

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

**Ing. Tereza Fenclová**

Přirozené inhibitory koagulačních faktorů, jejich úloha v prevenci trombózy a v procesech  
imunitní odpovědi, angiogeneze a karcinogeneze

Physiological anticoagulants and their role in thrombosis prevention, immune response,  
angiogenesis, and carcinogenesis

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Ingrid Hrachovinová, Ph.D.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28. 3. 2024

Ing. Tereza Fenclová

.....

**Identifikační záznam:**

FENCLOVÁ, Tereza. *Přirozené inhibitory koagulačních faktorů, jejich úloha v prevenci trombózy a v procesech imunitní odpovědi, angiogeneze a karcinogeneze. [Physiological anticoagulants and their role in thrombosis prevention, immune response, angiogenesis, and carcinogenesis]*. Praha, 2024. 78 stran, 0 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta. Ústav hematologie a krevní transfuze. Vedoucí závěrečné práce: Hrachovinová, Ingrid.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Ingrid Hrachovinové, Ph.D. za odborné vedení, příležitost naučit se novým metodám a poznatkům a v neposlední řadě za trpělivost.

Můj dík také patří kolegům a kolegyním z Národní referenční laboratoře pro hemostázu, především Mgr. Daně Provazníkové, Ph.D. za její neocenitelné rady a podporu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala také svému snoubenci MUDr. Ivanu Zahradkovi, který mi byl oporou po celou dobu studia.

## Abstrakt

Přirozené inhibitory koagulace jsou významnou regulační složkou hemostázy. Vzhledem k množství funkcí nejen v regulaci hemostázy jsme se v této práci zaměřili konkrétně na protein S (PS) a práci jsme rozdělili do tří dílčích částí. Cílem první části bylo nalézt kauzální mutace v genu *PROS1* u kohorty pacientů s vrozeným deficitem PS pomocí Sangerova sekvenování a metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Deficit PS je významným známým rizikovým faktorem pro vznik žilní trombózy, nicméně vzhledem k struktuře PS lze formulovat hypotézu, že mutace v určitých částí PS budou rizikovější než v jiných. Proto jsme dále analyzovali vliv polohy mutace na riziko trombózy u v této kohortě pacientů s vrozeným deficitem PS. V druhé části práce bylo naším cílem popsat pozorované získané deficity PS u kohorty pacientů Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha s hematologickými malignitami. Na závěr ve třetí části bylo cílem ověřit stabilitu PS a dalších koagulačních parametrů v podmínkách zmražené plazmy, což má důležitý přesah jak do každodenní laboratorní praxe, tak pro diagnostiku deficitu PS.

Kauzální mutace v genu *PROS1* byla nalezena u 73/79 (92 %) pacientů. Celkem bylo identifikováno 34 různých mutací, z nichž 15 nebylo dosud popsáno. Výskyt mutací nevykazuje soustředění v žádné oblasti genu. Velkou delecí metodou MLPA jsme identifikovali u 3 rodin (7 %), což odpovídá výskytu delecí popsanému v literatuře. Dále jsme zjistili, že poloha mutace v SHBG (sex-hormone binding globulin) doméně PS je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik trombózy a pacienti s těmito mutacemi také prodělali trombózu v mladším věku. U pacientů se získaným deficitem se aktivita PS signifikantně lišila mezi skupinami podle diagnózy s největším podílem patologických hodnot u pacientů s akutní myelomonocytární leukémií. V poslední části práce jsme prokázali dostatečnou stabilitu všech sledovaných parametrů včetně proteinu S, pokud byly uchovávány alespoň při -80 °C a zmražení probíhalo šokově. Při těchto podmínkách byly sledované parametry stabilní po dobu 6 měsíců, kromě krátkodobé anomálie na začátku skladování, kdy APTT, PS aktivita a PS volný antigen byly zvýšené nad nejistotu metody a po určité době se vrátily na úroveň výsledků z čerstvé plazmy (pouze vzorky skladované při -80 °C a méně).

Tato práce potvrzuje význam PS a jeho molekulární diagnostiky pro lepší odhad rizika trombózy u pacientů s vrozeným deficitem a zároveň ukazuje, jakým směrem by mohly být v budoucnu zaměřeny studie tohoto multifunkčního přirozeného inhibitoru koagulace.

**Klíčová slova:** Protein S, přirozené inhibitory koagulace, žilní tromboembolismus, SHBG doména, deficit proteinu S, riziko trombózy

## Abstract

Physiological anticoagulants play a significant regulatory role in hemostasis. Due to numerous functions not only in hemostasis regulation, we focused specifically on protein S (PS) in this work, which we divided into three parts. The aim of the first part was to identify causal mutations in the *PROSI* gene in a cohort of patients with inherited PS deficiency using Sanger sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). PS deficiency is a significant known risk factor for venous thrombosis; however, considering the structure of PS, we hypothesized that mutations in certain parts of PS would carry larger thrombotic risk than in others. Therefore, we further analyzed the influence of mutation position on thrombosis risk in this cohort of patients with inherited PS deficiency. In the second part of the work, our goal was to describe the observed acquired PS deficiencies in a cohort of patients from the Institute of Hematology and Blood Transfusion in Prague with hematological malignancies. Finally, in the third part, the aim was to verify the stability of PS and other coagulation parameters in frozen plasma conditions, which has important implications for both daily laboratory practice and the diagnosis of PS deficiency.

Causal mutations in the *PROSI* gene were found in 73/79 (92%) patients. A total of 34 different mutations were identified, 15 of which had not been described previously. The distribution of mutations does not show clustering in any region of the gene. We identified a large deletion using the MLPA method in 3 families (7%), corresponding to the occurrence of deletions described in the literature. Furthermore, we found that the mutation location in the sex-hormone binding globulin (SHBG) domain of PS is an independent risk factor for thrombosis, and patients with these mutations also experienced thrombosis at a younger age. In patients with acquired deficiency, PS activity significantly differed between groups according to diagnosis, with the highest proportion of pathological values observed in patients with acute myelomonocytic leukemia. In the last part of the work, we demonstrated sufficient stability of all monitored parameters, including protein S, if stored at least at  $-80^{\circ}\text{C}$  and snap-frozen. Under these conditions, the monitored parameters remained stable for 6 months, except for short-term anomalies at the beginning of storage, when APTT, PS activity, and free PS antigen were elevated above the method's uncertainty and

eventually returned to the level of results from fresh plasma (only samples stored at -80°C or lower).

This work confirms the significance of PS and its molecular diagnostics for better thrombosis risk estimation in patients with inherited deficiency and indicates future directions for studies of this multifunctional physiological coagulation inhibitor.

**Keywords:** Protein S, physiological anticoagulants, venous thromboembolism, SHBG domain, protein S deficiency, thrombotic risk



## Seznam zkratek

Ag – antigen, množství

APC – aktivovaný protein C (*activated protein C*)

APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový test (*activated partial thromboplastin time*)

AT – antitrombin (*antithrombin*)

BCR/ABL – fúzní gen protoonkogenu *ABL* s genem *BCR*, tzv. Filadelfský chromozom

C1-inh – C1-esterázový inhibitor (*C1-esterase inhibitor*)

C3b – fragment b složky komplementu C3

C4b – fragment b složky komplementu C4

C4BP – C4 vazebný protein (*C4 binding protein*)

cDNA – komplementární DNA syntetizovaná podle mRNA (*complementary DNA*)

CI – interval spolehlivosti (*confidence interval*)

CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý (*carbon dioxide*)

COVID-19 – koronavirové onemocnění 2019 (*coronavirus disease 2019*)

CV – variační koeficient (*coefficient of variation*)

dbSNP – databáze jednonukleotidových polymorfismů (*single nucleotide polymorphism database*)

DIC – diseminovaná intravaskulární koagulopatie (*disseminated vascular coagulopathy*)

DVT – hluboká žilní trombóza (*deep vein thrombosis*)

EGF – epidermální růstový faktor (*epidermal growth factor*)

F... – faktor (koagulační faktor), římské číslice označují konkrétní faktor

F...a – aktivovaná forma koagulačního faktoru, římské číslice označují konkrétní faktor

FAB – French-American-British klasifikace leukémií

FPS – volný antigen PS (*free protein S antigen*)

Gas6 – Growth Arrest Specific protein 6

HBS – vazebné místo pro heparin (*heparin-binding site*)

HCII – heparinový kofaktor II (*heparin cofactor II*)

HGMD – The Human Gene Mutation Database

HIF1 – hypoxií indukovaný faktor 1 (*hypoxia-induced factor 1*)

HIV – virus lidské imunodeficiencie (*human immunodeficiency virus*)

$\chi^2$  – chí kvadrátový test (*chi-square test*)

IL-6 – interleukin 6

IQR – interkvartilní rozptyl (*interquartile range*)  
ISTH – International Society of Thrombosis and Hemostasis  
K1, K2, K3 – Kunitz domény TFPI- $\alpha$   
KO – knock-out  
LG – laminin G  
MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
NF- $\kappa$ B – nukleární faktor kappa B (*nuclear factor kappa B*)  
NGS – sekvenování nové generace (*next-generation sequencing*)  
NO – oxid dusnatý (*nitric oxide*)  
OR – odds ratio  
PC – protein C  
PE – plicní embolie (*pulmonary embolism*)  
PS – protein S  
PSD – deficit proteinu S (*protein S deficiency*)  
PZ – protein Z  
RS – reakční místo (*reactive site*)  
RTK – receptorová tyrosin kináza (*receptor tyrosin kinase*)  
SERPINy – rodina inhibitorů serinových proteáz (*serine protease inhibitors*)  
SHBG – globulin vážící pohlavní hormony (*sex hormone-binding globulin*)  
SLE – systémový lupus erytematodes (*systemic lupus erytematodes*)  
SVT – povrchová žilní trombóza (*surface vein thrombosis*)  
TAFI – trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (*thrombin activated fibrinolysis inhibitor*)  
TAM – rodina tyrosinkinázových receptorů Tyro-3, Axl, Mer  
TAMR – TAM receptorové kinázy  
TF – tkáňový faktor (*tissue factor*)  
TFPI – inhibitor cesty tkáňového faktoru (*tissue factor pathway inhibitor*)  
TLR – toll-like receptor  
TM – trombomodulin (*thrombomodulin*)  
TSR – trombin senzitivní oblast PS (*thrombin sensitive region*)  
ÚHKH – Ústav Hematologie a Krevní Transfúze  
VTE – žilní tromboembolismus (*venous thromboembolism*)

# Obsah

<b>1. Teoretický úvod</b> .....	13
1.1 Regulace hemostázy.....	13
1.2 Přírozené inhibitory koagulačních faktorů.....	15
1.3 Struktura proteinu S .....	18
1.4 APC-kofaktorová funkce PS.....	20
1.5 TFPI- $\alpha$ kofaktorová funkce PS .....	21
1.6 Role Proteinu S v imunitní odpovědi.....	22
1.6.1 Role proteinu S v apoptóze.....	23
1.7 Role proteinu S v integritě endotelu .....	24
1.8 Protein S v karcinogenezi a metastatickém procesu .....	24
1.9 Vrozený deficit proteinu S .....	25
1.10 Získaný deficit proteinu S.....	27
<b>2. Cíle práce</b> .....	29
<b>3. Experimentální část</b> .....	29
3.1 Materiál a metody .....	29
3.2 Shrnutí výsledků .....	30
3.2.1 Přehled publikací a podíl práce doktoranda .....	30
3.2.2 Genetika vrozeného deficitu PS .....	31
3.2.3 Vliv polohy mutace v <i>PROS1</i> na riziko trombózy .....	34
3.2.4 Získaný deficit PS u hematologických pacientů .....	36
3.2.5 Stabilita PS a dalších koagulačních parametrů ve zmražené plazmě... ..	39
3.3 Publikace I .....	41
3.4 Publikace II .....	50
<b>4. Diskuze</b> .....	58
4.1 Mutační profil .....	58
4.2 Míra detekce mutací.....	58

4.3	Vliv typu mutace na hladinu PS.....	59
4.4	Fenotyp nově zachycených mutací .....	60
4.5	Vliv polohy mutace na riziko trombózy .....	62
4.6	Získaný deficit PS .....	63
4.7	Vliv mražení na stabilitu PS při skladování plazmy .....	64
<b>5.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>65</b>
	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>67</b>

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Regulace hemostázy

Hemostáza je proces, který udržuje integritu krevního oběhu při poranění. Zástava krvácení je při fyziologických podmínkách pečlivě regulována jak prokoagulačními, tak antikoagulačními a fibrinolytickými mechanismy. Pro řádné fungování tohoto procesu jsou nezbytné buněčné povrchy, především povrchy krevních destiček a endotelových buněk, stejně jako koagulační proteiny obsažené v plazmě. Interakce mezi aktivovanými krevními destičkami a koagulačními proteiny spolu s integrovanou amplifikací koagulační kaskády vedou k hemostatické reakci, která probíhá rychle (v řádu minut) a je lokalizována na místě poranění.

Cévní stěna je důležitým účastníkem a také regulátorem hemostázy. Probíhají zde mechanismy zodpovídající za první linii obrany proti vzniku trombózy, jako je syntéza oxidu dusnatého (NO) a prostacyklinu (Ignarro et al. 1987). Po poranění cévní stěny jsou kolagen a tkáňový faktor (TF) odhaleny proudem krve, což nastartuje jednak aktivaci a akumulaci destiček na místo poranění, a přes cestu tkáňového faktoru také generaci trombinu. Tato prvotní expozice je důležitým stimulem a proto je endoteliální dysfunkce jedním z hlavních rizikových faktorů trombózy (Lerman a Zeiher 2005).

Klasický model koagulace byl kategorizován na vnější cestu (iniciovanou TF/FVIIa), vnitřní cestu (iniciovanou kontaktem s negativně nabitými povrchy) a cestu společnou, která pokračuje od aktivace FX. Tento systém byl takto rozčleněn podle chování plazmatických koagulačních faktorů *in vitro*, nicméně jedná se o rozdělení umělé a nedostatečně popisující děje probíhající *in vivo*.

Aktuální model koagulace je založen na umístění na buněčném povrchu a zahrnuje tři fáze: iniciační, amplifikační a propagační. Tyto fáze se částečně překrývají. Proces koagulace začíná na buňkách s exponovaným TF a na povrchu aktivovaných destiček. V iniciační fázi jsou tyto buňky (a jejich části, tzv. mikropartikule) vystaveny koagulačním faktorům v oběhu. Dále jsou rekrutovány destičky, které se aktivují a adherují na místo poranění (De Caterina et al. 2013). TF tvoří komplex s FVIIa, který cirkuluje v plazmě částečně v aktivované formě. Tento komplex pak za přítomnosti vápníku rychle aktivuje FIX na FIXa a FX na FXa, což

vygeneruje stopové množství trombinu. V amplifikační fázi toto malé množství trombinu slouží jako signál pro další aktivaci destiček a současně jako induktor pro jejich agregaci. Na povrchu destiček trombin lokálně aktivuje FV, FVIII a FXI. V propagační fázi pak FVIIIa na destičkovém povrchu vytvoří komplex s FIXa (tenáza) a FVa s FXa (protrombináza), které významně urychlují tvorbu FXa, respektive trombinu. FXa vázaný na FVa je chráněn proti inhibici jak pomocí TFPI, tak antitrombinu (viz dále). Až v této propagační fázi vzniká dostatečné množství trombinu, aby mohl být fibrinogen přeměněn na nerozpustnou fibrinovou síť. Tato amplifikační kaskáda má potenciál vytvořit až 1000 molekul trombinu na jednu molekulu FXa. Trombin zároveň funguje ve zpětnovazebné smyčce, kdy sám zvyšuje svoji tvorbu pomocí aktivace FXI a kofaktorů FV a FVIII. Je také důležitý pro vznik pevné fibrinové sítě, neboť aktivuje FXIII (transglutaminázu), který stabilizuje vzniklou sraženinu crosslinkováním fibrinových vláken kovalentní vazbou. Trombin také aktivuje TAFI (trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy), čímž zabraňuje předčasné fibrinolýze.

Pokud patologické procesy překonají regulační mechanismy hemostázy, vede to k nadbytečné tvorbě trombinu a vzniku trombózy, která vede k zánětu cév a poškození tkání (Furie a Furie 2008). Naštěstí k tomu obvykle nedochází, neboť koagulace je regulována řadou mechanismů: rozředěním prokoagulantů v proudu krve, eliminací aktivovaných faktorů retikuloendoteliálním systémem (převážně v játrech), a regulací aktivovaných prokoagulantů a krevních destiček pomocí přirozených antikoagulačních drah a současně působící fibrinolýzy. Většina těchto regulačních systémů je také lokalizována na povrchích vaskulárních endoteliálních buněk a aktivovaných destiček, což umožňuje souběžné působení prokoagulačních i antikoagulačních mechanismů přímo v místě poškození. (Lane et al. 2005).

Trombóza je jedním z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělém světě. Dělí se podle lokalizace na arteriální a žilní trombózu, ta pak dále na povrchovou (SVT) a hlubokou žilní trombózu (DVT). Pokud se patologický trombus uvolní a zablokuje plicní oběh nebo mikrocirkulaci jiného orgánu (např. mozku), mluvíme o embolii, souhrnně se tomuto stavu pak říká žilní tromboembolismus (VTE). Rizikových faktorů, které přispívají ke vzniku trombózy je velké množství a dají se rozdělit na vrozené a získané. Vrozenými rizikovými faktory jsou například mutace FV Leiden, mutace protrombinu

G20210A, deficit antitrombinu, proteinu C nebo proteinu S (Mateo et al. 1997; Margaglione et al. 1998; Crowther a Kelton 2003; Dahlbäck 2008). Mezi nejčastější získané rizikové faktory patří například předchozí anamnéza trombózy, recentní chirurgický výkon, infekce, přítomnost centrálního žilního katetru, trauma, dlouhá imobilizace, nádorová onemocnění, těhotenství, myeloproliferativní syndrom, užívání orálních kontraceptiv, antifosfolipidový syndrom a další (Martinelli 2001; Heit et al. 2002; Ocak et al. 2013). U většiny pacientů, kteří prodělají VTE je přítomen více než jeden rizikový faktor zároveň, například při hospitalizaci po ortopedické operaci, která vede k delší imobilizaci, přičemž nejčastějším spouštěčem trombózy je probíhající akutní infekce (Rogers et al. 2012).

## 1.2 Přírodní inhibitory koagulačních faktorů

Tato dizertační práce je zaměřená na přírodní inhibitory koagulace, jejichž popis a funkce jsou předmětem této kapitoly. Přírodní inhibitory se podle cílové fáze účinku mohou rozčlenit do několika skupin.

### **Inhibitory iniciační fáze koagulace:**

- **TFPI (Tissue factor pathway inhibitor, Inhibitor cesty tkáňového faktoru)** – TFPI je inhibitor serinových proteáz, který obsahuje Kunitz domény, což jsou evolučně konzervované domény bohaté na cysteiny (Mast 2016; Mishra 2020). Tento antikoagulační protein působí v počáteční fázi koagulace dvěma způsoby, a to zablokováním aktivity komplexu TF-FVIIa a přímou inhibicí FXa. Obě tyto aktivity jsou významně amplifikovány vazbou Proteinu S na molekulu TFPI (viz dále). Je primárně syntetizován endotelem. TFPI cirkuluje v plazmě ve volné formě (TFPI- $\alpha$ ), která tvoří 10-20 % celkového plazmatického TFPI, a ve zkrácené formě (TFPI- $\beta$ ) vázané na lipoproteiny s nízkou hustotou a na povrchové glykosaminoglykany endotelu, která tvoří ~80 % celkového plazmatického TFPI. Plazmatická koncentrace TFPI se zvyšuje po intravenózním podání heparinu díky uvolňování endoteliálního TFPI- $\beta$ , což může přispívat k antitrombotickým účinkům heparinu. Nicméně většina antikoagulačního potenciálu leží ve volné formě TFPI- $\alpha$ , která obsahuje domény schopné vázat své kofaktory: Protein S a FV (Maroney a Mast 2015).

- **C1 esterázový inhibitor** – C1-inh je členem rodiny inhibitorů serinových proteáz (SERPINy). Je syntetizován v játrech. C1-inh inhibuje FXIIa, FXIa a prekalikrein, a také primárně komplementové proteázy C1r a C1s.

#### **Inhibitory amplifikační fáze koagulace:**

- **Aktivovaný Protein C (APC)** – Dráha proteinu C je významný zpětnovazebný mechanismus tlumící tvorbu trombinu v amplifikační a propagační fázi koagulace. Protein C je vitamin K-dependentní enzym syntetizovaný v játrech. V plazmě cirkuluje jako zymogen a je aktivován trombinem vázaným na trombomodulin (TM), integrální membránový protein na povrchu endoteliálních buněk. Trombin svojí vazbou na TM projde drastickou změnou substrátové specifity: ztrácí všechny své prokoagulační funkce (např. aktivaci krevních destiček, přeměnu fibrinogenu na fibrin) a místo toho získává schopnost aktivovat protein C (Esmon et al. 1982). Zároveň je díky vazbě na endoteliální povrch přes TM tato změna specifity lokalizovaná přímo do místa vzniku sraženiny. Primární úlohou APC je inaktivovat FVa a FVIIIa, které jsou nezbytné pro účinnou tvorbu trombinu, respektive aktivaci FX (Clouse a Comp 1986). Inhibiční účinek APC je zesílen jeho kofaktorem proteinem S, vitamin K-dependentním glykoproteinem (viz dále). Faktor Va je nejprve velmi rychle štěpen pomocí APC na Arg506 a poté už pomaleji na Arg306 a Arg679. Štěpení peptidové vazby na Arg506 způsobuje odhalení míst štěpení na Arg306 a Arg679. FV štěpený na pozici 506 zároveň slouží jako kofaktor spolu s proteinem S pro další štěpení FVa a FVIIIa. Vrozený nebo získaný nedostatek proteinu C může vést k trombofilii (zvýšený sklon k trombóze).
- **Protein S (PS)** – Protein S (pojmenován po Seattlu ve státě Washington, kde byl poprvé izolován) cirkuluje ve dvou formách. Ve volné formě je aktivní jako antikoagulant; ve vázané formě je v komplexu s C4b vazebným proteinem (C4BP) systému komplementu, resp. jeho izoformou která obsahuje  $\beta$  podjednotku, a je převážně neaktivní. C4b vazebný protein je reaktant akutní fáze, jehož koncentrace se zvyšuje při zánětlivých stavech; v důsledku toho je za těchto podmínek snížena aktivita volného proteinu S, čímž se zvyšuje riziko trombózy. Protein S má široké spektrum funkcí, ať už antikoagulačních nebo jiných, které budou detailněji



popsány v dalším textu. Vrozený nebo získaný nedostatek proteinu S může taktéž vést k trombofilii.

### **Inhibitory propagační fáze koagulace:**

- **Antitrombin** – AT je nejvýznamnějším z rodiny inhibitorů serinových proteáz (SERPINy) zasahujících v procesu koagulace. Představuje přibližně 80 % veškeré inhibiční aktivity plazmy na trombin (Perry 1994). Neutralizuje většinu enzymů koagulační kaskády: primárně trombin (FIIa) a FXa, dále pak v menší míře FIXa, FXIa a FXIIa tím, že s nimi tvoří ekvimolární, ireverzibilní komplexy. AT má dvě aktivní místa, reakční centrum (Arg393-Ser394) a vazebné místo pro heparin umístěné na N-konci proteinu. Antikoagulační aktivita AT je amplifikována heparansulfátem (glykosaminoglykan nacházející se na endoteliálních površích), obsahující pentasacharidovou sekvenci, která zprostředkovává jeho vazbu na AT. Vazba endogenních (nebo exogenních) heparinů na vazebné místo heparinu na AT vyvolá konformační změnu, čímž jej „aktivuje“ a urychlí jeho inaktivaci srážecích faktorů 1000 až 4000krát. (Marcum et al. 1984) Celý povrch vaskulárního systému je pokryt endoteliálními buňkami, které jsou potaženy aktivovaným AT a připraveny k rychlé inaktivaci jakéhokoli přebytku trombinu v celkovém oběhu. Potenciál tohoto systému je umocněn zejména v mikrocirkulaci, ve které může být 1 ml krve vystaven až 5000 cm<sup>2</sup> povrchu endotelu.
- **Heparin kofaktor II (HCII)** – HCII je inhibitor serinových proteáz kódovaný genem *SERPIND1*, patří tedy do stejné rodiny proteinů jako antitrombin a alfa-1-antitrypsin (Tollefsen et al. 1982). HCII je silným inhibitorem trombinu, ale oproti antitrombinu vykazuje jen velmi malou inhibiční aktivitu vůči FXa. Jeho deficit nezpůsobuje trombofilii, nicméně má velkou roli v udržování homeostázy a jeho hladiny a tím inhibiční potenciál trombinu se zvyšují v graviditě.
- **Protein Z (PZ)** – slouží jako kofaktor pro inhibici faktoru Xa inhibitorem proteáz závislým na proteinu Z (ZPI). ZPI je člen rodiny inhibitorů serinových proteáz (SERPINů), který obsahuje ve svém reakčním centru tyrosin. PZ cirkuluje v plazmě v komplexu se ZPI. Inhibice faktoru Xa pomocí ZPI v přítomnosti fosfolipidů a Ca<sup>2+</sup> je urychlena až 1000krát při současné vazbě PZ, ale ZPI také inhibuje faktor XIa v procesu, který nevyžaduje PZ, fosfolipidy nebo Ca<sup>2+</sup> (G. J. Broze 2001).

Další text bude věnován převážně proteinu S (PS), vzhledem k jeho množství funkcí jak v regulaci hemostázy, tak jeho signalizační a regulační funkce mimo hemostázu.

### 1.3 Struktura proteinu S

Protein S je vitamin K-dependentní jednořetězcový glykoprotein o hmotnosti přibližně 75 kDa, jehož preproprotein obsahuje 676 aminokyselin a finální funkční protein po všech post-translačních modifikacích obsahuje 635 aminokyselin. PS je kódován genem *PROS1*, který se nachází v blízkosti centromery na chromozomu 3 v oblasti 3q11.2 (Watkins et al. 1988). Gen *PROS1* obsahuje 15 exonů (16 s alternativním transkriptem), které kódují jednotlivé domény PS (Schmidel et al. 1990).

Plazmatický PS je syntetizován převážně hepatocyty (Biron-Andréani et al. 2010), dále endoteliálními buňkami (Fair et al. 1986), megakaryocyty (Ogura et al. 1987), Leydigovými buňkami (Malm et al. 1994) a také osteoblasty (Maillard et al. 1992). V plazmě cirkuluje v koncentraci ~20-25 µg/ml (300-350 nmol/L), přičemž až 2,5 % z tohoto množství je lokalizováno v alfa granulích destiček, kde se vyskytuje PS syntetizovaný výlučně megakaryocyty.

Jako všechny vitamin K-dependentní proteiny tak i PS pro svou biologickou aktivitu vyžaduje karboxylaci glutamátových (Glu) zbytků. Tento proces zabezpečuje  $\gamma$ -glutamylkarboxyláza, která s pomocí redukované formy vitamínu K provádí adici CO<sub>2</sub> molekuly ke  $\gamma$ -uhlíku kyseliny glutamové, čímž vzniká  $\gamma$ -karboxyglutamátový (Gla) zbytek na N-konci proteinu (Furie et al. 1999). Oblast obsahující více Gla zbytků se nazývá Gla doména. Ta umožňuje proteinu vazbu vápenatých iontů a tím zprostředkovává vazbu na fosfolipidové povrchy.

Exon 1 kóduje signální peptid (ak 1–24) a exon 2 propeptid (ak 25–41), které jsou oba proteolytickým štěpením odstraněny před sekrecí proteinu. Finální sekretovaný protein obsahuje již zmíněnou N-terminální Gla doménu (ak 42–86) kódovanou exony 2 a 3, která je klíčová pro vazbu proteinu na negativně nabitě fosfolipidové povrchy. Tato vazba vyžaduje konformační změnu Gla domény způsobenou navázáním Ca<sup>2+</sup> iontů, která odhalí hydrofobní strukturu umožňující pevnější a stabilnější vazbu na fosfolipidy (Stenflo 1999).

Exon 4 kóduje trombin senzitivní oblast (ak 87–113) obsahující místa, která mohou být štěpena trombinem a FXa. Tato trombin senzitivní oblast (TSR) je bohatá na cysteinové zbytky tvořící disulfidové můstky a umožňující formaci smyčky, která stabilizuje sousední Gla doménu (Giri et al. 1998). Štěpení PS trombinem/FXa v této oblasti vede ke ztrátě jeho APC-kofaktorové antikoagulační aktivity (Dahlbäck et al. 1986; Long et al. 1998), nicméně jeho afinita k fosfolipidovým povrchům zůstává zachována (Borgel et al. 2001). Vliv štěpení na TFPI-kofaktorovou funkci nebyl dosud objasněn. Štěpení PS pomocí FXa je významně inhibováno v přítomnosti FVa a může být dalším ze způsobů, kterými FVa přispívá k regulaci koagulace po iniciační fázi.

