj studiji je korišćen vektor pCIneo $\Delta$ SV40 u koji je uklonjena celokupna cDNK za protrombin: signalna sekvenca, 14 egzona i 3' nekodirajući region zaključno sa nukleotidom iza koga se vrši iskrajanje-

pCIneo $\Delta$ SV40Pt. Ukupna dužina ukloniranog regiona iznosila je 2018bp [140,141]. Takođe je korišćen vektor kod koga je uklonirana sekvenca cDNK produžena za 50bp 3' FR regiona protrombinskog gena nizvodno od mesta iskrajanja-pCIneo $\Delta$ SV40Pt+50 [141].

U pCIneo $\Delta$ SV40Pt konstrukt su metodom *in-situ* mutageneze uvedene zamene na 20068 i 20210 nukleotidu (Pt serija konstrukata). U duži, pCIneo $\Delta$ SV40Pt+50 konstrukt su istom metodom uvedene zamene na 20063, 20068 i 20210 nukleotidu (Pt+50 serija konstrukata). Brojevi nukleotida su prema nomenklaturi Degena i saradnika (30). Na slici 18 dati su šematski prikazi konstrukata. Kao kontrola korišćen je pCIneo $\Delta$ SV40 vektor bez inserta.

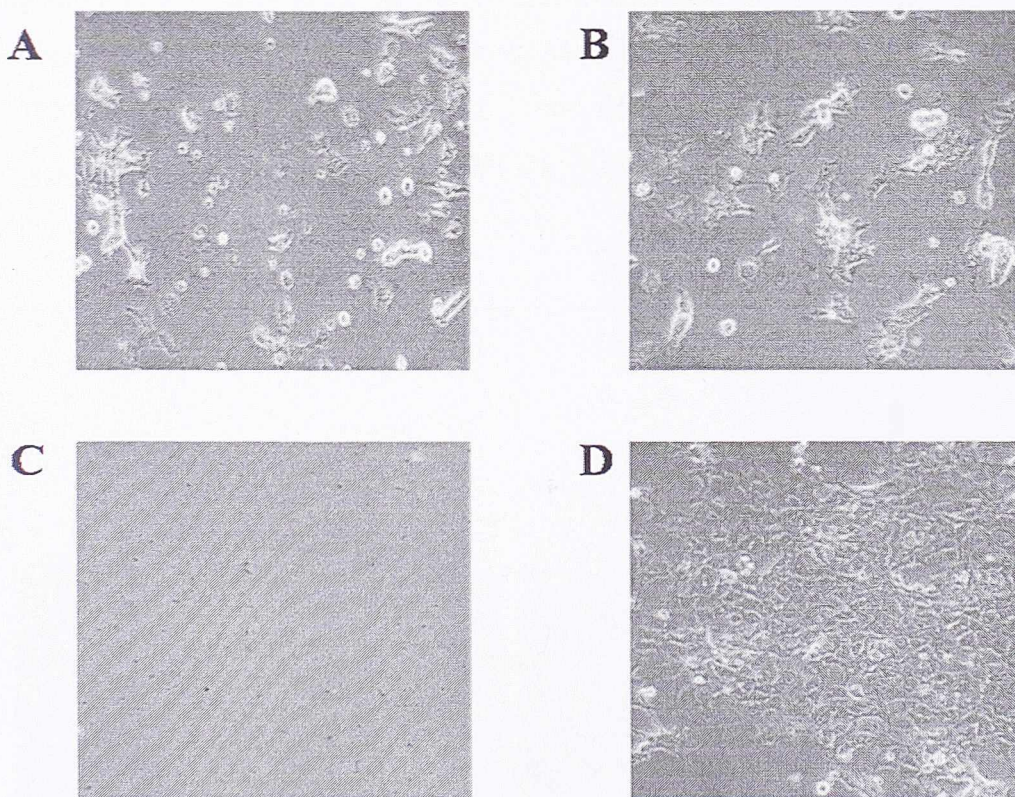


Slika 18 Šematski prikaz konstrukata korišćenih za transfekciju cos-7 ćelijske linije e-egzon, UTR-nekodirajući region,  $\blacklozen$  pozicija polimorfizma

#### 4.2.2 Stabilna transfekcija permanentne ćelijske linije cos-7

Ćelije permanentne ćelijske linije Cos-7 su transfekovane dobijenim konstruktima (ukupno 7, slika 18) i pCIneo $\Delta$ SV40 vektorom bez inserta. Svi vektori su pre transfekcije linearizovani kako bi se olakšala integracija vektora u genom i dobili stabilni transfektanti. Zahvaljujući činjenici da vektor nosi gen za neomicin-N-transferazu, gajenjem ćelija u medijumu sa G418 antibiotikom selektovane su

transfektovane ćelije. Ćelije su gajene 3-4 nedelje pod konstantnim selektivnim pritiskom (1mg/mL G418 antibiotika). Kontrolne netransfektovane ćelije su zasejavane u istom broju i u procesu transfekcije tretirane samo medijumom. Na slici 19 prikazane su transfektovane i netransfektovane ćelije nakon 24 sata i nakon 8 dana gajenja u medijumu sa G418 antibiotikom. 24 sata nakon transfekcije broj ćelija je približno isti (slika 19A i B). Međutim, nakon 8 dana gajenja u medijumu sa antibiotikom, među netransfektovanim ćelijama nema preživelih (slika 19C), dok transfektovane ćelije formiraju "ostrvca" i počinju sa deobom (slika 19D). U periodu od 3-4 nedelje ćelije su više puta pasažirane.



*Slika 19* Ćelije Cos-7 gajene u potpunom medijumu sa G418 (1mg/mL)

24 sata: A) netransfektovane ćelije, B) transfektovane ćelije  
8 dana: C) netransfektovane, ćelije D) transfektovane ćelije

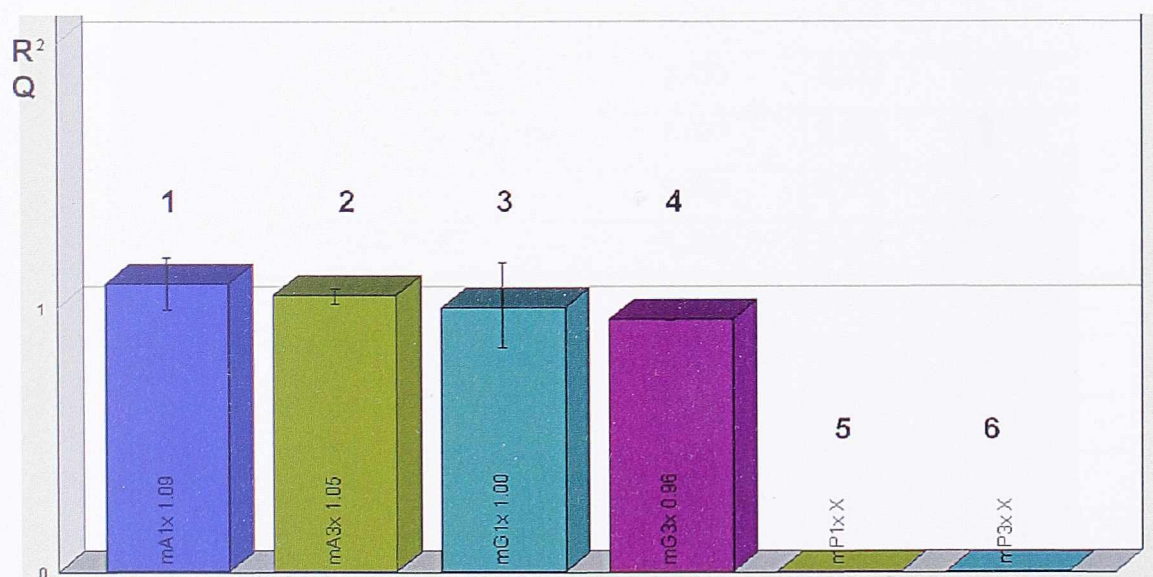
Stabilno transfekovane ćelije su dostigle fazu fluktuentnog rasta, odnosno njihova brzina rasta i deobe u medijumu sa antibiotikom se nije razlikovala od netransfekovanih Cos-7 ćelija gajenih u standardnom medijumu.

Za svaki vektor su rađene po tri nezavisne transfekcije, a zatim su iz svake, tako dobijene stabilno transfekovane ćelijske linije urađene po tri nezavisne izolacije RNK.

### 4.2.3 Praćenje ekspresije gena za protrombin relativnom kvantifikacijom iRNK metodom Real-Time PCR

Iz stabilno transfekovanih ćelija Cos-7 izolovana je ukupna RNK koja je korišćena kao matrica za dobijanje pula cDNK, koji je zatim korišćen u reakcijama Real-Time PCRa, po protokolu opisanom u poglavlju Materijal i metode.

Prvo je urađen pilot eksperiment u kome su kao matrice za Real-Time PCR reakciju korišćeni plazmidi pCIneo $\Delta$ SV40Pt-wt, pCIneo $\Delta$ SV40Pt-A i pCIneo $\Delta$ SV40 u dve koncentracije 20 ng/ $\mu$ L i 60 ng/ $\mu$ L.



Slika 20 Relativna kvantifikacija različitih koncentracija plazmida metodom Real-Time PCR: kalibrator uzorak 3 (1xpCIneo $\Delta$ SV40Pt-wt)

- 1) 1x pCIneo $\Delta$ SV40Pt-A, 2) 3x pCIneo $\Delta$ SV40Pt-A, 3) 1x pCIneo $\Delta$ SV40Pt-wt,  
4) 3x pCIneo $\Delta$ SV40Pt-wt, 5) 1x pCIneo $\Delta$ SV40P 6) 3x pCIneo $\Delta$ SV40P  
RQ-relative quantification

Ciljevi ovog eksperimenta su bili: da se utvrdi da li je normalizacija na endogenu kontrolu uspešna, da li postoji razlika u normalizaciji u slučaju dva različita konstrukta i



da li se signal sa target gena (protrombina) može detektovati i kod plazmida bez inserta. Na slici 20 prikazani su rezultati koji pokazuju da u odnosu na 1x pCIneo $\Delta$ SV40Pt-wt vektor (20 ng/ $\mu$ L), koje je uzet kao kalibrator, nije detektovano umnožavanje u reakcijama sa plazmidom bez inserta u oba koncentracije (20 ng/ $\mu$ L i 60 ng/ $\mu$ L). Dobijene RQ (*relative quantification*) vrednosti za ostale konstrukte se kreću u intervalu 0,98-1,05 u odnosu na 1 (koliko iznosi vrednost dodeljena kalibratoru), što se može okarakterisati kao uspešna normalizacija na endogenu kontrolu (slika 20).

