

Témavezető neve: Prof. Dr. Muszbek László

A téma címe: A véralvadás XIII-as faktora

A kutatás időtartama: 2003-2005.

I. A XIII-as faktor (FXIII) struktúrája és funkciója

1/ A FXIII aktivációjának vizsgálata molekula modellezési, molekuláris biológiai és fehérje biokémiai módszerekkel

a. Az aktivációs peptid lehasítása és szerepe az aktivált FXIII stabilizációjában

A thrombin aktív helyéhez dokkolt modell FXIII aktivációs peptid (AP) fragmens („extended” konformáció) és a kísérleti röntgendiffrakciós (β -turn konformáció, Sadasivan és Yee: J.Biol. Chem., 275, 36942, 2000) szerkezetekből kiindulva molekula-dinamikai szimulációkat végeztünk, hogy (a) megállapítsuk, hogy a thrombin-FXIII kölcsönhatás során melyik konformáció a valószínűbb és (b) ezt a valószínűséget hogyan befolyásolja a Val34Leu polimorfizmus. Bár 3ns szimulációs idő (AMBER program) alatt β -turn- \rightarrow „extended” vagy „extended”- \rightarrow β -turn konformációs változást nem észleltünk, az megállapítható volt, hogy a Leu34 variáns a β -turn konformációt kevésbé preferálja a Val34 variánsnál. Ebből, valamint molakulagrafikai analízisből és szabadentalpia perturbációs módszerrel kapott eredményeinkből (AMBER) azt a következtetést vontuk le, hogy a FXIII-thrombin kölcsönhatás során az AP az “extended” konformációt preferálja a β -turn-nel szemben. Eredményeink tehát az oldatfázisú NMR mérésekből levonható (Trumbo és Maurer: Biochemistry, 41, 2859, 2002) következtetéseket támasztják alá szemben a röntgendiffrakciós mérések eredményeivel.

A FXIII röntgendiffrakciós szerkezetéből kiindulva molekula szimulációs in silico kísérlet sorozat elvégzését kezdtük el a teljes FXIII A₂ dimerjére explicit oldószermodellt alkalmazva. Bár a rendkívül időigényes szimulációs kísérlet sorozat (a szimulált rendszer több mint 200 ezer atomot tartalmaz) még távolról sem tekinthető befejezettnek, a szimulációs trajektória analíziséből: **1)** A fentebb említett β -turn konformáció akár átmeneti meglétét eddig nem észleltük. **2)** AP hasítási helyének környezetében a peptidlánc különösen flexibilisnek adódik. (Ez érthető, hiszen az adott peptidszakasznak optimális konformációt kell felvenni a thrombin-FXIII kölcsönhatáshoz; értelmezhetővé válik egyúttal az is, hogy az adott szerkezeti részlet miért nem „látszik” röntgendiffrakciós módszerrel.) **3)** Az AP a core domain-hez (többek között) erős sóhidas hidrogén kötésekkel kötődik, amelyek a szimuláció eddigi (~4ns-ot felölelő) szakaszában intaktak maradtak. (Ezeknek valószínűleg döntő szerepük van abban, hogy a thrombin által már lehasított AP továbbra is a FXIII felületén marad.) A molekula modellezéssel kapott eredmények mára álltak össze úgy, hogy közlemény formájában is publikálhassuk.

Elméleti megfontolásokból eddig egy rekombináns mutánst állítottunk elő és vizsgáltunk. Ebben a 37-es pozícióban lévő arginint glutaminra cseréltük (R37Q), s vizsgáltuk az így előállított fehérje aktivációját. Kimutattuk, hogy a thrombin a Q37 mutánst nem képes hasítani, ugyanakkor Ca²⁺ jelenlétében a vad típusú celluláris FXIII-hoz hasonlóan a mutáns zimogén formában is aktiválódik, s ezt a nem proteolitikus aktivációt a magas ionerő mindkét esetben jelentősen meggyorsítja. Az eredmények azon korábbi feltételezésünket támasztják alá, mely szerint az aktivációs peptid hasítása nem szükséges az enzim aktív centrumának kialakításához, és a transzglutamináz aktivitás megjelenéséhez. Utóbbi kísérletek kapcsolódnak a kutatási program I/1/c pontjához (a Ca²⁺ kationok szerepe a proenzim aktiválásában). A

munkának ez a része nemzetközi kongresszuson bemutatásra került, de ahhoz, hogy közlemény formájában is megjelenhessen nagyobb mennyiségű mutáns fehérjét igénylő részletes biokémiai-enzimológiai karakterizálásra van szükség. Jelenleg tudunk beszerezni egy erre alkalmas készüléket, melynek segítségével megkezdtük a mutáns fehérje sejtmentes expresszióval nagy mennyiségben történő előállítását.