Další oblast obsahuje čtyři epidermal growth factor (EGF)-like domény, což jsou evolučně konzervované domény nacházející se ve velkém množství plazmatických proteinů a v extracelulárních částech membránových receptorů. Tato oblast je kódována exony 5–8 (ak 114–283). Ve třech z EGF-like domén byly zmapovány oblasti obsahující vazebná místa pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které po navázání způsobují v těchto doménách konformační změnu a tím zesilují antikoagulační funkce PS (Dahlbäck et al. 1990). Bylo dříve popsáno, že afinita k  $\text{Ca}^{2+}$  je podmíněna právě přítomností několika tandemově se opakujících EGF-like domén, což naznačuje, že domény navzájem amplifikují svoji vazebnou afinitu k  $\text{Ca}^{2+}$ .

Naopak C-terminální oblast je unikátní pro PS v rámci plazmatických vitamin K-dependentních proteinů. Exony 9–15 (ak 284–676) kódují C-terminální oblast, která se nazývá SHBG-like (sex hormone-binding globulin) oblast. Ta se skládá ze dvou laminin-G-like (LG) domén, které se vyskytují u některých multidoménových proteinů extracelulární matrix a bazální laminy jako jsou laminin, perlecan a agrin, nebo také signálních plazmatických proteinů, např. Gas6 a SHBG. V této oblasti je několik důležitých N-glykosylačních míst, které ovlivňují biologický poločas PS a jejich mutace vedou k deficitu PS (D. Lu et al. 1997). SHBG-like oblast je kriticky důležitá pro mnoho proteinových interakcí. Nachází se zde vazebná oblast pro C4BP; PS se váže na  $\beta$ -podjednotku C4BP v ekvimolárním množství s afinitou  $\sim 0.1$  nmol/L (Schwalbe et al. 1990). Přesné aminokyseliny, které zprostředkovávají vazbu v molekule PS nejsou známy, nicméně bylo prokázáno, že na interakci se podílí obě LG domény (Linse et al. 1997; Fernández et al. 1998). Dále se zde nachází vazebná místa pro TFPI $\alpha$ , konkrétně v LG1 doméně (Reglińska-Matveyev et al. 2014; Somajo

et al. 2015). Tyto dvě vazebné oblasti se pravděpodobně částečně překrývají a bylo potvrzeno, že vazba PS na C4BP blokuje afinitu k TFPI $\alpha$  (Teraz-Orosz et al. 2022) a tím i tuto kofaktorovou funkci PS.

#### 1.4 APC-kofaktorová funkce PS

Mechanismus inhibice tvorby trombinu pomocí APC v propagační fázi koagulace je popsán výše. Protein S je pro tuto funkci nezbytným kofaktorem. V jeho přítomnosti je proteolýza FVa na Arg306 urychlena 20-30krát, zatímco na Arg506 pouze 1-5krát (Rosing et al. 1995). Přesný mechanismus urychlení reakce za přítomnosti PS však není dosud objasněn. Celý proces je lokalizován na fosfolipidových povrchích, je tedy obtížné jej nasimulovat tak, aby stericky odpovídal tomu, jak probíhá *in vivo*. Jedním z možných mechanismů je schopnost PS zvyšovat afinitu APC k fosfolipidům (Walker 1981), přičemž v kombinaci s FVa je tato afinita zvýšena ještě více (Smirnov et al. 1998). Bylo dokonce prokázáno, že toto zvýšení afinity je ve funkčních testech dáno větším dílem přítomností FVa než PS, jde tedy v podstatě o zpětnovazebnou regulační smyčku inaktivace FVa (Gierula et al. 2019). Pro interakci PS s APC jsou důležité především proximální domény PS (Gla-TSR-EGF1-EGF2) (Ahnström et al. 2011; Andersson et al. 2010; Mille-Baker et al. 2003), stejně tak pro tvorbu inhibičního komplexu APC-PS-FVa, která je nutná pro efektivní štěpení FVa.

Proteolýza FVIIIa je v přítomnosti PS urychlena pouze mírně (1,5krát). Nicméně zde se uplatňuje FV (v neaktivní podobě), který se chová jako synergistický kofaktor a spolu s PS urychluje inaktivaci FVIIIa. Tyto dva kofaktory společně urychlují štěpení až 11krát (Váradi et al. 1996). Kofaktorová funkce FV je také zvýšena předchozím štěpením APC na Arg506. Na rozdíl od APC-kofaktorové funkce PS ve zprostředkování štěpení FVa, pro tuto synergistickou kofaktorovou inaktivaci FVIIIa je důležitý především SBHG-region PS, kde bylo identifikováno místo interakce s FV (Nyberg et al. 1998). PS vázané na C4BP má výrazně sníženou APC-kofaktorovou funkci jak pro inaktivaci FVa tak FVIIIa. C4BP jednak stericky ztěžuje vazbu PS do inaktivačního komplexu a dále blokuje svou vazbou na SHBG-like oblast místa interakce PS s FV (Nyberg et al. 1998).

## 1.5 TFPI- $\alpha$ kofaktorová funkce PS

Další funkcí PS je jeho kofaktorová úloha v aktivitě TFPI, který reguluje vnější cestu aktivace koagulace. TFPI inhibuje přímo FXa a blokuje aktivaci FX a FIX skrz tvorbu komplexu TF/FVIIa/FXa/TFPI. Tuto aktivitu vykazuje pouze volná celořetězcová izoforma TFPI $\alpha$ , protože oproti zkrácené TFPI- $\beta$  izoformě obsahuje tři Kunitz domény (K1, K2 a K3) v distální části proteinu a zásaditý C-terminální konec. U TFPI- $\beta$  je tato distální část nahrazena glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, která ho lokalizuje na povrch endotelových buněk (George J. Broze a Girard 2012). TFPI- $\alpha$  tvoří 10-20 % z celkové plazmatické hladiny TFPI (1,4-2,5 nmol/L) a také je uvolňován z destiček po jejich aktivaci. PS je kofaktorem výhradně TFPI- $\alpha$  (plazmatického i destičkového), protože k této funkci vyžaduje vazbu na K3 doménu TFPI. PS urychluje přímou inhibici FXa 4-10krát (Tilman M. Hackeng et al. 2006), což je vzhledem k velmi nízké koncentraci TFPI- $\alpha$  kritické. Vazbou na PS se totiž inhibiční konstanta TFPI- $\alpha$  pro FXa dostane na hodnotu, kdy už je schopen vázat substrát. PS zároveň slouží jako kofaktor TFPI- $\alpha$  v inhibici TF-FVIIa komplexu a jím zprostředkované tvorby FXa a FIXa, tuto inhibici urychluje cca 9krát (Peraramelli et al. 2014). Přesný mechanismus, kterým PS urychluje inhibiční aktivitu TFPI- $\alpha$  není znám, nicméně jsou data ukazující na roli PS v lokalizaci komplexu na fosfolipidové povrchy s navázaným FXa (Wood et al. 2014).

Hladina TFPI- $\alpha$  v plazmě je asociována s hladinou PS, kdy pacienti s deficitem volného PS vykazují zároveň snížené hladiny TFPI- $\alpha$ . Bylo prokázáno, že TFPI- $\alpha$  cirkuluje v plazmě vázaný na PS s vysokou afinitou (Castoldi, Simioni, et al. 2010). PS vázaný na C4BP je také z této vazby blokován, vzhledem k tomu, že vazebná místa pro TFPI se nachází v SHBG-like oblasti PS, konkrétně v LG1 doméně.

V recentních studiích bylo objeveno, že PS není jediným kofaktorem TFPI- $\alpha$ . FV (ne FVa) hraje v inhibici pomocí TFPI také významnou roli, kde působí jako synergistický kofaktor s PS a zároveň také váže volné TFPI- $\alpha$  v plazmě a tím zpomaluje jeho odbourávání (Wood et al. 2017). Kromě pomáhání v přímé inhibici FXa lokalizací na fosfolipidové povrchy, PS a FV dokážou také synergisticky urychlovat inhibici tvorby protrombinázy vlivem TFPI- $\alpha$ . Stejnou funkci jako FV, ale s až 100krát vyšší afinitou, vykazuje izoforma FV nazývaná FV-short, která vzniká

alternativním splicingem způsobujícím vystřížení velké části B-domény FV. Tato izoforma byla objevena v souvislosti s mutacemi v genu pro FV způsobujícími onemocnění East Texas bleeding disorder, kde je tato izoforma více exprimována a způsobuje cca 10násobné zvýšení hladiny TFPI- $\alpha$  v plazmě. Nicméně izoforma FV-short se v malém množství vyskytuje i u zdravých jedinců v koncentraci, která přesně odpovídá koncentraci TFPI- $\alpha$  v plazmě, což ukazuje na jejich interakci (Vincent et al. 2013). Tato interakce ale nebyla experimentálně potvrzena kvůli tomu, že neexistuje metoda specifická pouze pro FV-short. Také není jasné, jak toto pozorování zapadá do předchozích dat o interakci volného TFPI- $\alpha$  a PS v plazmě.

Kromě APC a TFPI kofaktorových funkcí byla u PS objevena i nezávislá antikoagulační funkce, kdy PS přímo inhibuje aktivitu protrombinázy a vnitřní tenázy (Chattopadhyay et al. 2012; van Wijnen et al. 1996; T. M. Hackeng et al. 1994). Tato inhibiční aktivita není ovlivněna vazbou PS na C4BP, naopak vázaný vykazuje efektivnější inhibici než volný PS (Heeb et al. 2004). Inhibice je zprostředkována především Gla doménou a TSR oblastí, důležitá je pro tuto aktivitu také vazba  $Zn^{2+}$  iontů na molekulu PS (Fernandes et al. 2010).

## 1.6 Role Proteinu S v imunitní odpovědi

Protein S má primárně antikoagulační funkci, ale bylo objeveno že v určitých situacích plní také signální funkci. PS byl identifikován jako ligand pro unikátní receptorovou rodinu tyrosinkináz označovanou jako TAM (Tyro-3, Axl, Mer) (Lemke a Rothlin 2008). Receptor tyrosin kinázy (RTK) jsou typy receptorů obsahující tyrosin kinázové podjednotky, a vazbou ligandu na extracelulární část dochází k jejich dimerizaci a aktivaci kinázové aktivity. RTK regulují množství buněčných procesů od diferenciace až po buněčnou smrt. TAM receptorové kinázy (TAMR) jsou exprimované v mnoha buněčných typech, např. buňky imunitní (dendritické a NK buňky, makrofágy), nervové, reprodukčního systému (Sertoliho buňky varlat), v retinálních epitelových buňkách a v buňkách vaskulární hladké svaloviny a v endotelu. Dalším ligandem pro TAMR je Gas6 (growth-arrest-specific 6), což je glykoprotein s vysokou homologií s PS (~44 % aminokyselin a stejné doménové uspořádání, postrádá TSR oblast), ale nevykazující jinou než signální funkci (Stitt et al. 1995). Důležitá je homologie C-terminální SHBG-like oblasti, která je nezbytná pro vazbu a aktivaci TAMR (Sasaki et al. 2002).

TAM receptory jsou důležitými inhibitory vrozené imunity, což bylo prokázáno na myších s knockoutovanými (KO) TAMR geny. Tyto myši měly sníženou zánětlivou reakci zprostředkovanou makrofágy a dendritickými buňkami (Rothlin et al. 2007). U těchto myší byla také pozorována větší frekvence výskytu a vážnější průběh různých autoimunitních stavů (chronický zánět, infiltrace lymfocytů ve všech tkáních, vysoká hladina cirkulujících protilátek a příznaky syndromu podobnému systémovému lupusu). To naznačuje signifikantní tlumivý vliv TAMR signalizace na regulaci TLR (toll-like receptory) a jimi indukovanou tvorbu cytokinů (Q. Lu a Lemke 2001).

Je několik důkazů pro roli PS jako negativního regulátoru zánětu. PS signifikantně snižuje aktivaci dendritických buněk přes TLR signalizaci (Rothlin et al. 2007). Dále bylo prokázáno, že PS výrazně snižuje expresi prozánětlivých cytokinů u wild-type makrofágů stimulovaných LPS (lipopolysacharidem) oproti makrofágům bez TAMR (Deng et al. 2012). Hladiny PS jsou sniženy například u pacientů se SLE (systémový lupus erythematoses), u nich je také větší výskyt anti-PS protilátek (Keeling et al. 1990; Song et al. 2000), nebo u pacientů s chronickými zánětlivými onemocněními střev, kde byly hladiny významně nižší než u zdravých kontrol (Kempton et al. 2001; Aadland et al. 1992; Koutroubakis et al. 2000). Tato data ukazují na důležitost PS/Mer/P13/Akt/NF- $\kappa$ B signalizační osy v down-regulaci transkripce prozánětlivých cytokinů v makrofázích a dendritických buňkách.

### *1.6.1 Role proteinu S v apoptóze*

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je mechanismus, kterým se organismus kontrolovaně zbavuje starých a opotřebovaných buněk. Odstraňování apoptotických buněk je důležité pro prevenci uvolňování toxických a imunogenních zbytků do okolí a tím limitování nekontrolovaného šíření zánětu. Toto odstraňování je úlohou fagocytujících buněk, především tkáňových makrofágů (deCathelineau a Henson 2003). TAM receptorové kinázy v této funkci hrají významnou roli, neboť jejich vazba na PS zprostředkovává rozpoznávání apoptotických tělísek makrofágy. Buňky prodávající apoptózu exprimují na svém povrchu fosfatidylserin, na který se váže PS skrz Gla doménu. TAMR na fagocytujících buňkách rozpoznává přes N-terminální imunoglobulinovou doménu SHBG-like oblast PS a způsobí tím aktivaci fagocytární

aktivity (Anderson et al. 2003). Tato funkce se zdá být dílem převážně Mer RTK (Scott et al. 2001).

Dalším možným mechanismem, jak PS může pomáhat při odstraňování apoptotických tělísek je přes komplement. PS vázaný na  $\beta$ -podjednotku C4BP nijak neovlivňuje jeho schopnost vázat C4b/C3b na jeho  $\alpha$ -podjednotky. U vázaného PS je však stále přístupná Gla doména, která je schopná vázat negativně nabitě fosfolipidy a existuje hypotéza, že PS tímto umožňuje komplementovému systému lokalizaci na membránové povrchy, například cílené na fosfatidylserin apoptotických a nekrotických buněk (Dahlbäck 2011; Schwalbe et al. 1990; Dahlbäck 2018). Nicméně proti tomu jde zjištění, že PS-C4BP vázané na povrch buněk může také vázat C4b a lokálně tím inhibovat fagocytózu zprostředkovanou komplementem (Kask et al. 2004).

### 1.7 Role proteinu S v integritě endotelu

PS a Gas6 jsou syntetizovány v endotelových buňkách v buňkách cévní hladké svaloviny (Fair et al. 1986; Benzakour a Kanthou 2000). Důležitost PS v regulaci vaskulogeneze a angiogeneze byla prokázána fenotypem myši s KO *PROS1*  $-/-$ , u kterých byla objevena kromě letální koagulopatie také vaskulární dysgeneze, způsobená defektním vývojem cévního systému z primární cévní sítě, a dále narušení hematoencefalické bariéry s poškozením mozku (Saller et al. 2009; Burstyn-Cohen et al. 2009). Přesný mechanismus regulace není znám, nicméně pravděpodobně do něj zasahuje osa PS/Axl a PS/Mer, které regulují vaskulogenezi.

Recentní studie dále ukazují, že PS hraje důležitou roli v ochraně integrity hematoencefalické bariéry přes Tyro3 a sfingosin-1-fosfátový receptor v mozkovém endotelu a zmírňuje poškození v důsledku hypoxie a ischemie (Zhu et al. 2010). PS/Tyro3 dráha zde ve výsledku snižuje proapoptické působení vyvolané ischemií a tím ochraňuje neurony před poškozením (Zhong et al. 2010).

### 1.8 Protein S v karcinogenezi a metastatickém procesu

Nádorové buňky jsou v neustálém a komplexním kontaktu se svým okolím, tedy nádorovým mikroprostředím, koagulačním systémem, destičkami a cévním endotelem. Důležitost provázanosti mezi nádorem a hemostatickým systémem je



známa už přes 150 let, a od té doby se nashromáždilo velké množství klinických dat, která ukazují, že pacienti s pokročilým a metastatickým nádorovým onemocněním mají zvýšené riziko trombotických chorob, embolie či diseminované intravaskulární koagulopatie (DIC) (Varki 2007). Diagnóza malignity společně s trombózou (až do 1 roku mezi diagnózami) je asociována s vyšším stupněm malignity a horší prognózou (Falanga et al. 2012).

Fyziologická role PS v karcinogenezi byla podpořena velkým množstvím studií. PS je exprimován v mnoha různých typech lidských nádorových buněk, například u lymfomů (Anderson et al. 2003), plicních karcinomů (Wimmel et al. 1999), papilárních karcinomů štítné žlázy (Chung et al. 2012) a high-grade karcinomů prostaty (Saraon et al. 2012). U karcinomu prostaty je PS over-exprimován až při vyšších stádiích onemocnění a přidání lidského PS k buňkám karcinomu prostaty navíc zvýšilo jejich migrační a metastatický potenciál v porovnání s neošetřenými buňkami (Saraon et al. 2012).

Několik studií také doložilo že i TAMR jsou ve velkém množství lidských malignit over-exprimovány a hrají důležitou roli v migraci, invazi a metastáze selektivní modulací exprese aktinu a molekul zprostředkovávající buněčnou adhezi (Linger et al. 2008). I přes to není jasné, jak v těchto případech PS aktivuje TAMR signalizaci a čím konkrétně ovlivňuje mobilitu buněk.

## 1.9 Vrozený deficit proteinu S

Deficit proteinu S (PS deficiency, PSD) byl poprvé popsán u rodiny s opakovanými těžkými žilními trombózami v roce 1984 (H. P. Schwarz et al. 1984). Existence deficitu proteinu S je přímým důkazem ukazující jeho důležitost v regulaci generace trombinu. Vrozený PSD je vzácné autosomálně dominantně dědičné onemocnění a v heterozygotní formě vede ke zvýšenému riziku žilního tromboembolismu (VTE) i v mladším věku. Vrozený PSD je častější ve východoasijské populaci než v kavkazské populaci (frekvence výskytu ~0,03–0,13 % v Evropě (ten Kate a van der Meer 2008) a ~0,48–0,63 % v japonské populaci (Adachi 2005)). U pacientů s trombózou je odhadovaná prevalence PSD kolem 2-5 % a u pacientů selektovaných pouze z trombofilních rodin je to pak 2-13 % (Seligsohn a Lubetsky 2001). Nosiči

homozygotní nebo dvojitě heterozygotní mutace se mohou projevit už v raném dětství masivní koagulopatií až purpurou fulminans s nutností substituční terapie.

Vrozený deficit proteinu S se rozděluje podle fenotypu do tří typů. Typ I (kvantitativní), kde jsou snižené hodnoty volné i celkové formy PS, typ II (kvalitativní), kde je snížena pouze APC-kofaktorová aktivita PS a množství volné i celkové formy je v normálním rozmezí, a typ III (smíšený), kde je snižené množství volné frakce, ale celkové množství je zachováno. V literatuře je popsáno mnoho případů, kdy stejná mutace způsobuje fenotypy I a III v jedné rodině, přičemž typ III se v těchto rodinách častěji objevuje u starších pacientů (Castoldi, Maurissen, et al. 2010). Volný antigen PS je doporučován jako screeningová metoda oproti aktivitě PS, nicméně pokud je používán výhradně volný antigen, může docházet k poddiagnostikování funkčních deficitů PS (Bereczky et al. 2016). Naopak screening pouze stanovením aktivity PS také není vhodný, protože ne všechny jsou ale spolehlivé vzhledem k interferencím, například přítomnosti FV Leiden.

Je známo velké množství různých typů mutací v genu *PROSI* způsobujících PSD, nicméně oficiální databáze ISTH vydala poslední aktualizaci před více než 20 lety (Gandrille et al. 2000), množství známých mutací v literatuře objevených od té doby bude tedy výrazně vyšší. Například ve volně dostupné databázi mutací HGMD (The human gene mutation database) (Stenson et al. 2017) je k datu prosince 2023 uvedeno 509 známých mutací v genu *PROSI*. Většina pacientů je zachycena trombofilním screeningem po prodělané trombóze nebo plicní embolii (PE), preemptivní screening se provádí pouze u gravidních osob nebo při pozitivní rodinné anamnéze. Limitací laboratorního vyšetření jsou možné interference způsobené antikoagulační léčbou a preanalytickými faktory (Persson et al. 2003). Existují i polymorfismy v genu *PROSI* které mohou ovlivňovat hladinu PS, nicméně většinou nezpůsobují zvýšené riziko trombózy. Nejčastějším polymorfismem v kavkazské populaci je PS Heerlen (záměna S501P), která snižuje hladinu volného PS, nicméně jeho vliv na riziko trombózy je sporný (Bertina et al. 1990; Suchon et al. 2017). V japonské populaci je nejčastějším polymorfismem PS Tokushima (záměna K196E), která je rizikovým faktorem pro žilní trombózu (Miyata et al. 2009).

V literatuře je také známo velké množství případů, kdy u pacientů s PSD bez nalezené mutace byly objeveny velké delece nebo duplikace. Segregační analýzou

byly tyto změny nepřímo odhaleny i při negativitě PCR a poté potvrzeny metodou MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Tato metoda se osvědčila jako výborný prvek screeningu u pacientů, kde se nepodařilo nalézt mutaci i přes zjevný vrozený původ onemocnění (segregace PSD v rodině). Prevalence velkých delecí/duplikací u pacientů s PSD je reportována různě a je uváděna mezi 5 % (Alhenc-Gelas et al. 2016) a 10 % (Castoldi, Maurissen, et al. 2010), u vyselektovaných pacientů s PSD bez nalezené bodové mutace to pak může být až 33 % (Pintao et al. 2009).

### 1.10 Získaný deficit proteinu S

Hladina proteinu S je ovlivněna různými faktory a jejich kombinace může vést až ke klinicky vyjádřenému deficitu PS. Získaný deficit je častější než vrozený, je proto nutné testy na hladiny PS opakovat alespoň s tříměsíčním odstupem po prvním záchytu pro odlišení krátkodobých vlivů.

Protein S je fyziologicky snížen v graviditě, nejvíce ve třetím trimestru, protože jeho tvorba je down-regulována hladinou estrogenů, konkrétně 17-beta-estradiolu (Suzuki et al. 2010). Stejným principem je ovlivněna hladina PS u osob užívajících kombinovaná orální kontraceptiva obsahující estrogen. Naopak u kontraceptiv obsahujících pouze některé typy progesterinu je hladina PS zvýšena (Hughes et al. 2007). Celkové PS roste s věkem, a u žen navíc PS stoupá díky klesající produkci estrogenů po menopauze (Ellery et al. 2018).

Dále je pozorováno významné snížení hladin PS u nefrotického syndromu, kdy dochází se zvýšeným ztrátám volné frakce PS ledvinami. Pak může být hladina PS snížena při léčbě vitamin-K antagonisty (např. warfarin), také akutně po trombotické příhodě nebo při DIC, kdy dochází k jeho konzumaci. Snížení hladiny PS bylo také pozorováno u mnohočetného myelomu (Deitcher et al. 1996) a u některých virových onemocnění. Získaný deficit PS je relativně častou komplikací infekcí HIV-1 (Sim et al. 2022; Stahl et al. 1993), varicella (Nguyên et al. 1994), dengue (Wills et al. 2002) a také SARS-CoV-2 (Stoichitoiu et al. 2020). U HIV-1 pacientů je deficit PS nejčastější koagulační abnormalitou, objevuje se až u 76 % pacientů a koreluje se sníženým počtem T-lymfocytů a progresí do syndromu získaného imunodeficitu (Bissuel et al. 1992). U případů HIV, varicelly, mnohočetného myelomu a leukémie

(Miljić et al. 2000) byla také vzácně popsána tvorba anti-PS autoprotilátek, které způsobují zvýšený clearance PS a způsobují těžké trombózy.

Deficit PS u pacientů s COVID-19 byl pozorován vícero studiemi, které potvrdily korelaci přítomné koagulopatie s tíží onemocnění a horším outcome (Stoichitoiu et al. 2020; Baicus et al. 2021; White et al. 2021). Možných mechanismů, kterými může COVID-19 způsobovat deficit PS je několik. Nejpravděpodobnějším mechanismem je jeho zvýšená konzumpce díky obecně protrombotickému stavu při těžkém COVID-19. To podporuje pozorování konzumpce většiny koagulačních faktorů a fibrinogenu (Devreese 2021). COVID-19 je také asociován s lokální a systémovou zánětlivou odpovědí, což zahrnuje dysregulaci PS/Gas6-TAM RTK osy a aktivaci až hyperaktivaci komplementu. V recentních studiích bylo ukázáno, že jednak koncentrace Gas6 a AxlTK byly zvýšeny u pacientů s horším outcome (Morales et al. 2021), a zároveň koncentrace volné MerTK byla snížena u pacientů s rychlejším odezněním nemoci (Tonello et al. 2022). PS zde sledován nebyl, nicméně jeho role jako ligand obou RTK je zde také důležitá. Dále díky hyperaktivaci komplementu, který je hlavní hnací silou trombózy a zánětu při COVID-19, lze předpokládat i větší konzumpci volného PS díky zvýšenému vychytávání C4BP komplexů na membrány apoptotických buněk a obecně větší vychytávání PS na různé proteiny se kterými při tomto vysoce zánětlivém stavu interaguje (Sim a Wood 2022).

Dalším mechanismem deplece PS při onemocnění COVID-19 může být jeho přímé štěpení enzymy SARS-CoV-2 virionu. Virus syntetizuje několik cysteinových proteáz a jedna z nich, papain-like proteáza, byla *in vitro* schopná štěpit PS. Ruzicka *et al.* identifikovali možné štěpné místo v LG1 doméně, což by mělo za následek odštěpení ~80 % SHBG-like oblasti PS a tím znemožnění většiny funkcí PS (Ruzicka 2020). Nicméně není jasné, jestli toto štěpení probíhá *in vivo*, protože ošetření PS poolovaným sérem obsahujícím tuto proteázu neukázalo detekovatelné štěpné produkty (Reynolds et al. 2021).

Dalším mechanismem může být snížená syntéza. Bylo prokázáno, že hypoxie a interleukin-6 (IL-6) downregulují syntézu PS v játrech, díky zvýšené stabilizaci transkripčního faktoru HIF1 (hypoxia-induced factor 1), který snižuje expresi PS (Pilli et al. 2018; Chatterjee et al. 2020). Také byla nalezena výrazně snížená exprese PS a

dalších antikoagulačních a fibrinolytických faktorů přímo v alveolech plic pacientů s COVID-19 (Mast et al. 2021).

## 2. Cíle práce

Z přirozených inhibitorů koagulačních faktorů jsme se v této práci zaměřili na protein S, především kvůli jeho širokému spektru funkcí a jeho významu v diagnostice trombofilií. Konkrétní cíle práce jsou:

- Nalezení kauzálních mutací u kohorty pacientů s vrozeným deficitem PS.
- Na základě nalezených mutací popsat genotyp a fenotyp pacientů s vrozeným deficitem PS v České republice a zjistit, zda se liší v porovnání s evropskou a světovou populací.
- Stanovit vliv polohy mutace (SHBG oblast vs. non-SHBG) na riziko trombózy u těchto pacientů.
- Popsat pozorované získané deficity PS u kohorty pacientů ÚHKT Praha s hematologickou malignitou v akutní fázi onemocnění a zanalyzovat, jak se lišila aktivita PS v závislosti na diagnóze.
- Ověřit stabilitu PS a dalších koagulačních parametrů v podmínkách zmražené plazmy.