**Tabela 10** RQ i vrednosti dobijene Real-Time PCRom  
RQ-*relative quantification* , CI- *Confidence Interval*

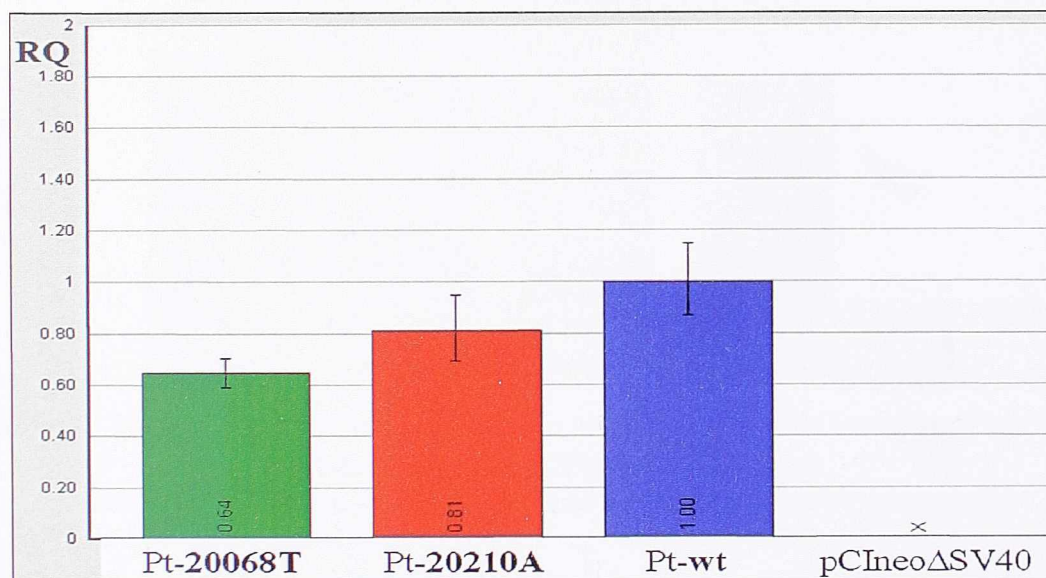
kalibrator pt-wt	konstrukt	RQ	95%CI	
			min	max
	pt-wt	1	0,871	1,149
	pt-20068T	0,633	0,592	0,702
	pt-20210A	0,811	0,649	0,947
	pt+50bp -wt	0,224	0,224	0,310
	pt+50bp-20063C	0,287	0,253	0,326
	pt+50bp-20068T	0,433	0,325	0,577
	pt+50bp-20210A	0,435	0,408	0,465
kalibrator pt+50bp -wt	pt-wt	3,393	3,302	4,356
	pt-20068T	2,445	2,245	2,663
	pt-20210A	3,076	2,644	3,592
	pt+50bp -wt	1	0,850	1,117
	pt+50bp-20063C	1,089	0,960	1,236
	pt+50bp-20068T	1,643	1,234	2,188
	pt+50bp-20210A	1,651	1,547	1,763

Dobijeni uzoraci cDNK su analizirani u triplikatu u reakcijama Real-Time PCRa. Reakcije su rađene kao multipleks, odnosno detekcija signala za protrombin i endogenu kontrolu je rađena u istom uzorku, na istoj cDNK matrici. Kao kontrole su korišćeni uzorci dobijeni iz ćelija transfekovanih pCIneo $\Delta$ SV40 plazmidom bez inserta, kao i reakcije bez dodate cDNK matrice.

Rezultati su obrađeni korišćenjem 7500 System Software. Dobijene RQ vrednosti, kada su kao kalibratori korišćeni Pt-**wt** i Pt+50-**wt** konstrukti, prikazane su u tabeli 10.

Kada je prisutan samo 3' UTR gena za protrombin, bez nizvodne sekvence (Pt serija), najveću ekspresiju pokazuje *wt* plazmid. Polimorfizmi, uključujući i 20210A ne dovode do povećane ekspresije. Ekspresija sa kontrolnog plazmida bez inserta nije detektovana (slika 21).

U poređenju sa Pt-**wt** konstruktom, Pt-**20210A** mutirani konstrukt ima približno istu ekspresiju (0,811 u odnosu na 1 koliko je dodeljena kalibratoru), dok je RQ vrednost za Pt-**20068T** bila čak i značajno niža: 0,64 vs 1 (95%CI 0,592-0,702,  $p < 0,05$ ) (slika 21).



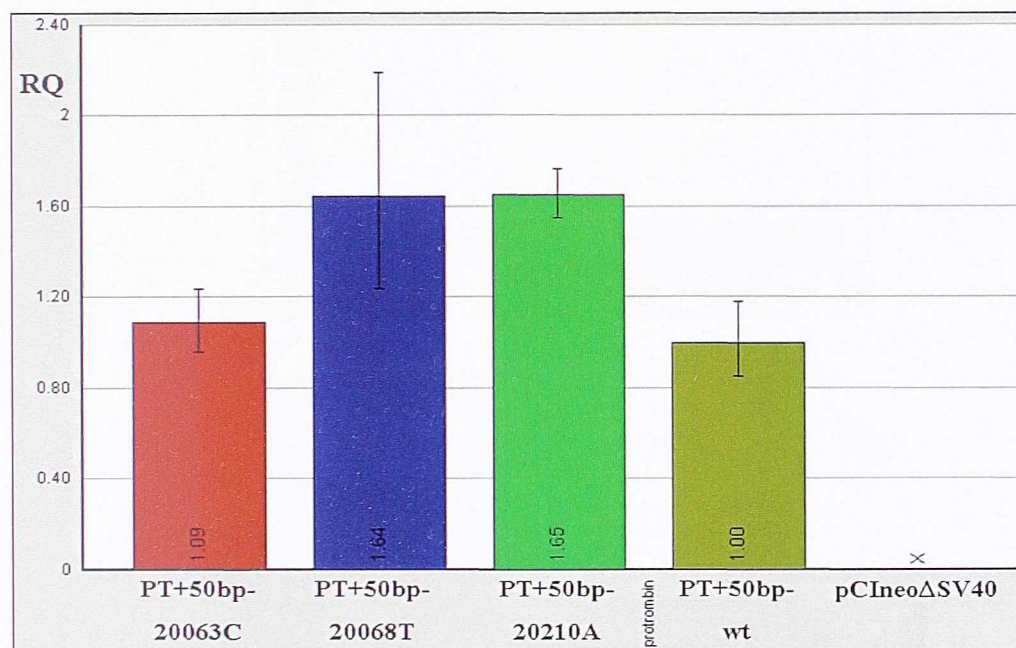
**Slika 21** Relativna kvantifikacija ekspresije gena za protrombin metodom Real-Time PCR za pCIneoΔSV40Pt konstrukte.

kalibrator: Pt-**wt**, pCIneoΔSV40- vektor bez inserta, RQ-relative quantification

Međutim, kada se uporede vrednosti dobijene za duže fragmente slika je potpuno drugačija (slika 22). Kada je prisutan 3' UTR i region od 50bp 3' FR protrombinskog gena (serija Pt+50bp), najveća ekspresija je detektovana kod konstrukta koji sadrži 20210A polimorfizam. U poređenju sa Pt+50bp-**wt** konstruktom, Pt+50bp-**20210A** ima 1,65 (95%CI 1,547-1,763,  $p < 0,05$ ), a Pt+50bp-**20068T** 1,64 puta (95%CI 1,234-2,188  $p < 0,05$ ) veću ekspresiju. Za konstrukt Pt+50bp-**20063T** je dobijena ista ekspresija kao i

za Pt+50bp-wt (RQ 1,09). I u ovom eksperimentu, ekspresija sa kontrolnog plazmida bez inserta nije detektovana (slika 22).

Kada je poređena ekspresija između dve serije konstrukata, povećana ekspresija je detektovana za sve kraće konstrukte u odnosu na konstrukte koji su sadržali dodatnih 50bp nizvodne sekvence (slika 23).

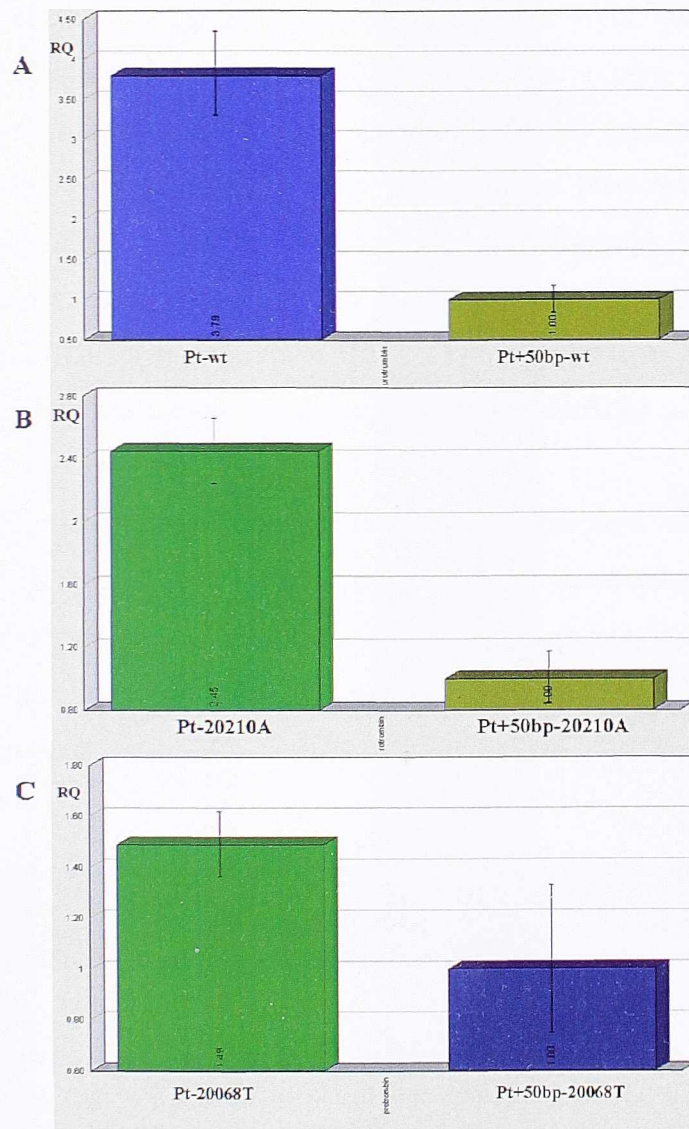


Slika 22 Relativna kvantifikacija ekspresije gena za protrombin metodom Real-Time PCR za pCIneoΔSV40Pt+50bp konstrukte.

kalibrator: Pt+50bp-wt, pCIneoΔSV40- vektor bez inserta, RQ-relative quantification

Poređenje Pt+50bp-wt i Pt-wt konstrukata pokazuje da odsustvo fragmenta od 50bp FR sekvence u kome se nalazi DSE element protrombinskog 3' kraja, dovodi do skoro 4 puta veće ekspresije kraćeg konstrukta. Njegovo odsustvo ima nešto manji efekat kada je prisutan 20210A polimorfizam, odnosno u poređenju sa Pt+50bp-20210A, Pt-20210A konstrukt ima 2,45 puta (95%CI 2,00-2,638) veću ekspresiju.

Najmanji efekat je detektovan pri poređenju Pt+50bp-20068T sa Pt-20068T gde je dobijena razlika u ekspresiji od 1,49 (95%CI 1,366-1,621). Histogrami ovih poređenja prikazani su na slici 23.



*Slika 23* Relativna kvantifikacija ekspresije konstrukata Pt i Pt+50bp serije metodom Real-Time PCR

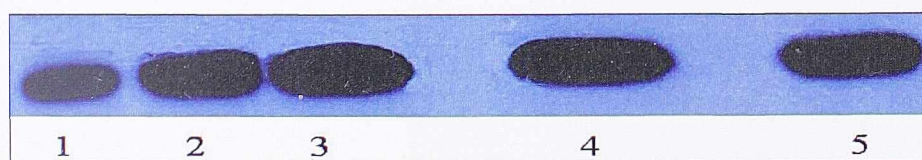
A) kalibrator: Pt+50bp-wt, B) kalibrator: Pt+50bp-20210A, C) kalibrator: Pt+50bp-20068T  
RQ-relative quantification

#### 4.2.4 Kvantifikacija količine protrombina u plazmi

Kod pacijenata koji su nosioci C20068T polimorfizma kvantifikovana je količina protrombina u uzorcima plazme. U tu svrhu je korišćen metod relativne kvantifikacije signala dobijenog Western blot analizom. Standardna komercijalna plazma je korišćena kao kontrolni uzorak u odnosu na koji su iskazivane dobijene vrednosti.

Nakon razdvajanja elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu i transfera na membranu, proteini uzoraka standardne plazme i plazme pacijenata sa C20068T polimorfizmom inkubirani su sa primarnim antitelom za protrombin i sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena. Vizuelizacija signala je vršena hemiluminescentnim supstratom, a detekcija je vršena na fotosenzitivnom filmu (slika 24). Relativna kvantifikacija signala koji odgovara količini proteina, vršena je uz pomoć softvera BioDocAnalyze, koji je u sklopu sistema za dokumentaciju gelova (CCD kamera Biometra).

