

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A véralvadás XIII-as faktorának megjelenése akut
myeloid leukémiás sejtekben**

Dr. Simon Ágnes

Témavezető: Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2012**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	5
CÉLKITŰZÉSEK	8
BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	9
<i>Klinikai és kontroll minták</i>	9
<i>Áramlási citometria alkalmazása immunfenotípus meghatározásra</i>	9
<i>Citogenetika és FISH vizsgálat</i>	11
<i>A FXIII elleni antitestek FITC konjugálása</i>	12
<i>Sejtenyésztés</i>	12
<i>FXIII-A vizsgálata ELISA módszerrel</i>	12
<i>FXIII-A vizsgálata Western-blot módszerrel</i>	13
<i>Konfokális mikroszkópia</i>	14
<i>Statisztikai módszerek</i>	14
EREDMÉNYEK	15
<i>FXIII-A expresszió vizsgálata áramlási citometriával normál csontvelői és perifériás vérmintákon</i>	15
<i>A FXIII-A pozitivitás specificitásának, szenzitivitásának vizsgálata tenyésztett sejteken</i>	16
<i>A FXIII-A pozitivitás vizsgálata akut myeloid leukémiás mintákon</i>	18
<i>FXIII-A és CD14 jelölődés összehasonlítása AML és CMML betegmintákon</i>	20
<i>AML M3 leukémiás beteg minták áramlási citometriás vizsgálatának eredménye</i>	22
<i>A FXIII-A detektálása APL sejtekben CLSM-val</i>	24
<i>A vizsgált AML M3-as betegek immunfenotípus megoszlása</i>	25
<i>Normál promyelocyták FXIII-A expressziójának vizsgálata áramlási citométerrel</i>	26
<i>A FXIII-A fehérje megjelenési formáinak és mennyiségének vizsgálata APL-ben</i>	27
<i>Az akut promyelocytás leukémiás betegek túlélésének vizsgálata a FXIII-A expresszió tükrében</i>	29
MEGBESZÉLÉS	30
ÖSSZEFOGLALÁS	39
SUMMARY	41
IRODALOMJEGYZÉK	43

TÁRGYSZAVAK	53
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	54
FÜGGELÉK	55

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALL	akut lymphoid leukémia
AML	akut myeloid leukémia
APC	allophycocyanine
APL	akut promyelocytás leukémia
BAL	bifenotípusos akut leukémia
CD	cluster of differentiation
CMMoL	chronic myelomonocytic leukemia
Cy5	Cyanine5
FISH	fluoreszcencia in situ hibridizáció
FITC	fluorescein isothiocyanát
HNE	human neutrophil elasztáz
LAIP	leukemia associated immunophenotype
MFI	mean fluorescence intensity
MPAL	mixed-phenotype acute leukemia
MPO	myeloperoxidáz
MRD	minimal residual disease
NOS	not otherwise specified
PAP	peroxidáz-anti-peroxidáz
PBS	phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
PerCP	peridin chlorophyll protein
PFA	paraformaldehid
PI	propidium iodide
PMN	polimorfonukleáris
TF	tissue factor

BEVEZETÉS

A XIII-as faktor felépítése, plazma és celluláris XIII-as faktor jellemzése

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy protranszglutamináz, melyet a thrombin Ca^{2+} jelenlétében proteolitikus úton aktivál. A folyamatot kalcium mellett a fibrin(ogén) szabályozza.[1,2] Az enzim aktív formája (FXIIIa) $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizil}$ keresztkötéseket alakít ki fibrin monomerek között, így stabilizálva a véralvadási folyamat végső fázisában kialakuló fibrinhálót. [3,4]

A véralvadás során a keringő prekursor enzimfehérjék (véralvadási faktorok) kaszkádszerűen, proteolízis útján aktiválódnak. A folyamat elindításának legerősebb stimulusa a sejtek felszínén lévő szöveti faktor (TF). Szöveti faktort számos sejttípus jelenít meg: pl. fibroblastok és pericyták az érfalban, az agy astrocytái, veseglomerulusok epithel sejtjei, szívizomsejtek. [5-7] Ezek azonban a vér alkotóelemeivel csak akkor kerülnek kapcsolatba, ha endothel sérülés következik be. A keringő vérben a monocyták és az erek endothel sejtjei TF-t expresszálnak. Ezen kívül a keringésbe került TF-t hordozó tumorsejtek okozhatnak alvadásaktivációt. [8,9] A TF foszfolipid és Ca^{2+} jelenlétében aktiválja a FVII-t, ami a prothrombináz komplexet alkotó FV és FX aktivációját végzi. A TF-FVIIa komplex a FIX-t is aktiválja. A prothrombináz komplex hatására a prothombin aktív proteázzá, thrombinná alakul. A thrombin thrombocytákat és a FXIII-t aktiválja valamint a fibrinogént fibrinné alakítja. Robbins és munkatársai állapították meg kísérleteik során, hogy a kalcium nem elegendő a fibrin alvadék gyenge savban vagy lúgban való oldhatatlanná tételéhez, feltételezték egy további, szérumban meglévő faktor jelenlétét. [10] A fibrin alvadék stabillá válásához szükséges szérumban meglévő faktor jelenlétét két magyar kutató, Laki Kálmán és Lóránd László írta le elsőként 1948-ban. [11-13] Az általuk fibrinstabilizáló faktornak elnevezett fehérjét Loewy és munkatársai állították elő tisztított formában és írták le enzimatisztikus tulajdonságait. 1963-ban ismerték el véralvadási faktorként XIII-as sorszámmal. [14-18]

A XIII-as faktor A és B alegységeinek expressziós helyei

A FXIII-nak két formája található meg az emberi szervezetben: a vérben heterotetramerként kering, intracellulárisan két A alegységből álló homodimerként (A_2) van jelen. A heterotetramer forma két potenciálisan aktív A (FXIII-A) és két gátló/stabilizáló B (FXIII-B) alegységből áll (A_2B_2). [19] A B alegység megakadályozza az A alegység aktiválódását. [20,21]

A B alegységet az emberi szervezetben a májsejtek [22], az A alegységet a megakaryocyták/thrombocyták [23,24] és a monocyta/macrophag rendszer sejtjei [25-28], valamint kis mértékben a májsejtek szintetizálják [29-31]. Az egyéb sejtípusok közül a chondrocyták FXIII-A szintetizáló képességét is bizonyították [32], valamint osteoblastokban is kimutatták. [33] A vérben lévő FXIII-B mennyiség kb. fele szabadon kering a plazmában, míg a FXIII-A teljes mennyisége a tetramer komplexben található. A FXIII komplex átlagos plazma koncentrációja 21 mg/L. A FXIII- A_2B_2 komplex képződésének körülményei máig nem tisztázottak.

A FXIII-A intracelluláris lokalizációs helyei (szubcelluláris megoszlás)

A thrombocyták igen nagy mennyiségű FXIII-A-t tartalmaznak, 150-szer többet, mint a vérplazma, a monocyták FXIII-A tartalma viszont egy nagyságrenddel kisebb, mint a thrombocytáké. [34] A csontvelői megakaryocyta és monocyta prekursor sejtek FXIII-A expresszióját is leírták. [28] Az intracelluláris enzim funkciója még nem teljesen ismert, de számos kísérleti eredmény azt mutatja, hogy a megakaryocyták, monocyta és macrophag sejtek nem csupán a FXIII-A szintézis helyei, hanem a sejtek patofiziológiai funkcióinak aktív részesei.

A FXIII-A macrophag sejtekben jellegzetes citoplazmatikus eloszlást mutat; megfigyelhető a citoplazmatikus vakuolumok körül és a pseudopodiumokban, a fagocitotikus vakuolumokban azonban nem mutatható ki. [35] A monocyta /macrophag érés korai szakaszában a FXIII-A nukleáris akkumulációját figyelték meg a sejtekben. [36] Feltételezik szerepét a fagocitózisban és az alternatív macrophag aktivációban. [37,38] A thrombocytákban a FXIII-A egy alacsony molekulásúlyú hősokk proteinhez, a HSP27-hez kapcsolódva található meg. [39,40]

A malignus kórképekben megjelenő FXIII-A

A FXIII-A a megakaryocytá/thrombocytá és monocytá/macrophag rendszer sejtein kívül nem található meg egyéb csontvelői és perifériás vér sejtben. [25,41] A FXIII-A jelenlétét azonban sok más betegségben és malignus kórképben vizsgálták. Megfigyelték, hogy a Hodgkin-kórban szenvedők nyirokcsomóiban fibrin lerakódások vannak jelen, valamint a nyirokcsomókban döntő többségben vannak a macrophag-szerű sejtek. Ez a sejtpopuláció FXIII-A aegységet tartalmaz. Bizonyították a macrophag eredetét és így azt, hogy tumor-asszociált macrophagokról van szó. [42]

Vizsgálták a FXIII-A megjelenését malignus fibrotikus histiocytómában (MFH). A sejtek FXIII-A pozitívítást mutattak MFH-ban, amely így elkülöníthető a szövettanilag hasonló lágy szöveti tumoroktól. [43] Azt tapasztalták, hogy a FXIII-A pozitívítást nem a malignus sejtekben, hanem a tumor-asszociált sejtekben jelenik meg, pl. a macrophagokban, folliculáris dendritikus reticulum sejtekben (DRCs), fibroblast-szerű mesenchymális sejtekben, valamint a sinusoidális és interfolliculáris histiocytá reticulum sejtekben. [44, 45]

Feltételezték, hogy a megakaryocytá és monocytá sejtek malignusan transzformálódott formái is expresszálnak FXIII-A antigént. Invernizzi és munkatársai akut myeloid leukémiás beteg mintáit vizsgálták FXIII-A ellenes nyúl antitestet alkalmazva peroxidáz-anti-peroxidáz (PAP) immunológiai módszerrel. Az AML megakaryocytás (M7), myelomonocytás (M4) és monocytás (M5) szubtypusaiban pozitív reakciót detektáltak. [46]

Vizsgálatainkban mi elsőként alkalmaztunk egy újonnan kifejlesztett FXIII-A ellenes monoklonális antitestet, amivel áramlási citométeren vizsgáltuk akut myeloid leukémiás beteg mintákon a FXIII-A expressziót, amely az AML diagnosztikában és követésben is hasznosnak bizonyulhat.

CÉLKITŰZÉSEK

A munkám során célul tűztem ki a XIII-as faktor akut myeloid leukémiákban (AML) történő megjelenésének vizsgálatát.

1. Megvizsgáltuk, hogy az akut myeloid leukémiás sejtekben kimutathatók-e a FXIII alegységei.
2. Teszteltük a FXIII-A megjelenés specificitását és szenzitivitását AML altípusaiban.
3. Vizsgáltuk, hogy leukémia-asszociált immunfenotípust (LAIP) jelent-e a FXIII-A pozitivitás és hogyan alkalmazható új markerként a leukémia differenciáldiagnosztikában.
4. Tanulmányoztuk a FXIII-A lehetséges prognosztikai szerepét akut promyelocytás leukémiában.