## 3. Experimentální část

### 3.1 Materiál a metody

Detailní popis metod a materiálů použitých v této práci je obsažen v sekcích Materiál a metody vložených publikací. Zde je uveden pouze výčet použitých metod:

- Stanovení aktivity proteinu S v plazmě – Publikace I a II
- Stanovení volné formy proteinu S – Publikace I a II
- Stanovení celkového množství proteinu S – Publikace I
- Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), protrombinový čas (PT), stanovení aktivity fibrinogenu, antitrombinu, faktoru VIII, stanovení množství D-Dimerů a fibrin/fibrinogen degradačních produktů v plazmě, ethanol-gelifikační test – Publikace II

- Izolace DNA – Publikace I
- Polymerázová řetězová reakce (PCR) – Publikace I
- Sangerovo sekvenování – Publikace I
- MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) – Publikace I
- Statistická analýza – Publikace I a II

Vzhledem k přítomnosti vysoce homologního pseudogenu *PROS2* (*PROSP*) na stejném lokusu jako *PROS1* jsme museli před sekvenováním potvrdit, zda došlo k amplifikaci správného produktu. Toho bylo dosaženo zejména designem primerů, které u všech exonů obsahovaly sekvence unikátní pro *PROS1*. Účinnost tohoto kroku jsme verifikovali pomocí restriktivního štěpení amplifikovaného produktu enzymy, které měly restriktivní místo buď pouze v genu *PROS1*, nebo pouze v pseudogenu. Tímto jsme předešli riziku ko-amplifikace obou genů. Pro predikci kauzální povahy nově objevených mutací jsme použili několik volně dostupných predikčních softwarů: Polyphen-2 (Adzhubei et al. 2013), PMut (López-Ferrando et al. 2017), MutationTaster2 (J. M. Schwarz et al. 2014), PROVEAN (Choi et al. 2012), SNPs&GO (Capriotti et al. 2013), HOPE (Venselaar et al. 2010) a VarSome (Kopanos et al. 2019). Pro splicingové mutace byl navíc použit program „Splice site prediction by Neural Network“ (Reese et al. 1997). Mutace byla označena jako patogenní, když alespoň 5 ze 7 použitých predikčních softwarů vyhodnotilo mutaci jako „disease-causing“, tedy kauzální pro deficit PS.

## 3.2 Shrnutí výsledků

### 3.2.1 Přehled publikací a podíl práce doktoranda

#### **Publikace I:**

**Fenclova Tereza**, Matyskova Miloslava, Provaznikova Dana, Marecek Frantisek, Geierova Vera, Kovarova-Kudrnova Zuzana, Hrachovinova Ingrid. **The impact of *PROS1* mutation position on thrombotic risk in protein S-deficient patients.** *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2023 May 24;7(4):100194. doi: 10.1016/j.rpth.2023.100194.

IF<sub>2023</sub> = 4,6

Podíl doktoranda na práci:

Měření hladiny a aktivity PS, genetická analýza, statistická analýza a příprava publikace.

### **Publikace II:**

**Fenclova Tereza, Marecek Frantisek, Hrachovinova Ingrid. Effects of frozen storage conditions and freezing rate on the stability of coagulation proteins in human plasma. *Blood coagulation and fibrinolysis*. 2023 Sep 1;34(6):377-384.**

doi: 10.1097/MBC.0000000000001239.

IF<sub>2022</sub> = 1,1

Podíl doktoranda na práci:

Příprava testované dárcovské plazmy, provádění koagulačních vyšetření, statistická analýza a příprava publikace.

### *3.2.2 Genetika vrozeného deficitu PS*

V naší kohortě pacientů s vrozeným deficitem PS byla nalezena kauzální mutace u 73/79 (92 %) pacientů a bylo nalezeno celkem 34 různých mutací, z toho 15 nebylo dosud v literatuře popsáno (přehled mutací viz tabulka 1 a 2). Z nalezených mutací bylo 14 nesmyslných (nonsense) mutací (4 frame shift – posun čtecího rámce, 4 záměny za stop kodon, 6 sestřihových (splicingových)) a 19 záměnných (missense) mutací. Velká delece zahrnující exony 1-15 genu *PROSI* byla nalezena metodou MLPA u 3 ze 43 rodin (7 %). Všechny nalezené mutace byly v heterozygotní formě. Ve dvou rodinách byly nalezeny současně dvě patogenní heterozygotní mutace lokalizované na stejné alele (dle společné segregace mutací v rodině), nejednalo se tedy o dvojitě heterozygoty.

**Tabulka 1:** Přehled námi nově nalezených mutací, které nebyly dosud popsány v literatuře, ISTH databázi mutací, nebo ve volně dostupných databázích jako jsou NCBI dbSNP databáze a HGMD – The Human Gene Mutation Database. Uvedené hladiny PS představují probanda nebo u rodin se smíšeným fenotypem příbuzného s daným fenotypem.

Číslo rodiny	Mutace: p.	cDNA: het.c.	Místo	PSD typ	PS aktivita [M:65-140%; F:50-140%]	PS Free Ag [M:70-148%; F:50-134%]	PS Total Ag [M:75-140%; F:60-140%]	Predikce
29	Met1Ile	3G>C	Ex1	I	26	4	32	patogenní
5	Ser28Phefs*11	82dupT	Ex2	I	34	24	49	patogenní
28	Cys113Ser	338G>C	Ex4	III	35	36	61	patogenní
12, 13	Cys171Trp	513C>G	Ex6	I	40	52	43	patogenní
21	Gln173Lys	517C>A	Ex6	III	23	31	62	patogenní
19	Cys228*	684C>A	Ex7	I	22	22	39	patogenní
38	Glu304*	910G>T	Ex9	I	20	34	32	patogenní
41	IVS9+5G>A	965+5G>A	In9	I	52	57	45	patogenní
37	Pro416Alafs*22	1244dupA	Ex11	I	27	29	49	patogenní
17	Leu446Arg	1336_1337del insAG	Ex12	I	27	16	24	patogenní
35	Ala525Thr	1573G>A	Ex13	I	27	17	30	patogenní
4	IVS13+1 G>T	1644+1G>T	In13	I III	11 18	6 8	24 110	patogenní
3, 36	Gly621Asp	1862G>A	Ex14	-	29	-	-	patogenní
23	Asp624Metfs*9 (skipping Ex14)	1645_1870del	Ex14, In14	I	34	28	62	-
42	Asp652Gly	1955A>G	Ex15	III	-	20	60	patogenní

Mutace byla označena jako patogenní, když alespoň 5 ze 7 použitých predikčních softwarů vyhodnotilo mutaci jako „disease-causing“, tedy kauzální pro deficit PS.



**Tabulka 2:** Přehled nalezených mutací, které jsou již známy v literatuře nebo volně dostupných databázích. Uvedené hladiny PS představují probanda nebo u rodin se smíšeným fenotypem příbuzného s daným fenotypem.

Číslo rodiny	Mutace: p.	cDNA: het.c.	Místo	PSD typ	PS aktivita [M:65-140%; F:50-140%]	PS Free Ag [M:70-148%; F:50-134%]	PS Total Ag [M:75-140%; F:60-140%]
10†	Glu67Ala	200A>C	Ex2	I	32	30	48
18	Thr78Met	233C>T	Ex2	II	38	68	56
43	IVS2+5G>A	234+5G>A	In2	I	57	62	55
39	Trp149*	446G>A	Ex5	I	36	10	43
6	Cys186Tyr	557 G>A	Ex6	I	17	66	75
11, 20, 22	Cys226Ser	676 T>A	Ex7	I	46	61	56
40	Tyr234Cys	701A>G	Ex7	I	25	48	42
14	IVS8-1G>A	728-1G>A	In7	II	41	80	75
16	Cys267Ser	800G>C	Ex8	I	24	31	47
9†, 10†	Gly272Arg	814G>A	Ex8	I	30	28	49
2, 24, 27	Trp383Arg	1147T>C	Ex10	I	24	21	43
34	IVS10+1G>A	1155+1G>A	In10	-	27	-	-
25, 33	IVS10+5G>A	1155+5G>A	In10	-	25	-	-
30	Trp506*	1517G>A	Ex13	-	29	-	-
1	Arg515Cys	1543C>T	Ex13	I	8	<10	18
				III	11	13	88
9†	Ser547Ilefs*9	1638dupA	Ex13	I	26	25	50
31	Thr617Ile	1850C>T	Ex14	-	30	-	-
8, 26	Cys639Tyr	1916G>A	Ex15	I	24	29	37
7, 15, 32	-	Delece ex. 1-15*	Ex1-15	I	18	15	34

† Tyto rodiny mají mutaci Gly272Arg dohromady s druhou patogenní mutací na stejné alele.

\* Velká delece nalezená metodou MLPA.

Tabulky nalezených mutací neobsahují nalezené polymorfismy (SNP = single nucleotid polymorphism), které byly predikčními metodami vyhodnoceny jako benigní a vyskytovaly se u velkého procenta vyšetřovaných pacientů. Patří mezi ně námi nově nalezená varianta p.Val669Phe a už dříve popsaná synonymní varianta p.Pro667= (c.2001A>G), která je v populaci běžná a nezpůsobuje snížení hladiny PS (Castaman et al. 2007).

U pacientů jsme prováděli sekvenační analýzu Sangerovou metodou paralelně s metodou MLPA vzhledem k očekávaným vyšším frekvencím velkých delecí, nicméně neobjevil se žádný případ potvrzené souběžné velké delecce a kauzální bodové mutace. V jednom případě jsme metodou MLPA zachytili u pacienta s mutací c.200A>C (p.Glu67Ala) pozitivitu pro delecí exonu 2, ale zde se jednalo o interferenci, jelikož mutace se nachází na pozici nasedání próby pro exon 2. Výrobce udává, že pokud se takové interference vyskytnou, může být ve výsledné fragmentační analýze ovlivněna výška píku a toto nesprávně vyhodnoceno jako delecce, i když ve skutečnosti jde pouze o nedostatečnou ligaci próby pro daný exon. Proto je důležité zároveň s analýzou MLPA provádět sekvenační analýzu celého genu pro vyloučení možných interferencí.

Většina nalezených mutací se u pacientů projevila fenotypem PSD typu I nebo smíšeným fenotypem I/III. Pouze dva pacienti vykazovali PSD typu II, z toho u jednoho byla nalezena mutace (p.Thr78Met), která byla už dříve spojována s fenotypem typu II (Rezende, Lane, Mille-Baker, et al. 2002; Alhenc-Gelas et al. 2010). Druhý pacient má splicingovou mutaci v intronu 7 (c.728-1G>A), která byla popsána v databázi ClinVar, ale její vliv na funkci PS je nejasný.

### 3.2.3 Vliv polohy mutace v *PROS1* na riziko trombózy

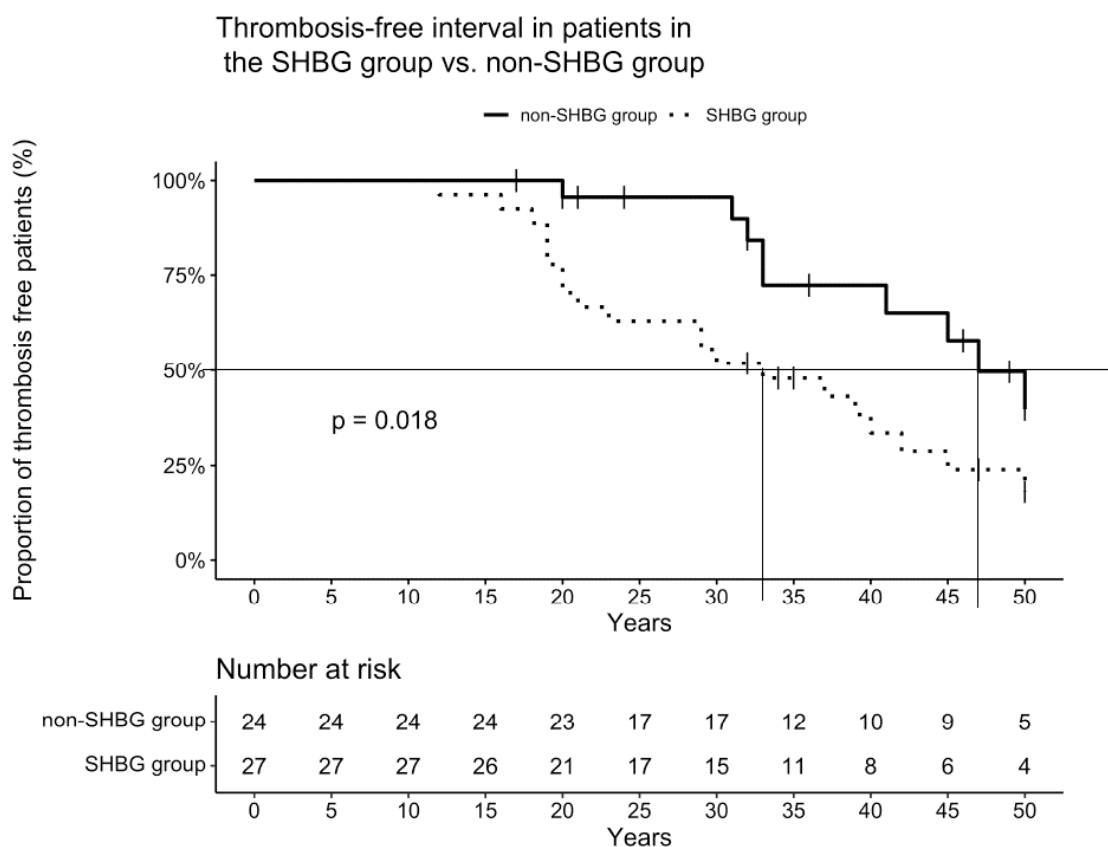
V publikaci I jsme se zabývali zhodnocením vlivu polohy záměnné (missense) mutace na riziko trombózy u pacientů s vrozeným deficitem PS. Kohortu pacientů s vrozeným PSD a nalezenou mutací jsme rozdělili do skupin podle polohy mutace na SHBG a non-SHBG, vzhledem k důležitosti této oblasti PS v jeho různých funkcích a vazbách na další proteiny. Zahrnuti byli pouze pacienti se záměnnými (missense mutace), protože u ostatních typů mutací (frame-shift, záměny za stop kodon, splicingové, delecce) je převažujícím fenotypem ztráta exprese, a tedy snížení syntézy, zatímco u záměnných mutací fenotyp není jasný.

Mezi SHBG a non-SHBG skupinami nebyl významný rozdíl ve věku ani pohlaví pacientů. Pacienti, kteří prodělali trombózu měli častěji mutaci v SHBG oblasti než mimo tuto oblast (69 % vs. 31,8 %;  $p = 0,008$ ). Naopak se významněji nelišila míra pacientů, kteří prodělali trombózu v závislosti na přítomnosti mutace FV Leiden (31 % vs. 18,2 %;  $p = 0,30$ ) a to i přes výrazně vyšší zastoupení v SHBG skupině (44,4 % vs.

4,2 %,  $p = 0,001$ ), což naznačuje, že samotný FVL nebyl nezávislým rizikovým faktorem. Zároveň diverzita mutací uvnitř skupin byla dostatečná vzhledem k výskytu trombózy napříč skupinami, ani v jedné skupině nepřevažovala jedna mutace v počtu pacientů (5 různých mutací v SHBG skupině vs. 8 různých mutací v non-SHBG).

Multivariátní regresní analýzou těchto dvou skupin jsme prokázali, že poloha mutací v SHBG oblasti PS byla nezávislým rizikovým faktorem pro trombózu (OR 5,17, CI 1,29 – 20,65). Pacienti v SHBG skupině měli také nižší aktivitu PS (medián 27 %, IQR 20-29,5 vs. medián 37,5 %, IQR 25,8-44,3) a hladinu volného antigenu (medián 19 %, IQR 10-23 vs. medián 49,5 %, IQR 31-52,8) a zároveň se u nich trombóza objevovala v mladším věku (Obrázek 1,  $p = 0,018$ ).

Podrobnosti viz Publikace I.



**Obrázek 1:** Kaplan-Meierova křivka intervalu do výskytu první trombózy u pacienta. Skupina pacientů s mutací v SHBG oblasti (tečkovaná čára) má kratší interval do výskytu trombózy, tedy se u nich vyskytuje v mladším věku, než u pacientů s mutacemi v non-SHBG oblasti (plná čára).

### 3.2.4 Získaný deficit PS u hematoonkologických pacientů

Screening trombofilních rizikových faktorů je standardním postupem při příjmu pacientů na lůžkové oddělení a jednotku intenzivní hematologické péče na ÚHKT Praha. Provedli jsme centrovou retrospektivní analýzu, do které jsme zařadili všechny pacienty poprvé hospitalizované s hematoonkologickou malignitou v období mezi 3.1.2013 a 31.12.2023. Následně jsme vyřadili všechny pacienty s nízkými hladinami proteinu C nebo jiných koagulačních faktorů, tedy pacienty s konzumpční koagulopatií, syntetickou jaterní dysfunkcí nebo dalšími stavy charakterizovanými globální poruchou koagulace. Finálně bylo do analýzy zahrnuto 1878 pacientů z čehož 46 pacientů mělo ve vstupním trombofilním screeningu izolovanou patologickou aktivitu PS (<50 %). U těchto pacientů bylo také ve follow-upu potvrzeno, že se jedná o získaný deficit. Pokud follow-up nebyl možný z důvodu úmrtí pacienta nebo nemožnosti opakovat vyšetření PS z jiných důvodů, byla získaná povaha deficitu ověřena z předchozích vyšetření a z rodinné anamnézy.

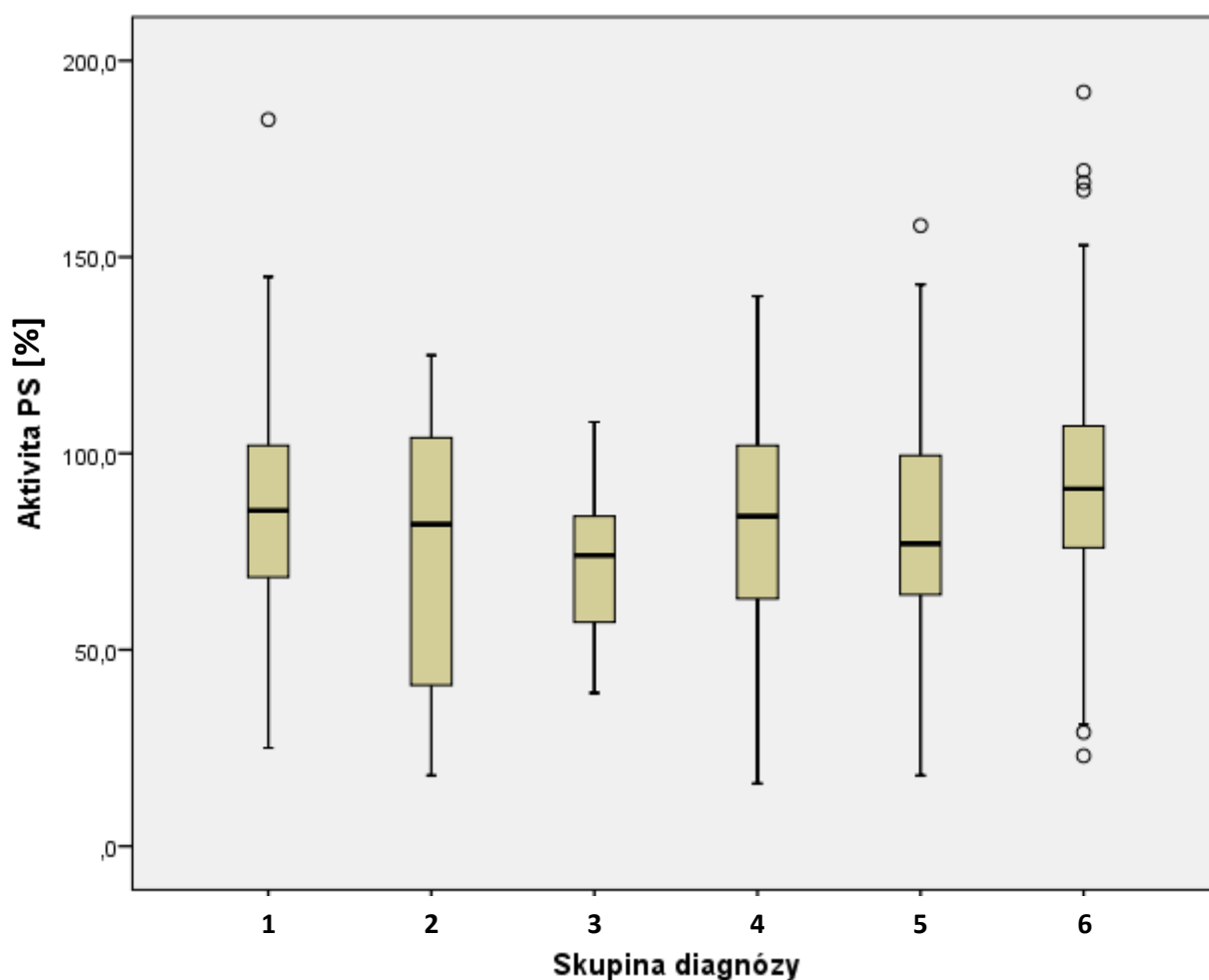
Diagnózy pozorované u pacientů s patologickou aktivitou PS byly rozděleny do těchto skupin: 1) C920 – Akutní myeloblastická leukemie, 2) C925 – Akutní myelomonocytická leukemie, 3) C930 – Akutní monoblastická/monocytická leukemie, 4) C910 – Akutní lymfoblastická leukemie, 5) C921 – Chronická myeloidní leukemie (CML), BCR/ABL-pozitivní, 6) ostatní myelo/lymfoproliferativní onemocnění (např. polycytemia vera, primární myelofibróza, akutní promyelocytární leukémie, myelodysplastický syndrom, chronická lymfatická leukémie, jiné neurčené leukémie, atd.).

V analýze bylo zjištěno, že se mezi danými skupinách onemocnění významně lišily jak absolutní hodnota PS aktivity ( $p < 0.001$ ; Kruskal-Wallis test; Obrázek 2), tak proporce pacientů s patologickými hodnotami ( $p < 0.001$ ;  $\chi^2$  test; Tabulka 3). Vůbec nejvyšší zastoupení pacientů s izolovanou patologickou PS aktivitou bylo ve skupině pacientů s akutní myelomonocytickou leukémií (37,5 %). Nepoměrné zastoupení pacientů s izolovaným získaným PS deficitem je demonstrováno na Obrázku 3, kdy pacienti s myelomonocytickou leukémií tvořili nejmenší skupinu pacientů, ale současně zaujímalí významnou proporcii ze všech patologických měření.

**Tabulka 3:** Porovnání skupin pacientů a podíl pacientů s patologickou aktivitou PS napříč definovanými skupinami diagnóz.

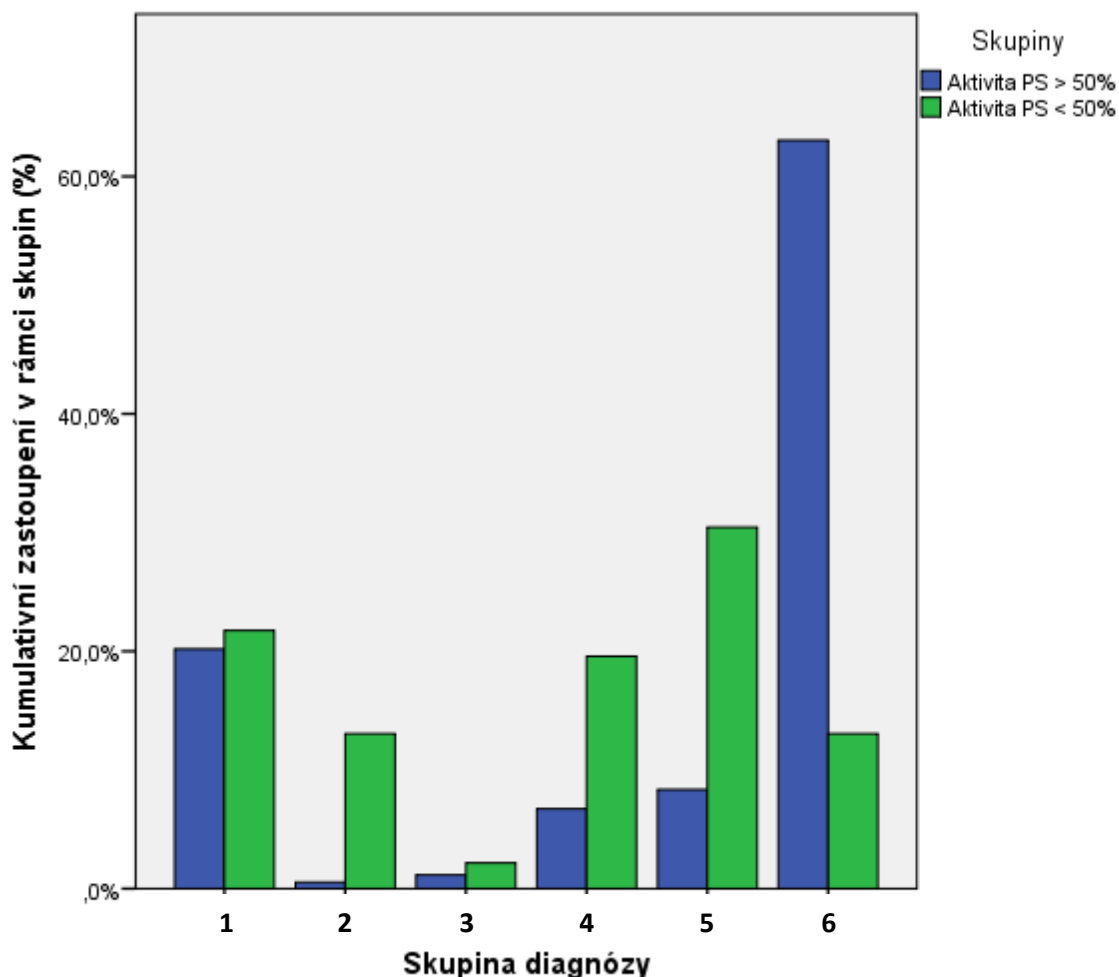
Diagnóza	C920 (1)	C925 (2)	C930 (3)	C910 (4)	C921 (5)	Ostatní (6)	Celkem
Počet pacientů	380	16	22	132	167	1161	1878
Počet s PS <50 %	10	6	1	9	14	6	46
Aktivita PS [%] (medián, IQR)	86 (68-102)	82 (40-105)	74 (57-85)	84 (63-102)	77 (64-100)	91 (76-107)	88 (72-105)
Podíl PS <50 v %	2,6	37,5	4,5	6,8	8,4	0,5	2,4

IQR – interkvartilní rozptyl (interquartile range)



**Obrázek 2:** Zobrazení hodnot aktivity PS v hodnocených skupinách diagnóz. Krabicový graf rozděluje data do kvartilů, střední dělení představuje medián a zvýrazněné body odlehle hodnoty. 1) C920 – Akutní myeloblastická leukemie, 2) C925 – Akutní myelomonocytická leukemie, 3) C930 – Akutní monoblastická/monocytická leukemie, 4) C910 – Akutní lymfoblastická leukemie, 5)

C921 – Chronická myeloidní leukemie (CML), BCR/ABL-pozitivní, 6) ostatní myelo/lymfoproliferativní onemocnění.



**Obrázek 3:** Zastoupení patologické aktivity PS napříč skupinami pacientů. Modře jsou znázorněny procentuální proporce pacientů s normální PS aktivitou v jednotlivých skupinách počítané ze všech pacientů s normální PS aktivitou. Zeleně jsou znázorněny proporce pacientů s patologickou PS aktivitou (<50 %) v jednotlivých skupinách počítané ze všech pacientů s patologickou PS aktivitou. Součet jednotlivých sloupců je roven 100 % v rámci jedné barvy (tedy modré nebo zelené). 1) C920 – Akutní myeloblastická leukemie, 2) C925 – Akutní myelomonocytická leukemie, 3) C930 – Akutní monoblastická/monocytická leukemie, 4) C910 – Akutní lymfoblastická leukemie, 5) C921 – Chronická myeloidní leukemie (CML), BCR/ABL-pozitivní, 6) ostatní myelo/lymfoproliferativní onemocnění.