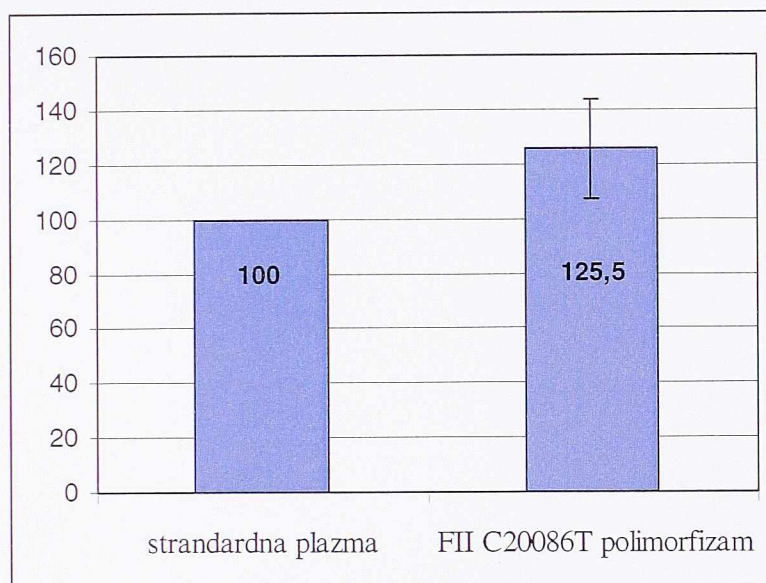
Radi preciznije kvantifikacije na gel je nanošen standardni uzorak u tri različite količine i to 50% (0,5 $\mu$ L), 100% (1 $\mu$ L) i 150% (1,5 $\mu$ L) standardne plazme i po 1 $\mu$ L plazme pacijenata. Kvantifikacija je rađena na uzorcima plazme dva pacijenta koji su nosioci C20068T polimorfizma. Pacijenti nisu bili pod antikoagulantnom terapijom u vreme uzimanja uzoraka.



*Slika 24* Western blot analiza nivoa protrombina u plazmi pacijenata koji su nosioci FII C20068T polimorfizma

1) 0,5 $\mu$ L standardne plazme, 2) 1 $\mu$ L standardne plazme, 3) 1,5  $\mu$ L standardne plazme, 4) i 5) 1 $\mu$ L plazme pacijenta sa FII C20068T polimorfizmom

U odnosu na standardnu plazmu (referentna vrednost 100) u plazmi pacijenata sa C20068T polimorfizmom detektovan je povišeni nivo protrombina  $125,5 \pm 18,3$ , što je grafički prikazano na slici 25.



*Slika 25* Relativna kvantifikacija količine protrombina u plazmi pacijenata koji su nosioci FII C20068T polimorfizma u odnosu na uzorak standardne plazme

# 5. Diskusija

Uticaj 3' kraja na ekspresiju gena je daleko manje proučen u odnosu na 5' kraj i promotorski region. Međutim, novija istraživanja ukazuju na to da je učešće ovog regiona u regulaciji ekspresije daleko kompleksnije nego što se pretpostavljalo i da se u okviru njega nalazi veći broj potencijalnih regulatornih elemenata, čiji mehanizmi delovanja još uvek nisu rasvetljeni.

Ova studija je obuhvatila strukturnu i funkcionalnu analizu 3' kraja gena za protrombin sa ciljem rasvetljavanja mehanizama kojima 3' kraj i polimorfizmi locirani u okviru njega, utiču na ekspresiju protrombina i patogenezu trombofilije.

## 5.1 STRUKTURNA ANALIZA 3' KRAJA GENA ZA PROTROMBIN

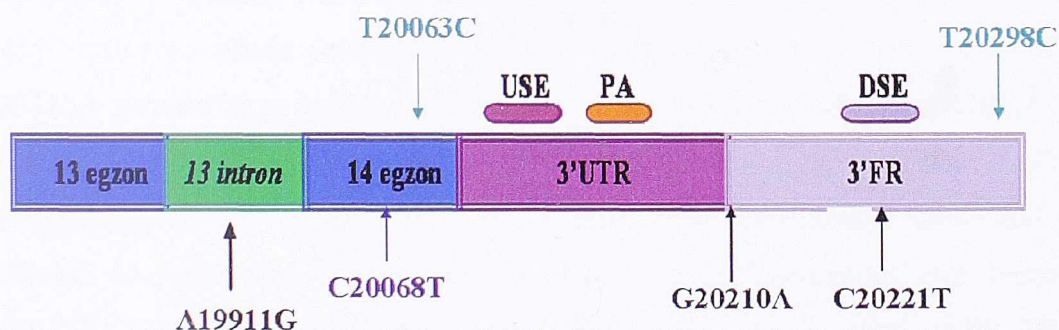
Strukturna analiza je obuhvatila skrining 54 pacijenta sa trombofilijom koji nisu nosioci FII G20210A polimorfizma, a kod kojih je detektovana povišena aktivnost protrombina. Protrombin je jedan od reaktanata akutne faze, pa njegova povišena aktivnost može biti izazvana i nekim inflamatornim procesom u organizmu. Stoga su iz grupe pacijenata koja je analizirana isključeni svi koji su imali povišeni nivo fibrinogena, koji je, takođe, reaktant akutne faze. Međutim, uprkos strogoj selekciji novi polimorfizmi su identifikovani samo kod dva pacijenta (3,7%). Jedno od mogućih objašnjenja je činjenica da 3' kraj gena predstavlja samo jednu od brojnih komponenti koje učestvuju u regulaciji genske ekspresije kod eukariota. Region promotora ima veoma značajnu ulogu u tom procesu. Identifikovan je pojačivač (*enhancer*) u 5' kraju, lociran oko 1kb od start kodona protrombinskog gena, koji bi potencijalno mogao da utiče na njegovu ekspresiju. U ovom regionu se vezuje više transkripcionih faktora, ali u okviru njega, do sada, nisu identifikovani polimorfizmi koji su povezani sa patogeneзом nekog oboljenja, uključujući i trombofiliju [35,37]. Povišena aktivnost proteina takođe može biti rezultat mutacija u kodirajućem regionu gena koje dovode do njegove veće aktivnosti. Međutim, sve mutacije koje su do sada opisane u kodirajućem delu gena za protrombin dovode do njegove smanjene aktivnosti i/ili smanjene količine proteina. Naravno, treba imati u vidu i činjenicu da je u okviru ove studije pretraživan samo region veličine 415bp nizvodno od Stop kodona gena za protrombin. Rezultati novijih istraživanja pokazuju da je dužina



3' kraja eukariotskih gena mnogo veća od pretpostavljene i da tek predstoji proučavanje uloge udaljenih regiona [67,68]. To ostavlja mogućnost da je povišena aktivnost protrombina kod nekih pacijenata iz ove grupe posledica postojanja polimorfizama u nizvodnim regionima 3' kraja protrombinskog gena, koji nisu analizirani u ovoj studiji.

### 5.1.1 Analiza učestalosti polimorfizama 3' kraja gena za protrombin

Analiza učestalosti polimorfizama 3' kraja gena za protrombin obuhvatila je G20210A polimorfizam, za koga je dokazano da predstavlja faktor rizika za nastanak trombofilije, kao i dva polimorfizma (A19911G, i C20221T) koji su u literaturi već povezivani sa patogeneom trombofilije. Takođe su analizirana i tri polimorfizma koji su detekovani skininom 3' kraja protrombinskog gena u ovoj studiji. Polimorfizmi **T20063C**, **T20298C** i **C20068T** su u ovoj studiji po prvi put razmatrani kao mogući faktori rizika za nastanak trombofilije. Položaj analiziranih polimorfizama je dat na slici 26.



Slika 26 Položaj analiziranih polimorfizama u 3' kraju gena za protrombin

- polimorfizmi ranije povezani sa patogeneom trombofilije; polimorfizmi koji su u ovoj studiji povezani sa patogeneom trombofilije: ● ranije opisani, ● opisani prvi put i ovoj studiji

USE- upstream sequence element; PA- poliadenilacioni signal; DSE- downstream sequence element; UTR- untranslated region; FR- flanking region

Analiza učestalosti **FII G20210A polimorfizma** je potvrdila da on predstavlja statistički značajan faktor rizika za nastanak trombofilije (OR 3,99, p=0,047). Detektovan je kod 11% pacijenata i 3% ispitanika kontrolne grupe. Ovi rezultati su u skladu sa

objavljenim frekvencama za našu populaciju, kao i sa frekvencama dobijenim u drugim populacijama [142,143,144].

**FII A19911G polimorfizam**, opisan 2001. godine, nalazi se u poslednjem intronu protrombinskog gena i pokazano je da dovodi do blagog povećanja nivoa protrombina u plazmi. Nosioci GG genotipa, imaju nivo protrombina od 107,2 U/dL u odnosu na 99,0 U/dL koliko je izmereno kod nosilaca AA genotipa [123]. Iako je u više studija ispitivana učestalost ovog polimorfizma u drugim populacijama [123,124,125,145], njena zastupljenost u našoj populaciji do sada nije analizirana. U okviru naše studije, A19911G polimorfizam je detektovan kod 74 pacijenta sa trombofilijom i 70 ispitanika kontrolne grupe. U obe grupe je otkriven po 51 heterozigotni nosilac, dok je homozigota bilo 23% u grupi pacijenta i 19% u kontrolnoj grupi (OR 1,27,  $p=0,603$ ). Dobijene učestalosti odgovaraju ranije publikovanim podacima za evropske populacije [123,124,125]. Perez-Ceballos i saradnici su u španskoj populaciji utvrdili da homozigotni GG genotip predstavlja faktor rizika od 1,37 ( $p=0,179$ ) [124]. U velikoj MEGA studiji, koja je obuhvatila skoro 5000 pacijenata i 5000 kontrola iz više različitih zemalja, pokazano je da je 19911GG genotip faktor rizika od 1,43 (95%CI 1,27-1,67) u odnosu na 19911AA [145]. Studije su takođe pokazale da postoji *linkage disequilibrium* između A19911G i G20210A polimorfizma koji je lociran u njegovoj blizini. U pomenutoj MEGA studiji, 19911GG genotip nije detektovan ni kod jednog homozigotnog nosioca G20210A polimorfizma, dok je kombinacija 19911GG/20210GA detektovana samo kod jednog pacijenta. U italijanskoj studiji, koja je obuhvatila 367 ispitanika, ova kombinacija (19911GG/20210GA) je detektovana kod dva pacijenta [125]. U našoj studiji, 19911GG genotip nije detektovan ni kod jednog nosioca drugih ispitivanih polimorfizama. Iako su neke studije pokazale da prisustvo A19911G polimorfizma u heterozigotnom obliku povećava rizik za nastanak tromboza kod nosilaca 20210GA genotipa [123,145], naši rezultati to ne potvrđuju. U našoj populaciji 20210GA genotip predstavlja faktor rizika od 3,99 (95%CI 1,08-14,79), dok ta vrednost za haplotip 19911AG/20210GA iznosi 2,43 (95%CI 0,61-9,69). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Martinelli i saradnika koji se odnose na italijansku populaciju [125]. Rezultati naše studije, dobijeni za kombinaciju A19911G i C2068T polimorfizama takođe pokazuju da prisustvo 19911GA genotipa ne dovodi do povećanja rizika za nastanak tromboza kod nosioca C2068T polimorfizma.