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Klinikai és kontroll minták

Akut myeloid leukémiás betegek csontvelő és perifériás vér mintáit vizsgáltuk. 2000. és 2010. év között összesen 100 AML-es betegnél végeztünk szisztematikus áramlási citometriai analízist FXIII-A reakcióval összefüggésben. A vizsgálatok első részében 2000. és 2004. év között 86 fő - AML M0, M1, M2, M4, M5 és M6 FAB típusba sorolható - akut myeloid leukémiás és 12 normál mintát vizsgáltunk meg, a leukémiás betegek esetén 76 csontvelői és 10 perifériás vérmintát, a normál minták esetén 7 csontvelői és 5 perifériás vérmintát, valamint 6 krónikus myelomonocyta leukémiás (CMMoL) beteg perifériás vérmintáját dolgoztuk fel. Minden csontvelő minta esetén megtörtént a morfológiai, citokémiai és immunfenotípus vizsgálat.

Később az akut myeloid leukémia promyelocytás szubtypusára (AML M3) fókuszálva további betegeket vontunk be a vizsgálatba, így betegeink között 14 db újonnan diagnosztizált akut promyelocytás leukémiás (APL) beteg csontvelői és perifériás vér mintáját is analizáltuk. Esetükben a csontvelőkenetekben több, mint 70%-os blast arányt találtunk. Minden APL a hypergranuláris típusba tartozott és FISH technikával a jellegzetes t(15;17) volt detektálható. A 10 férfi- és 4 nőbeteg átlagéletkora 48 év (25-68 év). Normál promyelocyták tanulmányozásához négy vashiányos anémiában szenvedő beteg csontvelőmintáját vizsgáltuk meg.

A leukémiás minták újonnan felismert, kezelés előtt álló betegekből származtak. A perifériás vér gyűjtése EDTA antikoagulánst tartalmazó zárt vacutainer csőbe történt, a csontvelő minták sternum punkcióból származtak és heparin volt az alvadás gátló (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). A festési eljárások minden minta esetén aznap vagy max. 16 óra szobahőn tárolást követően megtörténtek.

Áramlási citometria alkalmazása immunfenotípus meghatározásra

Az immunfenotípus vizsgálat során fluoreszcens festékekkel jelölt monoklonális antitestekkel vizsgáltuk a sejtfelszíni és intracelluláris markereket.

Az áramlási citometria vizsgálataink kezdetén 2000. évben zömmel az alábbi, kereskedelmi forgalomban kapható, fluorokrómmal direkt konjugált monoklonális antitesteket alkalmaztuk 3 színű jelölésű panelben (1. táblázat):

1.táblázat. Fluorokrómmal jelölt monoklonális antitestek

Fluorokróm:	FITC	PE	PECy5	PerCP
Marker ellenes antitestek	CD4	CD8	CD13	CD34
	CD14	CD34	CD19	HLA-DR
	Glycophorin-A	CD33		CD45
	CD45	CD117		
	CD15	CD135		
	CD7			
(Gyártó: Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA, USA)				
Marker ellenes antitestek	CD13	CD41 MPO		
(Gyártó: Dako Glostrup, Dánia)				

(FITC= fluorescein isothiocyanát, PE=phycoerythrin, PE/Cy5[Cyanine5] fluorokróm tandem, PerCP=peridin chlorophyll protein)

A FXIII alegységei ellen egerekben termeltetett monoklonális antitesteket FITC jelölő reagens kit segítségével konjugáltuk (Sigma, St. Louis, MO, USA). A FXIII A és B alegységei ellenes monoklonális antitesteket korábban intézetünkben fejlesztették ki Katona és munkatársai. A tisztított FXIII-B előállításához az A alegységet ismételt fagyasztás-olvasztás módszerével a komplexről leválasztották [47], majd affinitás kromatográfiával tisztították [48]. A FXIII-A alegységet humán placentából preparálták [49]. A monoklonális antitesteket egér rendszerben állították elő. [34,50]

A sejtfelszíni jelölés kezdeti lépéseként a csontvelői és teljes vér minták fehérvérsejt számát 10 G/L –re állítottuk PBS-sel (phosphate buffered saline, 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, 1000 mL dH₂O, pH 7.4), majd az 50 µL mintát telítő koncentrációjú direkt konjugált antitestekkel inkubáltuk 15 percig, szobahőn, sötétben. A vörösvérsejteket hemolizáltuk FACS lizáló oldattal (Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA, USA). Majd 2x kimostuk a mintákat PBS-sel (centrifugálás 300 g-n, 5 percig), végül reszuszpendáltuk a sejteket 0,5 mL, 1%-os paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS-ben.

Az intracitoplazmatikus jelölést az Intrastain reagens (Dako Glostrup, Dánia) leírásának megfelelően végeztük. A felszíni jelölés minden esetben megelőzi a permeabilizálást és

intracitoplazmatikus festést. A FITC-al jelölt FXIII-A antitestet 2 µg/mL végkoncentrációban alkalmaztuk megfelelő izotípus kontroll mellett. A PFA-val fixált mintákat 4°C-on tároltuk maximum 24 óráig. A mérések FACSCalibur áramlási citométeren történtek (Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA, USA), minden mintánál azonos PMT beállítást alkalmazva. Bead-ekre történő kalibrálással standard mérési körülményeket biztosítottunk, mely a FacsCalibur áramlási citométeren havi rendszerességgel a BD Calibrite 3 és APC gyöngyeivel történt. A *de novo* leukémiák esetén 10 000 sejt adatait gyűjtöttük be ún. list mode fájlokba és analizáltuk Cell Quest 3.2 szoftver segítségével.

A FXIII-A expressziót normál csontvelői promyelocytákon is vizsgáltuk az alábbi antitestekkel történő jelölés után: FXIII-FITC, CD117-PE, HLA-DR-PerCP-Cy5.5, CD33-PE-Cy7, CD15-APC, CD14-APC-H7, CD45-Pacific Orange. A minta előkészítés és festés a fent leírt protokollnak megfelelően történt. A mérés a három lézerrel rendelkező FACSCanto II áramlási citométeren zajlott (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). Standard mérési körülményeket a Cytometer Setup and Tracking Beads gyöngyök segítségével naponta végzett kalibrációval biztosítottunk.

Az analízis során a pozitív sejtek százalékos arányát adtuk meg a vizsgált sejtpopuláción belül. Az eredmények értékelésekor figyelembe vettük a pozitív sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI= mean fluorescence intensity) is, mely jellemezhet egyes kóros sejtcsoportokat.

Citogenetika és FISH vizsgálat

A hagyományos citogenetikai vizsgálatot minden APL-es beteg csontvelő mintáján elvégeztük. Minden beteg esetében 20 G-sávú metafázis került kiértékelésre. A karyotípusok leírása a Humán Cytogenetikai Nomenklátúra Nemzetközi Rendszerének (ISCN, 2009) megfelelően történt. A fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) a kromoszóma preparátumokból származó sejt szuszpenziókon a PML-RARA transzlokációs próba (Abbot/Vysis, Downers Grove, IL, USA) gyári leírásának megfelelően zajlott.

A sejteken háttérfestésként DAPI-t (4,6-diamidino-2-fenilindol) alkalmaztunk, Valamennyi esetben 200 interfázisú sejtet analizáltunk. Az értékelést Zeiss Axioplan2

(Carl Zeiss, Zaventum, Brussels) fluoreszcens mikroszkóppal és ISIS szoftverrel (Metasystems, Altlussheim, Németország) végeztük.

A FXIII elleni antitestek FITC konjugálása

A FXIII ellenes antitestek konjugálása FluoroTag FITC konjugáló kittel történt (Sigma, St. Louis, MO, USA). Az eljárás során a FITC fluorokrómot és az antitesteket 20:1 moláris arányban 9,0 pH-án inkubáljuk 2 órán át. A jelölt antitestet Sephadex-G25M oszlopon választjuk el a nem kötött FITC-től. Meghatározzuk a moláris FITC/Protein arányt 495nm és 280nm-en történő abszorbancia mérésel, így ellenőrizzük a konjugálás sikerességét. A F/P hányados 3-6 között volt. Majd kiszámoljuk az antitest koncentrációt. A konjugált antitest 0,1% Na-azid jelenlétében +4 C-on tárolható.

Sejtenyésztés

A Mono-Mac6 sejteket Dr. Duda Ernő ajándékként kaptuk a Szegedi Biológiai Kutatóközponttól, a PLB-985 sejtvonal sejtjei az Országos Haematológiai és Immunológiai Intézetből származnak (Országos Gyógyintézeti Központ). A sejtek tenyésztése 10% főtális borjú szérumot (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mmol glutamint, penicillint és streptomycint (Sigma) tartalmazó RPMI 1640 (Sigma, St.Louis, Mo, USA) közegben történt. A monocyta érési folyamatot 30 nM D₃-vitaminnal (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA) a granulocyták érését 1 µmol all-trans-retinsavval (ATRA-Sigma), és 1.25%-os dimetil-sulfoxiddal (DMSO-Sigma) indukáltuk. Három napon át minden nap analizáltuk bizonyos sejt felszíni markerek expresszióját.

FXIII-A vizsgálata ELISA módszerrel

A XIII-as faktor A alegységének vizsgálata akut promyelocytá leukémiás minták sejtlizátumából történt az intézetünkben korábban Katona és munkatársai által közölt módszer alapján kis módosítással.[34] A thrombocytá kontamináció elkerülése érdekében a promyelocytá sejteket 3x mostuk 20 mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben 2200g-n, 4 percig. A szerin és cisztein proteázok gátlására egy proteáz inhibitor koktélt (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) adtunk a mosó pufferhez. A sejteket ultrahangos szonikálással tártuk fel (Branson, Danbury, CT, 4°C, 3x30 másodpercig

PBS-ben), de előtte sejtszámot határoztunk meg, hogy pontosan kiszámolható legyen az egy sejtre eső FXIII-A tartalom.

FXIII-A vizsgálata Western-blot módszerrel

A thrombocyta mentesített APL blast sejtek FXIII-A tartalmának meghatározása után a fennmaradó sejteket centrifugáltuk és 100 μ L SDS PAGE minta pufferben vettük fel (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0,1% brómfenol kék, 4,5% merkaptóetanol), majd a sejtuszpenziót 5 percig forraltuk. A mintákat, melyek mennyiségét 60 μ L-re állítottuk minta pufferrel és 18 ng volt a FXIII-A tartalmuk, 7,5%-os SDS poliakrilamid géltre vittük fel, és redukáló közegben elektroforetizáltuk (BioRad, Hercules, CA), majd Immobilon P membránra (Millipore, Bedford, MA) blottoltuk. A nem specifikus kötések blokkolására a membránt 1 órán át inkubáltuk 3%-os zselatin tartalmú TRIS puffer oldatban (0,5 M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH: 7,5; TBS) szobahőn, majd egy éjszakán át 4°C-on 1%-os zselatin tartalmú blokkoló pufferben tartottuk.