Az aktivációs peptid szerepének további vizsgálatára olyan rekombináns mutánst kíséreltünk meg expresszálni, melyből hiányzik az aktivációs peptid, és Ca^{2+} jelenlétében spontán aktiválódik. Ilyen mutáns előállítására vonatkozó kísérleteink azonban nem hoztak eredményt. A mRNS vad típusnak megfelelő mennyiségben történő képződése ellenére enzimatis aktivitással rendelkező fehérjét nem észleltünk, s a fehérje a sejtben szinte azonnal degradálódott. Ez felvetette azt a lehetőségét, hogy a FXIII-A az aktivációs peptid nélkül (vagy annak lehasadásával!) instabillá válik, azaz, maga az aktivált FXIII is instabil, s spontán elveszti aktivitását. Legújabb, az utolsó félévben elkezdett vizsgálataink ezt támasztják alá. Kimutattuk, hogy az aktivált FXIII aktivitása 37 °C-on inkubálva gyorsan csökken. Ugyanakkor semmiféle proteolízis nem detektálható. Az eredményeknek az adja meg a jelentőségét, hogy eddig az aktivált FXIII down-regulációjára vonatkozóan semmiféle elképzelésünk sem volt, s ez a spontán down-reguláció megmagyarázhatja, miért nem képződik extrémén keresztkötött, a fibrinolitikus rendszerek által eltávolíthatatlan fibrin az alvadás során.

b. A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatása a FXIII proteolitikus aktivációjára plazmában, illetve teljes vérben.

A kísérletek során plazmához thrombint adtunk, s komplex plazma környezetben vizsgáltuk a fibrinképződést, a fibrin γ lánc FXIII által történő keresztkötését, a FXIII inkorporációját a fibrinhálóba és a FXIII proteolitikus aktiválását (az aktivációs peptid lehasadását), illetve e jelenségek időbeli viszonyát. Kimutattuk, hogy a FXIII teljes mértékben inkorporálódik a fibrin hálóba és proteolitikus aktiválódása a fibrin felületén történik meg. Az aktivált FXIII a fibrin háléhoz kötve marad, soha nem jelenik meg a plazmában vagy szérumban. A FXIII aktiváció beindulása a fibrin polimerizáció kezdetétől függ, s arra nincs hatással a Val34Leu polimorfizmus. Ugyanakkor azt, hogy a FXIII aktivációja milyen késéssel követi a fibrin polimerizációt a Val34Leu polimorfizmus lényegesen befolyásolja, s Leu34 esetében a lag fázis igen rövid. E konklúziót olyan kísérletekkel is bizonyítottuk, melyekben nagy tisztaságú Val34, illetve Leu34 homozigóta egyénekből izolált FXIII-t adtunk FXIII hiányos plazmához (ez esetben a fibrin polimerizáció ugyanakkor következett be, és a Val34Leu polimorfizmus hatása a fibrin polimerizációtól függetlenül volt vizsgálható). Megkíséreltük a vizsgálatokat teljes vérben is elvégezni, szöveti tromboplasztinnal indítva az alvadás folyamatát. Ez esetben azonban olyan sok változós rendszer befolyásolta a trombin képződés idejét, sebességét és a keletkezett trombin mennyiségét, hogy a rendszer nem látszik alkalmasnak érdemi következtetések levonására. A résztémából elkészült közlemény közlés alatt áll.

2/ A FXIII A és B alegységek asszociációjáért felelős strukturális elemek

a. A két típusú alegység összekapcsolódását akadályozó monoklonális ellenanyagok szelektálása.

A FXIII A és B alegységei ellen eddig mintegy 100 monoklonális ellenanyagot állítottunk elő. Az A alegység ellen termelt mintegy negyven monoklonális antitest közül két olyat találtunk, melyek csak akkor kötődnek az A alegységhez, ha az szabad dimer (A_2) formában van, azaz nincs komplexben a B alegységgel. Ugyanakkor ezek

az antitestek, amennyiben először az A alegységhez kötődtek nem tudták megakadályozni a B alegység bekötődését. Ebből arra következtettünk, hogy vagy a B alegység leszorítja a gyengébb affinitású antitesteket az A alegységről, vagy az A₂ formában lévő A alegységen meglévő az antitestekkel reagáló strukturális epitóp(ok) konformáció változás következtében eltűnnek a B alegységgel képződő tetramer (A₂B₂) kialakulása során.