### 3.2.5 *Stabilita PS a dalších koagulačních parametrů ve zmražené plazmě*

Standardizované a kvalitní skladování zmražených vzorků je důležité jednak pro správné stanovení výsledku a také pro spolehlivou mezilaboratorní návaznost. Cílem analýzy popsané v publikaci II bylo jednak krátkodobé skladování, protože v hematologických laboratořích většinou nejsou speciální metodiky analyzovány z čerstvé plazmy ale z plazmy zmražené a uchovávané do doby, než bude stanovení provedeno. A dále také dlouhodobé skladování, zejména pro použití zmražené plazmy jako kontrolního materiálu. Vzhledem ke složité laboratorní diagnostice trombofilií obecně a PS konkrétně jsme vytipovali několik koagulačních parametrů, kterými jsme sledovali stabilitu biologických funkcí v čase v plazmě zmražené za různých podmínek. Sledovaná plazma byla rozdělena do skupin dle následujícího schématu:

- A) plazma zmražená a uchovávaná v 1ml kryozkumavkách ponořených v tekutém dusíku (šokové zmražení)
- B) plazma zmražená a uchovávaná v 1ml kryozkumavkách v mrazáku při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- C) plazma zmražená a uchovávaná v 1,8ml kryozkumavkách v mrazáku při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v horizontální poloze (větší plocha hladiny)
- K) plazma zmražená v 1ml kryozkumavkách v lázni se suchým ledem (šokové zmražení) a uchovávaná v mrazáku při  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$
- L) plazma zmražená a uchovávaná v 1ml kryozkumavkách v mrazáku při  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  na dně mrazáku (stabilní teplota)
- M) plazma zmražená a uchovávaná v 1ml kryozkumavkách v mrazáku při  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  u víka mrazáku (fluktuující teplota)

Ve vzorcích směsné normální plazmy jsme prokázali dlouhodobou stabilitu po dobu maximálně 6 měsíců pro FVIII a PS, respektive 12 měsíců pro APTT, PT, fibrinogen a antitrombin, pokud byly uchovávány alespoň při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a zmražení probíhalo šokově. Ideálním způsobem skladování bylo ponoření v tekutém dusíku (až 12 měsíců pro FVIII), nicméně tato metoda skladování není pro laboratoře běžně dostupná.

APTT vykazovalo anomálii, kdy v období 14 dnů po zmražení byly hodnoty testu zvýšené nad interval nejistoty metody ( $>1\text{ CV}$ ) a po uplynutí tohoto období se

vrátily do hodnot, které odpovídaly měření z čerstvé nemražené plazmy. Toto zvýšení má potenciál ovlivnit analýzy, které jsou závislé na APTT, například lupus antikoagulant. Dále také byly zvýšené obě stanovení PS (aktivita a volný antigen) nad nejistotu metody během prvních dvou měsíců skladování ve všech teplotách (včetně kapalného dusíku), ale aktivita PS začala klesat po uplynutí 2 měsíců, zatímco PS antigen zůstal zvýšený. Toto zvýšení má potenciál ovlivnit výsledky pacientů, nicméně v tomto experimentu nebyly sledovány vzorky pacientů s PSD a sledované hodnoty normální plazmy se nevychýlily mimo kontrolní rozmezí. Vzhledem k tomu, že bylo vychýlení pozorováno u všech sledovaných teplot skladování, jde pravděpodobně o vliv samotného zmražení plazmy.

Podrobnosti viz Publikace II.



### 3.3 Publikace I

Received: 29 December 2022 | Accepted: 16 May 2023

<https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100194>



#### ORIGINAL ARTICLE

## The impact of *PROS1* mutation position on thrombotic risk in protein S-deficient patients

Tereza Fenclova MSc<sup>1,2</sup> | Miloslava Matyskova MD, PhD<sup>3</sup> | Dana Provaznikova PhD<sup>2</sup> |  
Frantisek Marecek MSc<sup>2</sup> | Vera Geierova MD<sup>4</sup> |  
Zuzana Kovarova-Kudrnova MD, PhD<sup>5</sup> | Ingrid Hrachovinova PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, National Reference Laboratory for Disorders in Hemostasis, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>University Hospital Brno, Clinical Hematology, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Centre for Thrombosis and Hemostasis, Prague, Czech Republic

<sup>5</sup>Thrombotic Centre of Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital, Prague, Czech Republic

#### Correspondence

Ingrid Hrachovinova, Institute of Hematology and Blood Transfusion, National Reference Laboratory for Disorders in Hemostasis, U Nemocnice 2094/1, 128 00 Prague, Czech Republic.  
Email: [ingrid.hrachovinova@uhkt.cz](mailto:ingrid.hrachovinova@uhkt.cz)

Handling Editor: Dr Suzanne Cannegieter

#### Abstract

**Background:** Inherited protein S deficiency is a thrombophilic risk factor associated with venous thromboembolism. However, there is not much data on the impact of mutation position on thrombotic risk.

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the risk of thrombosis due to mutations located in the sex hormone-binding globulin (SHBG)-like region as opposed to the rest of the protein.

**Methods:** Genetic analysis of *PROS1* was performed in 76 patients with suspected inherited protein S deficiency, and the effect of missense mutations present in the SHBG region on thrombosis risk was analyzed by statistical methods.

**Results:** We found 30 unique mutations (13 of them novel), of which 17 were missense mutations, in 70 patients. Patients with missense mutations were then divided into 2 groups: the "SHBG-region" mutation group (27 patients) and the "non-SHBG" group (24 patients). The multivariable binary logistic regression analysis showed that mutation position in the SHBG region of protein S is an independent risk factor for thrombosis in deficient patients (OR, 5.17; 95% CI, 1.29–20.65;  $P = .02$ ). The patients with a mutation in the SHBG-like region also developed a thrombotic event at a younger age compared to the "non-SHBG" group in the Kaplan-Meier analysis (median thrombosis-free survival of 33 vs 47 years, respectively;  $P = .018$ ).

**Conclusion:** Our findings show that a missense mutation located in the SHBG-like region may contribute to higher thrombotic risk rather than a missense mutation located elsewhere in the protein. However, as our cohort was relatively small, these findings should be taken with this limitation.

#### KEYWORDS

protein S deficiency, venous thromboembolism, missense mutation, thrombosis, protein S

© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Inc. on behalf of International Society on Thrombosis and Haemostasis. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Res Pract Thromb Haemost. 2023;7:e100194  
<https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100194>

[www.rpthjournal.org](http://www.rpthjournal.org) | 1 of 9

### Essentials

- Inherited protein S (PS) deficiency is an established risk factor for venous thromboembolism.
- The impact of missense mutations and their location on the risk of thrombosis is not clear.
- Mutations located in a specific region of PS may have a higher impact on thrombotic risk.
- Thus, genetic analysis could contribute to further risk prediction in PS-deficient patients.

## 1 | INTRODUCTION

Protein S (PS) acts as a cofactor for activated protein C (APC) in proteolytic inactivation of blood coagulation factors (F) Va and VIIIa, thus participating in regulation of thrombin generation through the APC pathway. Protein S was also reported to have direct anticoagulant activity, ie, independent of APC—in the presence of zinc ions, it directly binds to FIXa and inhibits the activation of FX, and it also directly binds FVa and FXa and inhibits their combined activity [1,2]. It also serves as a cofactor for tissue factor pathway inhibitor- $\alpha$  (TFPI $\alpha$ ) together with FV or with its splice variant (FV-short) during factor Xa inhibition, in which it enhances TFPI-FXa complex formation [3]. Protein S in plasma can circulate free or bound to the complement regulatory factor complement factor 4b (C4b)-binding protein. Free PS (FPS) accounts for around 40% of total PS and is responsible for most of its cofactor activity [4].

Protein S deficiency can be acquired or hereditary. Inherited PS deficiency is divided into 3 types—type I (quantitative) with low PS activity and FPS and total PS (TPS) levels; type II (qualitative) with low PS activity and normal FPS and TPS levels; and type III (mixed) with low PS activity and FPS levels and normal TPS levels [5]. In some families, different individuals can present with either type I or type III protein S deficiency, suggesting that the same mutation can cause different laboratory patterns [6,7].

The protein S gene (*PROS1*) is located on chromosome 3q11.2. Protein S in its mature form is a single-chain (75 kDa) glycoprotein. The N-terminal gamma-carboxyglutamic (Gla) domain (exon 3), containing 11 Gla residues, interacts with calcium ions to facilitate high-affinity binding to negatively charged phospholipid membranes. The thrombin-sensitive region (exon 4) contains 2 thrombin-sensitive cleavage sites and an FXa-sensitive cleavage site. After proteolysis, the Gla domain remains attached to the remaining PS via the disulphide bridge but loses affinity for the membrane, and thus, PS loses its APC cofactor activity. Four connected epidermal growth factor-like domains (exons 5-8) are important for PS activity as they also facilitate Ca<sup>2+</sup> binding. The following sex hormone-binding globulin (SHBG)-like region (exons 9-15, Val243-Ser635), comprising 2 laminin G-type domains, hosts several critical functions. The Gla domain is essential for all anticoagulant functions of PS due to the fact that it binds to negatively charged phospholipids. The SHBG-like region has been identified as having a number of important functions, including all of the direct anticoagulant functions of PS (direct binding to FIXa, FVa [aa 621-635], and FXa in the presence of zinc ions and binding to the TFPI $\alpha$  Kunitz-3 domain) and C4BP binding (specifically aa

420-434, 447-460, and 605-615) [8,9]. There are data showing the interaction with tyrosine kinase receptors of the Tyro3, Axl, and Mer family, which is also located within the laminin G-type domains [10,11].

Considering the diverse functions of the SHBG-like region of PS, it is possible that mutations located within that region would be more damaging in respect to the disrupted folding and subsequent loss of function of this region. Therefore, the aim of this study is to evaluate the risk of thrombosis due to mutations located in the SHBG-like region, as opposed to the rest of the protein.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Study design and population characteristics

Our study consisted of 2 parts. First, we determined the *PROS1* mutations in our patients. Next, we conducted a retrospective cohort study to evaluate whether mutation position in the SHBG-like region affects thrombotic risk. The monitored outcomes were occurrence of any thrombotic event and the age of the patient when the patient's first thrombotic event occurred.

Informed consent was obtained from all participants, and the study met the institutional ethics requirements. The families selected for the study population had confirmed low PS activity and/or antigen levels in the index patient and, if possible, at least 1 close relative. Other causes of thrombophilia (antithrombin or protein C deficiency, FV Leiden [FVL], FII20210A polymorphism, and high FVIII levels) were tested in all patients. The study population includes PS-deficient patients from the Czech Republic from different hospitals and centers with different testing routines. Thus, some of the patients did not have FPS and TPS antigen levels tested, as the primary method for PS deficiency screening in the Czech Republic has, for many years, been solely the PS activity assay. PS deficiency was defined per our laboratory reference range as PS activity levels of <50% for women and 65% for men, free PS levels of <50% for women and <70% for men, and total PS levels of <65%.

When our patients underwent thrombophilia screening and PS deficiency was found, we first repeated the PS activity assay after approximately 3 months to exclude anomalous results or interference of medication. We would then consult the patient's physician to determine any relevant factors that could influence PS activity levels (anticoagulants, recent thrombosis, high FVIII levels, nephrotic syndrome, etc.). Gravidity or hormonal therapy status was noted, and

additional testing was postponed in these patients. With these confounding factors ruled out, FPS and TPS levels were analyzed along with the confirmatory PS activity, and if the abnormal results persisted, the patient was indicated for genetic testing. If a mutation was found, we would then test all available first-degree relatives of the index patient and evaluate the personal and family history of thrombosis. The patient and family history data were obtained through clinical records search. Family members were selected for genetic analysis if they were PS-deficient, regardless of their thrombosis history.

Screening for PS deficiency in the index patients was done based on patient and/or family history of thrombosis (deep vein thrombosis, pulmonary embolism, and thrombosis in atypical locations such as portal, mesenteric, or cerebral vein), first venous thromboembolic event (VTE) before the age of 50, recurrent VTE, and in some cases, pregnancy complications or miscarriages. Deep vein thrombosis and other thrombotic events were documented by duplex ultrasonography and pulmonary embolism by computed tomography angiography. In some cases, PS deficiency was detected in thrombophilia screening done before beginning of oral contraceptive use or due to suspected thrombosis that was, however, later not confirmed.

We indicated 42 index patients for genetic analysis of *PROS1*. Out of the referred families, 43 PS-deficient family members were also indicated. However, sample material for genetic testing was only available from 34 of them, and therefore, in total, 76 PS-deficient patients were analyzed.

## 2.2 | Protein S plasma levels

PS coagulation activity was measured using STA-Sta clot Protein S assay (Diagnostica Stago), which was also used as a screening method for suspected PS deficiency. Free PS antigen was measured by STA Liatest Free Protein S (Diagnostica Stago). PS total antigen was measured by Laurell immunoelectrophoretic assay [12] using polyclonal rabbit anti-human protein S antibodies (A0384, Dako Denmark A/S). All our assays used in this study are verified by external quality assessment (UK NEQAS). Other laboratories contributing to this study have interlaboratory traceability verified (use of IVD/CE reagents and participation in external quality assessment).

## 2.3 | *PROS1* genetic analysis

Informed consent for genetic analysis was obtained from all patients. Human genomic DNA was isolated from leukocytes from peripheral whole blood [13].

The exons, intron-exon boundaries, and 439 base pairs of the proximal promoter area of *PROS1* (gene ID: 5627, OMIM#176880, reference sequence for genomic DNA: NG009813.1) were examined by direct sequencing as previously described [14]. Primers and conditions were chosen so as to avoid coamplification of the highly homologous PS pseudogene (*PROS2*, *PROSP*), and restriction analysis was performed for each amplification product to ensure that the pseudogene was not

present. Apart from the 15 exons in the PS transcriptional variant 2 (reference sequence: NM000313.4), we designed primers for the additional exon from the alternatively spliced transcriptional variant 1 (reference sequence: NM001314077.2; primer sequences available on request), positioned between exons 1 and 2 of variant 2, so as to prevent overlooking any variations influencing the processing of PS. The additional exon is in further text referred to as "exon 2-variant 1."

The possibility of a large deletion or duplication was verified by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis using the SALSA MLPA P112 *PROS1* kit, (MRC; probemix lots: A3-0313, A3-0416, and A4-0318). The assay contains probes for 12 of the 15 exons of *PROS1*. MLPA was done in parallel with direct sequencing in all index patients regardless of mutations found. In family members, gene analysis was restricted to the abnormal region determined in the index patient.

For each novel sequence variation, the likelihood that the mutation could be disease-causing was evaluated by using several prediction software algorithms, such as Polyphen-2 [15], PMut [16], MutationTaster2 [17], PROVEAN [18], SNPs&GO [19], HOPE [20], and VarSome [21]. For splice-site changes prediction, Splice site prediction by Neural Network tool was used [22]. Novel mutations (newly discovered mutations in our patient cohort) were indicated as "disease-causing" when at least 5 of 7 *in silico* tools used in our study provided this prediction. Other disease-causing mutations were previously described as associated with PS deficiency.

## 2.4 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 22.0 (IBM Corp) and R version 1.2.5019 (Development for R, RStudio Inc). Continuous variables are expressed as median (IQR), and categorical variables are expressed as number (percentage) of participants within each group. The normality of data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Since a substantial part of the data did not fit normal distribution, only nonparametric statistical methods were used. The Mann-Whitney U-test was used for continuous variables, and chi-squared test was used for categorical variables. Binary logistic regression was used to assess the risk factors of thrombotic events. Aside from the mutation position (main variable of interest), the variables included in the multivariable model were age at admission, sex, and FVL, as these factors likely affect the outcome. Furthermore, PS activity was considered for inclusion; however, it should be viewed as at least a partial mediator in the relationship between mutation position and thrombotic risk and, therefore, cannot be included in the same model as it is a colinear. Thus, the variables included in the final multivariable model are mutation position, sex, age at admission, and FVL. The variable selection is depicted by a directed acyclic graph (Supplementary Figure). In the multivariable model, there were 3 instances of missing values of PS activity, and in these cases, the median value was inputted in the regression. There were no missing values for categorical variables. The results of multivariable analyses were expressed as odds ratios (ORs) with 95% CIs. For all other analyses,

missing values were ignored (complete case analyses). Kaplan-Meier survival curves and the log-rank test were used to project thrombosis-free intervals for patients with mutations in different parts of PS. "Thrombosis-free interval" herein represents the period from birth to the first VTE event. All reported tests were 2-sided, and a *P* value of <0.05 was considered significant.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Mutation profile

In our patient cohort, we found a disease-causing mutation in 92% (70 of 76) of PS-deficient patients, consisting of 13 novel and 17 previously reported mutations. The disease-causing mutations include 13 null mutations (1 large deletion, 4 nonsense mutations, 4 splice-site substitutions, 3 small insertions <40 base pairs, and 1 small

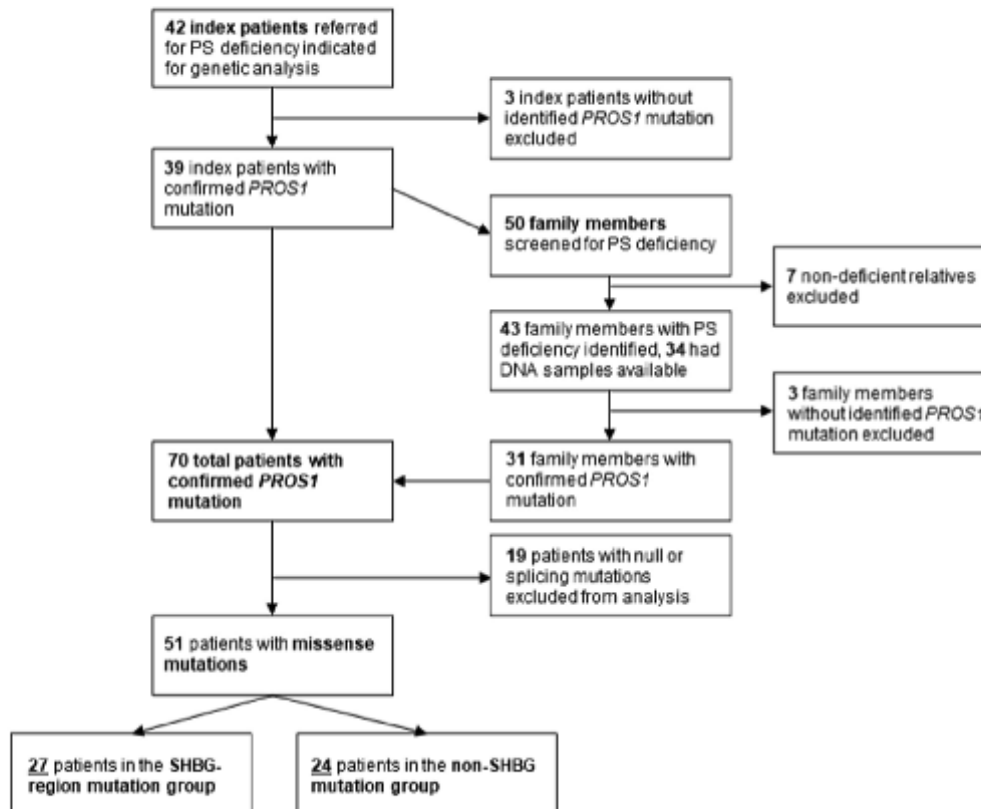
deletion) and 17 missense mutations, respectively. All found mutations were in heterozygous form; 2 families (3 patients) had 2 different concurrent heterozygous mutations. The prevalence of large deletions in our study was 7% (3 of 42 families).

#### 3.2 | Patient characteristics

The study flowchart is shown in Figure 1. Further supporting data are available in the Supplementary Table 1.

#### 3.3 | *PROS1* mutation position groups

The patients with missense mutations (null mutations were excluded) were divided into 2 groups: the "SHBG-region" mutation group (27 patients with 5 different missense mutations in exons 9-15) and the



**FIGURE 1** Summary flowchart of the study population showing patient selection and analysis process. PS, protein S; SHBG, sex hormone-binding globulin.

**TABLE 1** Basic characteristics of the mutation groups.

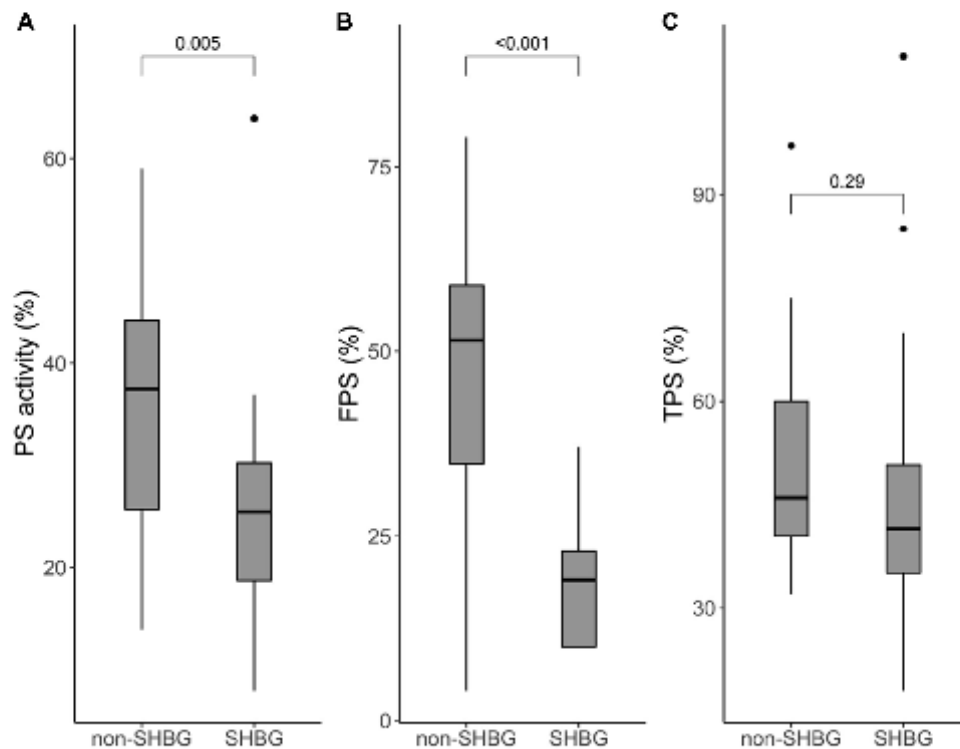
Factor	All participants (n = 51)	SHBG group (n = 27)	Non-SHBG group (n = 24)	P value
Age (y), median (IQR)	32 (21-47)	32 (22-48)	33 (17-46)	.93
Female sex, n (%)	36 (70.6)	17 (63)	19 (72.9)	.21
FV Leiden, n (%)	13 (25.5)	12 (44.4)	1 (4.2)	.001
Thrombotic event, n (%)	29 (56.9)	20 (74.1)	9 (37.5)	.008
Age at first thrombosis (y), median (IQR)	31 (20-40.5)	26 (19-38.5)	33 (31.5-46)	.03

F, factor; SHBG, sex hormone-binding globulin.

"non-SHBG" mutation group (24 patients with 8 different mutations in exons 1-8). Basic characteristics of the mutation groups are summarized in Table 1. The age of admission and sex did not significantly differ between "SHBG-region" and "non-SHBG" groups. The mean PS activity level was significantly lower in the "SHBG-region" group than in the "non-SHBG" group, and the same trend was observed in FPS ( $P = .005$  for PS activity and  $P = .001$  for FPS, Figure 2). On the other hand, TPS levels did not show any significant difference ( $P = .30$ , Figure 2).

### 3.4 | *PROS1* mutation position and thrombosis risk

Next, the patients were divided into 2 groups according to whether they had a history of thrombotic event, and the basic characteristics are shown in Table 2. There was no difference in age at admission and sex between the groups. Patients with thrombotic events had higher rates of mutations in the "SHBG-region" group (69 vs 31.8%;  $P = .008$ ). Interestingly, the rates of thrombotic events in patients with FVL



**FIGURE 2** Results of comparison of PS levels in 2 groups of missense mutations: "SHBG-region" group (27 patients) and "non-SHBG" group (24 patients). A. PS activity: n = 51. B. Free PS (FPS): n = 32 (12 patients in "SHBG-region" group and 20 in "non-SHBG" group). C. Total PS (TPS): n = 31 (7 type III patients were excluded [3 and 4, respectively]; counted were 11 patients in "SHBG-region" group and 19 in "non-SHBG" group). PS, protein S; SHBG, sex hormone-binding globulin.

**TABLE 2** Basic characteristics of the groups of patients with and without thrombotic events.

Factor	Thrombosis + (n = 29)	Thrombosis – (n = 22)	P value
Age (y), median (IQR)	35 (22–46)	29.5 (16–48.3)	.36
Female sex, n (%)	20 (69)	16 (72.7)	.77
FV Leiden, n (%)	9 (31)	4 (18.2)	.30
SHBG+, n (%)	20 (69)	7 (31.8)	.008

F, factor; SHBG, sex hormone-binding globulin.

mutations did not significantly differ (31% vs 18.2%;  $P = .30$ ) even though FVL was found significantly more in patients in the “SHBG-region” mutation group (44.4% vs 4.2%,  $P = .001$ ).

It is also important to note that the families from which multiple participants were enrolled had overall similar rates of family members affected by thrombosis with no 1 family being the majority driving force for thrombotic outcomes (Supplementary Table 2).

To evaluate the baseline impact of PS levels on thrombotic risk in patients with missense mutations (independent of mutation position), we compared them in patients with and without history of a thrombotic event. We found that patients with a history of thrombotic events showed a significant decrease in PS activity ( $P = .02$ ) and FPS (type II patients excluded,  $P < .001$ ) but not TPS (type II and III patients excluded;  $P = .07$ ; Table 3).

To assess the association of mutation position with thrombotic risk, we performed a multivariable binary logistic regression analysis. FVL was included because this polymorphism is an established risk factor for thrombosis [23] and was present in 13 of 51 studied patients in heterozygous form, consisting of 12 patients in the “SHBG-region” group and 1 in the “non-SHBG” group. Since the representation of FVL in the mutation groups was uneven, the model was adjusted for FVL. The analysis showed that mutation position in the “SHBG-region” mutation group (as opposed to the “non-SHBG” group) is an independent risk factor for thrombotic events in PS-deficient patients (Table 4).

Additionally, several sensitivity analyses were performed. To explore whether the skewed distribution of FVL carriers in the 2 patient groups could have affected the results, we have excluded all FVL carriers and the multivariable model was adjusted for age at admission and sex. In this model, the mutation position was still independently associated with risk of thrombotic event (Supplementary Table 3). Next, to assess if the inclusion of index cases in the study affected the results, we performed another sensitivity

analysis on only family members and excluded all index patients, regardless of whether they experienced a thrombotic event or not. In this sensitivity analysis, it was found that the mutation position was independently associated with the risk of thrombotic event even after the index patients were excluded (Supplementary Table 3). Similarly, the PS levels were lower in patients with mutation in the “SHBG-region” than in those with mutation in the “non-SHBG” region when index patients were removed (median, 25 [IQR, 19–31] vs 38 [IQR, 28–44];  $P = .02$ ).

Lastly, Kaplan-Meier method was used to compare the thrombosis-free period in both patient mutation groups. We found that patients in the “SHBG-region” group had shorter thrombosis-free survival (median thrombosis-free survival of 33 vs 47 years,  $P = .02$ ; Figure 3). Furthermore, the median age of the first thrombotic event in the “SHBG-region” group was 26 years, compared with 33 years in the “non-SHBG” group ( $P = .04$ ).

## 4 | DISCUSSION

In our study, we were able to identify a disease-causing mutation in 92% (70 of 76) of PS-deficient patients. Our analyses of the data from the deficient patients show that a missense mutation located in the SHBG-like region may contribute to higher thrombotic risk in our patients rather than a missense mutation located elsewhere in the protein. The group with mutations in the SHBG-like region also displayed shorter thrombosis-free survival.

### 4.1 | Impact of mutation position on protein S

The association of PS deficiency and low FPS levels with higher thrombotic risk has been previously described [24,25]. However, the impact of various *PROS1* missense mutations on thrombotic risk is poorly understood. Furthermore, there are cases in, for example, antithrombin (*SERPINC1*) missense mutations, in which there is a significant impact on thrombotic risk due to the location of the mutation [26]. Therefore, in this study, we sought to assess the influence of mutations located in the SHBG-like region on thrombotic risk as opposed to the rest of the protein.

We have shown that patients with mutations in the SHBG-like region present with lower PS activity and FPS levels than patients with mutations in other regions. There may be additional biological detrimental roles of mutations in the SHBG-like region outside of APC

**TABLE 3** Comparison of PS levels in patients with and without history of thrombosis. Free PS values of type II and total PS values of type II and III-deficient patients were excluded.

Factor	Thrombosis + (n = 29)	Thrombosis – (n = 22)	P value
PS activity, median (IQR)	26 (19–31)	36.5 (27.5–43.25)	.02
Free PS, median (IQR)	22 (10–29)	51 (37–55)	<.001
Total PS, median (IQR)—type III patients excluded	39 (35–47)	45 (42–52.25)	.07

PS, protein S; SHBG, sex hormone-binding globulin.

**TABLE 4** Results of logistic regression analysis of selected factors and their association with thrombotic risk.

Factor	Univariable regression		Multivariable regression	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
FVL	2.03 (0.53, 7.73)	.3	0.88 (0.17, 4.43)	.88
Age at admission (y)	1.01 (0.975, 1.05)	.59	1.01 (0.97, 1.05)	.58
Mutation position	4.76 (1.44, 15.7)	.01	5.17 (1.29, 20.65)	.02
Sex (female)	0.83 (0.25, 2.84)	.77	1.12 (0.29, 4.32)	.86
PS activity	0.94 (0.89, 0.99)	.03		

FVL, factor V Leiden; OR, odds ratio; PS, protein S.