Az elsődleges antitest birka poliklonális anti-humán FXIII-A volt (Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada). Az immunreakcióhoz biotinált, nyúlban termelődött anti-birka IgG-t és avidin-biotinált peroxidáz komplexet alkalmaztunk (Vectastain ABC kit összetevői, Vector, Burlingame, Kanada), majd a reakció kialakulását elektro-kemilumineszcencia elve alapján detektáltuk (ECL Plus⁺, Amersham, Little Chalfont, UK). Negatív kontrollként granulocyta sejteket és sejtlizátumot használtunk, melyek áramlási citometriával, ELISA és Western-blot módszerrel sem mutattak FXIII-A antigén pozitivitást.

Annak demonstrálására, hogy a human neutrophil elasztáz (HNE) hasítja a FXIII-A fehérjét, 2 μ g/mL tisztított FXIII-A₂-t és 2 μ g/mL tisztított HNE enzimet inkubáltunk 2.85 mM Ca²⁺ jelenlétében különböző ideig 37°C-on. A reakciót egyenlő mennyiségű SDS Laemmli pufferrel állítottuk le. A FXIII-A₂ preparálása human placentából történt az intézetünk munkatársai által korábban leírt eljárás szerint [51], a tisztított HNE (20-22 egység/mg) a Calbiochem terméke (La Jolla, CA, USA). Thrombocytamentes promyelocyta sejtlizátumot két beteg perifériás véréből és a második beteg csontvelő mintájából állítottunk elő.

Konfokális mikroszkópia

APL-es betegmintákból cytospin preparátumot készítettünk, amit 4%-os PFA-ban 10 percig fixáltunk és 3x átmostuk PBS-ben. A FITC-el konjugált anti-FXIII monoklonális antitestek koncentrációját 15 µg/mL-re állítottuk 1 mg/mL BSA-t és 0.1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel. Ezt a puffert a sejtekhez adva 30 percen át szobahőn inkubáltuk a mintákat, így permeabilizálva a sejtek membránját. Az inkubáció utolsó 5 percében 0.5 µg/mL végkoncentrációban propidium jodidot (PI) adtunk az oldathoz. Ezután a cytospin készítményeket 3x mostuk 1 mg/mL BSA-t és 0.05% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben. Utolsó lépésként a mintákat újra PBS-ben mostuk és 10 µL Mowiol-al (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 25 w/v% glycerol és 10% Mowiol 4-88, Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Németország) fedtük be.

A konfokális mikroszkópia (CLMS=confocal laser scanning microscopy) Zeiss (Göttingen, Németország) LSM 510 rendszerrel és C-Apochromat 63×/1,25 NA vízimmerziós objektívvel történt. A fluoreszcenciát 488 nm-es Argon ion lézer gerjeszti, a kibocsátott jelet 505-550 nm-es sávszűrőt használva lehet begyűjteni. A propidium jodidot 543 nm-es HeNe lézer gerjeszti és a jelek 560 nm-es long pass filtert használva gyűjthetők be. A detektáláshoz 1 µm-es optikai szeletek szükségesek és így 512×521 pixel-es képek készíthetők 6,4 µs-os pixel idővel. Valamennyi felvétel ún. "multitrack" módon történt, amellyel a csatornák közötti átszennyezés küszöbölhető ki.

Statisztikai módszerek

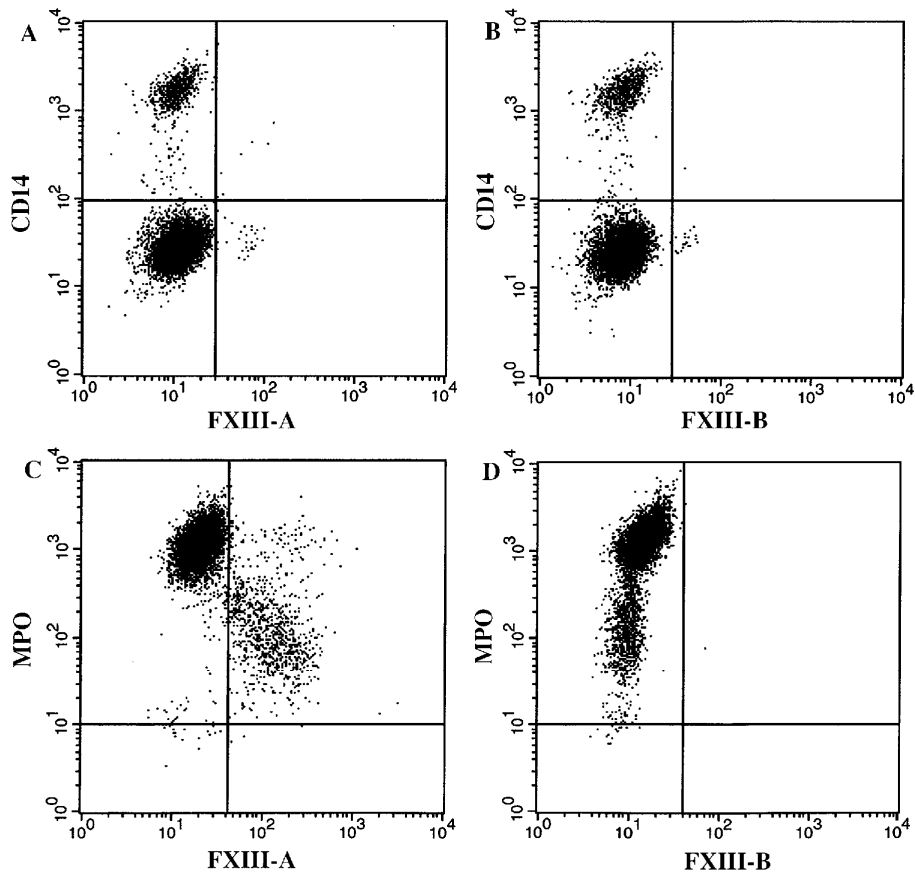
Az AML szubtípusaiban megtalálható pozitív sejtek arányának összehasonlításakor az adatok normalitásának ellenőrzésére Kolmogorov-Szmirnov tesztet alkalmaztunk. Mivel az adatok Gauss-eloszlást mutattak mindkét csoportban, így az eredményeket páros t-próbával elemeztük. A normál és leukémiás mintákban detektált pozitív sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása (MFI) nem mutatott Gauss-eloszlást, ezért a páratlan Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk a statisztikai értékeléshez. Az eredményeket 0,05 alatt tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A FXIII pozitív és FXIII negatív betegpopulációk túlélési idejének statisztikai összehasonlítását GraphPad Prism 4.0 szoftverrel végeztük.

EREDMÉNYEK

FXIII-A expresszió vizsgálata áramlási citometriával normál csontvelői és perifériás vérmintákon

A normál perifériás vérmintákat először CD14-PE-el és FITC-al konjugált FXIII-A és FXIII-B ellenes antitestekkel jelöltük meg. A felszíni festés után analizáltuk a myeloid kapuban lévő sejteket. Itt a monocyták mutatták a rájuk jellemző CD14 pozitivitást, de FXIII-A és FXIII-B pozitivitást nem találtunk (1. ábra A, B). Intrastain-el történő permeabilizálást követően minden myeloid sejt myeloperoxidáz (MPO) pozitivitást mutatott.



1. ábra. Perifériás vér myeloid sejtjeinek FXIII-A és FXIII-B jelölődése. A normál myeloid sejtek felszíni CD14 jelölődése alapján elkülöníthetők a monocyták az egyéb myeloid sejtektől. A sejtek felszínén sem FXIII-A, sem FXIII-B pozitívitas nem detektálható.(A,B) Permeabilizálást követően a myeloid sejtek MPO pozitívitas mutatnak. Az MPO-dim monocytákban FXIII-A található, míg az MPO-bright neutrophil sejtek negatívak.(C) Az összes myeloid sejt FXIII-B negatív.(D)

A monocyta sejtcsoport megjelent, mint jellegzetes „dim” MPO populáció, amelyben FXIII-A is detektálható volt, míg FXIII-B-re teljesen negatív reakciót adott. Az MPO-bright populációt a polimorfonukleáris granulocyták (PMN) alkotják, melyek a FXIII mindkét alcsoportjára negatívak (1. ábra C, D).

A lymphocyták sem mutattak sejtfelszíni FXIII-A jelölődést. A FXIII-A-val és az intracitoplazmatikus cyCD79 α B-sejt és cyCD3 T-sejt markerrel történt kettős jelölés után látható, hogy a T és B lymphocyták nem expresszálják FXIII-A-t.

A normál csontvelői mintában a FXIII-A a myeloid kapuban két sejtpopulációban detektálható: a CD45-bright érett monocytákon és a CD45-dim monoblastokon.

Az eredményeink azt mutatják, hogy normál perifériás vér és csontvelő mintában a FXIII alegységei közül kizárólag az A alegység van jelen, ami intracellulárisan található meg a monocyta sejtvonal sejtjeiben.

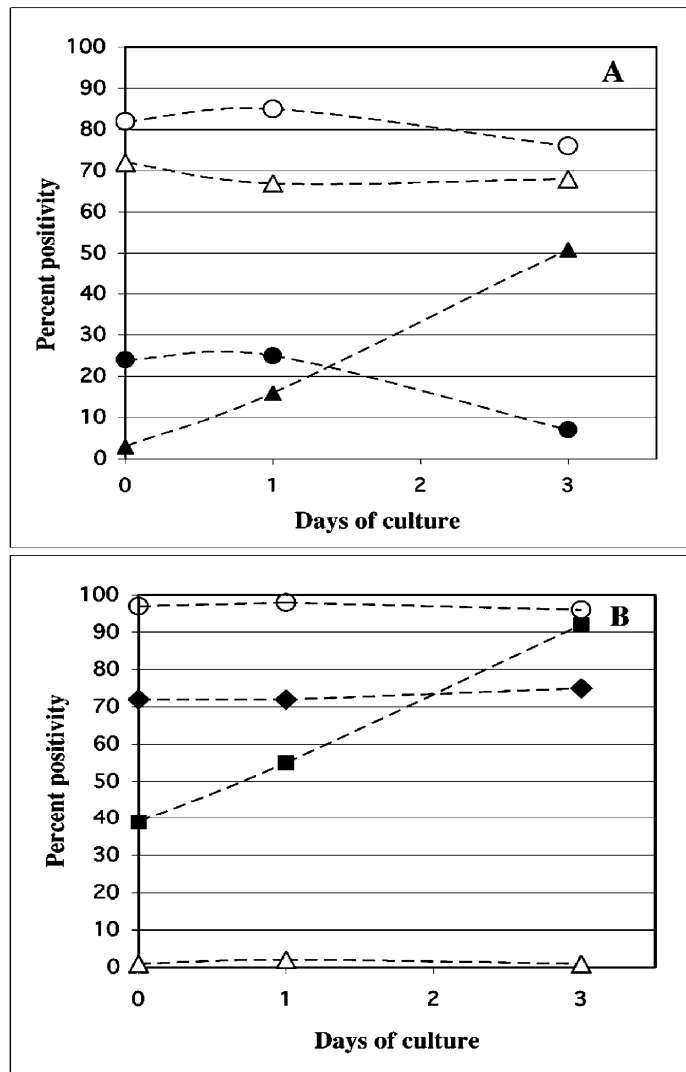
A FXIII-A pozitivitás specificitásának, szenzitivitásának vizsgálata tenyésztett sejteken

A sejttenyésztés ideje alatt a CD33 és cyMPO myeloid, CD64 és CD14 monocyta, CD11b granulocyta markerek és a FXIII-A expressziójának megjelenését, időbeni változását vizsgáltuk. A Mono-Mac6 monoblast sejtvonal sejtjein már a tenyésztés 0. napján kimutatható volt a FXIII-A, ami egyformán magas pozitivitást mutatott végig a tenyésztés 3 napja alatt, akár a CD33. A felszíni CD14 kezdetben nem expresszálódott, majd a monocyta differenciációt indukáló D-vitamin hatására 24 óra múlva már detektálni tudtuk. Ez idő alatt a CD64 pozitivitás csökkenését láttuk.