Az első B alegység ellen termelt monoklonális antitest széria során képződött közel 60 monoklonális antitest között nem találtunk olyat melyek csak a szabad B alegységhez kötődnének. Egy újabb immunizáció során azonban 5 olyan monoklonális antitestet is sikerült előállítani melyek csak az izolált B alegységgel reagálnak, az A₂B₂ tetramerral nem, ill. amelyek a B alegységgel reagálva megakadályozzák annak A alegységgel képzett komplexét. A kiválasztott antitestek ELISA módszerrel végzett kötődési vizsgálatait az elmúlt év utolsó hónapjában beszerzett Biacore készülékkel kívánjuk kiegészíteni.

b. A komplex képződést gátló ellenanyagokkal reagáló epitópok, ill. mimotópok identifikálása és lokalizációja az alegységek strukturájában

Az eredeti tervek szerint az epitóp keresését „phage display” technikával terveztük. Ez a technika azonban hosszas keresés ellenére nem hozott értékelhető eredményeket. Ezért új epitóp keresési technikák bevezetésével próbáltuk(juk) megközelíteni a problémát. Az egyik ilyen a hidrogén-deutérium (vagy deutérium-hidrogén) cserét követő pepszines emésztésen és MALDI-TOF technikával történő peptid identifikáláson alapuló technika. Ennek segítségével sikerült a B alegységen olyan peptidet találni ahol a H-D (D-H) csere lényegesen kisebb, mint a többi peptid esetében. Jelenleg ezen peptidok identifikálása folyik. Párhuzamosan megkezdtük a PepsScan technika epitóp keresés céljára történő felhasználását is.

c. Vizsgálatok FXIII-B deléciós és szubsztitúciós (kiméra) mutánsokkal

Ezen új molekuláris genetikai megközelítés keretében klónoztuk a FXIII B alegységét és az 5 sushi doménnel rendelkező fehérje esetében olyan mutáns klónokat is készítettünk, melyekből egy vagy több sushi domént kihagytunk. E mutáns klónokat az 1-es sushi domén kivételével sikerült expresszálni. Ezt követően a pályázat keretében ez a munka megszakadt, az e tevékenységben résztvevő Dr. Balogh István távozott a munkacsoportból, e témára önálló OTKA pályázatot nyújtott be, melyet ez évben az OTKA bizottság jóváhagyott.

3/ A FXIII szerepe a thrombocyták funkciójában

a. A FXIII szerepe a thrombocyták adhéziójában

A pályázatot megelőzően már kimutattuk, hogy a FXIII hiányos betegek monocytáinak phagocytosisa csökken. Mivel a thrombocyták adhéziója a phagocytosis számos analógiát mutat ezen előzetes kísérleteket tovább folytattuk, s kimutattuk, hogy a FXIII hiányos monocytákban mind az ellenanyag, mind a komplement függő receptor mediált phagocytosis csökkent, elsősorban az internalizáció csökkenése miatt. Kimutattuk, hogy a monocyták macrophagokká történő differenciálódása során a FXIII mRNS szintézise a phagocytosis hatékonyságával párhuzamosan fokozódik, és a phagocytosis fokozó stimulusok a FXIII szintézisét is fokozzák. Az e munkából elkészült publikációt a Cellular Immunology-ban közzétettük. Ez volt az első olyan közlemény, mely a celluláris FXIII phagocytosisban játszott szerepét bizonyítja.

FXIII-A hiányos heparinnal alvadásgátolt betegek vérével a thrombocytá adhéziót és a thrombusképződést vizsgáltuk áramlási körülmények között. Izraeli kollaborációban hét FXIII-A hiányos beteg vérével alkalmazva kimutattuk, hogy a thrombocyták adhéziója kollagén felszínhez, és a képződött thrombus magassága egyaránt csökken. A csökkenés FXIII pótló terápia (Fibrogammin-P kezelés) után vett vérrel nem volt kimutatható. Az eredmények azt igazolják, hogy az inaktív FXIII áramlási körülmények között elősegíti a thrombocyták kollagénhez való adhézióját, s nagy nyíróerőnél a FXIII hozzájárul a von Willebrand faktor mediálta thrombocytá adhézióhoz és a fibrinogén mediálta thrombocytá-thrombocytá kölcsönhatáshoz.

b. FXIII által kovalensen módosított fibrin(ogén) felszín thrombocytá adhéziós tulajdonságának vizsgálata

Kifejlesztettünk egy olyan technikát, melynek segítségével a felszínhez kötött fibrinogén trombinnal fibrinné alakítható, s aktivált FXIII-mal mind a fibrin, mind a fibrinogén keresztbe köthető. Statikus és áramlási körülmények között, utóbbi esetben különböző nyíróaránynál (100/sec-től 2600/sec) megvizsgáltuk, hogy a kereszt-kötés hogyan befolyásolja a thrombocyták fibrinhez, illetve fibrinogénhez történő adhézióját. Mind a két esetben azt találtuk, hogy a kereszt-kötés hatására az adhézió lényegesen csökkent, s ez különösen kifejezett volt az artériás áramlási viszonyoknak megfelelő magas nyíróarány esetén. Atomerő mikroszkóp segítségével kimutattuk, hogy az adherált thrombocyták morfológiáját a kereszt-kötés nem befolyásolja. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a FXIII indukálta kereszt-kötések a fibrinhez történő thrombocytá adhéziót leegyelmeztetik, s ez által fontos limitáló szerepet játszanak az artériás rendszerben kialakuló thrombusok növekedésében. Az elkészült közleményt publikációra benyújtottuk.