**FII C20221T polimorfizam** nije detektovan ni kod jednog ispitanika u našoj studiji. Ovaj polimorfizam je prvi put opisan 2001. godine kod devetogodišnjeg dečaka koji je razvio trombozu nakon transplantacije bubrega, usled čega je došlo do odbacivanja transplantiranog organa. Kod njega je detektovana aktivnost protrombina od 119%. Otac i mlađa sestra su bili asimptomatski heterozigotni nosioci ovog polimorfizma [120]. Godinu dana kasnije, opisan je dvadesetosmogodišnji pacijent sa Budd-Chiari sindromom, koji je takođe bio heterozigotni nosilac C20221T polimorfizma. Izmerena protrombinska aktivnost je iznosila 115%. Njegova dva asimptomatska brata su takođe bila heterozigotni nosioci ovog polimorfizma [121]. Treći opisani slučaj je pacijentkinja sa više spontanih pobačaja i trudnoćom koja se završila u 35. nedelji, rođenjem bebe sa interuterinim zastojem u rastu. Autori navode da je izmerena aktivnost protrombina kod nje bila 134% [122]. Do sada nisu publikovani podaci o učestalosti ovog polimorfizma ni za jednu populaciju, tako da su rezultati ove studije prvi na tom polju. Oni ukazuju na to da se radi o retkom polimorfizmu. Prema rezultatima ove studije, s obzirom da nije detektovan ni kod jednog od 100 pacijenata i 100 ispitanika kontrolne grupe, njegova učestalost u našoj populaciji je niža od 1%.

**FII T20063C** i **FII T20298C**, su novi polimorfizmi detektovani skriningom 3' kraja protrombinskog gena u okviru ove studije. T20063C varijanta je smeštena u poslednjem egzonu i dovodi do zamene aminokiseline fenilalanina na poziciji 606 aminokiselinom izoleucinom. T20298C polimorfizam se nalazi u delu 3' FR sekvence. Oni predstavljaju novootkrivene polimorfizme tako da nema podataka o njihovoj učestalosti. U okviru ove studije oni su pronađeni kod jednog od 54 pacijenata sa povišenim nivoom protrombina u plazmi. Međutim, nisu detektovani ni kod jednog od 100 pacijenata i 100 zdravih subjekata u okviru kontrolne grupe, tako da se najverovatnije radi o retkim polimorfizmima čija je učestalost manja od 1%.

**Polimorfizam C20068T**, koji se nalazi u poslednjem egzonu gena za protrombin, je takođe detektovan skriningom u okviru ove studije. U NCBI/SNP bazi podataka utvrđeno je da je ovaj polimorfizam registrovan pod brojem rs3136532. Detektovan je u okviru PGA-Europen-Panel grupe (*PGA-Programs for Genomic Applications*) gde je od 22 testirana subjekta bele rase, jedan bio heterozigotni nosilac ovog polimorfizma (4,5%). HapMap grupa (deo internacionalnog **Haplotype Map** projekta) je analizom 60 ispitanika

iz Evrope detektovala ovaj polimorfizam kod 1 ispitanika (1,7%). U okviru naše studije C20068T je u heterozigotnom obliku detektovan kod 3% pacijenta i 1% zdrave populacije. Heterozigotni nosioci su tri puta učestaliji u grupi pacijenata u odnosu na ispitanike kontrolne grupe, ali ta razlika nije statistički značajna ( $p=0,687$ ). Homozigotni nosioci ovog polimorfizma nisu detektovani. U okviru PGA-African-Panel grupe, koja je obuhvatila 21 ispitanika, ovaj polimorfizam nije detektovan. HapMap grupa ga takođe nije detektovala na uzorku od 90 ispitanika iz Azije i 60 iz Afrike. Ovi rezultati ukazuju da je C20068T, slično kao i G20210A polimorfizam, prisutan kod belaca, a veoma redak kod drugih rasa. U okviru naše studije, analogno G20210A polimorfizmu, C20068T nije detektovan u kombinaciji sa 19911GG homozigotnim genotipom, dok kombinacija 19911AG/20068CT predstavlja faktor rizika od 2,02 (95%CI 0,18-22,64), što je vrlo slično faktoru rizika koji nosi kombinacija 19911AG/2021GA 2,43 (95%CI 0,61-9,69).

### **5.1.2 3' kraj protrombinskog gena i somatski mozaicizam**

Termin mozaicizam označava da u okviru jednog organizma postoji deo ćelija čija se DNK razlikuje od ostalih, pri čemu nije reč o ćelijama koje su maligno transformisane [146]. S obzirom da mogu da se detektuju citogenetskim tehnikama, prvi su opisani i najintenzivnije proučavani mozaicizmi na nivou hromozoma (bilo da se radi o razlici u broju hromozoma ili o hromozomskim aberacijama), dok se mnogo manje zna o mozaicizmu na nivou pojedinačnih baznih zamena [146].

Opšte je prihvaćeno da mozaicizam predstavlja redak događaj. Do sada je kod oko 30 monogenских oboljenja potvrđeno postojanje mozaika [146,147]. Međutim, prisustvo mozaicizma kod multifaktorijalnih bolesti i njegov eventualni uticaj na patogenezu ovih oboljenja, da sada nisu razmatrani.

G20210A polimorfizam u 3' kraju protrombinskog gena predstavlja potvrđeni faktor rizika za pojavu trombofilije i deo je rutinskih dijagnostičkih testova. U okviru ove studije, po prvi put je opisan somatski mozaicizam za ovaj polimorfizam. Kod jedne pacijentkinje, G20210A polimorfizam je detektovan u uzorku koji je izolovan iz ćelija bukalne sluzokože, nije detektovan u uzorku DNK iz periferne krvi, dok je u uzorku izolovanom iz ćelija korena kose, traka koja odgovara mutiranom alelu detektovana u

minimalnoj količini. Oba roditelja pacijentkinje nisu testirana, tako da se ne može sa sigurnošću govoriti o tome da li je mozaik nastao *de novo* ili reverzijom nasleđenog polimorfizma, ali obzirom da je G20210A polimorfizam prisutan u dva od tri testirana uzorka pacijentkinje, verovatnije je da se radi o reverziji. Ovakvoj interpretaciji dobijenih rezultata, indirektno ide u prilog i pozitivna porodična anemneza (deda, otac i stric pacijentkinje su imali trombotičke manifestacije).

Ovo je prvi somatski mozaicizam koji je opisan kod gena čiji su polimorfizmi povezani sa nastankom trombofilije. Kod pacijentkinje nisu identifikovani drugi trombofilni faktori rizika, tako da se otvara pitanje kako razmatrati mozaicizam u kontekstu postojećih algoritama terapije, koji se razlikuju ukoliko su prisutni nasledni faktora rizika. Takođe se otvara pitanje šta predstavlja adekvatni uzorak na kome treba vršiti testiranje. Kako se protrombin predominantno sintetiše u jetri, pretpostavlja se da prisustvo polimorfizma u ćelijama jetre ima presudan uticaj na njegovu ekspresiju. Međutim, uzimanje uzorka jetre nije primenljivo u rutinskoj dijagnostici trombofilija. U većini laboratorija se testiranje na prisustvo ovog polimorfizma vrši na uzorku periferne krvi koja je mezodermalnog porekla, dok je jetra endodermalnog porekla [148,149]. Na taj način, postoji mogućnost da se prisustvo eventualnog mozaika za G20210A polimorfizam, koji predstavlja faktor rizika za pacijenta, ne detektuje u standardnom testiranju. Razmatrano iz ugla embrionalnog porekla, ćelje bukalne sluzokože su adekvatniji uzorak jer su kao i jetra endodermalnog porekla [150].

U okviru ove studije, kod jedne pacijentkinje su detektovana dva nova polimorfizma T20063C i T20298C u haplotipu. Međutim, ni jedan od ovih polimorfizama nije otkriven ni kod jednog od roditelja. Metodom tipizacije DNK potvrđeno je roditeljstvo, pa pretpostavljamo da su ova dva polimorfizma nastala *de novo*. Testiranjem uzoraka DNK izolovanih iz krvi i bukalne sluzokože pokazano je da su polimorfizmi prisutni samo u DNK izolatu iz krvi, odnosno da su ova dva polimorfizma, takođe somatski mozaicizam u genu za protrombin, koji je nastao *de novo*. Za sada u literaturi nema podataka o *de novo* polimorfizmima u genu za protrombin.

U somatskom mozaiku za G20210A polimorfizam, koji je opisan u našoj studiji, G20210A je, takođe, detektovan u haplotipu sa novim polimorfizmom C20061T. Da li

haplotip ima neku posebnu ulogu u pojavi mozaicizma u 3' kraju gena ostaje da se utvrdi u daljnim istraživanjima.

3' kraj gena je u odnosu na kodirajući region i 5' kraj gena daleko manje rigidna struktura. Razmatrano sa evolucionog stanovišta, veći stepen slobode koji postoji u ovom regionu pruža mogućnost modulacije "sudbine" gena i samim tim razvoj potencijalno novih mehanizama regulacije ekspresije [151]. Pojava *de novo* ili reverzija polimorfizama može predstavljati jedan od mogućih mehanizama. U nedavno objavljenoj studiji, Gottlieb i saradnici su detektovali SNPs u okviru BAK1 gena na uzorcima DNK izolovanim iz tkiva abdominalne aorte pacijenata sa aneurizmima i zdravih ljudi, kao i na odgovarajućim uzorcima periferne krvi ovih ispitanika. Detektovali su različite polimorfizme u tkivu i perifernoj krvi i kod pacijenata i kod zdravih kontrola [152]. Moguće je da je uzrok niske frekvence do sada detekovanih mozaika na nivou polimorfizama, u nedovoljno osetljivim tehnikama, ali verovatno udeo u tome ima i nedostatak istraživanja na tom polju. Sa izuzetkom kancera, testiranje uzoraka različitog embionalnog porekla kod istog pacijenta nije deo rutinskog postupka.

Na osnovu dva primera u ovoj studiji ne može se zaključivati o učestalosti mozaicizma u 3' kraju protrombinskog gena kao ni eventualnom uticaju na ekspresiju i patogenezu trombofilija. Međutim, ova studija po prvi put ukazuje na mogući značaj mozaicizma u patogenezi multifaktorijskih bolesti, i svakako treba nastaviti istraživanja u tom pravcu.

### 5.1 FUNKCIONALNA ANALIZA POLIMORFIZAMA 3' KRAJA GENA ZA PROTROMBIN I ZNAČAJ ANALIZIRANIH POLIMORFIZAMA KAO MARKERA TROMBOFILIJE

U okviru ove studije kao metod za funkcionalnu analizu polimorfizama 3' kraja gena za protrombin, odabrana je relativna kvantifikacija iRNK Real-Time PCRom. Sa ciljem da se izbegnu mogući artefakti koji su posledica himernih sekvenci, umesto korišćenja reporter gena, izabran je eksperimentalni sistem koji prati uticaj 3' kraja protrombinskog gena na ekspresiju samog protrombina.

Jedan od ključnih elemenata za praćenja ekspresije metodom Real-time PCRa jeste izbor adekvatne endogene kontrole koja će služiti za normalizaciju dobijenih rezultata [153]. Odlučili smo se da koristimo gen za neomicinN-transferazu koji nije uobičajan izbor za endogenu kontrolu, pogotovu što se on u našem eksperimentalnom sistemu eksprimira sa ukloniranih konstrukata. Međutim takav izbor ima više prednosti. Ekspresija gena za neomicinN-transferazu je nezavisna od prisustva polimorfizama ili određenih regiona 3' kraja, koji su target ovog istraživanja, što je osnovni zahtev koji endogena kontrola treba da ispuni [153,154]. Količina sintetisane iRNK za ovaj enzim je direktno srazmerna broju insertovanih kopija konstrukta u genom transfekovanih ćelija što omogućava da ovako izabrana endogena kontrola predstavlja ujedno i kontrolu uspešnosti transfekcije (u vektoru se nalazi u odnosu 1:1 sa cDNK za protrombin, čija se ekspresija prati).