A PLB-985 sejtvonal sejtjein a CD33 és MPO végig pozitív maradt. DMSO indukció hatására a myeloid érést jelző CD11b fokozatosan megjelent a sejtek felszínén, FXIII-A-t viszont nem tudtunk detektálni. ATRA indukciót követően hasonló eredményeket kaptunk. (2. ábra)

Az eredményeink szerint a FXIII-A expresszió intenzitása, ami a monocyta sejtekérésének kezdetén is magas, nem növekszik tovább a sejt érési folyamatának előrehaladásával, ellentétben a CD14 expresszióval. Mivel a CD14 éretlen

monocytákon nem is detektálható, így a FXIII-A korai markerként sokkal szenzitívebb a monocyta sejtvonagra, mint a később megjelenő felszíni CD14.



○=CD33 ●=CD64 ▲=CD14 ■=CD11b ◆=MPO △=FXIII-A

2. ábra. Myeloid, granulocyta és monocyta markerek expressziója Mono-Mac6 és PLB-985 sejtvonalon. Mono-Mac6 sejtenyészetben vizsgáltuk a CD64, CD14 monocyta marker, a FXIII-A és a CD33 myeloid marker jelölődést. A CD14 folyamatosan növekvő expressziót mutatott, a FXIII-A minden mintában pozitív volt. (A) A PLB-985 myeloid sejt vonal sejtjei DMSO hatására folyamatosan növekvő CD11b expressziót mutattak érésük során. A sejt felszíni CD33 és az intracitoplazmatikus myeloperoxidáz minden mintában pozitív volt, de egyik sem mutatott FXIII-A pozitívítást.(B)

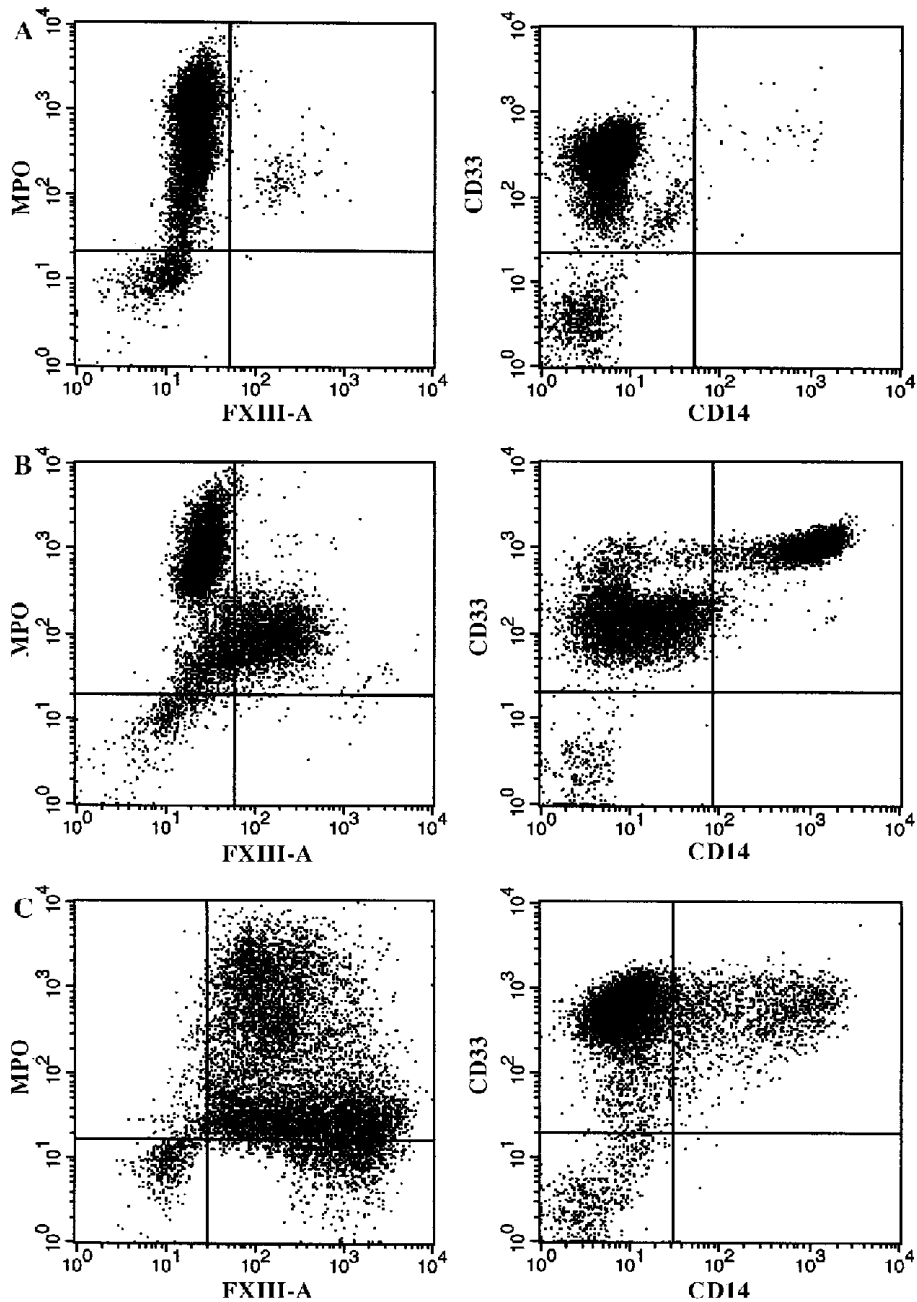
A PBL-985 sejtvonal esetén egyáltalán nem tudtuk detektálni a FXIII-A expressziót a kezdeti szakaszban sem és a granulocytá irányú differenciálódást követő napokban sem. Ezen eredmények alapján a FXIII-A specifikusnak mutatkozik a monocytá sejtvonal sejtjeire.

A FXIII-A pozitivitás vizsgálata akut myeloid leukémiás mintákon

A FXIII-A expresszió vizsgálatát összesen 100 AML-es beteg csontvelő és perifériás vér mintáján végeztük el 3-színű majd 4-színű jelöléssel áramlási citométeren. Ezzel párhuzamosan 6 CMMoL-es beteg perifériás vérére is vizsgáltuk. Az eredményeink azt mutatták, hogy a myeloblast (M0, M1, M2) és az erythroblast (M6) eredetű leukémiás blast sejtek nem expresszálnak FXIII-A-t vagy csak jelentéktelen mértékben. A pozitivitást egy adott markerre a 20%-os cut-off értéket meghaladó pozitív sejtarány jelentette. A 37 db M0, M1, M2, M3 és M6 AML-es betegből mindössze 2 esetben találtunk cut-off feletti FXIII-A expressziót. Az M4 és M5 AML esetekben a FXIII-A jelölődés megegyezett vagy nagyobb mértékű volt, mint a CD14 felszíni marker pozitivitás. A 3. ábrán bemutatok néhány jellegzetes dot plot képet, amit M1 és M5 AML-es betegek csontvelő mintájának mérése után készítettem. A jelölést követően a felszíni CD33, CD14 és intracitoplazmatikus MPO és FXIII-A expresszió megjelenését és intenzitását vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az M1 mintában csaknem az összes sejt MPO és néhány FXIII-A pozitív. Éppen annyi, mint amennyi sejt jelölődik CD14 monocytá markerre. (3. ábra A).

A másik két beteg AML M5 leukémiás, az egyik esetben a FXIII-A pozitivitás teljesen megegyezik a CD14-vel (3. ábra B).

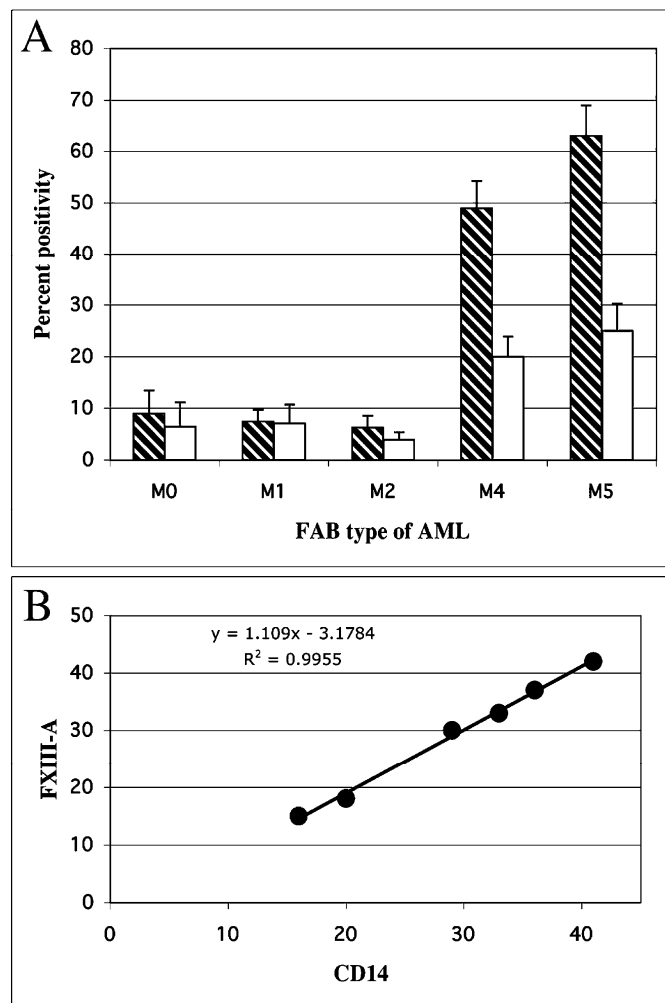
A másik betegnél jelentős eltérést találtunk: míg a CD33-bright sejtek mindössze 15%-a expresszált CD14 monocytá markert, addig FXIII-A-t csaknem az összes sejten detektáltunk (3. ábra C). Az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a FXIII-A intracitoplazmatikus marker szenzitívebb, mint a felszíni CD14, így az AML M4 vagy M5 leukémia esetén akkor is azonosíthatók a monocytá sejtvonalhoz tartozó sejtek, amikor azok a CD14 monocytá markert még nem expresszálják.