c. A thrombocytá FXIII sorsa és szerepe a thrombus érése során

Fibrinogén oldatban lévő thrombocytá szuszpenzióban, ill. ennek granulocytákkal kiegészített változatában vizsgáltuk a trombin adását követően képződött fibrin kereszt-kötését. Megállapítottuk, hogy a thrombocytákból még hosszú (4 óras) inkubáció után is csak minimális FXIII kerül ki, s így a fibrin kereszt-kötése is minimális. Eredményeink szerint a thrombocytákban lévő nagy mennyiségű FXIII az alvadékba még granulocyták jelenlétében sem szabadul ki, s gyakorlatilag csak a plazma FXIII vesz részt a fibrin kereszt-kötésében. Granulocyták jelenlétében meglepetésünkre gyakorlatilag teljes fibrinolízis következett be, így a fibrin kereszt-kötéséről nem beszélhettünk.

Amennyiben nem tiszta fibrinogén oldatból indultunk ki, hanem teljes plazmából a granulocytá mediált „alternatív” fibrinolízis jóval kisebb mértékű volt, bár a granulocyták számának emelésével és az inkubációs idő hosszabbodásával fokozódott. Kísérleteket végeztünk FXIII hiányplazmával ill. FXIII mentes fibrinogénnel annak érdekében, hogy felderítsük a FXIII esetleges védő szerepét a granulocyták által mediált fibrinolízisben. Úgy találtuk, hogy a FXIII sem tisztított rendszerben, sem plazma körülmények között nem tölt be védő szerepet és nem befolyásolja a lízis mértékét.

A kísérletek során mintegy mellékletként igen érdekes felfedezést tettünk. Kiderült, hogy a granulocytá proteázok igen gyorsan lebontják a plazma FXIII A és B alegységét, s ez a hatás, bár valamivel lassabb, de jelentős a plazmából képződött fibrin alvadékban is. Ez azért fontos, mert a plazma FXIII fibrin alvadékban történő

eddig ismeretlen down-regulációjának egyik fontos mechanizmusának tartható. Megkíséreltük a mechanizmusban résztvevő proteázokat is identifikálni, specifikus proteáz inhibitorok segítségével. Kiderült, hogy a FXIII proteolízisében az elasztáz játszik fontos, bár korántsem kizárólagos szerepet. A katepszin G és a matrix-metalloproteáz 9 szerepe kevésbé fontos. E proteázok inkább az elasztáz által képzett elsődleges lebontási termékek további hasításában játszanak szerepet (gátlásuk esetén a FXIII A alegységből keletkezett 53 és 55 kD hasadási produktumok felszaporodnak). A plazma fő elasztáz inhibitora, az α_1 antitripszin jelentős védő hatással bír a FXIII alegységek granulocytá proteázok által történő lebontásával szemben, azonban ez a gátlás közel sem teljes. Utóbbi magyarázza, hogy plazmából képződött alvadékban is jelentős a FXIII alegységek lebontása. E most elkészült munkából sikeres előadást tartottunk a Basel-i FXIII szimposiumon, a közlemény összeállítása folyamatban van.

4. Faktor XIII-at gátló peptidek előállítása és hatásuk vizsgálata

E részfeladat a terveknek megfelelően 2004-ben kezdődött. α_2 plazmin inhibitor (α_2 PI) N-terminális peptidjének (mely korábbi eredményeink szerint az aktivált FXIII kitűnő szubsztrátja) megfelelő szubsztrát analógokat állítottunk elő és megvizsgáltuk ezeknek a transzglutamináz reakcióban kifejtett gátló hatását, ill. kompetitív szubsztrát funkcióját. Eddig a következő eredményeket kaptuk: a dodekapeptid C-terminális lizin reziduumának az elhagyása nem befolyásolja lényegesen a FXIIIa aktivitását, azaz a 11 tagú peptid is jól alkalmazható szubsztrátként. További reziduumok elhagyása a 7-tagú peptidig csökkenti a peptid szubsztrátként való felhasználhatóságát, amely ennél kisebb peptid esetén megszűnik. A 12 tagú peptid 4-es pozíciójában lévő glutamin aszparaginra cserélése csökkenti a katalitikus effektivitást, azaz ennek a reziduumnak szerepe van a hatékony enzim szubsztrát kapcsolatban. A 2-es pozícióban lévő glutamin aszparaginra való cserélését követően a peptid megszűnik szubsztrátként funkcionálni, ugyanakkor gátolja a FXIIIa aktivitását. Ha a 2-es és 4-es pozícióban lévő glutamint egyaránt aszparaginra cseréljük a gátló hatás csökken. Tekintettel arra, hogy a jelenleg rendelkezésünkre álló peptid gátló hatása még nem éri el azt a mértéket, mely *in vivo* kísérleteket megalapozhat, gátló hatást mutató peptidből kiindulva a molekula modellezést is igénybe véve még hatékonyabb gátló peptidek (vegyületek) kialakításán dolgozunk.