Sa druge strane, ovakav izbor targeta i endogene kontrole ima i otežavajuće elemente. Obzirom da se ekspresija vrši sa konstrukata koji sadrži cDNK, uobičajni pristup da se dizajniranjem prajmera na egzon/egzon spoju izbegne uticaj DNK kontaminacije se ne može primeniti. Da bi se izbegla eventualna kontaminacija sa DNK, RNK izolati su tretirani *DNAzom*.

Kao potencijalni trombofilni markeri u okviru ove studije, analizirani su ranije opisani: A19911G i C20221T polimorfizmi, kao i tri polimorfizma detektovana u ovoj studiji: T20063C, T20298C i C20068T, od kojih su na funkcionalnom nivou analizirani T20063C i C20068T polimorfizmi (slika 26).

### **A19911G**

Sve dosadašnje studije u kojima je određivan nivo protrombina u plazmi nosioca A19911G polimorfizma su pokazale da njegova prisustvo dovodi do blago povišenog nivoa protrombina [123,125,145]. Međutim, jos uvek nije u potpunosti razjašnjen mehanizam kojim on dovodi do povišenog nivoa proteina. Pokazano je da poslednji intron može da utiče na efikasnost 3' obrade, i da prisustvo GGG motiva (što je slučaj kada je A19911G polimorfizam prisutan) u okviru introna predstavlja motiv koji povećava efikasnost iskrajanja pre-iRNK transkripta [155,156]. Funkcionalnu analizu A19911G polimorfizma uradili su von Ahsena i Oelleric koristeći sistem reporter gena luciferaza/ $\beta$ -galaktozidaza [139]. Ovako postavljeni eksperiment je pokazo da je G

nukleotid na 19911. mestu za oko 30% efikasniji u iskrajanju introna. Međutim, kada su iza gena za luciferazu uklonirali dužu protrombinsku sekvencu, za konstrukt koji je sadržao 19911G-20210G kombinaciju detektovana je manja ekspresija u odnosu na konstrukt 19911A-20210G, što je u suprotnosti sa *in vivo* dobijenim podacima. Deo objašnjenja može da leži u činjenici da nastali fuzioni proteini mogu da utiču na aktivnost reporter gena nezavisno od ukloniranih polimorfizama, tako da zabeležena razlika potiče od njihove novonastale interakcije koja *in vivo* nije prisutna [157].

U okviru naše studije određena je učestalost A19911G polimorfizma koja je pokazala da se radi o veoma čestom polimorfizmu (frekvencija G alela je 0,48 u grupi pacijenta i 0,44 u kontrolnoj grupi). Takođe, naši rezultati ukazuju da A19911G predstavlja mali faktor rizika za nastanak trombofilije (OR 1,27,  $p=0,603$ ) i da nema osnova da se uključi u rutinski panel testova. Eventualno ga treba uzeti u razmatranje kada je u kombinaciji sa drugim polimorfizmima.

#### **FII C20221T**

Danckwardt i saradnici su, koristeći konstrukte u kojima je deo 3' kraja  $\beta$ -globinskog gena zamenjen 3' krajem gena za protrombin, pokazali da prisustvo C20221T polimorfizma dovodi do povećane ekspresije  $\beta$ -globinskog gena. To su objasnili činjenicom da polimorfizam uvodi dodatni T nukleotid u DSE region, koji je u genu za protrombin siromašan T nukleotidima [94]. Činjenica da C20221T nismo detektovali ni kod jednog ispitanika u našoj studiji ukazuje da je u našoj populaciji redak. Obzirom da se radi o funkcionalnom polimorfizmu, njegov značaj kao potencijalnog dijagnostičkog markera za trombofiliju ne treba u potpunosti odbaciti. Međutim, imajući u vidu njegovu učestalost nema osnova da bude uključen u rutinski panel testova, već ga treba razmatrati kod pacijenata kod kojih je detektovan povišeni nivo protrombina.

#### **T20063C i T20298C**

T20063C polimorfizam je lociran u poslednjem egzonu protrombinskog gena. U literaturi za sada ne postoje podaci da se u ovom delu gena nalaze neki regulatorni elementi koji bi mogli da utiču na ekspresiju. Na nivou proteina, ovaj polimorfizam dovodi do zamene fenilalanina izoleucinom na poziciji 606 u proteinu, u S1 proteaznom domenu, ali u delu koji se ne nalazi u katalitičkom regionu. Predikcija sekundarne strukture koja je urađena uz pomoć PSIPRED v2.6 programskog paketa je pokazala da



prisustvo ovog polimorfizma ne dovodi do promene u strukturi proteina (slika 27). To je donekle bilo i očekivano s obzirom da on dovodi do zamene dve neutralne aminokiseline.



**Slika 27** Predikcija sekundarne strukture protrombina u regionu od 560-620 aminokiseline u prisustvu T20063C polimorfizma

Funkcionalna analiza urađena u ovoj studiji je pokazala da konstrukt Pt+50bp-20063C ima skoro identičnu ekspresiju kao i *wt* i da ne dovodi do povećane ekspresije.

Za sada nije poznato da li se u 3' FR regionu protrombinskog gena u kome se nalazi T20298C polimorfizam nalaze i neki regulatorni elementi koji mogu da utiču na ekspresiju. Prema bazi podataka NCBI/SNP u blizini ovog polimorfizma je opisan još jedan polimorfizam A20300G sa frekvencom heterozigota od 0,4%, ali on nije za sada povezan sa patogeneozom nekog oboljenja.

S obzirom da su T20063C i T20298C polimorfizmi veoma retki u našoj populaciji (nisu detektovan ni kod jednog od 100 pacijenta i 100 ispitanika iz kontrolne grupe) i oni ne predstavljaju potencijalno značajan trombofilni marker. Funkcionalna analiza za T20063C polimorfizam, takođe pokazuje da nema razlike u ekspresiji konstrukt sa ovim polimorfizmom u odnosu na *wt* konstrukt. Međutim, ova dva polimorfizma su detektovana u haplotipu, pa postoji mogućnost da je za ispoljavanje njihovog uticaja na ekspresiju gena za protrombin potrebna njihova interakcija.

**C20068T**

C20068T pripada grupi *silence* polimorfizama, odnosno dovodi do zamene treće baze u kodonu, ali ne dovodi do aminokiselinske zamene na nivou proteina. Funkcionalna analiza C20068T u okviru ove studije je pokazala da u poređenju sa pt+50bp-wt konstruktom, konstrukt koji sadrži ovaj polimorfizam dovodi do 1,64 puta povećane ekspresije ( $p < 0,05$ ). Ovo povećanje ekspresije je vrlo slično povećanju detektovanom kod konstrukt koji sadrži 20210A varijantu, a za koga je dokazano da predstavlja faktor rizika za nastanak trombofilije (1,65). Relativnom kvantifikacijom količine protrombina u plazmi pacijenata koji su nosioci ovog polimorfizma potvrđeno je da oni imaju povećani nivo ovog proteina ( $125,5 \pm 18,3$  u odnosu na 100, koliko je referentna vrednost za standardnu plazmu). Pored toga, analiza učestalosti je pokazala da je ovaj polimorfizam tri puta učestaliji u grupi pacijenta u odnosu na kontrolnu grupu koju čine zdravi ispitanici.

U poslednjih desetak godina, sve je više studija koje pokazuju da koncept o *silence* polimorfizmima kao ne funkcionalnim jer ne dovode do promene na proteinskom nivou treba modifikovati. Sve češće se termin *silence*, koji naglašava da oni nemaju funkciju, zamenjuje terminom *synonymous* koji ih bolje opisuje [158,159]. Najviše podataka ima o uticaju sinonimnih polimorfizama na ekspresiju gena preko uticaja na iskrajanje iRNK, pre svega tako što njihovo postojanje generiše ektopično mesto za iskrajanje [160]. Takođe je opisan i mehanizam u okviru koga prisustvo sinonimnog polimorfizma dovodi do generisanja retkog kodona, što onda direktno utiče na brzinu sinteze nekog proteina, i time potencijalno remeti proces za koji je neophodno prisustvo tog proteina [159]. Za više sinonimnih polimorfizama je pokazano da uticajem na obradu iRNK mogu biti uključeni u patogenezu multiple skleroze ili autizma [161,162].

Šta je u osnovi mehanizma kojim C20068T polimorfizam dovodi do povišenog nivoa protrombina, tek treba rasvetliti, ali prema rezultatima ove studije on predstavlja potencijalno značajni marker trombofilije.

### 5.3. ANALIZA UTICAJA RAZLIČITIH REGIONA 3' KRAJA NA EKSPRESIJU GENA ZA PROTROMBIN

Za eksperimente analize uticaja različitih regiona 3' kraja gena na ekspresiju, dizajnirane su dve serije konstrukata: 1) oni koji su sadržali 3' UTR sa USE regulatornim elementom (Pt konstrukti) i 2) oni kojima je region 3' UTRa produžen za 50bp FR regiona u okviru kojih se nalazi DSE regulatorni element (Pt+50bp konstrukti), tako da su sadržali oba opisana regulatorna elementa. USE element 3' kraja gena za protrombin je relativno dobro proučen, dok o ulozi DSE elementa ima manje podataka [94,98]. Ovako dizajnirani konstrukti su omogućili bolje rasvetljavanje funkcije DSE elementa.

#### 5.3.1 Uticaj DSE elementa na ekspresiju protrombinskog gena

Kod gena sa nekanonskom organizacijom 3' kraja kao što su protrombin, lamin B2, kolagen i C2 komplement, uloga DSE regulatornog elementa nije do kraja razjašnjena. Sachchithanathan i saradnici su pokazali da se iskrajanje i poliadenilacija protrombinske iRNK obavlja i kada konstrukti sadrže samo cDNK za protrombin, zaključno sa 3' UTRom, odnosno, da DSE element, za razliku od USE elementa, nije neophodan za ekspresiju protrombina [94,141]. Rezultati naše studije su to i potvrdili, jer je ekspresija detektovana kod serije Pt konstrukata, bilo da se radi o *wt* sekvenci ili su prisutni polimorfizmi. Međutim, kada se uporede ekspresije konstrukata serije Pt i Pt+50bp svi konstrukti koji sadrže dodatnih 50bp nizvodne sekvence imaju nižu ekspresiju. Ta razlika je najuočljivija kada se porede dva *wt* konstrukta i iznosi skoro 4 puta. Da prisustvo 3' FR sekvence protrombinskog gena dovodi do smanjenja ekspresije pokazali su i Danckwardt i saradnici koji su za konstrukt *βglobinski gen-protrombinski 3'UTR-protrombinski3'FR* dobili 3,9 puta manju ekspresiju nego za konstrukt *βglobinski gen-protrombinski3'UTR-βglobinski3'FR* [94]. Naši rezultati su u saglasnosti sa njihovim, kao i sa ranije postavljenim modelom nekononske organizacije 3' kraja gena za protrombin, u okviru koga je DSE element manje efikasan u iskrajanju zbog manje sposobnosti da veže proteinski kompleks CstF [94]. Suprotno našim rezultatima Sachchithanathan i saradnici su u svojoj studiji za kraći konstrukt koji se završava sa 3' UTRom dobili nešto manju ekspresiju u odnosu na konstrukt koji sadrži i DSE sekvencu

(1,5 u odnosu na 1,7) [141]. Jedno od objašnjenja ove razlike može biti u činjenici da su naša i studija Danckwardt-a rađene na diferenciranim ćelijskim linijama (Cos-7 i HeLa), dok je u studiji Sachchithanathan-a i saradnika korišćena HEK-293 ćelijska linija, koja vodi poreklo od ćelija bubrega humanog embriona [40,147]. Pokazano je da je proces embriogeneze i diferencijacije ćelija povezan sa korišćenjem alternativnih poliadenilacionih signala, i da zavisno od stepena diferencijacije postoji razlika u korišćenju udaljenih poliadenilacionih signala, što u *in vitro* uslovima može da utiče na generisanje kriptičnih poliadenilacionih signala u regionu vektorske sekvence koji onda utiču na ekspresiju [76,163].