3. ábra. FXIII-A pozitivitás megjelenése jellegzetes dot plot képeken AML M1 és M5 leukémiás mintákban. Az AML M1-es betegmintánál (A) a sejtek MPO pozitivitást mutatnak, de csak néhány sejt jelölődik FXIII-A markerre. Ezek a sejtek CD14 monocyta markerre is pozitívak. Egy AML M5 mintában (B) az MPO-dim, CD33-bright sejtek intracitoplazmatikus FXIII-A és sejtfelszíni CD14 markert egyenlő arányban expresszálnak. Egy másik AML M5 minta (C) esetén a CD33-bright sejtek csaknem mindegyike FXIII-A pozitív, de csupán 15%-uk expresszál CD14 markert.

FXIII-A és CD14 jelölődés összehasonlítása AML és CMML betegmintákon

Összehasonlítottuk az AML különböző szubtypusaiban kapott FXIII-A százalékos pozitívitas értékeket, valamint a FXIII-A és CD14 expresszió mértékét. Az AML M0, M1, M2 esetekben FXIII-A-t nem detektáltunk. Az AML M4 és M5 csoportban a FXIII-A pozitív sejtek átlagos aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a CD14 jelölődést mutató sejteké ($p < 0.0001$). (4. ábra A)



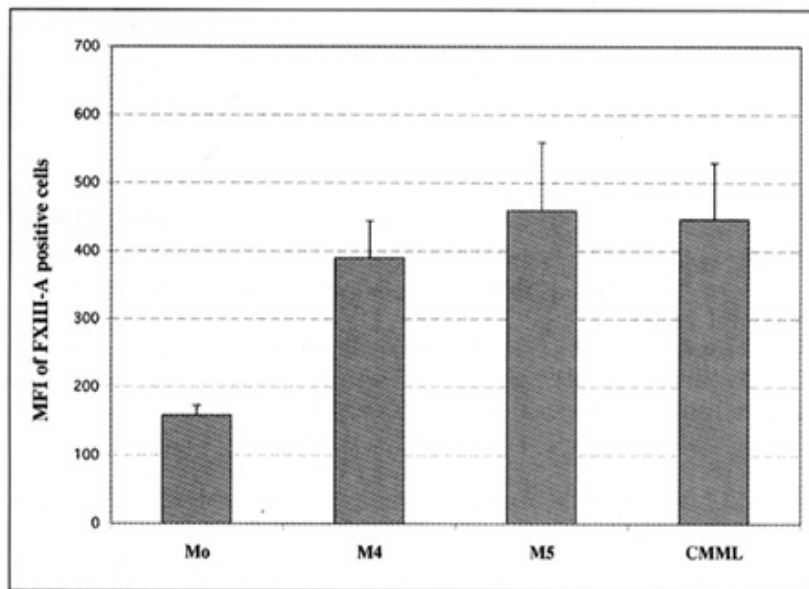
4. ábra. FXIII-A és CD14 jelölődés összehasonlítása. Myeloblast és monocyta sejt eredetű AML-es csontvelői minták esetén hasonlítottuk össze a FXIII-A (sötét oszlop) és a CD14 (világos oszlop) marker átlagos százalékos pozitívitasát. Az M4 és M5 esetén szignifikáns a különbség a FXIII-A és a CD14 jelölődés között.(A) A CMML-es minták FXIII-A és CD14 jelölődése megegyezik.(B)

A FXIII-A expresszió kiemelkedően magas volt (átlag: 68%) azokban az esetekben, ahol az éretlen sejtek voltak túlsúlyban, így az M5a szubtypusban.

A 6 vizsgált krónikus myelomonocytás leukémiás betegnél azt találtuk, hogy a FXIII-A és CD14 pozitív sejtek aránya teljesen egyezik. (4. ábra B) A korrelációs együttható $R=0.9977$. Megállapíthatjuk, hogy az érett monocytákon a két marker ugyanolyan mértékben expresszálódik.

Az adatok alapján a FXIII-A marker jelölődés mérése myeloblastos és monoblastos leukémiák esetén 100%-os szenzitivitású és 95%-os specificitású volt a monocytás/monoblastos leukémiákra (M4, M5).

Összehasonlítottuk a normál monocyták és a leukémiás minták (AML M4, M5, CMMoL) monocytáinak átlagos fluoreszcencia intenzitás értékeit (MFI). (5. ábra)



5. ábra. A FXIII-A jelölődés intenzitása normál monocytákon és leukémiás sejteken. A FXIII-A pozitív sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékei AML M4, M5 és CMMML mintákban szignifikánsan magasabbak, mint a perifériás vér normál monocytá sejtjei esetén.

25 M4, 19 M5 típusú AML-es és 6 CMMoL-es beteg FXIII-A pozitív sejtjeinek MFI értékével számoltunk. Azt láttuk, hogy a FXIII-A jelölődés sokkal intenzívebb volt a leukémiás sejtekben, mint a normál monocytákban ($p<0.05$).

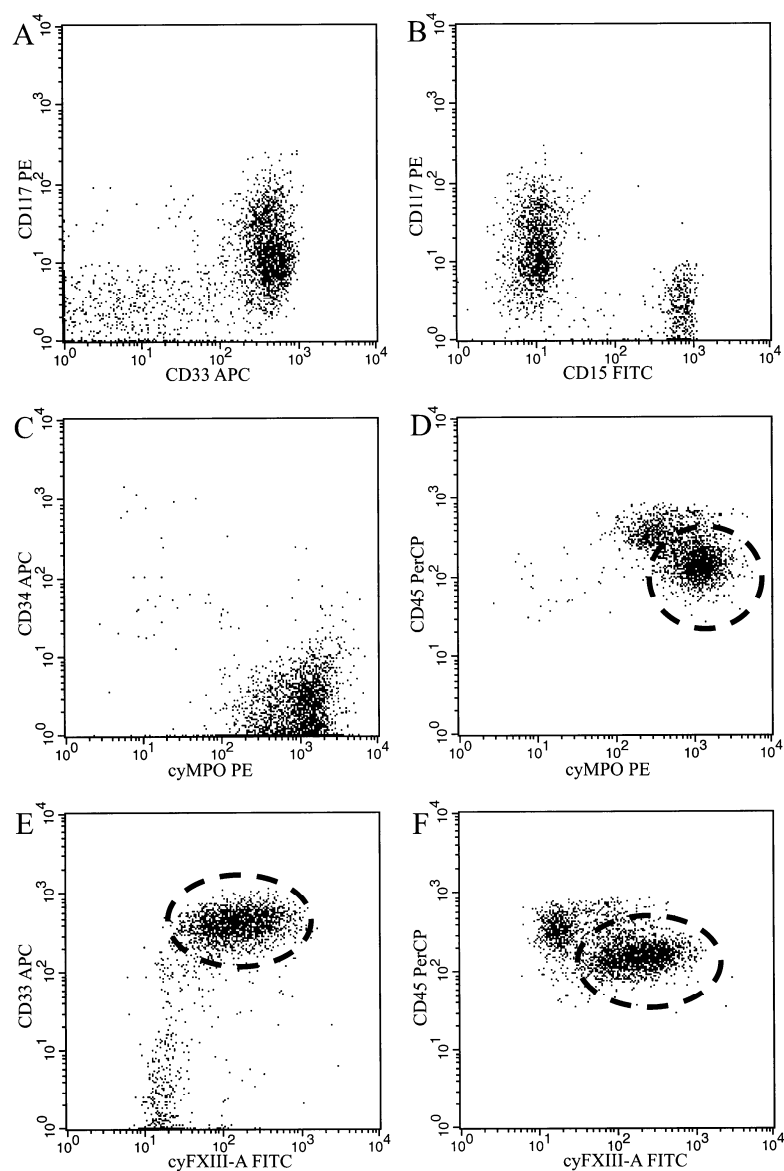
A monocyta sejtvonal mellett megvizsgált akut leukémiás betegek körében néhány AML M3 esetében FXIII pozitivitást találtunk. Ez váratlan eredmény volt mivel a neutrophil sejt sor prekurzoraiban nem volt FXIII-A kimutatható. Ennek a jelenségnek részletesebb vizsgálatát később minden de novo akut promyelocytás leukémia esetén elvégeztük és ezen leukémia-asszociált immunfenotípus (LAIP) valódiságát több módszerrel bizonyítottuk.

AML M3 leukémiás beteg minták áramlási citometriás vizsgálatának eredménye

A leukémiás promyelocyták citoplazmájukban számos granulummal rendelkező nagyméretű sejtek, melyek autofluoreszcenciája és oldal irányú fény szórása is nagymértékű. Ezeket a jellegzetességeket találtuk az általunk vizsgált beteg mintákon is. Tanulmányoztuk a myeloid markerek (MPO, CD13, CD33, CD14, CD15), a blast markerek (CD34, CD117), a HLA-DR és a FXIII-A expressziót.

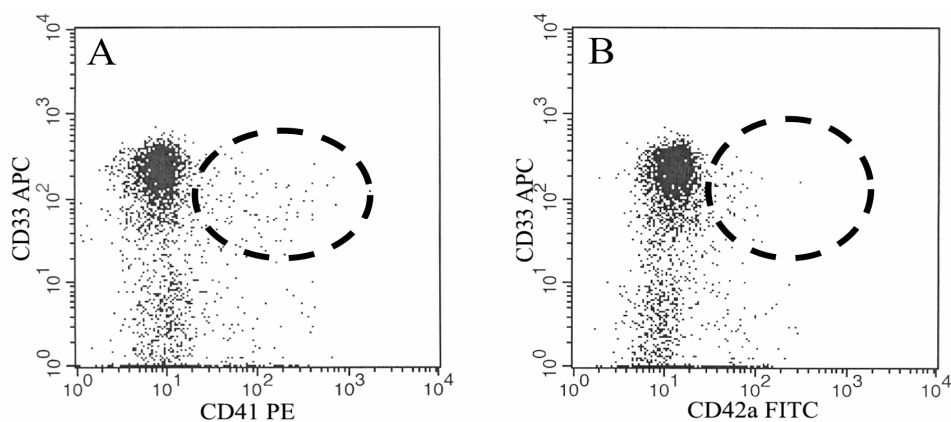
A jellegzetes dot plot képeken az látható, hogy CD45-dim leukémiás promyelocyták MPO és CD33 markereket intenzíven expresszálnak. (6. ábra D, E) A CD117 blast marker detektálható a leukémiás promyelocytákon, viszont CD34-re negatívak. (6. ábra A-C) A CD117-dim sejtek a CD15 granulocyta markert sem hordozzák. (6. ábra B)