II. Klinikai FXIII kutatások

1/ A FXIII meghatározására és kimutatására szolgáló módszerek kidolgozása, illetve továbbfejlesztése

a. Kinetikus kromogén teszt a FXIII aktivitás mérésére

Rájöttünk, hogy egyes a kereskedelemben forgalmazott FXIII assay-k súlyos FXIII hiányos betegek esetében lényegesen fölélik a plazma FXIII szintjét. Ez a beteg állapotának és a terápia hatékonyságának megítélésénél komoly problémákat okoz. Kiderítettük, hogy ennek oka a reakció elegendően lévő glutamin szubsztrátból nem FXIII által enzimatikusan felszabaduló ammónia, illetve a plazmában jelenlévő piruvát lebomlásából származó NADH konzumpció. Kimutattuk, hogy a FXIII aktivitás gátlása mellett mért plazmavak beiktatásával a fölélik kiküszöbölhető. A korábban kifejlesztett UV kinetikus tesztünkben jóacetamiddal gátoltuk a FXIIIa aktivitást, s az így előállított plazma vak levonásával a problémát kiküszöböltük. A munkából a közlemény a *Journal of Thrombosis and Haemostasis*-ban jelent meg.

Kimutattuk, hogy a FXIII koncentrátum mérésére módszerünk akkor is alkalmazható, ha a FXIII koncentrátum hígítása pufferrel történik, míg a Behring-Dade módszer csak akkor, ha a hígítást FXIII hiányos plazmával végzik. Az ezzel kapcsolatos közlemény összeállítás alatt van.

A FXIII aktivitás mérésére szolgáló kinetikus UV és ELISA tesztünket alkalmazva részt vettünk az első FXIII WHO plazma standard kidolgozásában, ill. annak koordinálására alakult FXIII Standardization Working Group munkájában. A standardizációval kapcsolatos közlemény rövidesen elkészül, a szintén ezzel kapcsolatos nomenklaturáról szóló közleményünket a J Thromb Haemost közlésre elfogadta.

A trombinnal és Ca^{2+} -val aktivált FXIII által katalizált transzglutamináz reakció során felszabadult ammóniát glutamin szintetáz enzimmal glutamátba építettük be, miközben ADP-ből ATP keletkezett. Az ADP-t piruvát kinázzal visszaalakítottuk ATP-vé, s a keletkező piruvát mennyiségét piruvát oxidáz-peroxidáz reakcióval kromogén szubsztráttal mértük. A reakció működött, de linearitása meglehetősen limitáltnak bizonyult, ezért több más lehetőséget is kipróbáltunk. E próbálkozások közül a nagy érzékenyséű "scintillation proximity assay" kidolgozása a FXIII (és általában a transzglutaminázok) mérésére volt igazán sikeres. A biotinált glutamin oldalláncokat tartalmazó szubsztrátot streptavidinnel fedett scintillációs mikrotiter lemezhez kapcsoltuk és a transzglutaminázok által kovalensen a peptidhez kötött radioaktív aminoszubsztrát szintillációt idézett elő a lemezben, amit megfelelő mérőeszközzel kvantitatíve mérni lehet. A módszert és a módszer levizsgálásának eredményeit az Analytical Biochemistry-ben közöltük.

b. Módszer kifejlesztése a FXIII-A intracelluláris kimutatására áramlásos citometriával és a módszer alkalmazása az acut myeloid leukaemiák (AML) tipizálásában