U našoj studiji, poređenjem vrednosti dobijenih za Pt-20210A i Pt+50bp-20210A konstrukte, pokazano je da prisustvo DSE regiona, takođe dovodi do smanjenja ekspresije, ali za razliku od poređenja dva *wt* konstrukta, kada su u pitanju dva konstrukta sa 20210A polimorfizmom, to smanjenje iznosi približno 2,5 puta ( $p < 0.05$ ). Ako ove rezultate razmotrimo iz ugla modela nekanonske organizacije 3' kraja protrombinskog gena, najveće smanjenje ekspresije je detektovano u slučaju prisustva "obe greške", odnosno manje efikasnog mesta iskrajanja (20210G) i DSE elementa koji nije efikasan u 3' obradi, dok u slučaju 20210A polimorfizma dolazi do "popravke jedne greške" i manje razlike u ekspresiji.

Kod Pt+50bp-20068T konstrukta detektovana je oko 1,5 puta manja ekspresija u odnosu na Pt-20068T. Najmanja razlika koja je zabeležena za ove konstrukte može biti posledica udaljenosti DSE elementa od C20068T polimorfizma i samim tim manjeg uticaja, ali i različitih mehanizama interakcije između ovih elemenata.

### **5.3.2 Interakcija između DSE elementa i G20210A polimorfizma**

G20210A polimorfizam predstavlja značajan faktor rizika za nastanak trombofilije i sve dosadašnje analize su potvrdile da se radi o funkcionalnom polimorfizmu. I pored velikog broja studija, tačan mehanizam kojim on dovodi do povišenog nivoa proteina još uvek nije do kraja rasvetljen.

Rezultati ove studije, po prvi put ukazuju na značaj DSE elementa za ispoljavanje efekta G20210A polimorfizma na ekspresiju gena. Poređenjem serije konstrukata koji sadrže samo 3' UTR protrombinskog gena detektovana je slična ekspresija konstrukata

koji sadrže *wt* i 20210A polimorfizam (RQ 1 vs. RQ 0,81). Nasuprot tome, kod konstrukata koji pored 3' UTRa sadrže i 50bp nizvodne sekvence, u okviru koje se nalazi DSE element, za konstrukt sa 20210A polimorfizmom deketovana je 1,65 puta povećana ekspresija u odnosu na *wt*.

Gehring i saradnici su prvi ukazali na značaj polimorfizma G20210A, kao potpuno novog genetičkog mehanizma u okviru koga zamena jednog baznog para u 3' kraju gena dovodi do povišene ekspresije gena, a time i do nastanka oboljenja. Oni su u svojim eksperimentima koristili konstrukte kod kojih je 3' kraj  $\beta$  globinskog gena zamenjen regionom koji je sadržao 3' UTR i 62bp 3' FR sekvence gena za protrombin i njima su transfekovali HepG<sub>2</sub> ćelijsku liniju. Northen analizom i kvantifikacijom iRNK za  $\beta$  globin pokazali su, da konstrukt koji sadrži varijantu 20210A dovodi do 1,8 puta povećane ekspresije u odnosu na *wt* [164]. U okviru naše studije koristili smo nešto drugačiji eksperimentalni pristup. Nismo koristili reporter gen, već smo uticaj polimorfizma G20210A pratili kvantifikacijom same iRNK za protrombin. Konstrukti korišćeni u našoj studiji su takođe bili neznatno kraći (3' UTR i 50bp 3' FR sekvence) i za transfekciju je korišćena Cos-7 ćelijska linija. Međutim, rezultati koje smo dobili poređenjem ekspresije *wt* i konstrukata sa varijantom 20210A (1,65 puta povećanje ekspresije) su potpuno u saglasnosti sa rezultatima Gehringove studije. Analogne rezultate dobili su Ceelie i saradnici koji su koristili dual-reporter assay (*Firefly luciferase/Renilla luciferase*). Oni su 3' kraj gena za luciferazu zamenili sa 3' UTR i 88bp 3' FRa gena za protrombin i tim konstruktom transfekovali HepG<sub>2</sub> ćelijsku liniju. Merenjem luciferazne aktivnosti su pokazali da prisustvo 20210A polimorfizma dovodi do 1,2 puta povećane ekspresije reporter gena [165].

Carter i saradnici su u svojim eksperimentima koristili konstrukte koji su sadržali cDNK za protrombin, zaključno sa krajem 3' UTRa, bez nizvodne sekvence FR. Njima su stabilno transfekovali NIH-3T3 ćelije i koristili su Real-Time metod za kvantifikaciju protrombinske iRNK, uz korišćenje ribozomalne RNK kao endogene kontrole. Njihovi rezultati pokazuju da u ovako postavljenom eksperimentu konstrukt sa 20210A polimorfizmom dovodi do 2,8 puta povećane ekspresije u odnosu na *wt* konstrukt [140], što je u suprotnosti sa rezultatima naše studije koji pokazuju da nema razlike u ekspresiji *wt* i 20210A konstrukta u Cos-7 ćelijama kada DSE element nije prisutan. Međutim, u

ovoj studiji su korišćeni pCIneo vektori kojima SV40 virusni poliadenilacioni signal nije deletiran, tako da se njegov uticaj ne može isključiti. Takođe, s obzirom da su stabilno transfekovane ćelije dobijane mešanjem klonova, postavlja se pitanje normalizacije dobijenih rezultata. Rezultati Real-time PCRa su direktno zavisni od broja insertovanih kopija konstrukta u genom ćelije domaćina, tako da je kontrola uspešnosti transfekcije neophodna, a ribozomalna RNK nije odgovarajući parametar.

U prilog našim rezultatima da je za ispoljavanje "efekta" G20210A polimorfizma neophodan DSE element, ide i podatak da nema razlike u selekciji mesta isecanja transkripta kod *wt* i 20210A konstrukata ukoliko DSE element nije prisutan. Tek u konstruktima koji sadrže i 50bp FRa sa DSE elementom dolazi do alelspecifičnog obrasca iskrajanja 3' kraja iRNK transkripta [141].

Sličan efekat DSE elementa na ekspresiju uočen je i kod C20068T polimorfizma. Povećana ekspresija u odnosu na *wt* varijantu je detektovana samo u poređenju Pt+50bp-20008T i Pt+50bp-*wt* konstrukata, dok je poređenjem kratkih konstrukata u kojima DSE element nije prisutan, mutirani konstrukt ima za skoro 40% nižu ekspresiju ( $p < 0,05$ ). Ovo upućuje na složenu interakciju između DSE elementa i ovog polimorfizma, koju je potrebno dalje istraživati.

### **5.3.3 Kraj poslednjeg egzona protrombinskog gena kao potencijalno značajni regulatorni region**

U okviru ove studije detektovano je više polimorfizama 3' kraja protrombinskog gena u od kojih su C20061T, T20063C i C20068T locirani u neposrednoj blizini (kodoni za 605., 607. i 608. aminokiselinu), u poslednjem egzonu. To ukazuje da ovaj region može biti potencijalno značajan za regulaciju ekspresije.

U literaturi postoji više studija koje potvrđuju da poslednji intron i egzon imaju značajnu ulogu u obradi 3' kraja i da su transkripcija i iskrajanje integrisani procesi koji bitno utiču jedan na drugi [79,80,155]. Za protrombinski gen je pokazano da su proces iskrajanja poslednjeg egzona i pospešivanje obrade 3' kraja kompleksno povezani sa regulatornim elementom USE, uz učešće specifičnih proteina vezanih za iskrajanje iRNK [95].

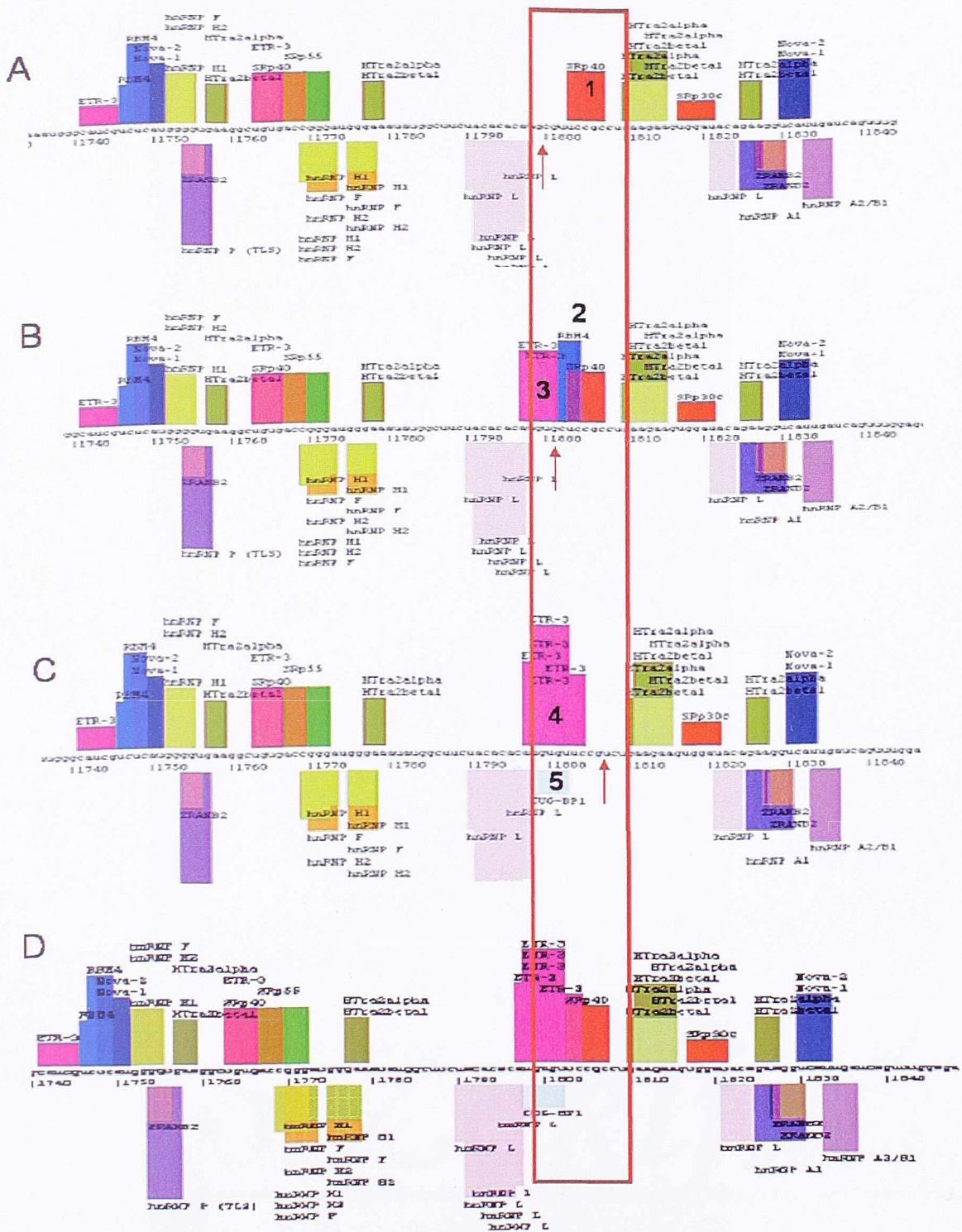
Kompijterska predikcija vezivanja transkripcionih faktora za poslednji egzon u kome se nalaze analizirani polimorfizmi, programskim paketima TFSEARCH i MATINSPECTOR, nije pokazala nikakvu razliku u odnosu na *wt* sekvencu.

Predikcija vezivanja proteina koji učestvuju u iskrajanju i obradi iRNK, uz pomoć SpliceAid baze podataka prikazana je na slici 28.