A CD33-bright, MPO-dim és CD117-dim sejtek FXIII-A markerrel is jelölődnek, ez a koexpresszió pedig azt jelenti, hogy a kóros promyelocyták intracitoplazmatikusan FXIII-A-t hordoznak. (6. ábra E, F)



6. ábra. Az AML M3 dot-plot képe. A kóros promyelocyták intenzív CD33 és MPO jelölődést mutatnak, CD34 , CD15 marker negatívak és CD117-dim pozitívak.(A-D) A kóros promyelocyták FXIII-A markert expresszálnak.(E,F)

Vizsgáltuk még a CD33/FXIII-A koexpressziót mutató sejtpopuláció esetleges CD41 (GPIIb) vagy CD42a (GPIX) thrombocyt marker jelölődését annak megállapítására, hogy a FXIII-A pozitivitás nem thrombocyt vagy thrombocyt mikropartikula kontaminációból adódik-e. Egyik thrombocyt marker sem volt detektálható. Mivel a FXIII-A intracelluláris jelölődést mutatott és a CD41 és CD42a negatív, kizárható az esetleges thrombocyt kontaminációból adódó FXIII-A pozitivitás.(7. ábra A, B)

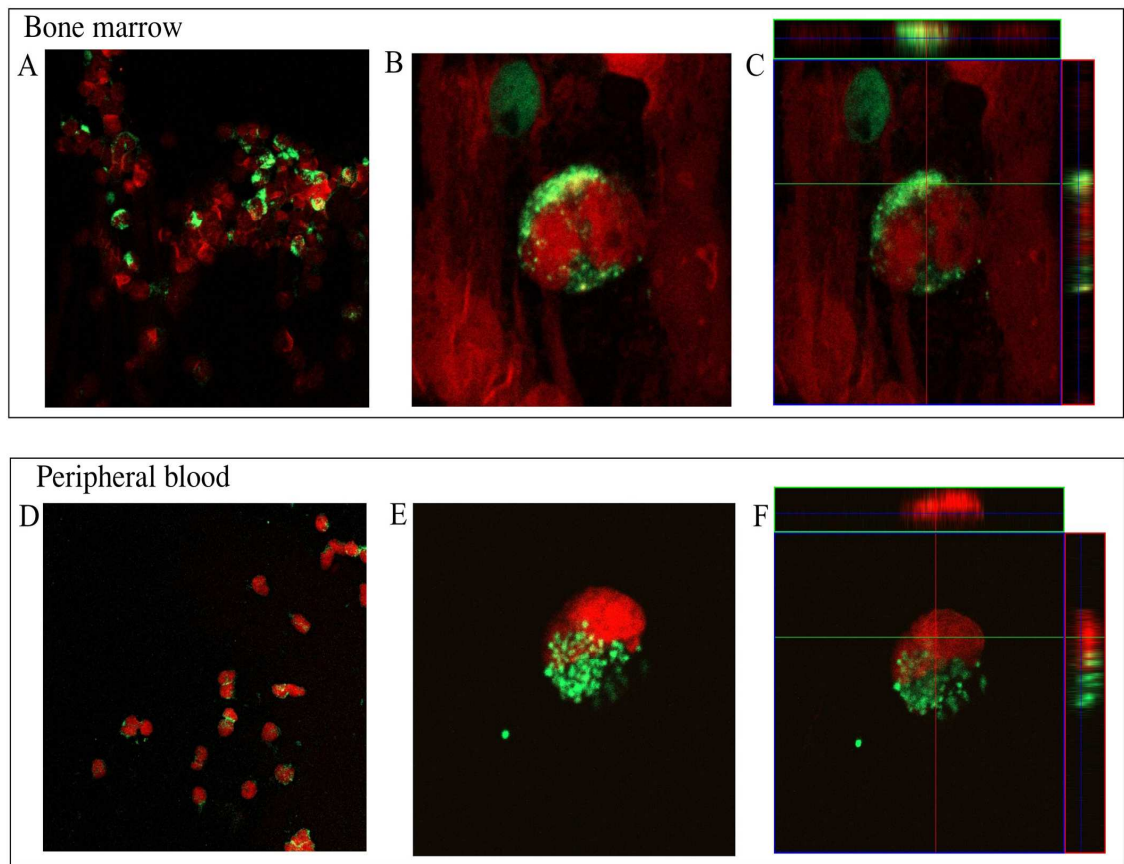


7. ábra. A FXIII-A jelölődés specificitásának vizsgálata. Az APL-es mintákban a kóros sejtek intracitoplazmatikus FXIII-A pozitivitást mutattak, de a CD41 és CD42a thrombocytá markerek hiánya azt bizonyítja, hogy a FXIII-A nem lehet thrombocytá vagy thrombocytá mikropartikula eredetű.

A FXIII-A detektálása APL sejtekben CLSM-val

A FXIII-A intracelluláris elhelyezkedését 3 promyelocytá leukémiás mintán vizsgáltuk konfokális lézer szkennig mikroszkóppal. Citospin készítményeken analizáltuk az APL sejteket. (8. ábra)

A FITC-el jelölt FXIII-A zöld színben, a propidium jodiddal festett sejtmagok piros színben jelennek meg. A kis nagyítású képen (8. ábra A, D) a vizsgált sejtek nagy része FXIII-A pozitivitást mutat. A kinagyított képeken (8. ábra B,E) és a 3D-s képen (8. ábra C,F) a FXIII-A lokalizációját vizsgáltuk. A FXIII-A fehérjét a kóros promyelocyták citoplazmájában detektáltuk.

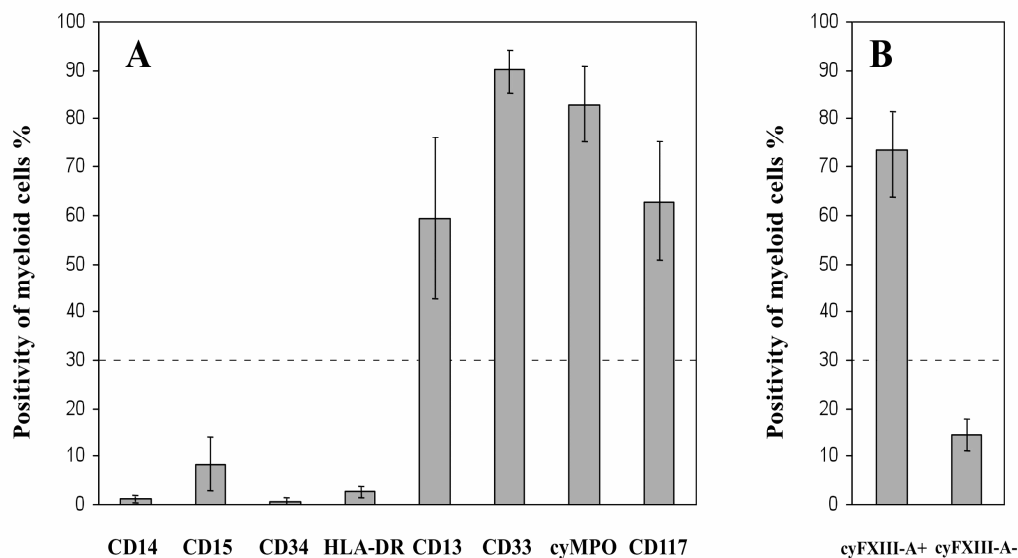


8. ábra. A FXIII-A intracelluláris lokalizációja. A konfokális lézerszenning mikroszkópiával készült képeken a propidium jodiddal (piros) jelölődő sejtmag mellett a FITC-el (zöld) jelölt FXIII-A fehérje látható csontvelői (A) és perifériás vér (D) minta sejteiben. A nagyított (B,E) és a 3D (C,F) képeken a FXIII-A citoplazmatikus elhelyezkedést mutat.

A vizsgált AML M3-as betegek immunfenotípus megoszlása

A klinikai minták esetén 30% volt az a cut-off érték, mely fölött pozitívnak tekintettük a marker expressziót.

Az általunk vizsgált mind a 14 APL-es mintában MPO és CD33 pozitivitást detektáltunk, átlagosan 83%-ban (41%-99%) illetve 90%-ban (74%-99%), míg a CD13 átlagos pozitivitás ennél alacsonyabb, 59% volt. Egy kivétellel a minták CD117 pozitivitást mutattak, az átlag 63% volt (40%-96%). A 14-ből 1 esetben láttunk CD15 expressziót, 13 esetben a CD15 marker hiányzott (átlagos pozitivitás mindössze 8%). Egyik APL-es mintában sem volt kimutatható HLA-DR és CD34 jelölődés (9. ábra A)

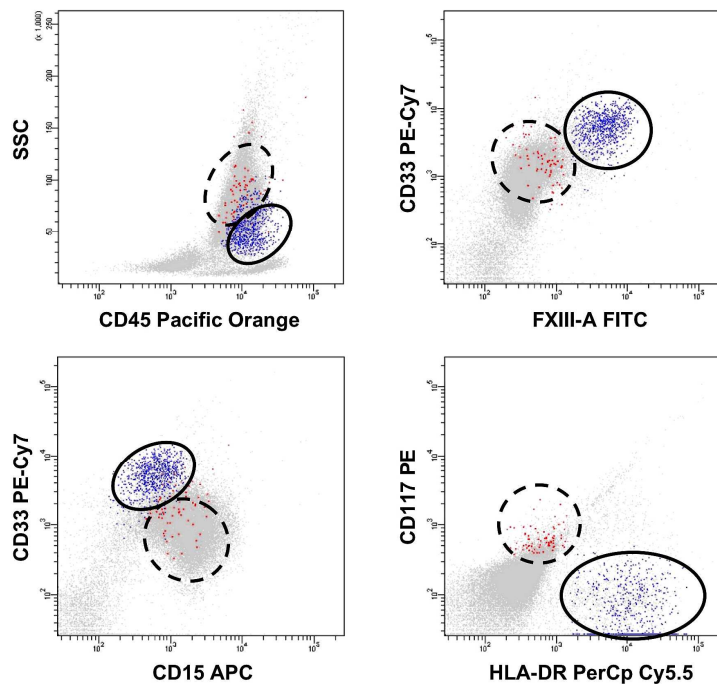


9. ábra. A vizsgált AML M3-as betegek immunfenotípus megoszlása. A leukémiás sejtek CD14, CD15, CD34 és HLA-DR markereket nem expresszálják, de CD13, CD33, CD117 és MPO markerre pozitívak. (A) Az APL-es minták egy részében a FXIII-A pozitívás nagymértékű, a négy FXIII-A negatív mintában jóval cut-off alatti. (B)

A 14 APL-es mintából 10 esetben találtunk FXIII-A pozitívást: az átlag jóval meghaladta a 30%-os határt. A négy negatív mintában nem érte el a cut-off értéket a FXIII-A pozitívás. (9. ábra B)

Normál promyelocyták FXIII-A expressziójának vizsgálata áramlási citométerrel

Normál csontvelő mintákat analizáltunk 7-szín jelöléssel áramlási citométeren. (10. ábra) A folyamatos vonallal körülrajzolt kék pontokkal megjelenített sejtpopulációt monocyták alkotják, melyek CD33, HLA-DR és FXIII-A pozitívást mutatnak. A szaggatott vonallal körülvett piros pontok által reprezentált sejtek normál promyelocyták, melyek CD15, CD33, CD117-dim marker pozitívak és HLA-DR negatívak, vizsgálataink alapján nem expresszálják FXIII-A markert.