A monocyta eredetű acut myeloid leukémiák (AML) pontos azonosítását igen megnehezíti, hogy nem rendelkezünk megbízható markerekkel mely a teljes monocyta érés során kimutatható lenne. Ennek megfelelően a myeloblastos és monoblastos leukémiák elkülönítése gyakran nehézségekbe ütközik. Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy (i) milyen az intracelluláris FXIII-A megjelenés különböző acut myeloid leukémiákban (ii) milyen a FXIII-A reakció szenzitivitása és specificitása különböző myeloblast és monoblast sejtvonalakon (iii) mennyire használható a teszt reziduális betegség kimutatására. A klinikai minták vizsgálata során 86 de novo AML, 6 krónikus myelomonocytás leukémia és 12 normál minta (7 csontvelő és 5 perifériás vér) analízisére került sor 3 színű áramlási citometriai analízissel. A FAB beosztás szerinti M0, M1 és M2 AML típusokban megjelenő blastokban a FXIII-A intracitoplazmatikus megjelenése átlagosan 10% alatt volt, míg M4 és M5 típusú AML-ekben 50% feletti pozitívitas mutatkozott. A FXIII-A szenzitivitása az M4 és M5 altípusokban jelentősen meghaladta az általánosan alkalmazott CD14 reakció szenzitivitását. A fluoreszcencia intenzitások analízisekor azt találtuk, hogy ellentétben pl. a myeloperoxidázzal a FXIII-A reakció intenzitása magasabb a leukémiás sejtekben, mint a normál monocytákban. A FXIII-A reakció jóval érzékenyebbnek mutatkozott reziduális betegség kimutatására is. A sejtkultúrák analízise azt mutatta, hogy a myeloblast érése során nem expresszálódik FXIII-A míg a monoblastok érése során jóval megelőzi a CD14 megjelenését és szenzitívebb mint a CD64. Eredményeink alapján a FXIII-A megbízható intracitoplazmatikus marker a M4, M5 M7 AML-ben és a krónikus myelomonocytás leukémiában. A munkából elkészült közlemény a Thrombosis and Haemostasis folyóiratban jelent meg.

c. FXIII szint meghatározása a thrombocyta rendszer kvantitatív rendellenességei esetében

Az autológ perifériás vér őssejt transzplantáció előkészítéskor alkalmazott csontvelő abláció során mind a monocyta, mind a thrombocyta szint rendkívül erősen csökken, a monocyta szint azonban ezt követően gyorsan, míg a thrombocyta szint lassan, mintegy 2 hét múlva kezd emelkedni, s a 4. hétre visszatér az eredeti szintre. A plazma FXIII aktivitás és koncentráció a thrombocytaszám csökkenésével párhuzamosan csökken és a két paraméter (thrombocyta szám és FXIII szint) szignifikáns korrelációt mutatott. A monocytaszám csökkenésével ilyen korrelációt nem találtunk. Az csontvelő aplasiás fázisban a thrombocytaszám csökkenése mintegy 95 %-os, ezzel szemben a FXIII csökkenés csak 25 %-os volt. A változás időbeli kinetikájának az elemzése azt bizonyítja, hogy csontvelő aplasiás betegekben – ellentétben az egészséges egyénekekkel – extra-haematopoiitikus sejtek is szintetizálják az FXIII-A alegységét. E munkából készült közleményt a Blood Coagulation and Fibrinolysis közölte.

Elvégeztük a magas thrombocytaszámmal járó myeloproliferatív megbetegedésekben is a plazma FXIII aktivitás és szint meghatározását. Eredményeink azt mutatják, hogy mind essentialis thrombocytamiában, mind egyéb myeloproliferatív megbetegedésben a FXIII szintek megemelkednek. Néhány igen nagy thrombocyta számmal járó esetben extrém magas FXIII szinteket lehetett mérni. A betegek hidroxüreával történő kezelése csökkenti a thrombocytaszámot és ezzel párhuzamosan az FXIII szintet is. Az eredmények azt mutatják, hogy a nagy mennyiségben képződött, sérülékeny, magas turnover-ű thrombocytákból kikerülő FXIII-A résztvesz a plazma FXIII szint kialakításában. Feltételezzük, hogy a magas FXIII szint hozzájárul e betegek fokozott thrombosis hajlamához. A munka elkészült, az ebből készült közleményt összeállítottuk.

Különböző destruktív és hyporegeneratív thrombocytopeniás betegek FXIII szintjének vizsgálata jelenleg is folyik.

A thrombocyta rendellenések vizsgálatát ki kívántuk terjeszteni a kvalitatív thrombocyta rendellenességekre is, hiszen előkísérleteink szerint pl. Glanzmann thrombastheniában a thrombocyta fehérjék FXIIIa által történő keresztkötése módosul. E vizsgálatokhoz jelenleg a Glanzmann thrombastheniás betegek molekuláris genetikai és fehérje biokémiai karakterizálása folyik. Az első ilyen beteg vizsgálatának eredményeit a Thrombosis and Haemostasis folyóirat közölte, a második beteg vizsgálata is befejeződött, ennek anyagát nemzetközi kongresszuson prezentáltuk, a közlemény összeállítása folyamatban van.

d. A FXIII Val34Leu polimorfizmus és FXIII szint, illetve aktivitás meghatározás occlusiv arteriás megbetegedésben

Felmérve, hogy a tervezett kísérletekhez szükséges nagyszámú Val34Leu polimorfizmus meghatározás szükséges kiderült, hogy a hagyományos PCR-RFLP technikával a vizsgálatok rendkívül hosszú időt vennének igénybe. Ezért a Val34Leu polimorfizmus meghatározására kidolgoztunk egy új „real-time” PCR-t alkalmazó módszert, melyben a különböző genotípusokat fluorescens rezonancia energia transzfer segítségével olvadási görbe analízissel detektáljuk. Az új módszert Roche LightCycler készülékre adaptáltuk, a hagyományos PCR-RFLP-vel és DNS szekvenálással az új módszer 100 %-os egyezést mutatott. Módszertani közleményünk a Clinical Chemistry and Laboratory Medicine folyóiratban jelent meg.