Za *wt* sekvencu ovog regiona se potencijalno vezuju sledeći proteini: ETR-3, CUG-BP i Srp40. Svi oni pripadaju grupi proteina koji učestvuju u alternativnoj obradi pre-iRNK transkripta. ETR-3 (*elav-type ribonucleoprotein*) i CUG-BP (*CUG binding protein*) prepoznaju CUG ponovke na RNK i eksprimirani su u većem broju tkiva [166,167]. SRP-40, često se naziva i SFRS5 (*splicing factor, arginine/serine-rich 5*), takođe ima ulogu u iskrajanju transkripta [168] (slika 28).

Prisustvo C20068T polimorfizama ukida mesto vezivanja za SRP-40 protein, dok prisustvo T20063C polimorfizma kreira mesto za vezivanje RBM4 (*RNA binding motif protein 4*) proteina, za koga je pokazano da učestvuje u translaciji, procesima utišavanja RNK (*RNA silencing*), kao i u alternativnoj obradi transkripta [169]. Kada je C20061T polimorfizam prisutan, predikcija pokazuje da se za ovaj region potencijalno vezuje samo SRP-40 protein (slika 28).

Predikcija ukazuje da je analizirani region poslednjeg egzona protrombinskog gena potencijalno uključen u mehanizme alternativne obrade pre-iRNK, međutim potrebna su dalja istraživanja kako bi se ti mehanizmi rasvetlili i samim tim objasnili uloga polimorfizama lociranih u ovom regionu.



Slika 28 Predikcija vezivanja proteina koji učestvuju u iskrajanju i obradi iRNK

A) C20061T, 1-Srp40; B) T20063C, 2-RBM4C, 3-ETR3; C) C20068T, 4- ETR3, 5-CUG-BP;

D) wt sekvenca



## 6. Závěrucci

1. Pretraživanjem 3' kraja gena za protrombin identifikovana su tri nova polimorfizma:
  - a) T20063C lociran u poslednjem egzonu i dovodi do zamene fenilalanina izoleucinom na poziciji 606,
  - b) C20068T lociran u poslednjem egzonu i kako je treća baza u kodonu ne dovodi do aminokiselinske zamene,
  - c) T20298C lociran u 3' FR regionu (u delu za koji do sada nisu opisani regulatorni elementi).
  
2. U grupi pacijenata sa trombofilijom i u kontrolnoj grupi određene su frekvence za dva ranije opisana polimorfizma u 3' kraju gena za protrombin, kao i za tri nova polimorfizma:
  - a) A19911G polimorfizam u homozigotnom obliku je zastupljen kod 23% kod pacijenta i 19% kod kontrolnih ispitanika (OR 1,27,  $p=0,603$ )
  - b) C20068T polimorfizam u heterozigotnom obliku je zastupljen kod 3% pacijenta i 1% kod kontrolnih ispitanika (OR 2,14,  $p=0,687$ )
  - c) C20221T, T20063C i T20298C polimorfizmi nisu detektovani ni kod jednog ispitanika.
  
3. U okviru strukturne analize 3' kraja protrombinskog gena, po prvi put je opisan somatski mozaicizam za G20210A polimorfizam, čime je otvoreno pitanje značaja mozaicizma u patogenezi multifaktorijalnih bolesti.
  
4. Funkcionalna analiza konstrukata sa C20068T polimorfizmom je pokazala da njegovo prisustvo dovodi do 1,64 puta povećane ekspresije u odnosu na nemutirani konstrukt ( $p<0,05$ ). Za konstrukt sa T20063C polimorfizmom je pokazano da nema razlike u ekspresiji u odnosu na nemutirani konstrukt.

5. Funkcionalnom analizom je pokazano da prisustvo dela 3' FR sekvence u kojoj se nalazi regulatorni region DSE dovodi do smanjene ekspresije protrombina. To smanjenje je najizraženije kada se porede dva nemutirana konstrukta ( $\approx 4$  puta), manje je kod konstrukata koji sadrže 20210A alel ( $\approx 2,5$  puta) i najmanje kod konstrukata sa 20068T alelom ( $\approx 1,5$  puta).
6. Deo 3' FR sekvence (sa DSE regionom) je neophodan da bi G20210A polimorfizam doveo do povećane ekspresije protrombinskog gena.
7. Deo poslednjeg egzona gena za protrombin (region od 20061-20068. nukleotida) je identifikovan kao potencijalno značajan regulatorni region.
8. Na osnovu strukturne i funkcionalne analize C20068T polimorfizam je identifikovan kao novi, potencijalno značajni marker trombofilije.

# 7. *Literatura*

1. Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S, (2006) Haemostasis and Thrombosis, Basic principles and clinical practice, 5th ed. Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins, Chapter A: 2-15.
2. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis *Thromb Haemost* 2001;85:958-965.
3. Ruggeri ZM. Mechanisms Initiating Platelet Thrombus Formation. *Thromb Haemost* 1997;78:611-616.
4. Gross S, Roarh S, (2000) Hematology, A problem-oriented approach Williams & Wilkins, Section 5, Chapter 30:570-571.
5. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M, Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia* 1998;4:331-334.
6. Dang QD, Vindigni A, Dicera E, An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 5977-5981.
7. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light SR, Bode W, Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 2000; 404: 518-525.
8. Degen JL, Genetic Interaction between the coagulation and fibrinolytic system. *Thromb Haemost* 2001;86:30-37.
9. Elezović I. Urođene i stečene trombofilije. *Bilten za transfuziologiju* 2000; (Suppl 1):16-25.
10. März W, Nauck M, Wieland H. The molecular mechanisms of inherited thrombophilia. *Z Kardiol* 2000;89:575-586.
11. Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S, (2006) Haemostasis and Thrombosis, Basic principles and clinical practice, 5th ed. Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins, Chapter A: 2-15.
12. Griffin JH, Evatt B, Wideman C. Anticoagulant protein C Pathway defective in majority of thrombophilia patients. *Blood* 1993;82:1989-1993.
13. Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:516-530.
14. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of prothrombin C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68:1370-1373.
15. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT, Familial preprotein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984;74:2082-2088.

16. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1994; 269: 31869-80.
17. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-6.
18. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: Clinical implications. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 367-79.
19. Lane D, Grant P. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease *Blood* 2000;95(5): 1517-32.
20. 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.
21. Bertina RM, Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001;86:92-103.
22. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995;10:111-113.
23. van Hylckama, Vlieg A, Komanasin N, Ariens RA, Poort SR, Grant PJ, Bertina RM, Rosendaal FR. Factor XIII Val34Leu polymorphism, factor XIII antigen levels and activity and the risk of deep venous thrombosis. *Br J Haematol* 2002;119:169-175.
24. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Scarabin PY, Bara L, Green F, Cambien F. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde*. *Circulation* 1996;93:440-449.
25. Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, D'Orazio A, Di Bitondo R, Donati MB, Iacoviello L. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost* 1998;79(2):354-358.
26. Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetic of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7:301-304.

27. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation *New Eng J Med* 1999;34:801-806.
28. Favaloro EJ, McDonald D, Lippi G. Laboratory investigation of thrombophilia: the good, the bad, and the ugly. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35(7):695-710.
29. Khor B, Van Cott EM. Laboratory evaluation of hypercoagulability. *Clin Lab Med.* 2009;29(2):339-66.
30. Degen S.J.F., Davie E.W. (1987) Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin *Biochemistry*, 26: 6165-77.
31. Degen S.J.F., Schaefer L.A., Jamison C.S., Grant S.G., Fitzgibbon J.J., Pai J.A., Chapman V.M., Elliott R.W. (1988) Characterization of the cDNA coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosome 2 *DNA Cell Biol*, 9: 487-98.
32. McDuffie FC, Giffin C, Niedringhaus R, Mann KG, Owen CA Jr, Bowie EJ, Peterson J, Clark G, Hunder GG. Prothrombin, thrombin and prothrombin fragments in plasma of normal individuals and of patients with laboratory evidence of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 1979;16(5-6):759-73.
33. Itai Yanai, Hila Benjamin, Michael Shmoish, Vered Chalifa-Caspi, Maxim Shklar, Ron Ophir, Arren Bar-Even, Shirley Horn-Saban, Marilyn Safran, Eytan Domany, Doron Lancet, Orit Shmueli. Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification *Bioinformatics* 2005;5: 650-659.
34. Chow BK, Ting V, Tufaro F, MacGillivray RT. Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene. *J Biol Chem.* 1991; 266(28):18927-33.
35. Bancroft JD, Schaefer LA, Degen SJ. Characterization of the Alu-rich 5'-flanking region of the human prothrombin-encoding gene: identification of a positive cis-acting element that regulates liver-specific expression. *Gene.* 1990;95(2):253-60.
36. Bancroft JD, McDowell SA, Degen SJ. The human prothrombin gene: transcriptional regulation in HepG2 cells. *Biochemistry.* 1992;31(49):12469-76.
37. 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(8):1688-98.
38. Quick AJ, Hussey CV. Hereditary hypoprothrombinemias. *Lancet* 1962; 279279: 173-177.
39. 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.
40. Henriksen RA, Mann K G. Substitution of valine for glycine-558 in the congenital dysthrombin thrombin Quick II alters primary substrate specificity. *Biochemistry* 1989;28:2078-2082.
41. Lefkowitz JB, Haver T, Clarke S, Jacobson L, Weller A, Nuss R, Manco-Johnson M, Hathaway WE. The prothrombin Denver patient has two different prothrombin point mutations resulting in glu300-to-lys and glu309-to-lys substitutions. *Brit J Haemat* 2000;108:182-187.
42. Rabiet M-J, Furie BC, Furie B. Molecular defect of prothrombin Barcelona: substitution of cysteine for arginine at residue 273. *J Biol Chem* 1986; 261: 15045-15048.
43. Morishita E, Saito M, Kumabashiri I, Asakura H, Matsuda T, Yamaguchi K. Prothrombin Himi: a compound heterozygote for two dysfunctional prothrombin molecules (met-337-to-thr and arg-388-to-his). *Blood* 1992; 80: 2275-2280.
44. Magnusson S, Sottrup-Jensen L, Petersen TE, Morris HR, Dell A. Primary structure of the vitamin K-dependent part of prothrombin. *FEBS Lett* 1974;44(2):189-93.
45. Chu AJ. Biochemical strategies to anticoagulation: a comparative overview. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2(3):199-228.
46. 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(2):310-4.
47. Park CH, Tulinsky A. Three-dimensional structure of the kringle sequence: structure of prothrombin fragment 1. *Biochemistry* 1986;25(14):3977-82.
48. 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):729-35.
49. 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(2):641-7.



50. Liu LW, Rezaie AR, Carson CW, Esmon NL, Esmon CT. Occupancy of anion binding exosite 2 on thrombin determines Ca<sup>2+</sup> dependence of protein C activation. *J Biol Chem* 1994;269(16):11807-12.
51. Girolami A, Simoni P, Scarano L, Carraro G Prothrombin and the prothrombin 20210G to A polymorphism: their relationship with hypercoagulability and thrombosis *Blood Rev* 1999; 13: 205-10.
52. Downing MR, Butkowski RJ, Clark MM, Mann KG. Human prothrombin activation. *J Biol Chem* 1975;250(23):8897-906.
53. Seegers WH, McCoy L, Kipfer RK, Murano G. Preparation and properties of thrombin. *Arch Biochem Biophys.* 1968;128(1):194-201.
54. Seegers WH, McCoy LE, Walz DA, Reuterby J, Andary TJ. Isolation of thrombin-E and the evolution of enzyme activity from prothrombin. *Experientia.* 1974;30(10):1130-2.
55. Hantgan R, McDonagh J, Hermans J. Fibrin assembly. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;408:344-66.
56. Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S, (2006) *Haemostasis and Thrombosis, Basic principles and clinical practice*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Chapter 10: 193-213.
57. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med.* 2006;38(6):378-88.
58. Celikel R, McClintock RA, Roberts JR, Mendolicchio G L, Ware J, Varughese KI, Ruggeri ZM. Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ib-alpha. *Science* 2003; 301:218-221.
59. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem.* 1989;264(9):4743-6.
60. Glenn KC, Frost GH, Bergmann JS, Carney DH. Synthetic peptides bind to high-affinity thrombin receptors and modulate thrombin mitogenesis. *Pept Res* 1988;1(2):65-73.
61. Reiter R, Derhaschnig U, Spiel A, Keen P, Cardona F, Mayr F, Jilma B. Regulation of protease-activated receptor 1 (PAR1) on platelets and responsiveness to thrombin receptor activating peptide (TRAP) during systemic inflammation in humans. *Thromb Haemost* 2003;90(5):898-903.