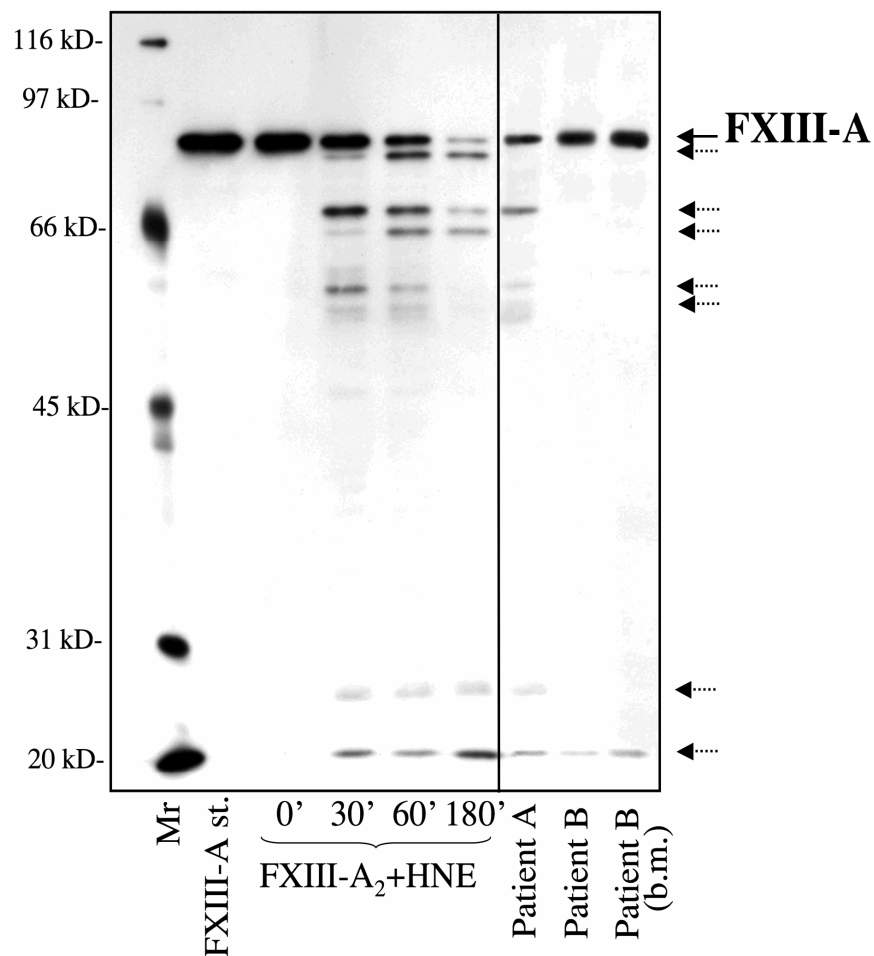
10. ábra. A LAIP jelleg igazolása. Normál csontvelői minta vizsgálata áramlási citométeren 7-színű jelöléssel. A kék színű pontok a FXIII-A, CD33, HLA-DR pozitív monocyták. A piros színnel jelzett sejtek a CD15, CD33, CD17-dim pozitív és HLA-DR negatív promyelocyták, melyek FXIII-A markert sem expresszálnak.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a FXIII-A kizárólag az akut promyelocytá leukémiás kóros sejtekben detektálható, a normál promyelocytákban nem. Az ábrán kizárólag a monocytá (kék) pozitív míg a normál promyelocytá (piros) negatív FXIII-A jelölődésre.

A FXIII-A fehérje megjelenési formáinak és mennyiségének vizsgálata APL-ben

A kóros blast sejtek FXIII-A fehérjéjének vizsgálatára nagy érzékenységgű kemilumineszcens előhívó rendszerrel kombinált Western blot analízist alkalmaztunk. Vizsgáltuk egy beteg csontvelő és egy másik beteg csontvelő és perifériás vérmintáját. Az APL-es betegek blast sejteiből származó FXIII-A pozitív sáv 82 kD-nál detektálható, ott ahol a pozitív kontroll FXIII-A fehérje is fut. A pozitív kontroll egyrészt thrombocytá lizátumból, másrészt 18 ng FXIII-A-t tartalmazó tisztított humán placentából származik (FXIII-A standard). A negatív kontroll izolált humán neutrophil

granulocytá sejtuszuspenzió volt, mely FXIII-A fehérjét nem tartalmazott. Összehasonlítottuk a betegek promyelocytá sejtlyizátumából származó FXIII-A hasítási termékei által adott sávokat a humán neutrophil elasztáz (HNE) által proteolízis útján hasított, tisztított FXIII-A₂-ből származó sávokkal. A Western blot képen a két sáv mintázata nagyfokú egyezést mutatott. A szaggatott nyilak mutatnak a HNE által hasított FXIII-A termékek sávjára. (11. ábra)



11. ábra. FXIII-A fehérje megjelenési formái APL-ben. APL-es betegek (A és B beteg) promyelocytá sejtlyizátumából származó FXIII-A és hasítási termékei által adott sávok és HNE által degradált tisztított FXIII-A₂ által adott sávok összehasonlítása Western blot analízissel. Nyíl: intakt FXIII-A; szaggatott nyíl: hasítási termékek; Mr: molekulásúly marker; FXIII-A st.: 18 ng, placentából származó tisztított FXIII-A standard; b.m.:csontvelő minta.

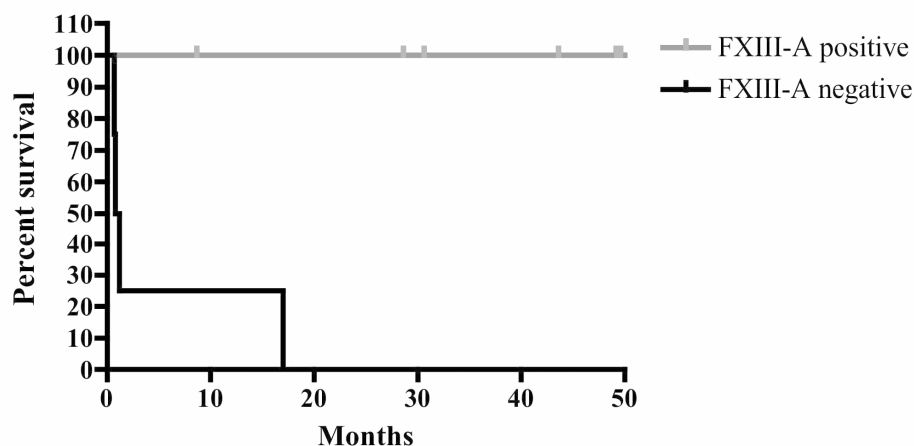
A fenti két beteg minta esetén ELISA módszerrel megmértük a sejtlyizátumokban található FXIII-A antigén mennyiségét. A minták több, mint 90% promyelocytát

tartalmaztak és a diagnózis felállításakor sem áramlási citométerrel sem hematológiai analízátorral monocyta sejteket kimutatni nem tudtunk. Így kizárható, hogy a FXIII-A monocyta eredetű lenne.

A két mintában az alábbi értékeket mértük: 29 és 80 fg/sejt. A promyelocyta leukémiás esetekben hasonló antigén mennyiséget mértünk, mint amit korábban thrombocytákban meghatároztak intézetünk munkatársai: 60 ± 10 fg/thrombocyta. [34] Ezek az eredmények az áramlási citometriával kapott átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékekkel is korrelálnak.

Az akut promyelocyta leukémiás betegek túlélésének vizsgálata a FXIII-A expresszió tükrében

Az általunk vizsgált APL-es betegek száma 14 volt. Közülük 10 esetén találtunk FXIII-A expressziót a kóros promyelocytákban, 4 beteg FXIII-A negatív volt. A betegek túlélési idejét követve azt láttuk, hogy szignifikáns különbség van a két betegcsoport között ($p < 0.0001$, logrank próbával). A FXIII-A negatív esetek kezelésre nem reagáltak vagy relapszus alakult ki. Az átlagos túlélés mindössze 1 hónap volt. A FXIII-A pozitív betegek a mai napig élnek. (12. ábra)



12. ábra. A FXIII-A pozitív és FXIII-A negatív APL betegek túlélése.

MEGBESZÉLÉS

A leukémiák diagnosztikájában minőségi ugrást jelentett az áramlási citometria alkalmazása, mely ma már alapvető módszer a különböző leukémia típusok meghatározásában. A vizsgálat során a sejtek immunfenotípusát analizáljuk, ami a különböző sejtfelszíni és intracelluláris markerek detektálását jelenti. A korábban alkalmazott morfológiai és citokémiai eljárások során jóval kevesebb -maximum néhány száz- sejt került vizsgálatra és az értékelés is szubjektív volt. Az áramlási citométerrel de novo leukémiáknál általában 10-50 ezer, de követéses vizsgálatoknál több százezer sejt analízisére kerül sor, kezeléseket után a reziduális sejtek keresésekor.

[52] A leukémiák immunfenotípus vizsgálatokor a multikolor analízis alkalmazása az általános módszer. A kezdetben egy vagy két színnel történő jelölést később a 3-majd 4-színű jelölés követte, a diagnosztikában ma már a 6-10-színű jelölést is rutin módszerként alkalmazzák. A leukémia diagnosztikában egyik cél a sejtvonallal meghatározása. [53,54,76] Ez a sejtfelszíni markerek mellett elsősorban az intracitoplazmatikus markerek detektálásával lehetséges (cyCD3 - T-sejt, cy79 α - B-sejt, MPO - myeloid sejtek). Az intracitoplazmatikus markerek a sejtek érettségi fokáról is információt adnak. A markerek analízise során vizsgáljuk, hogy a látott expressziós mintázat kizárólag a kóros, leukémiás esetekre jellemző-e. Amennyiben igen, akkor leukémia-asszociált immunfenotípusról (LAIP) beszélünk. [55,56]

Az akut leukémiák közül az akut lymphoid leukémia (ALL) került elsőként áramlási citometriás vizsgálat tárgyává. [57] Az ALL-ek zömmel B-sejt típusúak, melyek az alábbi alcsoportokra oszthatók: pro-B sejtes, common ALL (cALL), (late) pre-B sejtes és érett B sejtes ALL. Immunfenotípus vizsgálatokkal a fenti szubtypusok beazonosíthatók, de gyakoriak az olyan marker kombinációk, amelyben myeloid antigéneket detektálunk (CD13, CD33). Elsőként intézetünk munkatársai azonosítottak olyan prekursor B-sejtes ALL eseteket, melyekben az intracelluláris FXIII-A marker detektálható. [58] Bizonyították, hogy éretlen és érett normál B-sejtek sem expresszálják, de a B-ALL esetek 40%-ban megjelenik. Leukémia-asszociált immunfenotípusról van szó, melynek lehetséges prognosztikai jelentőségét jelenleg is vizsgálják.