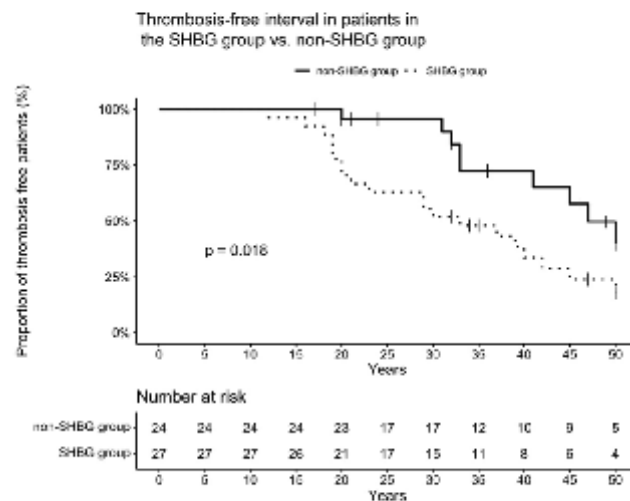
cofactor activity, possibly lowering TFPI $\alpha$ -cofactor activity of PS as well, which may be the explanation for our findings. This study may provide valuable insight given the recent focus on the TFPI $\alpha$ -cofactor activity. Both major inhibitory pathways (APC and TFPI) use the SHBG-like region of PS in their functions of regulating thrombin generation; however, for the TFPI $\alpha$  pathway, this region is critical [27]. This may be further elucidated by using a specific TFPI $\alpha$ -cofactor activity assay when it becomes commercially available [28]. However, the lower PS levels in the "SHBG-region" mutation group may also cause lower free TFPI $\alpha$  levels, as these proteins circulate in complex, which can also contribute to the thrombosis risk [29].

Besides the simple synthesis reduction, there may be other reasons for the lower PS levels in the "SHBG-region" mutation group. First, as the C4BP binding site is located in the SHBG-like region of PS, the reduction in FPS could be attributed to decreased C4BP binding and, consequently, lower half-life [30]. This would lead to an overall reduction in PS activity as well. On this note, the FPS assay is based on the principle of binding a monoclonal antibody to the region where PS-C4BP

binding is located, differentiating the bound and free portion of PS. This binding could then be disrupted by mutations in the SHBG-like region due to possible structural differences. Since this interaction has not been examined in this study, we cannot rule out assay-based interference.

Second, while all studied patients were heterozygotes, their PS activity levels are far below the reference range, even in patients with type II deficiency. This would suggest either problems in expression that lead to reduced synthesis of the healthy protein product (wild-type allele) or some other unknown interactions. The further reduction in PS activity, besides low FPS, could be caused by a disruption of structure by the mutation, which would then influence the anticoagulant activities of PS and its interaction with APC, TFPI $\alpha$ , and FV. The abnormal protein, when expressed, may thus be inactive in the classic PS activity assay based on APC pathway.

The mutations found in the "SHBG-region" patient group are relatively diverse. The missense mutations (p.W383R, p.L446R, p.R515C, p.A525T, p.T617L, p.G621D, and p.C639Y) affect highly conserved residues in which the substitution would result in disruption of the



**FIGURE 3** Thrombosis-free interval in patients in the "SHBG group" (n = 27) vs "non-SHBG group" (n = 24). SHBG, sex hormone-binding globulin.

secondary structure. Since there were similar rates of thrombosis in individual families affected with mutation in SHBG-like region, we assume that the observed higher risk of thrombosis is not caused by 1 specific mutation but the overall effect of mutations in this specific region.

Interestingly, even though FVL was found significantly more in patients with mutations in the SHBG-like region, the rates of thrombotic events in patients with FVL mutations did not significantly differ from the rest.

Among the limitations of our study is the relatively small study cohort stemming from rarity of the observed disease. Furthermore, due to the recruitment for this study, many of the participants have shared ancestry, and therefore, the outcomes are not fully independent as outcomes from members of the same family are likely correlated. Therefore, we have attempted to account for the kinship of the individuals by employing a mixed effects model. Unfortunately, the model could not be adjusted for family status as each family has a mutation specifically in either the SHBG-like region or non-SHBG-like region, and the mutation position is thus closely correlated with family status. Furthermore, we have included index patients into the analysis of association of mutation position and risk of thrombosis in order to increase the sample size of the study. Although not all index patients were identified due to a history of a thrombotic event, this could have been a potential source of bias, nonetheless. However, several sensitivity analyses were performed, including an analysis in which index patients were removed, and these analyses further support the conclusions of the study. Lastly, we have not done any experiments to verify if the mutated proteins undergo expression and secretion or if they show any activity in the assay.

## 5 | CONCLUSION

In conclusion, our analyses suggest that mutations in the SHBG-like region may have a larger impact on thrombotic risk in PS-deficient patients than those in other domains, as it is independently associated with risk of thrombosis, which is experienced at a younger age. Genetic analysis is routinely performed to confirm hereditary origin of PS deficiency and could have additional clinical value in its contribution to risk prediction in deficient patients.

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank J. Obernauerova, E. Sklenarova, M. Slechtova, and E. Fendova for providing patient data and for invaluable cooperation. We also thank I. Zahradka for excellent technical assistance with the statistical analysis and H. Cacarova for language check.

### FUNDING

This research received no external funding.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.F. performed the genetic analysis, protein S measurements, and statistical analysis. M.M. provided majority of the patient data and

clinical insight. V.G. and Z.K.-K. supplied additional patient data. D.P. provided expertise on genetic analysis. T.F. drafted the manuscript that was further revised by D.P., F.M., and I.H. L.H. designed and supervised the overall project and approved the final version of the manuscript. All authors have read and approved the final version of the paper.

### RELATIONSHIP DISCLOSURE

There are no competing interests to disclose.

### REFERENCES

- [1] Fernandes N, Mosnier LO, Tonnu L, Heeb MJ.  $Zn^{2+}$ -containing protein S inhibits extrinsic factor X-activating complex independently of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2010;8:1976–85.
- [2] Hackeng TM, van't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem*. 1994;269:21051–8.
- [3] Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitors, and protein S. *J Thromb Haemost*. 2017;15:1241–50.
- [4] Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:529–36.
- [5] Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S, et al. Protein S deficiency: a database of mutations—summary of the first update. *Thromb Haemost*. 2000;84:918.
- [6] Simmonds RE, Zöller B, Ireland H, Thompson E, de Frutos PG, Dahlbäck B, et al. Genetic and phenotypic analysis of a large (122-member) protein S-deficient kindred provides an explanation for the familial coexistence of type I and type III plasma phenotypes. *Blood*. 1997;89:4364–70.
- [7] Zöller B, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood*. 1995;85:3524–31.
- [8] Somajo S, Ahnström J, Fernández-Recio J, Gierula M, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Amino acid residues in the laminin G domains of protein S involved in tissue factor pathway inhibitor interaction. *Thromb Haemost*. 2015;113:976–87.
- [9] Saposnik B, Borgel D, Aiach M, Gandrille S. Functional properties of the sex-hormone-binding globulin (SHBG)-like domain of the anticoagulant protein S. *Eur J Biochem*. 2003;270:545–55.
- [10] Evenas P, Dahlbäck B, Garcia de Frutos P. The first laminin G-type domain in the SHBG-like region of protein S contains residues essential for activation of the receptor tyrosine kinase syk. *Biol Chem*. 2000;381:199–209.
- [11] Suleiman L, Négrier C, Boukerche H. Protein S: a multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88:637–54.
- [12] Comp PC, Doray D, Patton D, Esmon CT. An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood*. 1986;67:504–8.
- [13] Johns MB, Paulus-Thomas JE. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. *Anal Biochem*. 1989;180:276–8.
- [14] Castoldi E, Maurissen LFA, Tormene D, Spitzia L, Gavasso S, Radu C, et al. Similar hypercoagulable state and thrombosis risk in type I and type III protein S-deficient individuals from families with mixed type I/III protein S deficiency. *Haematologica*. 2010;95:1563–71.



- [15] Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* 2013;Chapter 7:Unit7.20.
- [16] López-Ferrando V, Gazzo A, de la Cruz X, Orozco M, Gelpi JL. PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:W222–8.
- [17] Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11:361–2.
- [18] Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLOS ONE*. 2012;7:e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
- [19] Capriotti E, Calabrese R, Fariselli P, Martelli PL, Altman RB, Casadio R. WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. *BMC Genomics*. 2013;14:56.
- [20] Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Helkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 2010;11:548.
- [21] Kopyanos C, Tsibikas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019;35:1978–80.
- [22] Reese MG, Eedman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in genie. *J Comput Biol*. 1997;4:311–23.
- [23] Dahlbäck B. Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVRS06Q mutation. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25:273–89.
- [24] Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood*. 1995;85:2756–61.
- [25] Lijffert WM, Mulder R, ten Kate MK, Veeger NJGM, Mulder AB, van der Meer J. Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. *Blood*. 2009;113:1225–30.
- [26] Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Hugon-Rodin J, Picard V, Horellou MH, GFTT Study Group on Genetic Thrombophilia. Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost*. 2017;117:1040–51.
- [27] Regliska-Matveyev N, Andersson HM, Rezende SM, Dahlbäck B, JTB Crowley, Lane DA, et al. TFPI cofactor function of protein S: essential role of the protein S SHBG-like domain. *Blood*. 2014;123:3979–87.
- [28] Brinkman HJM, Ahnström J, Castoldi E, Dahlbäck B, Marlar RA. Pleiotropic anticoagulant functions of protein S, consequences for the clinical laboratory. Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2021;19:281–6.
- [29] Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Rosling J, Hackeng TM. Hereditary and acquired protein S deficiencies are associated with low TFPI levels in plasma. *J Thromb Haemost*. 2010;8:294–300.
- [30] He X, Shen L, Malmberg AC, Smith KJ, Dahlbäck B, Unse S. Binding site for C4b-binding protein in vitamin K-dependent protein S fully contained in carboxy-terminal laminin-G-type repeats. A study using recombinant factor IX-protein S chimeras and surface plasmon resonance. *Biochemistry*. 1997;36:3745–54.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100194>

## Effects of frozen storage conditions and freezing rate on the stability of coagulation proteins in human plasma

Tereza Fenclova<sup>a,b</sup>, Frantisek Marecek<sup>a</sup> and Ingrid Hrachovinova<sup>a</sup>

**Objectives** Degradation of coagulation proteins in frozen plasma may influence assay results. The aims of this study were to explore the changes in coagulation parameters in patient plasma and internal quality control (IQC) after different freezing and storage conditions during the short-term and long-term periods.

**Methods** Platelet poor plasma was prepared from citrated peripheral blood collected from a group of healthy donors. The plasma was pooled, frozen and stored in a variety of freezing and storage conditions. The changes were monitored using routine coagulation assays, as well as factor VIII (FVIII) and protein S (PS) assays.

**Results** Plasma stored in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) or in  $-80^{\circ}\text{C}$  showed long-term stable values for routine tests for a period of over 12 months, and 6 months for FVIII. Interestingly, the activated partial thromboplastin time (aPTT) showed a temporary significant prolongation over the first two weeks. Plasma frozen and stored in  $-40^{\circ}\text{C}$  is not viable for aPTT and FVIII testing, otherwise it can be used for other parameters for up to 4 months. PS showed a significant increase in all frozen samples. Freezing rate has a significant impact on plasma quality and the final storage temperature influences the long-term stability.

### Introduction

Prenalytical conditions have a significant impact on laboratory assessment of hemostasis and coagulation assays. Prenalytical storage time and temperature are the main variables that affect the stability of plasma samples. Coagulation laboratories frequently freeze aliquots of patient plasma for nonroutine assays, as well as use frozen pooled plasma for internal quality control (IQC) in routine assays. The ideal control plasma should be qualitatively as close as possible to patient material, which is the main reason for using pooled donor plasma. Another reason is that for frequent daily IQC, pooled plasma is cheaper than using commercially available lyophilized controls.

There is a considerable body of literature on the overall long-term stability of coagulation parameters in frozen plasma [1,2]. However, there is a lack of comparative evidence on the suitability of different storage temperatures and conditions, especially in the first month of frozen storage, considering that is the time frame in which the majority of nonroutine patient sample testing is performed in a laboratory setting. We also aimed to evaluate the long-term stability of frozen pooled plasma aliquots for the use in IQC.

**Conclusion** The optimal storage conditions are ultra-low temperatures (LN<sub>2</sub> or  $-80^{\circ}\text{C}$ ) and the highest freezing rate possible. However, frozen plasma is not viable for IQC of aPTT during a period of two weeks after freezing. This study is unique in its conception as a practical guide for the handling of frozen plasma samples in modern laboratory settings. *Blood Coagul Fibrinolysis* 34:000–000 Copyright © 2023 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

*Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2023, 34:00–00

**Keywords:** blood coagulation tests, hemostasis, preanalytical phase, quality control

<sup>a</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, National Reference Laboratory for Disorders in Hemostasis and <sup>b</sup>Charles University, First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

Correspondence to Dr Ingrid Hrachovinova, PhD, Institute of Hematology and Blood Transfusion, National Reference Laboratory for Disorders in Hemostasis, U Nimrovice 2094/1, 128 00 Prague, Czech Republic.  
Email: ingrid.hrachovinova@uhkt.cz

Received 11 April 2023 Accepted 30 June 2023

The aims of this study were to explore the changes in coagulation parameters after freezing during the first month of storage, and to evaluate the long-term stability of frozen pooled plasma for the use in IQC. The parameters were selected based on whether they have previously shown to be affected by freezing, or whether they reflected the quality of a sample in some way. Out of the screening assays, the most affected by freezing is the activated partial thromboplastin time (aPTT) [3], which should thus be measured in fresh plasma when possible. The aPTT, prothrombin time (PT), fibrinogen and antithrombin assays were included in the study since these are the most common laboratory tests performed in patients suspected of having a coagulopathy. Factor VIII (FVIII) is labile in solution and is significantly affected by freezing, residual platelet activation [4] and also by oxidation during storage [1]. The D-dimer assay was employed to detect the activation of coagulation during freezing or thawing of the samples. Protein S (PS) was also shown to be affected by storage temperature [1]. However, the assay used in that study was only the coagulation activity assay. For this reason, we included the PS activity and the PS free antigen assays as well.

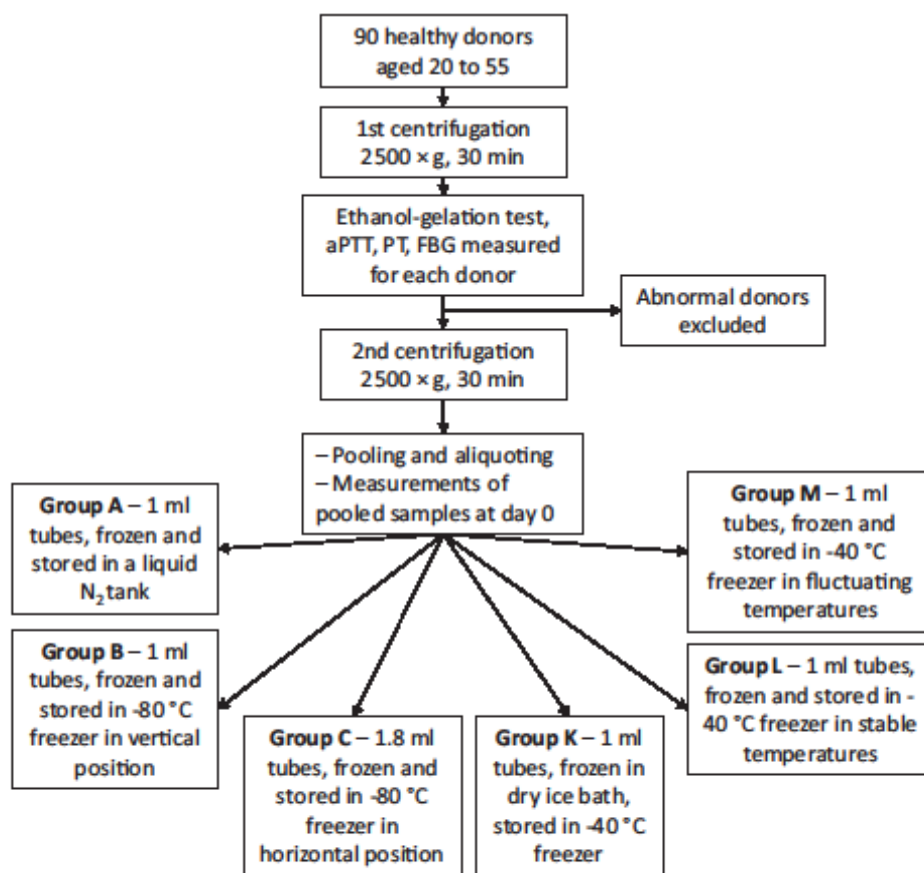
## Materials and methods

### Blood collection and sample processing

The plasma used for this study was obtained from a group of healthy donors aged 20–55 who gave informed consent. The concentration of sodium citrate in the collection tubes was 0.109 mol/l (3.2%) and the collected peripheral blood was centrifuged at  $2100 \times g$  for 30 min at room temperature, as per current guidelines for sample processing [5]. Individual donor samples were then tested with the ethanol gelation test [6] to exclude samples in which coagulation was activated during venipuncture. All donor samples were analyzed to verify normal coagulation and donors with abnormal results were excluded, as per our laboratory standard procedure

for IQC plasma preparation. The plasma samples were then centrifuged again to obtain platelet-poor plasma (PPP, the residual platelet count measured was  $<10 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). The plasma was then pooled and aliquoted into 1 ml (or 1.8 ml) silicon-sealed tubes (Nunc CryoTube, Thermo Scientific, USA). Ten aliquots of the pooled plasma were put aside before freezing and measurements were performed within 4 h after collection. These results served as a baseline. The rest were divided into six groups based on their planned storage conditions (Fig. 1). These were: freezing and storage in liquid nitrogen (submerged,  $-196^\circ\text{C}$ ) monitored for up to 1 year (group A), freezing and storage in a  $-80^\circ\text{C}$  freezer monitored for up to 1 year (group B – 1 ml tubes stored

Fig. 1



Flowchart of the sample preparation and organization of groups with different freezing and storage conditions. aPTT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time; FBG, fibrinogen; liquid N<sub>2</sub>, liquid nitrogen.

vertically, group C – 1.8 ml tubes stored horizontally), freezing in dry ice/ethanol bath ( $-76^{\circ}\text{C}$ , group K) and subsequent storage in a  $-40^{\circ}\text{C}$  freezer, and freezing and storage in the  $-40^{\circ}\text{C}$  freezer (group L – with stable temperatures, group M – with fluctuating temperatures) monitored for up to 6 months. The group stored in ‘fluctuating temperatures’ was positioned near the door of the  $-40^{\circ}\text{C}$  freezer to simulate the effect frequent opening of the freezer can have on plasma samples in a routine laboratory, however manipulation with the samples was always kept to a minimum as to ensure they would not thaw prematurely. The mean storage temperature of the freezers used for this study was  $-80$  and  $-40^{\circ}\text{C}$ , respectively and never varied by more than  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  during the study period. The temperature inside the liquid nitrogen tank was considered to be constant during the study period.

On each day of measurement, five aliquots from each group were thawed in a  $37^{\circ}\text{C}$  water bath for 10 min. All assays were performed on five aliquots in parallel and the mean value of the results was used for evaluation. The measurements were done using an automatic coagulometer (STA-R Evolution, Diagnostica Stago, France). All testing was completed within 1 h of sample thawing. Samples underwent only one thawing cycle and were discarded after measurement.

The frequency of measurements was as follows: groups A, B and C daily during the first week, then weekly, then monthly and after the period of 4 months the interval was once every 2 months for a total length of one year. The groups K, L and M (stored in higher temperatures) were measured according to the same schedule, but for a total period of only 4 months (except PS, which was monitored for up to 6 months in all groups).

In a separate experiment, we assessed the freezing rate of all of the freezing methods used. For this purpose, we employed a digital temperature sensor (Comet System, Czech Republic) with a thin probe (2 mm in diameter). The probe was securely placed inside a cryo-tube with plasma through a hole in the cap that was sealed afterwards. The tube was then placed into a freezer ( $-80$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$ ), liquid nitrogen or into dry ice/ethanol bath, respectively. The temperature reading was taken every 10 s. The time when the plasma sample froze completely was denoted when the temperature started to decrease after reaching  $0^{\circ}\text{C}$ .

The Comet monitoring system (Comet System, Czech Republic) was used throughout the study period to control the temperature of all freezing and frozen storage methods examined in this study.

### Materials

The reagent used for activated partial thromboplastin time (aPTT) assays was STA-PTT-A (Diagnostica Stago, France). The prothrombin time reagent used was STA-

Neoplastine with ISI of 0.97 (Stago). Fibrinogen was measured using the Clauss method with the DG-FIB Human reagent (Grifols, Spain), the diluent used was STA-Owren-Koller Buffer (Stago). PS activity was measured using the STA-Sta clot PS assay (Stago). For the FVIII assay the reagent used was Pathromtin SL (Siemens, Germany); the FVIII Deficient Plasma (Siemens) contained  $\leq 0.01 \text{ IU ml}^{-1}$  of residual FVIII activity. Antithrombin was measured using a chromogenic assay using Biophen AT-LRT (Hyphen BioMed, France), which contains the Sxa-11 chromogenic substrate. The D-Dimer and the PS free antigen were measured in a latex agglutination assay using the STA-Liatest D-Di and STA-Liatest Free PS, respectively. The calibrations of fibrinogen, FVIII and PS activity assays were performed using the Standard Human Plasma (Siemens), antithrombin using the STA-Unicalibrator (Stago). The D-dimer and the PS free antigen were precalibrated by the manufacturer. The normal and abnormal control plasmas used for IQC were: STA-Coag Control (Stago; aPTT, PT, fibrinogen, antithrombin), Dade Control Plasma (Siemens; FVIII, PS activity), STA-Liatest Control (Stago; D-dimer, PS-free antigen). The same lots of reagents, controls and calibration materials were used throughout the study period.

### Statistical analysis

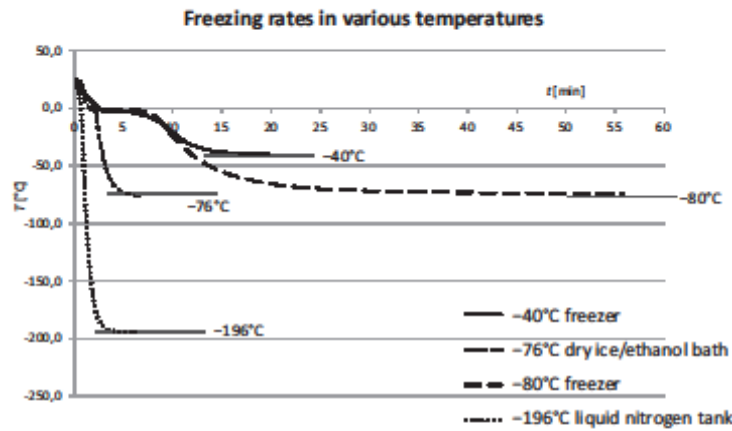
Statistical analysis was performed using StatView version 5.0.1 (SAS Institute, NC, USA). Data obtained from both the frozen and the fresh samples were compared using the independent *t*-test. *P*-value of  $< 0.05$  was considered significant. However, for the evaluation of the given plasma parameter stability, the uncertainty threshold of the given assay was used, since the assays differ in precision. In our study, the relative uncertainty of imprecision was calculated using IQC data as the coefficient of variation (CV) for reproducibility (intermediate precision).

### Results

The study flowchart is shown in Fig. 1. The freezing rate of the samples placed in liquid nitrogen was 2 min to freezing (phase transition) and another 6 min to reaching the target temperature ( $-196^{\circ}\text{C}$ ,  $32^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Samples stored in the  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer froze after 5 min 30 s and reached the target temperature after 40 min ( $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). In the  $-40^{\circ}\text{C}$  freezer, the rate to freezing was 5 min and time to reaching the target temperature was 20 min ( $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). For comparison, in the  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer, the sample reached the temperature of  $-40^{\circ}\text{C}$  in 12 min. Finally, the samples placed in the dry ice/ethanol bath froze in 2 min and reached the target temperature ( $-76^{\circ}\text{C}$ ) in 6 min ( $13^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , Fig. 2).

APTT showed significant, but temporary, changes in the first week of storage in all groups (A – day 5,  $P = 0.0007$ ; B/C/K/L/M – day 1,  $P < 0.0001$ ), shown in Fig. 3. Afterwards, the aPTT values returned to the baseline level for

Fig. 2



The freezing rate for all temperatures and conditions used in the study.

ultra-low temperatures groups (A, B and C), and stayed increased for higher temperatures groups (K, L and M), respectively. After the first week, the samples stored in ultra-low temperatures (groups A, B, C) showed no significant changes in aPTT, PT, fibrinogen, antithrombin and D-dimer levels for the entire one year of storage.

aPTT increased significantly on the first day ( $P < 0.0001$ ) in the higher temperatures groups (K, L and M) and continued rising during the 4-month storage period.

PT also showed a significant increase in groups the higher temperatures groups (K, L and M) on the first day ( $P$ -values: 0.0289, 0.0025, 0.0029, respectively), and continued rising during the storage period. Fibrinogen,

antithrombin and D-dimer levels were stable in the higher temperatures groups (K, L and M) for the entire storage period (4 months).

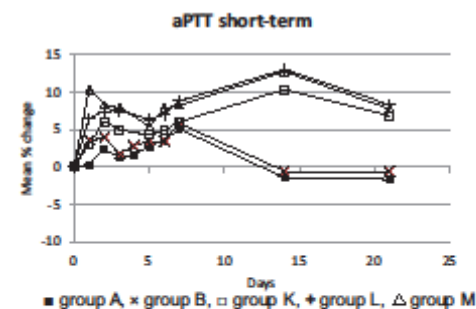
FVIII showed significant changes in all studied storage conditions. However, for this assay, we noted only the differences that were over the uncertainty threshold (8.1%) as significant for plasma stability. In the first week, groups C ( $-80^{\circ}\text{C}$ , horizontal position), L ( $-40^{\circ}\text{C}$ , stable temperatures) and M ( $-40^{\circ}\text{C}$ , fluctuating temperatures) decreased under the uncertainty threshold on day 5 (L, M,  $P < 0.0001$ ) or day 7 (C,  $P < 0.0001$ ), respectively. Group K (quick freezing in dry ice/ethanol, stored in  $-40^{\circ}\text{C}$ ) crossed the uncertainty threshold on day 42 ( $P < 0.0001$ ), group B on day 168 ( $P < 0.0001$ ) and group A samples were stable for the entire storage period (1 year).

The D-dimer differences were evaluated in absolute numbers instead of % change and these results were not included in the statistical analysis as there was a high variability inside the normal range of results. The D-dimer levels were not elevated over the abnormal cut-off in any of the studied sample groups.

PS was increased above the uncertainty threshold during the first week after freezing in all groups for both the PS activity and the PS-free antigen. PS activity started decreasing at 2 months, the PS-free antigen stayed increased the entire period (6 months).

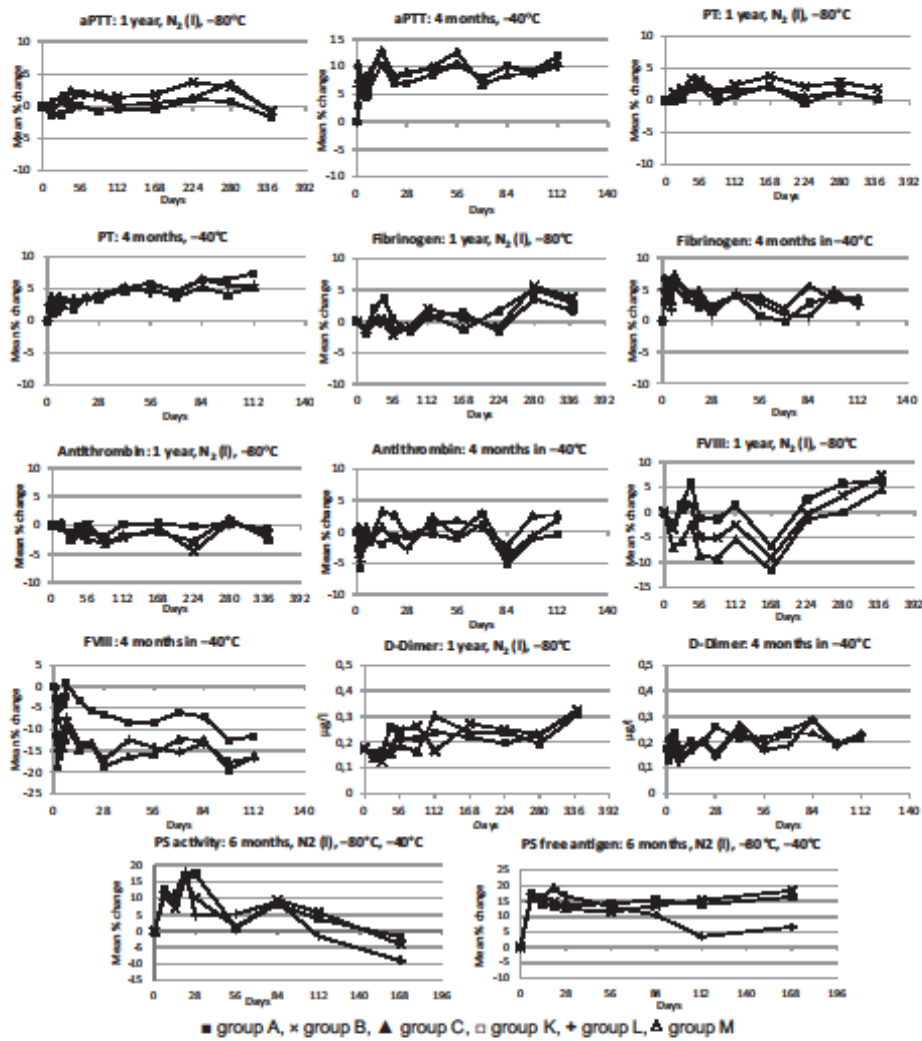
All parameters and their changes during the study period are shown in Fig. 4. The proposed usability of plasma frozen and stored in the given conditions is shown in Table 1.