Myocardiális infarctus

A vizsgálatok 955 egymást követő, coronaria angiographiával vizsgált betegen történtek. A coronaria sclerosis (CS) diagnózisát a coronarographiával $\geq 50\%$ szűkületet mutató betegcsoport esetében, a myocardialis infarctus (MI) diagnózisát a WHO ajánlásai alapján pozitívnak bizonyuló esetekben mondtuk ki. A betegeket a következő csoportokba osztottuk: CS-MI- (klinikai kontrollok), CS+MI-, CS-MI+ and CS+MI+. A vizsgálatok első részében meghatároztuk a plazma FXIII aktivitását és a FXIII antigén koncentrációját. A 4 csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget az adjusztált FXIII szintekben. Ha elvégeztük a nemek szerinti bontást nők esetében a CS+MI+ csoportban szignifikánsan magasabb FXIII aktivitás és antigén szinteket találtunk mint a CS+MI- csoportban. Férfiaknál ilyen különbség nem volt észlelhető. Emellett kimutattuk azt is hogy nők esetében az emelkedett FXIII szint szignifikáns rizikó faktor a myocardialis infarctusra. (A FXIII aktivitás és antigén felső harmadában lévő nők esetében a rizikó arány 2.180 (1.230-3.864, $p=0.008$), ill. 2.294 (1.297-4.058, $p=0.004$) volt. Az emelkedett FXIII szint egyik nemben sem jelentett fokozott rizikót a coronaria sclerosisra. Az e munkából készült közleményt benyújtottuk közlésre.

A vizsgálatok második részében a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusát vizsgáltuk a fenti betegcsoportban. E polimorfizmus előfordulását acut myocardialis infarctusban (AMI) és coronaria sclerosisban (CS) több tanulmány vizsgálta, az eredmények azonban ellentmondóak. Több szerző számolt be arról, hogy a FXIII-A Leu34 allél hordozása védő hatású AMI-val szemben, azonban más munkacsoportok ezt nem erősítették meg. Magyarországon az AMI/CS előfordulása az egyik legmagasabb az európai államok között, ezért különösen érdekes annak vizsgálata, hogy a Leu34 allél hordozása protektív-e. Nem találtunk ilyen protektív hatást, ugyanakkor az allél hordozása fokozott rizikót sem jelentett. Jelenleg az irodalomban megjelent adatok és saját adataink metaanalízise folyik (ilyen analízis eddig nem jelent meg), aminek befejezése 2006 első félévében várható. Kimutattuk e mellett, hogy a faktor Val34Leu polimorfizmus egyik betegcsoportban sem befolyásolta a plazma FXIII specifikus aktivitását. Ugyanakkor myocardialis infarctuson átesett Leu34 homozigóták esetében a FXIII aktivitása és antigén szintje is kb. 10%-kal alacsonyabb volt a vad típusúakénál.

Mintegy 300 perifériás érbetegnél is meghatároztuk a FXIII-A Val34Leu polimorfizmust, a plazma FXIII aktivitást és antigén szinteket. Kimutattuk, hogy okkluzív perifériás érbetegségben a FXIII szint szignifikánsan, mintegy 12-15 %-kal magasabb, mint a kontroll egyéneken. Ugyanakkor a FXIII-A Leu34 allél jelenléte sem hetero-, sem homozygota formában nem befolyásolja a betegség előfordulási gyakoriságát, illetve súlyosságát. Az közleményt jelenleg állítjuk össze.

e. FXIII szint különböző testfolyadékokban és e szintek változásai gyulladáisos megbetegedésekben

A tervezett kísérletek közül először a bronchoalveolaris mosófolyadékban történő FXIII meghatározásokat végeztük el. A korábban kifejlesztett igen érzékeny két immunoassay-énkkal el tudtuk különíteni a celluláris (FXIII A₂) és plazma (FXIII A₂B₂) faktort és meg tudtuk határozni mindkettőnek a koncentrációját a bronchoalveolaris mosófolyadékban. Egészséges gyermekek esetében, ahol a lavage nem igazolódott idegentest feltételezése miatt történt, kis mennyiségű celluláris FXIII-t találtunk a mosófolyadékban, míg plazma FXIII nem volt észlelhető. Chronicus bronchitis, illetve fibrotikus alveolitis esetén a celluláris FXIII szintje átlagosan a normális 4-5-szörösére emelkedett a bronchiális mosófolyadékban.