62. 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(6):501-12.
63. Chen D, Dorling A. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. *J Thromb Haemost* 2009 ;7 (Suppl 1):122-6.
64. Chang CJ, Hsu LA, Ko YH, Chen PL, Chuang YT, Lin CY, Liao CH, Pang JH. Thrombin regulates matrix metalloproteinase-9 expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385(2):241-6.
65. Licatalosi DD, Darnell RB. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat Rev Genet* 2010; 11(1):75-87.
66. Strachan T, Read AP. (1999) *Human Molecular Genetics 2* 2nd ed., New York City: John Wiley & Sons.
67. 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):1-21.
68. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 2002;3(3):REVIEWS0004.
69. Colgan DF, Manley JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 1997;11(21):2755-66.
70. Chen F, MacDonald CC, Wilusz J. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 1995;23(14):2614-20.
71. 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(19):5799-805.
72. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005; 434(7031):338-45.
73. Yan J, Marr TG. Computational analysis of 3'-ends of ESTs shows four classes of alternative polyadenylation in human, mouse, and rat. *Genome Res* 2005;15(3):369-75.
74. Ji Z, Lee JY, Pan Z, Jiang B, Tian B. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(17):7028-33.

75. Shi Y, Di Giammartino DC, Taylor D, Sarkeshik A, Rice WJ, Yates JR 3rd, Frank J, Manley JL. Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. *Mol Cell* 2009;33(3):365-76.
76. 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(2):405-45.
77. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 2007 ;8(7):533-43.
78. Lewis JD, Izaurralde E, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW. A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev* 1996;10(13):1683-98.
79. Millevoi S, Loulergue C, Dettwiler S, Karaa SZ, Keller W, Antoniou M, Vagner S. An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *EMBO J* 2006;25(20):4854-64.
80. Li X, Manley JL. Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. *Genes Dev* 2006;20(14):1838-47.
81. Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO J* 2008;27(3):482-98.
82. Buratowski S. Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17(3):257-61.
83. Jackson RJ, Standart N. Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 1990;62(1):15-24.
84. Proudfoot NJ. Genetic dangers in poly(A) signals. *EMBO Rep* 2001;2(10):891-2.
85. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(6):1670-4.
86. Bernstein P, Peltz SW, Ross J. The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 1989;9(2):659-70.
87. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004 1;32:D109-11.
88. Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 1999;96(3):307-10.
89. Hartevelde CL, Losekoot M, Haak H, Heister GA, Giordano PC, Bernini LF. A novel polyadenylation signal mutation in the alpha 2-globin gene causing alpha thalassaemia. *Br J Haematol* 1994;87(1):139-43.

90. Orkin SH, Cheng TC, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human beta-globin gene. *EMBO J* 1985;4(2):453-6.
91. Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F, O'Briant KC, Zhu Q, Fuleihan RL, Shigeoka AO, Ochs HD, Chance PF. A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics*. 2001;53(6):435-9.
92. Yasuda M, Shabbeer J, Osawa M, Desnick RJ. Fabry disease: novel alpha-galactosidase A 3'-terminal mutations result in multiple transcripts due to aberrant 3'-end formation. *Am J Hum Genet*. 2003;73(1):162-73.
93. Uitte de Willige S, Rietveld IM, De Visser MC, Vos HL, Bertina RM. Polymorphism 10034C>T is located in a region regulating polyadenylation of FGG transcripts and influences the fibrinogen gamma'/gammaA mRNA ratio. *J Thromb Haemost*. 2007;5(6):1243-9.
94. 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(2):428-35.
95. 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(11):2658-69.
96. 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(9):4942-51.
97. 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(8):2660-9.
98. 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(45):42733-40.
99. 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(16):2522-34.

100. Hall-Pogar T, Zhang H, Tian B, Lutz CS. Alternative polyadenylation of cyclooxygenase-2. *Nucleic Acids Res.* 2005 May 4;33(8):2565-79.
101. Danckwardt S, Hartmann K, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE. 3' end processing of the prothrombin mRNA in thrombophilia. *Acta Haematol.* 2006;115(3-4):192-7.
102. Djordjevic V, Rakicevic LJ, Radojkovic D. An overview of genetic risk factors in thrombophilia. *Srp Arh Celok Lek.* 2010;138(Suppl 1):79-81.
103. Chamouard P, Pencreach E, Maloisel F, Grunebaum L, Ardizzone JF, Meyer A, Gaub MP, Goetz J, Baumann R, Uring-Lambert B, Levy S, Dufour P, Hauptmann G, Oudet P Frequent factor II G20210A mutation in idiopathic portal vein thrombosis *Gastroenterology.* 1999;116:144-48.
104. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999;340(1):9-13.
105. Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, Sandmann W, Zotz RB. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med.* 2000;342(6):374-80.
106. Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):112-23.
107. Brenner B, Aharon A. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Clin Perinatol.* 2007; 34(4):527-41.
108. Kovac M, Mitic G, Mikovic Z, Djordjevic V, Savic O, Mandic V, Rakicevic LJ, Antonijevic N, Radojkovic D. Thrombophilia in Women with Pregnancy-Associated Complications: Fetal Loss and Pregnancy-Related Venous Thromboembolism. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(4):233-238.
109. Pabinger I. Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Thromb Res.* 2009;123 Suppl:S16-21.
110. de Moerloose P, Boehlen F. Inherited thrombophilia in arterial disease: a selective review. *Semin Hematol.* 2007;44(2):106-13.
111. Boekholdt SM, Kramer MH. Arterial thrombosis and the role of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33(6):588-96.
112. 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(4):706-8.
113. Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, Horellou MH, Seligsohn U. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood.* 1998 Aug 15;92(4):1119-24.
114. 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(3):152-6.
115. Hooper C, 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;118:767-8.
116. 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(10):2285-7.
117. 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(5):1078-85.
118. 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 Aug;51(8):1560-1.
119. 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(5):1064-8.
120. 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(5):943-4.
121. 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(4):852-3.

122. 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. *Mol Diagn.* 2003;5(4):250-3.
123. 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(6):1066-70.
124. 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. *J Haematol.* 2002;118(2):610-4.
125. Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, Mannucci PM. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Tromb Haemost.* 2006;4(12):2582-6.
126. Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. The CTAB-DNA precipitation method: A common mini scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing *Bio Techniques.* 1989;7:514.
127. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Lab. pp5;150-171.
128. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(8):2766-70.
129. Erlich HA. editor, (1989) *PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification,* Stocton Press.
130. McPherson MJ, Quireke P, Taylor GR, editors, (1991) *PCR. A practical approach.* Oxford University Press.
131. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Lab. pp-5;173-178.
132. Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of DGGE gels. *Clin Chem* 2000;46:883.
133. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual* Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Lab. pp2;55-75.
134. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual* Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Lab. pp;247-269.
135. Davis JM, edotor, (2002) *Basic cell culture. A practical approach. Second edition.* Oxford University Prees.

136. Kaplan J, Land S. Influence of Maternal-Fetal Histocompatibility and MHC Zygosity on Maternal Microchimerism. *J Immunol* 2005, 174:7123-7128.
137. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969;244(16): 4406-4412.
138. 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(2):195-203.
139. von Ahsen N, Oellerich M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood*. 2004;103(2):586-93.
140. Carter AM, Sachchithanathan M, Stasinopoulos S, Maurer F, Medcalf RL. Prothrombin G20210A is a bifunctional gene polymorphism. *Thromb Haemost*. 2002;87(5):846-53.
141. 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(3):1010-20.
142. Djordjevic V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D, Savic A. Prevalence of factor V Leiden, factor V Cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. *Acta Haematol*. 2004;112(4):227-9.
143. Bertina RM. Genetic Approach to Thrombophilia. *Thromb Haemost*. 2001;86:92.
144. Roldan V, Lecumberri R, Muñoz-Torrero JF, Vicente V, Rocha E, Brenner B, Monreal M; RIETE Investigators. Thrombophilia testing in patients with venous thromboembolism. Findings from the RIETE registry. *Thromb Res*. 2009;124(2):174-7.
145. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJ. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost*. 2006;4(12):2587-92.



146. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet.* 2002;3(10):748-58.
147. Gottlieb B, Beitel LK, Trifiro MA. Somatic mosaicism and variable expressivity. *Trends Genet.* 2001;17(2):79-82.
148. Ogawa M, Fraser S, Fujimoto T, Endoh M, Nishikawa S, Nishikawa SI. Origin of hematopoietic progenitors during embryogenesis. *Int Rev Immunol.* 2001;20(1):21-44.
149. Zhao R, Duncan S. Embryonic development of the liver. *Hepatology.* 2005;41(5):956-67.
150. Evers, Christine A., Lisa Starr. (2006) *Biology: Concepts and Applications.* 6th ed. United States:Thomson.
151. Conne B, Stutz A, Vassalli JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology?. *Nat Med* 2000;6(6):637-41.
152. Gottlieb B, Chalifour LE, Mitmaker B, Sheiner N, Obrand D, Abraham C, Meilleur M, Sugahara T, Bkaily G, Schweitzer M. BAK1 gene variation and abdominal aortic aneurysms. *Hum Mutat.* 2009;30(7):1043-7.
153. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005;39(1):75-85.
154. McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol.* 2007;8:107.
155. 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(2):849-62.
156. 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(8):4562-71.
157. van der Putten HH, Bertina RM, Vos HL. Is the prothrombin 19911A>G polymorphism a functional noncoding variant? *Blood.* 2005;105(7):2995.
158. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol.* 2009;578:23-39.

159. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-8.
160. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebukova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008;456(7221):470-6.
161. Fedetz M, Matesanz F, Caro-Maldonado A, Fernandez O, Tamayo JA, Guerrero M, Delgado C, López-Guerrero JA, Alcina A. OAS1 gene haplotype confers susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 2006;68(5):446-9.
162. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics*. 2004;113(5):e472-86.
163. Ji Z, Lee JY, Pan Z, Jiang B, Tian B. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(17):7028-3.
164. 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(4):389-92.
165. Ceelie H, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-end formation. *J Thromb Haemost*. 2004;2(1):119-27.
166. Lu X, Timchenko NA, Timchenko LT. Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*. 1999;8(1):53-60.
167. Pascual M, Vicente M, Monferrer L, Artero R. The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation*. 2006;74(2-3):65-80.
168. Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fisette JF, Revil T, Chabot B. hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol*. 2007;623:123-47.
169. Markus MA, Morris BJ. RBM4: a multifunctional RNA-binding protein. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(4):740-3.

Elektronske baze podataka

1. **Online Mendelian Inheritance in Man:** [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)
2. **Entrez Gene:** [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)
3. **Pub Med:** [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
4. **SpliceAid:** database of RNA-Splicing: [www.introni.it/splicing.html](http://www.introni.it/splicing.html)
5. **Matinspector:** [www.genomatix.de/matinspector.html](http://www.genomatix.de/matinspector.html)
6. **TFSEARCH:** Searching Transcription Factor Binding Sites:  
[www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)







РД 20756



300161916

COBISS •