Fig. 3



Close-up on the temporary increase in aPTT during the first 2 weeks of storage. aPTT, activated partial thromboplastin time.

Fig. 4



Overall changes in studied parameters and groups during the study period. Group A – freezing and storage in liquid nitrogen, group B – freezing and storage in a -80°C freezer in 1 ml tube stored vertically, group C – freezing and storage in a -80°C freezer in 1.8 ml tubes stored horizontally, group K – freezing in dry ice/ethanol bath (-76°C) and storage in a -40°C freezer, group L – freezing and storage in the -40°C freezer with stable temperatures, group M – freezing and storage in the -40°C freezer with fluctuating temperatures. aPTT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time; FVIII, factor VIII, N<sub>2</sub> (l), liquid nitrogen; PS, protein S.

Table 1 Period of time (in months) when measured parameters change exceeded the relative uncertainty of the assay (compared to fresh pooled plasma)

Parameter	Relative uncertainty (%)	Liquid N <sub>2</sub>	-80 ± 2°C		-40 ± 2°C	
			1 ml tube	1.8 ml tube, horizontal	Snap frozen	Passive
aPTT	5.5	12	12	12	N	N
PT	3.0	12	12	12	1.5	1.5
FBG	8.1	12	12	12	4	4
AT	9.2	12	12	12	4	4
FVIII	8.1	12	6	2	1.5	N
PS activity	8.5	6	6	–	–	4
PS free	4.3	6*	6*	–	–	4*

N – indicates a storage condition that is not viable. aPTT, activated partial thromboplastin time; AT, antithrombin; FBG, fibrinogen; FVIII, factor VIII; liquid N<sub>2</sub>, liquid nitrogen; PS, protein S; PT, prothrombin time. \*PS-free antigen was increased over the uncertainty limit in all timepoints, the stability is approximated from PS activity.

## Discussion

The objective of this investigation was to evaluate the changes in coagulation parameters after freezing during the first month of storage, and to also evaluate the long-term stability of frozen pooled plasma for the use in IQC.

aPTT measured in the plasma stored at ultra-low temperatures during the first week of storage showed a significant increase. This short-term temporary increase of aPTT may influence the results of quality control when using frozen pooled plasma, as well as skew patient results which are usually analyzed in the 2 weeks after freezing. A similar anomaly was previously observed in short-term storage studies [7,8]. However, in those studies, the plasma was not centrifuged twice to yield PPP, which is required for the stability of many coagulation factors in frozen plasma due to residual platelet activation upon thawing [9]. In a more recent study, there was an anomalous decrease in the aPTT during the first week of storage in -70°C [9]. However, this decrease was more apparent in samples with abnormal results but not in the normal range. Unfortunately, our study did not include samples with an abnormal aPTT.

In the samples stored in -40°C, there were generally greater deviations in aPTT from the results of the measurements taken from fresh plasma due to higher storage temperatures. Moreover, the changes were larger in groups which did not go through quick freezing (dry ice/ethanol bath). During the first week, the variance was largest in group M (passive freezing, fluctuating temperatures), and smallest in group K (quick freezing, stable temperatures); the difference was significant. Later, after 1.5 months, the difference became nonsignificant. This implies that the method of freezing and the freezing rate are most important in early stages of storage.

Therefore, for use in internal quality control of the aPTT, the pooled plasma should be stored at the lowest temperature possible (liquid nitrogen or -80°C freezer). The higher temperatures described here (-40°C and higher) are inappropriate, as the aPTT increases more quickly and to higher values than in the ultra-low temperatures,

which is consistent with earlier studies [1,3]. Furthermore, the freezing rate may contribute to the effect, as there is a proven relation between a higher FVIII degradation and slow or passive freezing methods. Finally, the frozen plasma (liquid nitrogen or -80°C) should not be used during the first two weeks of storage, as it may be unstable, and the IQC results would be affected.

Antithrombin has been previously shown to increase after freezing and thawing of plasma samples [10], which may also be indicative of residual platelet degranulation due to the release of alpha-2 macroglobulin that binds thrombin, a substrate commonly used in AT chromogenic assays. However, in our study, we used reagents containing FXa and chromogenic substrate Sxa-11, and no significant increase was observed using this assay.

Activity of FVIII was severely affected by both the method and the freezing rate. In the first sequence (ultra-low temperatures), the activity levels fluctuated within the interval of relative uncertainty (8.1%). However, there is a significant difference between each group. Group A (liquid nitrogen) showed the highest levels, group B (-80°C freezer, vertical) showed somewhat lower values, and group C (-80°C freezer, horizontal, 1.8 ml tubes) the lowest. The volume of the sample tube and the amount of air inside are important, as has been previously shown [1]. FVIII is highly susceptible to oxidation in vulnerable areas (7 disulfide bridges, 5 -SH residues and 43 methionine residues), as was shown on the model of the recombinant FVIII-SQ [11]. The oxidation occurs even in the frozen state, and this is the reason why the larger the surface area and volume of air in headspace, the lower the FVIII activity is found in the plasma sample. We observed that the group C samples, which were frozen at the same rate as group B samples (passive freezing), but in larger tubes (more air in headspace) and stored in a horizontal position (greater surface area), showed a much greater decrease in FVIII activity than others. In order to minimize the damage caused by oxidation, the plasma indicated for measuring the FVIII activity should be stored in small vials and in sufficient volumes, that the amount of air in headspace is minimal.

In the higher temperature groups ( $-40^{\circ}\text{C}$ ) there was a noticeable decrease in activity during the storage period, and also a significant difference between groups K, L and M. The samples in group K were frozen in a dry ice/ethanol bath, and the positive effect of this quick-freezing method was evident. In contrast, groups L and M (passive freezing) reached the uncertainty threshold already on the second day. Therefore, when it is required to store the plasma in temperatures  $-40^{\circ}\text{C}$  or higher, in order to preserve the FVIII activity for as long as possible, the plasma needs to be frozen at a lower temperature employing a quick-freezing method to prolong its stability. The storage conditions of groups L and M (passive freezing) are undesirable for the storage of plasma intended for FVIII determination. Although pooled plasma is rarely used in IQC of FVIII assays, patient samples are usually frozen, since many laboratories do not perform this assay on a daily basis or send the frozen samples for referral testing. Samples frozen for a longer period of time are at risk of a significant decrease of active FVIII levels due to inappropriate storage conditions. It should be noted that in their study, Woodhams *et al.* [1] did not attribute any effect on the final change in FVIII levels to the freezing rate. This may be due to the fact that the highest freezing rate applied was passive gradual freezing in a  $-74^{\circ}\text{C}$  freezer, which was denoted as snap-freezing, as opposed to freezing in a  $-24^{\circ}\text{C}$  freezer, or the combination of both. However, there are numerous studies that report the freezing rate as a key factor in the preservation of FVIII activity in a wide range of tested storage temperatures [12–15].

The stability of FVIII in frozen plasma samples was estimated to be at least 12 months when stored in liquid nitrogen. However, if the study period was longer, the stability would have probably been at least 24 months, as reported by Woodhams *et al.* [1]. In a  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer stored in a vertical position, the stability is at least 6 months, whereas in a horizontal position it is only 2 months. Furthermore, storage of plasma samples at higher temperatures ( $-40^{\circ}\text{C}$ ) should generally be avoided, as the degradation of FVIII and possibly other factors, such as FV, always takes place to some degree [16]. If higher temperatures are necessary, the instability may be partially mitigated using a quick freezing method (for example a dry ice/ethanol bath).

PS was increased above the uncertainty threshold in the first week after freezing in all groups for both methods. However, PS activity started to decrease after 2 months, and the decrease was most pronounced in the L group (stored in  $-40^{\circ}\text{C}$ ), while the free antigen stayed increased for the whole study period. PS was previously shown to increase after 2 weeks of frozen storage [1] and in 2 months returned to baseline for both the samples stored in  $-74^{\circ}\text{C}$  and in  $-24^{\circ}\text{C}$ . Since we had a lower temperature range used, there was not as large a decrease in the PS activity observed in our study. However, the

trend appears similar, with lower temperatures retaining a higher PS activity. On the other hand, Woodhams *et al.* [1] used only the PS activity assay and the first time point was at 2 weeks, whereas we measured the samples weekly up to the first month of the study. Notably, the free PS antigen stayed increased while the PS activity went down. There may be other interferences and influences that lay past the scope of this study. On the other hand, the study by Zander *et al.* [16] included the PS free antigen and showed no significant increase. However, their samples were analyzed for 90 days only and the acceptable difference was significantly larger ( $>3$  inter-assay CVs, CV 8.42) compared to our study. Since we wanted to incorporate both the changes that would be disruptive for the IQC use and also for the reproducibility in patient samples, we set the range of 1 inter-assay CV as an indicator. Since most patient samples are usually analyzed in the first 2 weeks after freezing, this increase may introduce a potential bias into the results, even if it may not be clinically significant. PS activity or free antigen are used as screening methods for the diagnosis of PS deficiency, a rare and severe thrombophilia, and this increase might result in an incorrect diagnosis.

In conclusion, the optimal storage conditions are ultra-low temperatures ( $-80^{\circ}\text{C}$  or liquid nitrogen) and the highest freezing rate possible (quick-freezing in liquid nitrogen or dry ice/ethanol bath). Samples stored at very low temperatures can be used for IQC and patient testing for the majority of parameters for up to 12 months, except for FVIII assays (in that case for up to 6 months when stored in  $-80^{\circ}\text{C}$ ), and in the first week of storage should not be used for aPTT and PS testing as the aPTT and PS levels show an anomalous increase in the first week of storage in all studied storage conditions. This study is unique in its conception as a practical guide for the handling of frozen plasma samples intended for coagulation testing in modern laboratory settings. It reveals interesting problems and challenges in plasma storage which have to be taken into account due to the possible interference in coagulation assays.

#### Acknowledgements

We would like to thank H. Cacarova for proof-reading and language check.

Research funding: None declared.

Author contributions: T. Fenclova performed the sample preparation, measurements and statistical analysis. F. Marecek assisted in the study design and sample preparation. T. Fenclova also drafted the manuscript that was further revised by F. Marecek and I. Hrachovinova. I. Hrachovinova designed and supervised the overall project and approved the final version of the manuscript. All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.



**Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest.

**References**

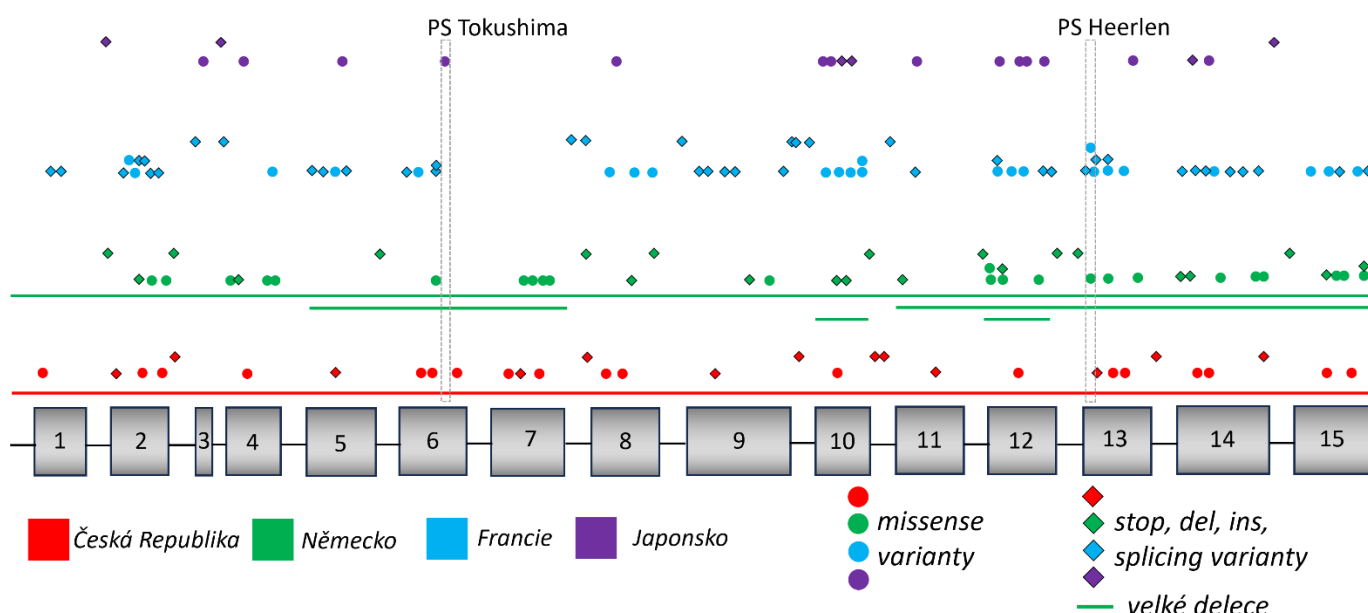
- 1 Woodhams B, Grandt O, Bianco MJ, Collesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; **12**:229–236.
- 2 Zhao Y, Fang G, Zhang J, Gong R, Cai C, Fang L. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VII and IX activity. *Sci Rep* 2017; **7**:12179.
- 3 Alwad S, Burggraf M, Dempfle CE. Effect of freezing method and storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$  on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Thromb Res* 2009; **124**:121–126.
- 4 Lippi G, Rossi R, Ippolito L, Zoppi V, Azzì D, Ppitone S, et al. Influence of residual platelet count on routine coagulation, factor VII, and factor IX testing in postfreeze-thaw samples. *Semin Thromb Hemost* 2013; **39**:834–839.
- 5 CLSI. *Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline—6th edition*. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 6 Godal HC, Abildgaard U. Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol. *Scand J Haematol* 1966; **3**:342–350.
- 7 Rao LV, Okorodudu AO, Pateman JR, Elgetangy MF. Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. *Clin Chim Acta* 2000; **300** (1–2):13–21.
- 8 Awad MA, Eidean OAS, Ibrahim HA. Stability of activated partial thromboplastin time (APTT) test under different storage conditions. *Hematology* 2008; **11**:311–315.
- 9 Gosselin RC, Dwyns DW. Determining the effect of freezing on coagulation testing: comparison of results between fresh and once frozen-thawed plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; **26**:69–74.
- 10 Inkster M, Sherman LA, Ahmad F, Benton MB, Gaston LW. Preservation of antithrombin III activity in stored whole blood. *Transfusion* 1984; **24**: 57–59.
- 11 Fatouros A, Österberg T, Mikaelsson M. Recombinant factor VII SD— influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution. *Int J Pharm* 1997; **155**:121–131.
- 12 Britten A, Grove-Rasmussen M. Stability of factor VII in the frozen state. *Transfusion* 2009; **49**:230–233.
- 13 Carlébjörk G, Blombäck M, Pihlstedt P. Freezing of plasma and recovery of factor VII. *Transfusion* 1986; **26**:159–162.
- 14 Sward-Nilsson AM, Persson PO, Johnson U, Lethagen S. Factors influencing factor VII activity in frozen plasma. *Vox Sang* 2008; **90**: 33–39.
- 15 Akarblom O, Bremme K, Dackland AL, Fatah K, Suontala AM, Blombäck M. Freezing technique and quality of fresh-frozen plasma. *Intensivther Transfusionsmed* 1992; **19**:283–287.
- 16 Zander J, Bruegel M, Kleinhepfer A, Becker S, Petros S, Korts L, et al. Effect of biobanking conditions on short-term stability of biomarkers in human serum and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2014; **52**:829–839.

Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcc.12414 by University of Groningen, Wiley Online Library on [01/11/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

## 4. Diskuze

### 4.1 Mutační profil

V naší kohortě pacientů s vrozeným deficitem PS jsme našli kauzální mutaci u 92 % pacientů. Bylo nalezeno celkem 34 různých mutací, z toho 15 nebylo dosud v literatuře popsáno. Mutační profil byl podobný jako byl reportován v předchozích studiích, s mutacemi všech typů rozptýlenými po celém genu (García de Frutos et al. 2007). Profil mutací v našem souboru z České republiky se významně nelišil od ostatních studií (viz obrázek 4). Nenalezli jsme ani jeden z vyjmenovaných frekventovaných polymorfismů.



**Obrázek 4:** Porovnání mutačního profilu několika populací s naším souborem pacientů na schématu genu *PROSI*. Německo (Caspers et al. 2012), Francie (Alhenc-Gelas et al. 2016), Japonsko (Adachi 2005; Miyata et al. 2009).

### 4.2 Míra detekce mutací

V literatuře je několik příkladů různé míry detekce mutací v závislosti na selekci pacientů, zejména podle hladin FPS. Například ve dvou velkých evropských studiích byla reportována detekce mutací 75 % (Caspers et al. 2012) respektive 94 % (Alhenc-Gelas et al. 2016) pro hladinu FPS pod 25 %. Naopak pro hladiny FPS 25-55 % byla míra detekce mutací 29% (Caspers et al. 2012) resp. 34% (Alhenc-Gelas et al. 2016).

Hodnota FPS 25 % byla v těchto studiích vybrána, protože obecně pacienti s nižšími hodnotami mají vyšší riziko trombózy (Alhenc-Gelas et al. 2016). Jiné studie uvádějí celkové míry detekce bez ohledu na hladinu FPS například 61% (Duebgen et al. 2012) nebo 92% (Espinosa-Parrilla et al. 1999), v druhém případě byli ale selektováni pacienti pouze s PSD typu I. Tato rozmanitost by částečně mohla být vysvětlena různými populacemi a tedy velikostmi vzorku pacientů, poměry mužů a žen a především rozdíly v selekci pacientů. Vyšší míra detekce mutací je výrazně posílena přísnějším výběrem pacientů a strategií testování. Proto aby bylo genetické vyšetření dostatečně efektivní, je důležité provádět důkladnou laboratorní diagnostiku a korelaci s rodinnou anamnézou před jeho zahájením. Míra detekce mutací v našem souboru pacientů byla 92 %, pravděpodobně díky přísnější selekci pacientů na základě anamnézy a léčby.

Doporučení k vyšetřování deficitu PS se různí. Například je uváděno, že FPS je lepší screeningová metoda oproti aktivitě PS, nicméně pokud je používán výhradně volný antigen, dochází k poddiagnostikování funkčních deficitů PS (typ II). Nicméně, sice je k dispozici velké množství reagensů ke stanovení aktivity PS, ne všechny jsou ale spolehlivé vzhledem k interferencím, například přítomnosti FV Leiden. Dále je taky nutné vyvinout metody pro stanovení aktivity PS jako kofaktoru TFPI, tyto jsou zatím odkázány na složité a často nedostupné výzkumné metodiky. Proto je spolehlivá laboratorní diagnostika PS složitá a často dochází k misdiagnostikování deficitu PS a zbytečnému genetickému vyšetření. Dokud nebude na trhu spolehlivá screeningová metoda citlivá na všechny typy PSD, je nutné diagnostiku provádět pečlivě a vždy zahrnovat anamnézu a historii pacienta a prozkoumat možné interference. Na druhou stranu genetické vyšetření v době sekvenování nové generace (NGS) již není tak obtížně dostupné jak tomu bylo v minulosti a proto je v případě nejasného fenotypu a rizikových pacientů stále možnost použít molekulárně genetické metody pro definitivní diagnózu (Berezky et al. 2016).

#### 4.3 Vliv typu mutace na hladinu PS

Pacienti s velkými delecemi a nonsense mutacemi měli výrazně nižší PS aktivitu a hladiny FPS než ostatní pacienti s PSD typu I s missense mutací. Nonsense mutace obecně vedou k těžším deficitům (García de Frutos et al. 2007; Rezende, Lane, Zöller, et al. 2002) a obvykle způsobují PSD prostřednictvím redukce syntézy. Naopak dopad

missense mutací je různý, sahající od velmi nízkých hodnot PS s nestabilním nebo chybně složeným mutovaným proteinem až po vyšší hodnoty a mírnější fenotyp v důsledku různých účinků na expresi a aktivitu PS nebo snížený poločas (Denis et al. 2005).

#### 4.4 Fenotyp nově zachycených mutací

U nově nalezených mutací jsme se na základě predikčních softwarů, povahy mutací a také mutací již popsaných na stejném místě pokusili vysvětlit fenotyp u daných pacientů. Nové mutace p.Ser28Phefs\*11, p.Cys228\*, p.Glu304\* a p.Pro416Alafs\*22 způsobují PSD typu I, což odpovídá mechanismu introdukce předčasného stop kodonu a zastavení syntézy. U těchto mutací se exprimuje protein pouze ze zdravé alely, což odpovídá spíše těžkému fenotypu PSD s velmi nízkými hladinami PS.

Záměna c.965+5G>A na začátku intronu 9 vede k abnormálnímu splicingu tohoto intronu a vzniku abnormálního produktu. Nicméně hladiny PS u pacienta s touto mutací jsou hraniční, jedná se tedy o lehký deficit. Vlastnosti mutovaného proteinu nebo zda tato mutace způsobuje alternativní splicing nebyly prozkoumány.

Nová substituce c.1644+1G>T vede k abnormálnímu splicingu v místě začátku intronu 13 a tedy vzniku abnormálního, pravděpodobně nefunkčního proteinu. Rodina nesoucí tuto novou mutaci měla smíšený fenotyp I/III, a hladiny PS a FPS byly u pacientů extrémně nízké (viz Tabulka 2) (Simmonds et al. 1997). Zajímavé je, že indexový pacient a další člen této rodiny trpí zároveň osteoporózou, to odpovídá již dříve reportovaným případům pacientů s těžkým deficitem PS s nižší hustotou kostní hmoty a osteopenií (Pan et al. 1990). Jeden z pacientů ve studii Pan *et al.* měl také PSD typu III s normálními celkovými hladinami PS a výrazně sníženým množstvím volného PS. Je známo, že se protein S syntetizuje v osteoblastech (Maillard et al. 1992) a má spolu s dalšími vitamin K-dependentními proteiny vliv na regulaci tvorby kostní hmoty a remodelaci kosti (Zhang et al. 2024). Deficit těchto proteinů může tedy přispět k vyššímu riziku pro osteoporózu (Cirovic et al. 2024).

Poslední z nových nonsense mutací byla delece části exonu 14 a začátku intronu 14 (c.1645\_1870del), která způsobuje vystřížení exonu 14 během splicingu, což vede

k PSD typu I. Vystřížení exonu 14 jsme u tohoto pacienta potvrdili na úrovni cDNA. Mutace tohoto štěpného místa byla již hlášena v (D'Andrea et al. 2003), kde byl mutován pouze první nukleotid intronu 14, což ale také vedlo k vystřížení exonu 14, tedy ke stejnému fenotypu.

Substituce p.Met1Ile znamená, že je změněn iniciační kodon, a tedy u mutovaného produktu neproběhne translace, což odpovídá velmi nízkým hladinám PS u této rodiny. Tato mutace je sice technicky missense, ale prakticky se jedná o nonsense mutaci s absencí proteinového produktu.

Mutace p.Cys171Trp byla nalezena ve dvou nepříbuzných rodinách. Tato mutace byla spojena s deficitem PS typu I u našich pacientů, nicméně hodnoty byly kolem 45 % (viz tabulka 1). Kvůli tomu, že jde o substituci cysteinu, existuje vysoká pravděpodobnost narušení terciární struktury chybějícím disulfidickým můstkem v EGF2 doméně. Substituce cysteinu je přítomna také u mutace p.Cys113Ser, která byla nalezena u rodiny s typem III. Další mutace p.Gln173Lys byla také nalezena u jedné rodiny s PSD typu III.

Nová mutace p.Leu446Arg sestává ze záměny dvou nukleotidů (CT>AG) u pacienta s PSD typu I. Po vyšetření členů rodiny jsme potvrdili, že se obě záměny nacházejí na jedné alele vzhledem ke společné segregaci.

Mutace p.Ala525Thr vnáší polární hydrofilní zbytek na místo hydrofobního, má tedy potenciál narušit strukturu této oblasti. Vzhledem k velmi nízkým hladinám PS pacienta tato mutace pravděpodobně způsobuje poruchu struktury, která vyústí v degradaci proteinu.

Další z nových mutací je p.Gly621Asp, kde se záměnou glycinu za aspartát vnáší hydrofilní zbytek do hydrofobní oblasti proteinu (-LGGLP-), což destabilizuje strukturu tohoto regionu, a také je tímto porušena vazba PS k FXa a FVa (Somajo et al. 2015). Podobným způsobem ale obráceně se pravděpodobně projevuje mutace p.Asp652Gly, kde je naopak vnášen hydrofobní zbytek místo hydrofilního.

## 4.5 Vliv polohy mutace na riziko trombózy

Hypotéza, že umístění mutace způsobuje různé poruchy, a tedy i rozdílné riziko trombózy nebyla v kontextu přirozených inhibitorů koagulace formulována poprvé. Zajímavým příkladem je zde antitrombin, kde poloha mutace v genu *SERPINC1* určuje typ a funkční prezentaci deficitu. Deficit antitrombinu se dělí podle hladin AT v plazmě na typ I (kvantitativní), kdy je snížen AT antigen a aktivita v poměru 1:1, a typ II (kvalitativní), kde je antigen vyšší než aktivita a jedná se o funkční deficit. Typ II se pak dále dělí podle typu funkčního deficitu, které korelují s polohou mutace. Typ IIa jsou mutace reakčního místa (reactive site – RS), IIb zahrnuje mutace vazného místa pro heparin (heparin binding site – HBS) a nakonec typ IIc neboli pleiotropní zahrnující mutace, které ovlivňují jak reakční místo, tak vazbu na heparin. Nicméně klinická prezentace pacientů je velmi heterogenní a hladiny aktivity a antigenu nemusí odpovídat fenotypu některých mutací (Corral et al. 2018). Riziko trombózy je taky velmi heterogenní v závislosti na typu a poloze mutace (Alhenc-Gelas et al. 2017).

U PS jsme prokázali, že hladiny aktivity a volného antigenu PS jsou významně nižší u pacientů s mutací v SHBG-like oblasti PS v porovnání s mutacemi v non-SHBG (G1a-EGF4) oblasti (Fenclova et al. 2023). Pacienti s mutacemi v SHBG-like oblasti mají také vyšší riziko trombózy a v průměru prodělají trombózu v mladším věku. To může být vysvětleno několika způsoby. Za prvé, SHBG-like oblast PS je důležitá pro funkci PS jako kofaktoru APC a kritická pro TFPI- $\alpha$  aktivitu. Tím, že zatím nejsou dostupné metody specifické pouze pro TFPI- $\alpha$  kofaktorovou aktivitu PS nelze vyloučit, že u pacientů s těmito mutacemi bude tato aktivita ještě nižší, než APC-kofaktorová aktivita, která je měřena standardně. Dokonce se uvažuje o upřesnění a rozšíření klasifikace PSD typu II tak jako je tomu u antitrombinu, tedy typ II-APC, kde je přítomen pouze deficit APC-kofaktorové funkce, typ II-TFPI, u kterého je deficit pouze TFPI-kofaktorové funkce a typ II-pleiotropní, kde jsou postiženy obě kofaktorové funkce (Brinkman et al. 2021). Tato klasifikace je zatím hypotetická, vzhledem k nedostupnosti komerčních metod pro stanovení TFPI-kofaktorové aktivity PS. V budoucnu by tato klasifikace mohla přinést lepší porozumění rizikům plynoucím z různých mutací PS.