Áramlásos citometriával kimutattuk, hogy a bronchoalveolaris mosófolyadékban lévő sejtek közül egyedül az alveolaris makrophagok tartalmaznak FXIII-at, így a celluláris FXIII minden valószínűség szerint e sejtekből származik, s mennyisége minden valószínűség szerint e sejtek aktivitását tükrözi. A legtöbb betegben a plazma FXIII is megjelent, ami fokozott capilláris permeabilitásra utal. Feltételezzük, hogy a FXIII lényeges szerepet játszik a a tüdő krónikus, gyulladással járó megbetegedéseiben képződött fibrin turn-overének a szabályozásában, s így e betegségek pathomechanizmusában. A munkából a közlemény a Journal of Thrombosis and Haemostasis folyóiratban jelent meg.

Az egészséges egyének és gyulladással, ill. degeneratív megbetegedésben szenvedők ízületi folyadékából és a liquorából történő FXIII meghatározások folynak, a megfelelő számú minta összegyűjtése azonban időigényes és e munka befejezése csak kb. egy év múlva várható.

f. Molekuláris genetikai vizsgálatok FXIII hiányos betegeken

Tekintettel arra, hogy a 2 magyarországi FXIII hiányos beteg mutációi az irodalomban már leírt mutációknak bizonyultak, a további vizsgálatok iráni betegek plazma és DNS mintáin történtek. A mintákat Flora Peyvandi-tól iráni származású olasz kollaborációs partnerünktől kaptuk. 10 nem rokon iráni beteg esetében végeztük el a fenotípus-genotípus analízist. Két különböző transzglutamináz mérésével csak azon betegeknél találtunk mérhető aktivitást, akik profilaktikus szubsztitúciós terápián voltak. Hasonló eredményt adott a plazma FXIII komplex és a plazmában lévő FXIII-A alegységek immunoassay-vel történő meghatározása. A genotípus meghatározásoknál a FXIII-A génben 4 új mutációt (2 misszenz és 2 kis deléció) találtunk, és 2 korábban már közölt misszenz mutációt is észleltünk. A misszenz mutációk strukturális következményeit molekula modellezéssel és energetikai számításokkal kíséreltük meg kideríteni. A mutációk az alábbi arginin rezidumok cseréjét eredményezték: Arg77His, Arg260Cis, Arg260His és Arg382Ser. Az első aminosav csere a FXIII-A β sandwich doménjében, az utóbbi négy a központi doménben található. Valamennyi mutáció az argininhez kapcsolódó extenzív és strukturális szempontból fontos hidrogénkötés hálózatot szüntette meg vagy károsította. Az energia dekompozíciós analízis azt mutatta, hogy ez a helyzet a molekula instabilitásához és feltehetően a inkorrekt folding-jához vezet, ami magyarázza a súlyos FXIII hiányt. Az eredményeket a Human Mutation folyóiratban közöltük.

Előzetes feltételezésünkkel szemben funkcionális FXIII „deficienciához” vezetett egy olyan rendellenesség, melyben a véralvadás V-ös faktorának (FV) FXIII által történő keresztkötése gátolt volt és a FV aktivitás is jelentősen csökkent. A FV gént megszekvenáltuk, és semmiféle genetikai eltérést nem találtunk, ezzel szemben kimutattuk, hogy az idős gastrointestinális vérzésektől szenvedő nőbetegben olyan IgG típusú auto-antitest található, mely a a FV könnyűláncon a molekula C2 doménjéhez kötődik, neutralizálja az aktív FV prokoaguláns aktivitását és gátolja keresztkötését. Az auto-antitest karakterizálását a Journal of Thrombosis and Haemostasis-ban közöltük.

E témakörhöz kapcsolható a FXIII sebgyógyulásban játszott szerepének vizsgálata. Klinikai megfigyelések utaltak arra, hogy egyes FXIII hiányos betegek esetében a sebgyógyulás kóros, azonban ennek exakt bizonyítására soha nem került sor. Izraeli és német kollaborációban kimutattuk, hogy az incíziós sebek záródása FXIII-A hiányos transzgen egereken jelentősen elhúzódó volt és a sebgyógyulás során bekövetkező szövettani változások kórosak voltak. Plazma FXIII pótló terápia esetén

a sebgyógyulás normalizálódott. Kísérleteinkben először szolgáltatunk exakt bizonyítékot arra, hogy a FXIII-A genetikai hiánya csökkent sebgyógyuláshoz vezet, s ez a plazma és nem a celluláris FXIII hiányának köszönhető. Az e munkából megjelent közleményt a Thrombosis és Haemostasis folyóirat közölte.