Za druhé, snížená hladina volného PS může vést také ke snížené hladině TFPI- $\alpha$  v plazmě, jelikož tyto dva proteiny (spolu s FV-short) spolu v plazmě tvoří komplex a PS zvyšuje poločas TFPI- $\alpha$  v plazmě, a tedy i jeho bioavailability. Toto může vést k dalšímu zvýšení rizika trombózy. Nicméně tento mechanismus bude logicky přítomen i u skupiny s mutacemi v jiné části proteinu jen díky snížené hladině volného PS. Tento efekt může být zvýšen u mutovaných proteinů s poruchou vazby TFPI- $\alpha$  oproti mutovaným proteinům s mutací mimo toho vazné místo (LG1 doména).

Dalším důvodem může být snížená vazba volného PS na C4BP, pokud mutace zasahuje do oblasti v SHBG doméně, kde dochází k vazbě na  $\beta$ -podjednotku C4BP. Tím může být u mutovaných forem PS které se dostanou do plazmy snížený poločas a tím celkově nižší hladina než u mutací, které toto nezpůsobují (He et al. 1997). Dále také může jít o interferenci ve stanovení volného antigenu PS. Vzhledem k tomu, že se jedná o vazbu monoklonální protilátky proti PS v místě, které je u vázané formy zablokované C4BP, tato vazba protilátky může teoreticky být také ovlivněna, pokud bude tato oblast významně pozměněna přítomnou mutací.

#### 4.6 Získaný deficit PS

Zanalyzovali jsme kohortu pacientů se získaným deficitem PS, kteří byli přijati do péče na ÚHKT Praha s aktivní hematologickou malignitou. Zjistili jsme, že se u těchto pacientů významně lišila jak absolutní PS aktivita, tak zastoupení pacientů s patologickými hodnotami PS aktivity napříč spektrem sledovaných diagnóz. Znatelně největší procento patologických pacientů z celku skupiny měla skupina s diagnózou C925 – Akutní myelomonocytická leukemie (dle FAB klasifikace leukémií AML M4).

U těchto pacientů jde o izolovaný deficit PS s normálním PC a ostatními parametry koagulace (kromě FVIII a fibrinogenu, které se v akutní fázi naopak zvyšují), nejde tedy o konzumpční koagulopatii. V literatuře jsou případy izolovaných deficitů PS například u různých virových onemocnění jako jsou HIV a syndromu získaného imunodeficitu (Bissuel et al. 1992) nebo varicelly. U těchto případů, a také vzácně u mnohočetného myelomu a leukémie (Miljić et al. 2000) byla popsána tvorba anti-PS autoprotilátek, které vycytávají PS do imunokomplexů a dochází k jeho degradaci. Dále byl deficit PS popsán u onemocnění COVID-19, nicméně není jasné,

jakým mechanismem ke snížení dochází. Vzhledem k vysokému procentu pacientů s deficitem ve skupině s diagnózou akutní myelomonocytické leukémie je možné, že se zde projevuje zvýšené vychytávání PS TAM receptory, které se vyskytují na buňkách monocytární řady a na makrofázích. Nicméně není známo, zda i tyto blastické elementy exprimují TAMR a v jaké míře. Over-exprese této rodiny receptorů a také Gas6 byla potvrzena u několika maligních onemocnění i u akutní myeloidní leukémie (Whitman et al. 2014), což tuto hypotézu podporuje. V budoucnosti však bude potřeba tento vztah prokázat experimentálně na buněčných liniích. Další výzkum by mohl být také zaměřen na zjištění, zda u této skupiny pacientů snížená aktivita PS koreluje s vyšším výskytem trombotických příhod nebo s horší prognózou onemocnění.

#### 4.7 Vliv mražení na stabilitu PS při skladování plazmy

Diagnostika trombofilií a konkrétně proteinu S je závislá na kvalitě analyzovaného materiálu. Cílem této části studie bylo tedy ověření stability proteinu S a dalších koagulačních parametrů v podmínkách zmražené plazmy. Jako optimální podmínky dlouhodobého skladování plazmy se ukázalo být ponoření v tekutém dusíku nebo skladování při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a méně. V těchto podmínkách byla plazma použitelná pro spolehlivé stanovení základních parametrů koagulace, antitrombinu, FVIII, PS aktivity a volného antigenu po dobu až 6 měsíců.

Anomálie přítomná na začátku skladovacího období u APTT byla už v minulosti pozorována v krátkodobých studiích, nicméně je možné, že se v těchto studiích projevila aktivace destiček po rozmražení plazmy, vzhledem k tomu, že vzorky nebyly před zmražením centrifugovány dvakrát (Rao et al. 2000; Awad et al. 2006). Dvojitá centrifugace je doporučena pro vzorky plazmy určené ke zmražení pro všechny koagulační analýzy, největší vliv zbytkových destiček je ale právě na APTT, což se nejčastěji pozoruje arteficiálním prodloužením časů APTT při stanovení lupus antikoagulant, které je na to obzvlášť citlivé. V naší studii obsahovala plazma před zmražením  $<10 \times 10^3/\mu\text{l}$  destiček, což odpovídá doporučení. Nicméně je možné, že i toto stopové množství destiček stačí k tomu, aby při krátkodobém zmražení přežily a po rozmražení a jejich rozpadu způsobily prodloužení APTT. Stejný mechanismus mohl mít za následek i zvýšení PS aktivity a volného antigenu. PS je syntetizován také v megakaryocytech a ve zralých destičkách je v alfa-granulích obsaženo až 2,5 % plazmatické hladiny PS. Proti tomu jde zdánlivě skutečnost, že hladiny PS aktivity



začaly po 2 měsících skladování klesat. Nicméně v literatuře bylo ukázáno, že PS aktivita po tomto iniciálním nárůstu později klesá při dlouhodobém skladování (Woodhams et al. 2001) a je tedy možné, že i přes toto zvýšení naměřených hodnot způsobené vylitím PS z destiček dochází k degradaci PS aktivity jak volně v plazmě, tak v destičkovém poolu a výsledná změřená aktivita je součtem těchto protichůdných vlivů. Dále volný antigen PS zůstal zvýšený po celé období skladování, tedy pravděpodobně nedochází k rozpadu proteinu, pouze snižování jeho antikoagulační funkce. V naší studii jsme tento nárůst pozorovali u všech skladovaných vzorků plazmy, mezi skupinami se lišila pouze doba, po které začala PS aktivita klesat. Toto arteficiální zvýšení hodnot PS nad nejistotu metody i přes dodržení preanalytických doporučení a dosažení minimálního počtu zbytkových destiček ve zpracované plazmě má potenciál ovlivnit výsledky trombofilního screeningu pacientů. Nicméně je velmi málo pravděpodobné, že toto ovlivnění dosáhne klinické významnosti, vzhledem k tomu že i při určování referenčního rozmezí těchto metod je pravděpodobně vycházeno ze zmražených vzorků. Obranou proti těmto preanalytickým vlivům je důsledné dodržování doporučených postupů jak při přípravě a analýze vzorků, tak při hodnocení výsledků klinickým pracovníkem. Pro stanovení deficitu PS je nutné, aby byly hodnoty PS sniženy v opakovaných vyšetřeních s odstupem alespoň tří měsíců, po vyloučení vlivů léčby, hormonálních vlivů a akutních stavů. I přes potenciál arteficiálního zvýšení aktivity a volného antigenu PS ze zmražené plazmy toto zvýšení není tak extrémní, aby zakrylo přítomný deficit PS. U pacientů s hraničními hodnotami je vhodné měření opakovat s odstupem pro vyloučení dalších vlivů a přihlížet zejména k anamnéze jak osobní, tak rodinné.

## 5. Závěr

V této práci jsme charakterizovali genotyp a fenotyp kohorty pacientů s vrozeným deficitem proteinu S v České republice. Tato populace se významně nelišila od ostatních popsaných kohort v evropských a světových studiích. U pacientů s vrozeným deficitem PS jsme prokázali, že poloha mutace v SHBG-like oblasti PS představuje rizikový faktor hluboké žilní trombózy a jejího vzniku v mladším věku.

Dále jsme analýzou kohorty pacientů se získaným deficitem PS a aktivním hematoonkologickým onemocněním zjistili, že aktivita PS se signifikantně lišila mezi

skupinami podle diagnózy s největším podílem patologických hodnot u pacientů s akutní myelomonocytární leukémií.

Prokázali jsme dostatečnou stabilitu všech sledovaných parametrů včetně proteinu S, pokud byly uchovávány alespoň při -80 °C a zmražení probíhalo šokově. Výsledky APTT, PS aktivity a PS volného antigenu vykazovali krátkodobou anomálii, kdy se zvýšily nad nejistotu metody ve všech skupinách hned od začátku sledovaného období a po určité době se vrátily na úroveň výsledků z čerstvé plazmy (u vzorků uchovávaných při -80 °C a méně). Tato studie potvrzuje důležitost dodržování správných preanalytických postupů zejména u speciálních vyšetření koagulace jako je PS, jelikož tyto metody jsou velmi citlivé a jakékoliv prodlení v měření nebo nesprávná manipulace se vzorky či reagensy v kombinaci s možným arteficiálním zvýšením hodnot z důvodu zmražení vzorku mohou vyústit v chybný výsledek.

Tato práce potvrzuje význam PS a jeho molekulární diagnostiky pro lepší odhad rizika trombózy u pacientů s vrozeným deficitem a zároveň ukazuje, jakým směrem by mohly být v budoucnu zaměřeny studie tohoto multifunkčního přirozeného inhibitoru koagulace.

## Seznam použité literatury

- Aadland, E., O. R. Odegaard, A. Røseth, a K. Try. 1992. „Free Protein S Deficiency in Patients with Chronic Inflammatory Bowel Disease". *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 27 (11): 957–60. <https://doi.org/10.3109/00365529209000170>.
- Adachi, Tomoko. 2005. „Protein S and Congenital Protein S Deficiency: The Most Frequent Congenital Thrombophilia in Japanese". *Current Drug Targets* 6 (5): 585–92. <https://doi.org/10.2174/1389450054545980>.
- Adzhubei, Ivan, Daniel M. Jordan, a Shamil R. Sunyaev. 2013. „Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2". *Current Protocols in Human Genetics* Chapter 7 (leden): Unit7.20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>.
- Ahnström, Josefin, Helena M. Andersson, Kevin Canis, Eva Norström, Yao Yu, Björn Dahlbäck, Maria Panico, Howard R. Morris, James T. B. Crawley, a David A. Lane. 2011. „Activated Protein C Cofactor Function of Protein S: A Novel Role for a  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid Residue". *Blood* 117 (24): 6685–93. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317099>.
- Alhenc-Gelas, M., M. Canonico, P. E. Morange, J. Emmerich, a Geht Genetic Thrombophilia Group. 2010. „Protein S Inherited Qualitative Deficiency: Novel Mutations and Phenotypic Influence". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 8 (12): 2718–26. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04073.x>.
- Alhenc-Gelas, M., G. Plu-Bureau, M. H. Horellou, A. Rauch, P. Suchon, a GEHT genetic thrombophilia group. 2016. „PROS1 Genotype Phenotype Relationships in a Large Cohort of Adults with Suspicion of Inherited Quantitative Protein S Deficiency". *Thrombosis and Haemostasis* 115 (3): 570–79. <https://doi.org/10.1160/TH15-05-0391>.
- Alhenc-Gelas, M., G. Plu-Bureau, J. Hugon-Rodin, V. Picard, M.H. Horellou, a GFHT study group on Genetic Thrombophilia. 2017. „Thrombotic Risk According to SERPINC1 Genotype in a Large Cohort of Subjects with Antithrombin Inherited Deficiency". *Thrombosis and Haemostasis* 117 (6): 1040–51. <https://doi.org/10.1160/TH16-08-0635>.
- Anderson, Howard A., Caroline A. Maylock, Joy A. Williams, Cloud P. Paweletz, Hongjun Shu, a Emily Shacter. 2003. „Serum-Derived Protein S Binds to Phosphatidylserine and Stimulates the Phagocytosis of Apoptotic Cells". *Nature Immunology* 4 (1): 87–91. <https://doi.org/10.1038/ni871>.
- Andersson, Helena M., Márcia J. Arantes, James T. B. Crawley, Brenda M. Luken, Sinh Tran, Björn Dahlbäck, David A. Lane, a Suely M. Rezende. 2010. „Activated Protein C Cofactor Function of Protein S: A Critical Role for Asp95 in the EGF1-like Domain". *Blood* 115 (23): 4878–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-256610>.
- Awad, Mohammed A., Omar A. Sharaf Eldeen, a Hoda A. Ibrahim. 2006. „Stability of Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test under Different Storage Conditions". *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 11 (5): 311–15. <https://doi.org/10.1080/10245330500397752>.
- Baicus, Cristian, Laura Elena Stoichitoiu, Larisa Pinte, a Camelia Badea. 2021. „Anticoagulant Protein S in COVID-19: The Low Activity Level Is Probably Secondary". *American Journal of Therapeutics* 28 (1): e139–40. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000001306>.
- Benzakour, O., a C. Kanthou. 2000. „The Anticoagulant Factor, Protein S, Is Produced by Cultured Human Vascular Smooth Muscle Cells and Its Expression Is up-Regulated by Thrombin". *Blood* 95 (6): 2008–14.

- Bereczky, Zsuzsanna, Réka Gindele, Marianna Speker, a Judit Kállai. 2016. „Deficiencies of the Natural Anticoagulants - Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing". *EJIFCC* 27 (2): 130–46.
- Bertina, R. M., H. K. Ploos van Amstel, A. van Wijngaarden, J. Coenen, M. P. Leemhuis, P. P. Deutz-Terlouw, I. K. van der Linden, a P. H. Reitsma. 1990. „Heerlen Polymorphism of Protein S, an Immunologic Polymorphism Due to Dimorphism of Residue 460". *Blood* 76 (3): 538–48.
- Biron-Andréani, Christine, Edith Raulet, Lydiane Pichard-Garcia, a Patrick Maurel. 2010. „Use of Human Hepatocytes to Investigate Blood Coagulation Factor". *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 640: 431–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_23).
- Bissuel, F., M. Berruyer, X. Causse, M. Dechavanne, a C. Trepo. 1992. „Acquired Protein S Deficiency: Correlation with Advanced Disease in HIV-1-Infected Patients". *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 5 (5): 484–89.
- Borgel, D., P. Gaussem, C. Garbay, C. Bachelot-Loza, T. Kaabache, W. Q. Liu, B. Brohard-Bohn, B. Le Bonniec, M. Aiach, a S. Gandrille. 2001. „Implication of Protein S Thrombin-Sensitive Region with Membrane Binding via Conformational Changes in the Gamma-Carboxyglutamic Acid-Rich Domain". *The Biochemical Journal* 360 (Pt 2): 499–506. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600499>.
- Brinkman, Herm Jan M., Josefin Ahnström, Elisabetta Castoldi, Björn Dahlbäck, a Richard A. Marlar. 2021. „Pleiotropic anticoagulant functions of protein S, consequences for the clinical laboratory. Communication from the SSC of the ISTH". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 19 (1): 281–86. <https://doi.org/10.1111/jth.15108>.
- Broze, G. J. 2001. „Protein Z-Dependent Regulation of Coagulation". *Thrombosis and Haemostasis* 86 (1): 8–13.
- Broze, George J., a Thomas J. Girard. 2012. „Tissue Factor Pathway Inhibitor: Structure-Function". *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 17 (1): 262–80. <https://doi.org/10.2741/3926>.
- Burstyn-Cohen, Tal, Mary Jo Heeb, a Greg Lemke. 2009. „Lack of Protein S in Mice Causes Embryonic Lethal Coagulopathy and Vascular Dysgenesis". *The Journal of Clinical Investigation* 119 (10): 2942–53. <https://doi.org/10.1172/JCI39325>.
- Capriotti, Emidio, Remo Calabrese, Piero Fariselli, Pier Luigi Martelli, Russ B Altman, a Rita Casadio. 2013. „WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation". *BMC Genomics* 14 (Suppl 3): S6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S3-S6>.
- Caspers, Michael, Anna Pavlova, Julia Driesen, Ursula Harbrecht, Robert Klamroth, Janos Kadar, Ronald Fischer, Bettina Kemkes-Matthes, a Johannes Oldenburg. 2012. „Deficiencies of Antithrombin, Protein C and Protein S - Practical Experience in Genetic Analysis of a Large Patient Cohort". *Thrombosis and Haemostasis* 108 (2): 247–57. <https://doi.org/10.1160/TH11-12-0875>.
- Castaman, G., E. Biguzzi, C. Razzari, A. Tosetto, G. Fontana, D. Asti, V. Brancaccio, D. Castori, D. A. Lane, a E. M. Faioni. 2007. „Association of Protein S p.Pro667Pro Dimorphism with Plasma Protein S Levels in Normal Individuals and Patients with Inherited Protein S Deficiency." *Thrombosis Research* 120 (3): 421–26. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.10.014>.
- Castoldi, E., L. Maurissen, D. Tormene, L. Spiezia, S. Gavasso, C. Radu, T. M. Hackeng, J. Rosing, a P. Simioni. 2010. „Similar Hypercoagulable State and Thrombosis Risk in Type I and Type III Protein S-Deficient Individuals from Mixed Type I/III Families". *Haematologica*, duben. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.021923>.
- Castoldi, E., P. Simioni, D. Tormene, J. Rosing, a T. M. Hackeng. 2010. „Hereditary and Acquired Protein S Deficiencies Are Associated with Low TFPI Levels in Plasma".

- Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 8 (2): 294–300. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03712.x>.
- Cirovic, Aleksandar, Marija Djuric, a Petar Milovanovic. 2024. „Deficiency of Protein C or Protein S as a Possible Cause of Osteoporosis". *Endocrine*, břez. <https://doi.org/10.1007/s12020-024-03774-8>.
- Clouse, L. H., a P. C. Comp. 1986. „The Regulation of Hemostasis: The Protein C System". *The New England Journal of Medicine* 314 (20): 1298–1304. <https://doi.org/10.1056/NEJM198605153142006>.
- Corral, Javier, María Eugenia de la Morena-Barrio, a Vicente Vicente. 2018. „The Genetics of Antithrombin". *Thrombosis Research* 169 (září): 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.008>.
- Crowther, Mark A., a John G. Kelton. 2003. „Congenital Thrombophilic States Associated with Venous Thrombosis: A Qualitative Overview and Proposed Classification System". *Annals of Internal Medicine* 138 (2): 128–34. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-2-200301210-00014>.
- Dahlbäck, B. 2008. „Advances in Understanding Pathogenic Mechanisms of Thrombophilic Disorders". *Blood* 112 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-077909>.
- . 2011. „C4b-Binding Protein: A Forgotten Factor in Thrombosis and Hemostasis". *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 37 (4): 355–61. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1276584>.
- . 2018. „Vitamin K-Dependent Protein S: Beyond the Protein C Pathway". *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 44 (2): 176–84. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1604092>.
- Dahlbäck, B, B Hildebrand, a J Malm. 1990. „Characterization of functionally important domains in human vitamin K-dependent protein S using monoclonal antibodies." *Journal of Biological Chemistry* 265 (14): 8127–35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39047-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39047-7).
- Dahlbäck, B, A Lundwall, a J Stenflo. 1986. „Localization of thrombin cleavage sites in the amino-terminal region of bovine protein S." *Journal of Biological Chemistry* 261 (11): 5111–15. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)89221-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)89221-9).
- D’Andrea, Giovanna, Pasquale Di Perna, Vincenzo Brancaccio, Elena M. Faioni, Giancarlo Castaman, Giuseppe Cibelli, Giovanni Di Minno, Maurizio Margaglione, a Protein S Italian Team. 2003. „A Novel G-to-A Mutation in the Intron-N of the Protein S Gene Leading to Abnormal RNA Splicing in a Patient with Protein S Deficiency". *Haematologica* 88 (4): 459–64.
- De Caterina, Raffaele, Steen Husted, Lars Wallentin, Felicita Andreotti, Harald Arnesen, Fedor Bachmann, Colin Baigent, et al. 2013. „General Mechanisms of Coagulation and Targets of Anticoagulants (Section I). Position Paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease". *Thrombosis and Haemostasis* 109 (4): 569–79. <https://doi.org/10.1160/TH12-10-0772>.
- deCathelineau, Aimee M., a Peter M. Henson. 2003. „The Final Step in Programmed Cell Death: Phagocytes Carry Apoptotic Cells to the Grave". *Essays in Biochemistry* 39: 105–17. <https://doi.org/10.1042/bse0390105>.
- Deitcher, S. R., J. K. Erban, a S. A. Limentani. 1996. „Acquired Free Protein S Deficiency Associated with Multiple Myeloma: A Case Report". *American Journal of Hematology* 51 (4): 319–23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8652\(199604\)51:4<319::AID-AJH12>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8652(199604)51:4<319::AID-AJH12>3.0.CO;2-9).
- Deng, Tingting, Yue Zhang, Qiaoyuan Chen, Keqin Yan, a Daishu Han. 2012. „Toll-like Receptor-Mediated Inhibition of Gas6 and ProS Expression Facilitates Inflammatory Cytokine Production in Mouse Macrophages". *Immunology* 135 (1): 40–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03511.x>.

- Denis, Cécile V., Sarah J. Roberts, Tilman M. Hackeng, a Peter J. Lenting. 2005. „In Vivo Clearance of Human Protein S in a Mouse Model: Influence of C4b-Binding Protein and the Heerlen Polymorphism". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (10): 2209–15. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000181760.55269.6b>.
- Devreese, Katrien M. J. 2021. „COVID-19-Related Laboratory Coagulation Findings". *International Journal of Laboratory Hematology* 43 Suppl 1 (Suppl 1): 36–42. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13547>.
- Duebgen, Sebastian, Teresa Kauke, Christoph Marschall, Andreas Giebl, Susanne Lison, Christina Hart, Andrea Dick, a Michael Spannagl. 2012. „Genotype and Laboratory and Clinical Phenotypes of Protein s Deficiency". *American Journal of Clinical Pathology* 137 (2): 178–84. <https://doi.org/10.1309/AJCP40UXNBTXGKUX>.
- Ellery, Paul E. R., Ida Hilden, Ken Sejling, Mette Loftager, Nicholas D. Martinez, Susan A. Maroney, a Alan E. Mast. 2018. „Correlates of Plasma and Platelet Tissue Factor Pathway Inhibitor, Factor V, and Protein S". *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2 (1): 93–104. <https://doi.org/10.1002/rth2.12058>.
- Esmon, C. T., N. L. Esmon, a K. W. Harris. 1982. „Complex Formation between Thrombin and Thrombomodulin Inhibits Both Thrombin-Catalyzed Fibrin Formation and Factor V Activation". *The Journal of Biological Chemistry* 257 (14): 7944–47.
- Espinosa-Parrilla, Y., M. Morell, J. C. Souto, I. Tirado, J. Fontcuberta, X. Estivill, a N. Sala. 1999. „Protein S Gene Analysis Reveals the Presence of a Cosegregating Mutation in Most Pedigrees with Type I but Not Type III PS Deficiency". *Human Mutation* 14 (1): 30–39. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)14:1<30::AID-HUMU4>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<30::AID-HUMU4>3.0.CO;2-X).
- Fair, D. S., R. A. Marlar, a E. G. Levin. 1986. „Human Endothelial Cells Synthesize Protein S". *Blood* 67 (4): 1168–71.
- Falanga, Anna, Marina Marchetti, a Laura Russo. 2012. „Venous Thromboembolism in the Hematologic Malignancies". *Current Opinion in Oncology* 24 (6): 702–10. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e3283592331>.
- Fenclova, Tereza, Miloslava Matyskova, Dana Provaznikova, Frantisek Marecek, Vera Geierova, Zuzana Kovarova-Kudrnova, a Ingrid Hrachovinova. 2023. „The Impact of PROS1 Mutation Position on Thrombotic Risk in Protein S-Deficient Patients". *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 7 (4): 100194. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100194>.
- Fernandes, N., L. O. Mosnier, L. Tonnu, a M. J. Heeb. 2010. „Zn<sup>2+</sup>-Containing Protein S Inhibits Extrinsic Factor X-Activating Complex Independently of Tissue Factor Pathway Inhibitor". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 8 (9): 1976–85. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03919.x>.
- Fernández, J. A., J. H. Griffin, G. T. Chang, J. Stam, P. H. Reitsma, R. M. Bertina, a B. N. Bouma. 1998. „Involvement of Amino Acid Residues 423-429 of Human Protein S in Binding to C4b-Binding Protein". *Blood Cells, Molecules & Diseases* 24 (2): 101–12; discussion 113. <https://doi.org/10.1006/bcmd.1998.0175>.
- Furie, B., B. A. Bouchard, a B. C. Furie. 1999. „Vitamin K-Dependent Biosynthesis of Gamma-Carboxyglutamic Acid". *Blood* 93 (6): 1798–1808.
- Furie, B., a B. C. Furie. 2008. „Mechanisms of Thrombus Formation". *The New England Journal of Medicine* 359 (9): 938–49. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>.
- Gandrille, S., D. Borgel, N. Sala, Y. Espinosa-Parrilla, R. Simmonds, S. Rezende, B. Lind, et al. 2000. „Protein S Deficiency: A Database of Mutations--Summary of the First Update". *Thrombosis and Haemostasis* 84 (5): 918.
- García de Frutos, Pablo, Pablo Fuentes-Prior, Begoña Hurtado, a Núria Sala. 2007. „Molecular Basis of Protein S Deficiency". *Thrombosis and Haemostasis* 98 (3): 543–56.

- Gierula, Magdalena, Isabelle I. Salles-Crawley, Salvatore Santamaria, Adrienn Teraz-Orosz, James T. B. Crawley, David A. Lane, a Josefin Ahnström. 2019. „The Roles of Factor Va and Protein S in Formation of the Activated Protein C/Protein S/Factor Va Inactivation Complex". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 17 (12): 2056–68. <https://doi.org/10.1111/jth.14594>.
- Giri, T. K., B. O. Villoutreix, A. Wallqvist, B. Dahlbäck, a P. G. de Frutos. 1998. „Topological Studies of the Amino Terminal Modules of Vitamin K-Dependent Protein S Using Monoclonal Antibody Epitope Mapping and Molecular Modeling". *Thrombosis and Haemostasis* 80 (5): 798–804.
- Hackeng, T. M., C. van 't Veer, J. C. Meijers, a B. N. Bouma. 1994. „Human Protein S Inhibits Prothrombinase Complex Activity on Endothelial Cells and Platelets via Direct Interactions with Factors Va and Xa". *The Journal of Biological Chemistry* 269 (33): 21051–58.
- Hackeng, Tilman M., Kristin M. Seré, Guido Tans, a Jan Rosing. 2006. „Protein S Stimulates Inhibition of the Tissue Factor Pathway by Tissue Factor Pathway Inhibitor". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (9): 3106–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504240103>.
- He, X., L. Shen, A. C. Malmberg, K. J. Smith, B. Dahlback, a S. Linse. 1997. „Binding Site for C4b-Binding Protein in Vitamin K-Dependent Protein S Fully Contained in Carboxy-Terminal Laminin-G-Type Repeats. A Study Using Recombinant Factor IX-Protein S Chimeras and Surface Plasmon Resonance". *Biochemistry* 36 (12): 3745–54. <https://doi.org/10.1021/bi962315q>.
- Heeb, M. J., R. R. Koenen, J. A. Fernández, a T. M. Hackeng. 2004. „Direct Anticoagulant Activity of Protein S-C4b Binding Protein Complex in Heerlen Heterozygotes and Normals". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 2 (10): 1766–73. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00901.x>.
- Heit, John A., W. Michael O'Fallon, Tanya M. Petterson, Christine M. Lohse, Marc D. Silverstein, David N. Mohr, a L. Joseph Melton. 2002. „Relative Impact of Risk Factors for Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: A Population-Based Study". *Archives of Internal Medicine* 162 (11): 1245–48. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.11.1245>.
- Hughes, Q., M. Watson, V. Cole, M. Sayer, R. Baker, a J. Staton. 2007. „Upregulation of Protein S by Progestins". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 5 (11): 2243–49. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02730.x>.
- Chatterjee, Sabyasachi, Tanusree Sengupta, Samarpan Majumder, a Rinku Majumder. 2020. „COVID-19: A Probable Role of the Anticoagulant Protein S in Managing COVID-19-Associated Coagulopathy". *Aging* 12 (16): 15954–61. <https://doi.org/10.18632/aging.103869>.
- Chattopadhyay, Rima, Tanusree Sengupta, a Rinku Majumder. 2012. „Inhibition of Intrinsic Xase by Protein S: A Novel Regulatory Role of Protein S Independent of Activated Protein C". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (10): 2387–93. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.250928>.
- Choi, Yongwook, Gregory E. Sims, Sean Murphy, Jason R. Miller, a Agnes P. Chan. 2012. „Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels". *PLOS ONE* 7 (10): e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>.
- Chung, Ki-Wook, Seok Won Kim, a Sun Wook Kim. 2012. „Gene Expression Profiling of Papillary Thyroid Carcinomas in Korean Patients by Oligonucleotide Microarrays". *Journal of the Korean Surgical Society* 82 (5): 271–80. <https://doi.org/10.4174/jkss.2012.82.5.271>.

- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, a G. Chaudhuri. 1987. „Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric Oxide". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24): 9265–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>.
- Kask, Lena, Leendert A. Trouw, Björn Dahlbäck, a Anna M. Blom. 2004. „The C4b-Binding Protein-Protein S Complex Inhibits the Phagocytosis of Apoptotic Cells". *The Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 23869–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400159200>.
- Kate, M. K. ten, a J. van der Meer. 2008. „Protein S Deficiency: A Clinical Perspective". *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 14 (6): 1222–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01775.x>.
- Keeling, D. M., S. J. Campbell, I. J. Mackie, S. J. Machin, a D. A. Isenberg. 1990. „Total and Free Protein S in Systemic Lupus Erythematosus". *Thrombosis Research* 60 (3): 237–40. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90185-f](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90185-f).
- Kempton, C. L., G. Bagby, a J. F. Collins. 2001. „Ulcerative Colitis Presenting as Purpura Fulminans". *Inflammatory Bowel Diseases* 7 (4): 319–22. <https://doi.org/10.1097/00054725-200111000-00007>.
- Kopanos, Christos, Vasilis Tsiolkas, Alexandros Kouris, Charles E. Chapple, Monica Albarca Aguilera, Richard Meyer, a Andreas Massouras. 2019. „VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine". *Bioinformatics (Oxford, England)* 35 (11): 1978–80. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>.
- Koutroubakis, I. E., A. Sfiridaki, I. A. Mouzas, A. Maladaki, A. Kapsoritakis, M. Roussomoustakaki, E. A. Kouroumalis, a O. N. Manousos. 2000. „Resistance to Activated Protein C and Low Levels of Free Protein S in Greek Patients with Inflammatory Bowel Disease". *The American Journal of Gastroenterology* 95 (1): 190–94. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.01683.x>.
- Lane, David A., Helen Philippou, a James A. Huntington. 2005. „Directing Thrombin". *Blood* 106 (8): 2605–12. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1710>.
- Lemke, Greg, a Carla V. Rothlin. 2008. „Immunobiology of the TAM Receptors". *Nature Reviews. Immunology* 8 (5): 327–36. <https://doi.org/10.1038/nri2303>.
- Lerman, Amir, a Andreas M. Zeiher. 2005. „Endothelial Function: Cardiac Events". *Circulation* 111 (3): 363–68. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000153339.27064.14>.
- Linger, Rachel M. A., Amy K. Keating, H. Shelton Earp, a Douglas K. Graham. 2008. „TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer". *Advances in Cancer Research* 100: 35–83. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00002-X).
- Linse, S., Y. Härdig, D. A. Schultz, a B. Dahlbäck. 1997. „A Region of Vitamin K-Dependent Protein S That Binds to C4b Binding Protein (C4BP) Identified Using Bacteriophage Peptide Display Libraries". *The Journal of Biological Chemistry* 272 (23): 14658–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14658>.
- Long, George L., Deshun Lu, Rong-Lin Xie, a Michael Kalafatis. 1998. „Human Protein S Cleavage and Inactivation by Coagulation Factor Xa\*". *Journal of Biological Chemistry* 273 (19): 11521–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11521>.
- López-Ferrando, Víctor, Andrea Gazzo, Xavier de la Cruz, Modesto Orozco, a Josep Ll Gelpí. 2017. „PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update". *Nucleic Acids Research* 45 (Web Server issue): W222–28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx313>.
- Lu, D., R. L. Xie, A. Rydzewski, a G. L. Long. 1997. „The Effect of N-Linked Glycosylation on Molecular Weight, Thrombin Cleavage, and Functional Activity of Human Protein S". *Thrombosis and Haemostasis* 77 (6): 1156–63.



- Lu, Q., a G. Lemke. 2001. „Homeostatic Regulation of the Immune System by Receptor Tyrosine Kinases of the Tyro 3 Family". *Science (New York, N.Y.)* 293 (5528): 306–11. <https://doi.org/10.1126/science.1061663>.
- Maillard, C., M. Berruyer, C. M. Serre, M. Dechavanne, a P. D. Delmas. 1992. „Protein-S, a Vitamin K-Dependent Protein, Is a Bone Matrix Component Synthesized and Secreted by Osteoblasts". *Endocrinology* 130 (3): 1599–1604. <https://doi.org/10.1210/endo.130.3.1531628>.
- Malm, J., X. H. He, A. Bjartell, L. Shen, P. A. Abrahamsson, a B. Dahlbäck. 1994. „Vitamin K-Dependent Protein S in Leydig Cells of Human Testis". *The Biochemical Journal* 302 ( Pt 3) (Pt 3): 845–50. <https://doi.org/10.1042/bj3020845>.
- Marcum, J. A., J. B. McKenney, a R. D. Rosenberg. 1984. „Acceleration of Thrombin-Antithrombin Complex Formation in Rat Hindquarters via Heparinlike Molecules Bound to the Endothelium". *The Journal of Clinical Investigation* 74 (2): 341–50. <https://doi.org/10.1172/JCI111429>.
- Margaglione, M., V. Brancaccio, N. Giuliani, G. D'Andrea, G. Cappucci, L. Iannaccone, G. Vecchione, E. Grandone, a G. Di Minno. 1998. „Increased Risk for Venous Thrombosis in Carriers of the Prothrombin G-->A20210 Gene Variant". *Annals of Internal Medicine* 129 (2): 89–93. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-129-2-199807150-00003>.
- Maroney, S. A., a A. E. Mast. 2015. „New Insights into the Biology of Tissue Factor Pathway Inhibitor". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 13 Suppl 1 (0 1): S200-207. <https://doi.org/10.1111/jth.12897>.
- Martinelli, I. 2001. „Risk Factors in Venous Thromboembolism". *Thrombosis and Haemostasis* 86 (1): 395–403.
- Mast, Alan E. 2016. „Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (1): 9–14. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305996>.
- Mast, Alan E., Alisa S. Wolberg, David Gailani, Michael R. Garvin, Christiane Alvarez, J. Izaak Miller, Bruce Aronow, a Daniel Jacobson. 2021. „SARS-CoV-2 Suppresses Anticoagulant and Fibrinolytic Gene Expression in the Lung". *eLife* 10 (březen): e64330. <https://doi.org/10.7554/eLife.64330>.
- Mateo, J., A. Oliver, M. Borrell, N. Sala, a J. Fontcuberta. 1997. „Laboratory Evaluation and Clinical Characteristics of 2,132 Consecutive Unselected Patients with Venous Thromboembolism--Results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study)". *Thrombosis and Haemostasis* 77 (3): 444–51.
- Miljić, P., N. Milosević-Jovčić, P. Antunović, D. Bosković, N. Basara, a Z. Rolović. 2000. „Recurrent Venous Thrombosis in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia and Acquired Protein S Deficiency". *Haematologia* 30 (1): 51–54. <https://doi.org/10.1163/15685590051129896>.
- Mille-Baker, Blandine, Suely M. Rezende, Rachel E. Simmonds, Philip J. Mason, David A. Lane, a Michael A. Laffan. 2003. „Deletion or Replacement of the Second EGF-like Domain of Protein S Results in Loss of APC Cofactor Activity". *Blood* 101 (4): 1416–18. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2353>.
- Mishra, Manasi. 2020. „Evolutionary Aspects of the Structural Convergence and Functional Diversification of Kunitz-Domain Inhibitors". *Journal of Molecular Evolution* 88 (7): 537–48. <https://doi.org/10.1007/s00239-020-09959-9>.
- Miyata, Toshiyuki, Yukiko Sato, Junko Ishikawa, Hiromi Okada, Satoshi Takeshita, Toshiyuki Sakata, Koichi Kokame, et al. 2009. „Prevalence of Genetic Mutations in Protein S, Protein C and Antithrombin Genes in Japanese Patients with Deep Vein Thrombosis". *Thrombosis Research* 124 (1): 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.08.020>.

- Morales, Albert, Silvia Rojo Rello, Helena Cristóbal, Aida Fiz-López, Elisa Arribas, Montserrat Mari, Anna Tutusaus, et al. 2021. „Growth Arrest-Specific Factor 6 (GAS6) Is Increased in COVID-19 Patients and Predicts Clinical Outcome". *Biomedicines* 9 (4): 335. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040335>.
- Nguyên, P., J. Reynaud, P. Pouzol, M. Munzer, O. Richard, a P. François. 1994. „Varicella and Thrombotic Complications Associated with Transient Protein C and Protein S Deficiencies in Children". *European Journal of Pediatrics* 153 (9): 646–49. <https://doi.org/10.1007/BF02190684>.
- Nyberg, P., B. Dahlbäck, a P. García de Frutos. 1998. „The SHBG-like Region of Protein S Is Crucial for Factor V-Dependent APC-Cofactor Function". *FEBS Letters* 433 (1–2): 28–32. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00877-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00877-1).
- Ocak, G., C. Y. Vossen, M. Verduijn, F. W. Dekker, F. R. Rosendaal, S. C. Cannegieter, a W. M. Lijfering. 2013. „Risk of Venous Thrombosis in Patients with Major Illnesses: Results from the MEGA Study". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 11 (1): 116–23. <https://doi.org/10.1111/jth.12043>.
- Ogura, M., N. Tanabe, J. Nishioka, K. Suzuki, a H. Saito. 1987. „Biosynthesis and Secretion of Functional Protein S by a Human Megakaryoblastic Cell Line (MEG-01)". *Blood* 70 (1): 301–6.
- Pan, E. Y., E. D. Gomperts, R. Millen, a V. Gilsanz. 1990. „Bone Mineral Density and Its Association with Inherited Protein S Deficiency". *Thrombosis Research* 58 (3): 221–31. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90092-q](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90092-q).
- Peraramelli, S., S. Thomassen, A. Heinzmann, J. Rosing, T. M. Hackeng, R. Hartmann, F. Scheiflinger, a M. Dockal. 2014. „Inhibition of Tissue Factor:Factor VIIa-Catalyzed Factor IX and Factor X Activation by TFPI and TFPI Constructs". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 12 (11): 1826–37. <https://doi.org/10.1111/jth.12713>.
- Perry, D. J. 1994. „Antithrombin and Its Inherited Deficiencies". *Blood Reviews* 8 (1): 37–55. [https://doi.org/10.1016/0268-960x\(94\)90006-x](https://doi.org/10.1016/0268-960x(94)90006-x).
- Persson, Kristina E. M., Björn Dahlbäck, a Andreas Hillarp. 2003. „Diagnosing Protein S Deficiency: Analytical Considerations". *Clinical Laboratory* 49 (3–4): 103–10.
- Pilli, Vijaya S., Arani Datta, Sadaf Afreen, Donna Catalano, Gyongyi Szabo, a Rinku Majumder. 2018. „Hypoxia Downregulates Protein S Expression". *Blood* 132 (4): 452–55. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-841585>.
- Pintao, Maria C., A. A. Garcia, D. Borgel, M. Alhenc-Gelas, C. A. Spek, M. C. H. de Visser, S. Gandrille, a Pieter H. Reitsma. 2009. „Gross Deletions/Duplications in PROS1 Are Relatively Common in Point Mutation-Negative Hereditary Protein S Deficiency". *Human Genetics* 126 (3): 449–56. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0687-9>.
- Rao, L. V., A. O. Okorodudu, J. R. Petersen, a M. T. Elghetany. 2000. „Stability of Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Tests under Different Storage Conditions". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 300 (1–2): 13–21. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(00\)00288-6](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(00)00288-6).
- Reese, Martin G., Frank H. Eeckman, David Kulp, a David Haussler. 1997. „Improved Splice Site Detection in Genie". *Journal of Computational Biology* 4 (3): 311–23. <https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.311>.
- Reglińska-Matveyev, Natalia, Helena M. Andersson, Suely M. Rezende, Björn Dahlbäck, James T. B. Crawley, David A. Lane, a Josefín Ahnström. 2014. „TFPI cofactor function of protein S: essential role of the protein S SHBG-like domain". *Blood* 123 (25): 3979–87. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-551812>.
- Reynolds, Nathanael D., Nathalie M. Aceves, Jinny L. Liu, Jaimee R. Compton, Dagmar H. Leary, Brendan T. Freitas, Scott D. Pegan, et al. 2021. „The SARS-CoV-2 SSHHPS

- Recognized by the Papain-like Protease". *ACS Infectious Diseases* 7 (6): 1483–1502. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00866>.
- Rezende, Suely M., David A. Lane, Blandine Mille-Baker, Michel M. Samama, Jacqueline Conard, a Rachel E. Simmonds. 2002. „Protein S Gla-Domain Mutations Causing Impaired Ca(2+)-Induced Phospholipid Binding and Severe Functional Protein S Deficiency". *Blood* 100 (8): 2812–19. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0909>.
- Rezende, Suely M., David A. Lane, Bengt Zöller, Blandine Mille-Baker, Mike Laffan, Björn Dalhbäck, a Rachel E. Simmonds. 2002. „Genetic and Phenotypic Variability between Families with Hereditary Protein S Deficiency". *Thrombosis and Haemostasis* 87 (2): 258–65.
- Rogers, Mary A. M., Deborah A. Levine, Neil Blumberg, Scott A. Flanders, Vineet Chopra, a Kenneth M. Langa. 2012. „Triggers of Hospitalization for Venous Thromboembolism". *Circulation* 125 (17): 2092–99. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084467>.
- Rosing, J., L. Hoekema, G. A. Nicolaes, M. C. Thomassen, H. C. Hemker, K. Varadi, H. P. Schwarz, a G. Tans. 1995. „Effects of Protein S and Factor Xa on Peptide Bond Cleavages during Inactivation of Factor Va and Factor VaR506Q by Activated Protein C". *The Journal of Biological Chemistry* 270 (46): 27852–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27852>.
- Rothlin, Carla V., Sourav Ghosh, Elina I. Zuniga, Michael B. A. Oldstone, a Greg Lemke. 2007. „TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response". *Cell* 131 (6): 1124–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.034>.
- Ruzicka, Jan A. 2020. „Identification of the Antithrombotic Protein S as a Potential Target of the SARS-CoV-2 Papain-like Protease". *Thrombosis Research* 196 (prosinec): 257–59. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.09.007>.
- Saller, François, Anne C. Brisset, Svetlana N. Tchaikovski, Monica Azevedo, Roman Chrast, José A. Fernández, Marc Schapira, Tilman M. Hackeng, John H. Griffin, a Anne Angelillo-Scherrer. 2009. „Generation and Phenotypic Analysis of Protein S-Deficient Mice". *Blood* 114 (11): 2307–14. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209031>.
- Saraon, Punit, Natasha Musrap, Daniela Cretu, George S. Karagiannis, Ihor Batruch, Chris Smith, Andrei P. Drabovich, et al. 2012. „Proteomic Profiling of Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Lines Reveals a Role for Protein S during the Development of High Grade and Castration-Resistant Prostate Cancer". *The Journal of Biological Chemistry* 287 (41): 34019–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384438>.
- Sasaki, Takako, Pjotr G. Knyazev, Yuri Cheburkin, Walter Göhring, Dominic Tisi, Axel Ullrich, Rupert Timpl, a Erhard Hohenester. 2002. „Crystal Structure of a C-Terminal Fragment of Growth Arrest-Specific Protein Gas6. Receptor Tyrosine Kinase Activation by Laminin G-like Domains". *The Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44164–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207340200>.
- Scott, R. S., E. J. McMahon, S. M. Pop, E. A. Reap, R. Caricchio, P. L. Cohen, H. S. Earp, a G. K. Matsushima. 2001. „Phagocytosis and Clearance of Apoptotic Cells Is Mediated by MER". *Nature* 411 (6834): 207–11. <https://doi.org/10.1038/35075603>.
- Seligsohn, Uri, a Aharon Lubetsky. 2001. „Genetic Susceptibility to Venous Thrombosis". *New England Journal of Medicine* 344 (16): 1222–31. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104193441607>.
- Schmidel, D. K., A. V. Tatro, L. G. Phelps, J. A. Tomczak, a G. L. Long. 1990. „Organization of the Human Protein S Genes". *Biochemistry* 29 (34): 7845–52. <https://doi.org/10.1021/bi00486a010>.

- Schwalbe, R., B. Dahlbäck, A. Hillarp, a G. Nelsestuen. 1990. „Assembly of Protein S and C4b-Binding Protein on Membranes". *The Journal of Biological Chemistry* 265 (27): 16074–81.
- Schwarz, Hans Peter, Michael Fischer, Pierre Hopmeier, Mary Ann Batard, a John H. Griffin. 1984. „Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease". *Blood* 64 (6): 1297–1300. <https://doi.org/10.1182/blood.V64.6.1297.1297>.
- Schwarz, Jana Marie, David N. Cooper, Markus Schuelke, a Dominik Seelow. 2014. „MutationTaster2: Mutation Prediction for the Deep-Sequencing Age". *Nature Methods* 11 (4): 361–62. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>.
- Sim, Martha M. S., Meenakshi Banerjee, Thein Myint, Beth A. Garvy, Sidney W. Whiteheart, a Jeremy P. Wood. 2022. „Total Plasma Protein S Is a Prothrombotic Marker in People Living With HIV". *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 90 (4): 463–71. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002994>.
- Sim, Martha M. S., a Jeremy P. Wood. 2022. „Dysregulation of Protein S in COVID-19". *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 35 (3): 101376. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2022.101376>.
- Simmonds, R. E., B. Zöller, H. Ireland, E. Thompson, P. G. de Frutos, B. Dahlbäck, a D. A. Lane. 1997. „Genetic and Phenotypic Analysis of a Large (122-Member) Protein S-Deficient Kindred Provides an Explanation for the Familial Coexistence of Type I and Type III Plasma Phenotypes". *Blood* 89 (12): 4364–70.
- Smirnov, M. D., O. Safa, L. Regan, T. Mather, D. J. Stearns-Kurosawa, S. Kurosawa, A. R. Rezaie, N. L. Esmon, a C. T. Esmon. 1998. „A Chimeric Protein C Containing the Prothrombin Gla Domain Exhibits Increased Anticoagulant Activity and Altered Phospholipid Specificity". *The Journal of Biological Chemistry* 273 (15): 9031–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.9031>.
- Somajo, Sofia, Josefín Ahnström, Juan Fernandez-Recio, Magdalena Gierula, Bruno O. Villoutreix, a Björn Dahlbäck. 2015. „Amino Acid Residues in the Laminin G Domains of Protein S Involved in Tissue Factor Pathway Inhibitor Interaction". *Thrombosis and Haemostasis* 113 (5): 976–87. <https://doi.org/10.1160/TH14-09-0803>.
- Song, K. S., Y. S. Park, a H. K. Kim. 2000. „Prevalence of Anti-Protein S Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus". *Arthritis and Rheumatism* 43 (3): 557–60. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200003\)43:3<557::AID-ANR11>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200003)43:3<557::AID-ANR11>3.0.CO;2-O).
- Stahl, C. P., C. S. Wideman, T. J. Spira, E. C. Haff, G. J. Hixon, a B. L. Evatt. 1993. „Protein S Deficiency in Men with Long-Term Human Immunodeficiency Virus Infection". *Blood* 81 (7): 1801–7.
- Stenflo, J. 1999. „Contributions of Gla and EGF-like Domains to the Function of Vitamin K-Dependent Coagulation Factors". *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 9 (1): 59–88.
- Stenson, Peter D., Matthew Mort, Edward V. Ball, Katy Evans, Matthew Hayden, Sally Heywood, Michelle Hussain, Andrew D. Phillips, a David N. Cooper. 2017. „The Human Gene Mutation Database: Towards a Comprehensive Repository of Inherited Mutation Data for Medical Research, Genetic Diagnosis and next-Generation Sequencing Studies". *Human Genetics* 136 (6): 665–77. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6>.
- Stitt, T. N., G. Conn, M. Gore, C. Lai, J. Bruno, C. Radziejewski, K. Mattsson, J. Fisher, D. R. Gies, a P. F. Jones. 1995. „The Anticoagulation Factor Protein S and Its Relative, Gas6, Are Ligands for the Tyro 3/Axl Family of Receptor Tyrosine Kinases". *Cell* 80 (4): 661–70. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90520-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90520-0).
- Stoichitoiu, Laura Elena, Larisa Pinte, Marius Ioan Balea, Valentin Nedelcu, Camelia Badea, a Cristian Baicus. 2020. „Anticoagulant Protein S in COVID-19: Low Activity, and

- Associated with Outcome". *Romanian Journal of Internal Medicine = Revue Roumaine De Medecine Interne* 58 (4): 251–58. <https://doi.org/10.2478/rjim-2020-0024>.
- Suchon, P., M. Germain, A. Delluc, D. Smadja, X. Jouven, B. Gyorgy, N. Saut, et al. 2017. „Protein S Heerlen Mutation Heterozygosity Is Associated with Venous Thrombosis Risk". *Scientific Reports* 7 (duben): 45507. <https://doi.org/10.1038/srep45507>.
- Suzuki, Atsuo, Naomi Sanda, Yuhri Miyawaki, Yuta Fujimori, Takayuki Yamada, Akira Takagi, Takashi Murate, Hidehiko Saito, a Tetsuhito Kojima. 2010. „Down-Regulation of PROS1 Gene Expression by 17beta-Estradiol via Estrogen Receptor Alpha (ERalpha)-Sp1 Interaction Recruiting Receptor-Interacting Protein 140 and the Corepressor-HDAC3 Complex". *The Journal of Biological Chemistry* 285 (18): 13444–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062430>.
- Teraz-Orosz, Adrienn, Magdalena Gierula, Anastasis Petri, David Jones, Renos Keniyopoulos, Patricia Badia Folgado, Salvatore Santamaria, James T. B. Crawley, David A. Lane, a Josefín Ahnström. 2022. „Laminin G1 Residues of Protein S Mediate Its TFPI Cofactor Function and Are Competitively Regulated by C4BP". *Blood Advances* 6 (2): 704–15. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005382>.
- Tollefsen, D. M., D. W. Majerus, a M. K. Blank. 1982. „Heparin Cofactor II. Purification and Properties of a Heparin-Dependent Inhibitor of Thrombin in Human Plasma". *The Journal of Biological Chemistry* 257 (5): 2162–69.
- Tonello, Stelvio, Manuela Rizzi, Erica Matino, Martina Costanzo, Giuseppe Francesco Casciaro, Alessandro Croce, Eleonora Rizzi, et al. 2022. „Baseline Plasma Gas6 Protein Elevation Predicts Adverse Outcomes in Hospitalized COVID-19 Patients". *Disease Markers* 2022: 1568352. <https://doi.org/10.1155/2022/1568352>.
- Váradi, K., J. Rosing, G. Tans, I. Pabinger, B. Keil, a H. P. Schwarz. 1996. „Factor V Enhances the Cofactor Function of Protein S in the APC-Mediated Inactivation of Factor VIII: Influence of the Factor VR506Q Mutation". *Thrombosis and Haemostasis* 76 (2): 208–14.
- Varki, Ajit. 2007. „Trousseau’s Syndrome: Multiple Definitions and Multiple Mechanisms". *Blood* 110 (6): 1723–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-053736>.
- Venselaar, H, Ta Te Beek, Rk Kuipers, Ml Hekkelman, a G Vriend. 2010. „Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces". *BMC bioinformatics*, srpen. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-548>.
- Vincent, Lisa M., Sinh Tran, Ruzica Livaja, Tracy A. Benseid, Dianna M. Milewicz, a Björn Dahlbäck. 2013. „Coagulation Factor V(A2440G) Causes East Texas Bleeding Disorder via TFPIα". *The Journal of Clinical Investigation* 123 (9): 3777–87. <https://doi.org/10.1172/JCI69091>.
- Walker, F. J. 1981. „Regulation of Activated Protein C by Protein S. The Role of Phospholipid in Factor Va Inactivation". *The Journal of Biological Chemistry* 256 (21): 11128–31.
- Watkins, P. C., R. Eddy, Y. Fukushima, M. G. Byers, E. H. Cohen, W. R. Dackowski, R. M. Wydro, a T. B. Shows. 1988. „The Gene for Protein S Maps near the Centromere of Human Chromosome 3". *Blood* 71 (1): 238–41.
- White, Danielle, Stephen MacDonald, Tara Edwards, Chris Bridgeman, Megan Hayman, Megan Sharp, Sally Cox-Morton, et al. 2021. „Evaluation of COVID-19 Coagulopathy; Laboratory Characterization Using Thrombin Generation and Nonconventional Haemostasis Assays". *International Journal of Laboratory Hematology* 43 (1): 123–30. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13329>.
- Whitman, Susan P., Jessica Kohlschmidt, Kati Maharry, Stefano Volinia, Krzysztof Mrózek, Deedra Nicolet, Sebastian Schwind, et al. 2014. „GAS6 Expression Identifies High-

- Risk Adult AML Patients: Potential Implications for Therapy". *Leukemia* 28 (6): 1252–58. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.371>.
- Wijnen, M. van, J. G. Stam, C. van't Veer, J. C. Meijers, P. H. Reitsma, R. M. Bertina, a B. N. Bouma. 1996. „The Interaction of Protein S with the Phospholipid Surface Is Essential for the Activated Protein C-Independent Activity of Protein S". *Thrombosis and Haemostasis* 76 (3): 397–403.
- Wills, Bridget A., Emmanuelle E. Oragui, Alick C. Stephens, Olufunmilayo A. Daramola, Nguyen Minh Dung, Ha Thi Loan, Nguyen Vinh Chau, et al. 2002. „Coagulation Abnormalities in Dengue Hemorrhagic Fever: Serial Investigations in 167 Vietnamese Children with Dengue Shock Syndrome". *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 35 (3): 277–85. <https://doi.org/10.1086/341410>.
- Wimmel, A., I. Rohner, A. Ramaswamy, H. H. Heidtmann, R. Seitz, M. Kraus, a M. Schuermann. 1999. „Synthesis and Secretion of the Anticoagulant Protein S and Coexpression of the Tyro3 Receptor in Human Lung Carcinoma Cells". *Cancer* 86 (1): 43–49. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19990701\)86:1<43::aid-cncr8>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19990701)86:1<43::aid-cncr8>3.0.co;2-d).
- Wood, Jeremy P., Paul E. R. Ellery, Susan A. Maroney, a Alan E. Mast. 2014. „Protein S Is a Cofactor for Platelet and Endothelial Tissue Factor Pathway Inhibitor- $\alpha$  but Not for Cell Surface-Associated Tissue Factor Pathway Inhibitor". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (1): 169–76. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302655>.
- Wood, Jeremy P., Helle H. Petersen, Bingke Yu, Xiaoi Wu, Ida Hilden, a Alan E. Mast. 2017. „TFPI $\alpha$  Interacts with FVa and FXa to Inhibit Prothrombinase during the Initiation of Coagulation". *Blood Advances* 1 (27): 2692–2702. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011098>.
- Woodhams, B., O. Girardot, M. J. Blanco, G. Colesse, a Y. Gourmelin. 2001. „Stability of Coagulation Proteins in Frozen Plasma". *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 12 (4): 229–36. <https://doi.org/10.1097/00001721-200106000-00002>.
- Zhang, Meng, Qingqi Zhang, Pengfei Du, Xin Chen, a Yumei Zhang. 2024. „Roles of Vitamin K-dependent Protein in Biomineralization (Review)". *International Journal of Molecular Medicine* 53 (1): 6. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2023.5330>.
- Zhong, Zhihui, Yaoming Wang, Huang Guo, Abhay Sagare, José A. Fernández, Robert D. Bell, Theresa M. Barrett, John H. Griffin, Robert S. Freeman, a Berislav V. Zlokovic. 2010. „Protein S Protects Neurons from Excitotoxic Injury by Activating the TAM Receptor Tyro3-Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway through Its Sex Hormone-Binding Globulin-like Region". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (46): 15521–34. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4437-10.2010>.
- Zhu, Donghui, Yaoming Wang, Itender Singh, Robert D. Bell, Rashid Deane, Zhihui Zhong, Abhay Sagare, Ethan A. Winkler, a Berislav V. Zlokovic. 2010. „Protein S Controls Hypoxic/Ischemic Blood-Brain Barrier Disruption through the TAM Receptor Tyro3 and Sphingosine 1-Phosphate Receptor". *Blood* 115 (23): 4963–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-262386>.