Az akut myeloid leukémiák immunfenotípus vizsgálatokor a myeloid sejtvonallal azonosítása intracitoplazmatikus MPO markerrel történik. Az MPO a különböző

myeloid eredetű sejtekben eltérő intenzitással van jelen. A polimorfonukleáris sejtekben intenzívebb, a monocytákban/monoblastokban gyengébb a jelölődés. A sejtvonal meghatározását követően vizsgáljuk azokat a további intracitoplazmatikus és sejtfelszíni markereket, amelyek detektálásával következtethetünk a sejtek érettségi fokára (blast markerek, kizárólag érett sejtekre jellemző markerek), és amelyek vizsgálatával az AML szubtípusai meghatározhatók.

A FAB (Franch-American-British) klasszifikáció szerinti szubtípusba történő besorolás alapját morfológiai jellemzők és citokémiai reakciók adták. Ez alapján az alábbi AML alcsoportok léteznek: M0-M4, M5a, M5b, M6-7. (M0: össejtes M1: differenciáció nélküli, M2: differenciálódást mutató, M3: akut promyelocytás leukémia, M4: akut myelomonocytás, M5a, b: akut monoblastos, monocytás, M6: erythroleukaemia M7: megakaryocytás leukémia.)

A különböző szubtípusokba sorolásnak azért van jelentősége, mert a prognózis nem egyforma és a kezelés is eltérő lehet az egyes alcsoportokban. Az immunfenotípus vizsgálatokkal a sejtek marker expressziója detektálható, az így kapott marker expressziós mintázatok alapján megtörténik a szubtípusba való besorolás.

Az éretlen, differenciálódás jeleit nem vagy csak kismértékben mutató sejteken blast markerek detektálhatók. A CD34 és CD117 blast marker különböző mértékű expressziót mutathat az alcsoportokban. A CD117 különösen alkalmas a CD13/CD33 negatív aberráns immunfenotípusú myeloblastok esetén a myeloid sejtvonal azonosítására. A myeloblastok zömmel CD13, CD33 és HLA-DR marker pozitívak. Az érettebb sejteken megjelenik a CD15 granulocytá marker.

Az egyéb markerek vizsgálata alapján a monoblast eredetű sejtek azonosíthatók. A sejtfelszíni CD14 kizárólag a monoblastokon/monocytákon expresszálódik.

Az akut promyelocytás leukémia immunfenotípus vizsgálatával történő azonosítása elsősorban egyes myeloid és blast markerek hiányán alapul: CD34, CD15, HLA-DR negatívítás. Az MPO, CD13, CD33 és CD117 expresszió továbbra is detektálható.

Az erythroleukémia és megakaryocytás leukémia ritka alcsoport, ezek a glycophorin-A és a CD41, CD42a megakaryocytá/thrombocytá markerekkel azonosíthatók.

A WHO 2001-ben majd módosítva 2008-ban kiadott dokumentuma szerint az AML klasszifikációja genetika eltéréseken alapul. [59] A 2001-es WHO klasszifikáció szerint az AML 50-60%-a a másképp nem specifikálható ún. AML-NOS (NOS = not otherwise

specified) kategóriába tartozott. Ezekben az esetekben normál karyotípust találtak. A 2008-as klasszifikációban a citogenetikai eltéréseken alapuló kategóriában szerepel három új kromoszóma eltérés: t(6;9), inv(3), t(1;22). Mindhárom eltérés ritkán előforduló forma, mégis fontos az azonosításuk, mert allogén őssejt transzplantáció nélkül a túlélési idő általában rövid. Felállítottak ezen kívül két új ideiglenesen kialakított alcsoportot: AML *NPM1* (nucleophosmin) és AML *CEBPA* (CCAT/enhancer kötő alfa protein) mutációval. Mindkettő zömmel normál karyotípussal jár.

Az *NPM1* egy, több funkcióval rendelkező nukleoláris fehérjét kódoló esszenciális gén. A fehérje tumor szupresszor proteint stabilizál, riboszóma kialakulását és centrosoma duplikációt szabályoz. Az *NPM1* mutációja és a nucleophosmin aberráns megjelenése a citoplazmában a sejt leukémiás transzformációjához vezet. A blast sejtek myelomonocytá vagy monocytá jellemzőket mutatnak, hiányzó CD34 expresszióval. Hetven év fölötti AML-es betegekben fontos kedvező prognosztikai faktornak tekinthető.

A *CEBPA* gén egy transzkripciós faktort kódol, mely a hematopoietikus sejtek sejtvonalléköteleződését és megújulását szabályozza. Mutációja sejtosztódást indukál és gátolja a granulocytá irányú érést. A leukémiás sejtek monocytá vagy monoblast jellegűek, HLA-DR, CD34, CD7 expresszióval. A mutáció kedvező prognózist jelent. [75]

Az AML-NOS csoportba tartozó esetek száma így kb. 30%-ra csökkent, ami azonban így is igen jelentős arány. A NOS kategóriában továbbra is a FAB klasszifikációhoz hasonló a beosztás.

Annak ellenére, hogy az AML klasszifikáció alapját a genetikai eltérések adják, a morfológiai vizsgálat és az immunfenotipizálás maradt az elsővonalbeli vizsgálati módszer. Az ilyen módon, rövid időn belül elkészült eredmények alapján célzott módon kereshető a genetikai eltérés. [76]

Az AML diagnosztika során a marker expressziós mintázat alapján megállapítható, melyik alcsoportba tartozik a vizsgált leukémia. A sejt felszíni és intracitoplazmatikus markerek megjelenése időbeni eltérést mutat. Az intracitoplazmatikus markerek a sejt érési folyamatának korábbi szakaszában jelenik meg, mint általában a sejt felszíni markerek. A citoplazmatikus markerekkel többnyire akkor is azonosítható a sejt vonal, ha a sejt felszínén még nem expresszálódnak jellegzetes antigének.

Az immunfenotípus vizsgálatok során sokszor differenciál diagnosztikai problémát jelent a szubtípusba történő besorolás. Az M3 promyelocytás leukémia esetén a markerek hiányára alapozott diagnózis, az M4-M5 esetekben a monoblast eredet igazolása vagy kizárása és elkülönítése az M0-M2 típusoktól jelenthet nehézséget. A leukémiás blastok myeloid eredetét alátámasztó MPO pozitivitás mellett az M0-M2 és M4-M5 leukémiákat elkülönítheti a CD14 monocyta marker expressziója. A CD14 sejtfelszínen expresszálódik, így az érés során később jelenik meg a sejteken. Korábban már ismert volt, hogy a monocyta sejtvonal sejtjei FXIII-A fehérjét tartalmaznak. Az a feltevés, hogy a malignusan transzformálódott monoblastokban/monocytákban is kimutatható a FXIII-A, beigazolódott: immunmorfológiai módszerrel kimutatták a FXIII-A-t ezekben a sejtekben. [51]

Munkám során elsőként vizsgáltuk áramlási citométerrel a FXIII-A jelenlétét AML-es csontvelő és perifériás vér mintákon.

Megállapítottuk, hogy a korábbi leírásoknak megfelelően a FXIII alegységei közül kizárólag az A alegység található meg a perifériás vér és csontvelői sejteken, a FXIII-B nem expresszálódik. FXIII-A pozitivitást csak a sejtek permeabilizálása után észleltünk, tehát az elhelyezkedés intracelluláris, a sejtek felszínén nem található meg ezen antigén. A sejtek közül a MPO-dim pozitív és CD14 monocyta marker koexpressziót mutató monocyták esetén detektáltuk kizárólag a FXIII-A markert, granulocytákon nem. Csontvelő mintában a CD45-bright monocytákon és CD45-dim monoblastokon is pozitivitást láttunk. Az eredményeink azt jelentik, hogy a FXIII-A ideális marker a granulocyta és monocyta sejt típusok elkülönítésére.

Granulocyta irányú érést és monocyta irányú érést mutató sejtvonalakon vizsgáltuk a FXIII-A időbeni megjelenését. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a granulocyta érési folyamat során az érés egyik szakaszában sem jelenik meg a FXIII-A. A monocyta érés vizsgálata folyamán viszont azt tapasztaltuk, hogy a FXIII-A a kezdetektől kimutatható erős intenzitással, míg a CD14 sejtfelszíni marker csak az érés későbbi szakaszában detektálható. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a FXIII-A igen korai markere a monocyta sejtvonalnak, akkor is igazolható a monocyta eredet, ha a CD14 marker még nem expresszálódik a sejtek felszínén.

Az eredményeink tükrében vizsgáltuk AML-es mintákon a FXIII-A pozitivitást áramlási citométerrel. Az M0, M1, M2, M3, M6 szubtípusokban két kivétellel nem

találtunk pozitivitást. Az M4 és M5 AML esetekben a FXIII-A jelölődés megegyezett vagy nagyobb mértékű volt, mint a CD14 felszíni marker pozitivitás. Sok esetben jelentős különbség volt a két marker százalékos pozitivitása között: sokkal több sejt mutatott FXIII-A, mint CD14 jelölődést. Az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) adatokból az is megállapítható, hogy a FXIII-A más intracitoplazmatikus markertől abban is különbözik, hogy a malignus sejtekben nagyobb intenzitással van jelen, mint a normál sejtpopulációban. AML M4, M5 esetekkel párhuzamosan CMMoL-ás betegek mintáit is vizsgálatuk, amelyekben a FXIII-A MFI értékei szintén szignifikánsan magasabbak voltak, mint a normál monocytákban.

Az eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a FXIII-A intracitoplazmatikus marker szenzitívebb, mint a felszíni CD14. Így az AML M4 vagy M5 leukémia esetén akkor is azonosíthatók a monocyta sejtvonallhoz tartozó sejtek, amikor azok a CD14 monocyta markert még nem expresszálják.

Az AML M7 altípus klasszifikációjában szintén hasznos marker a FXIII-A, hiszen a thrombocyta/megakaryocyta sejtvonall sejtjeiben kimutatták a jelenlétét korábban és a vizsgálataink alapján is igen erős FXIII-A fluoreszcencia detektálható a kóros megakaryocyta sejtvonall sejtjeiben.

Az AML esetén számos esetben megfigyelhető szokatlan marker expressziós kép. A szokatlan marker mintázatnak, a leukémia-asszociált immunfenotípusnak (LAIP) különösen a kezelést követő minimális reziduális betegség keresésekor van igen nagy jelentősége, hiszen a diagnóziskor talált kóros sejtpopuláció detektálására így lesz mód a beteg későbbi mintáiból. A LAIP alapján tudjuk megkülönböztetni a leukémiás blastokat a normál hemopoietikus progenitor sejtektől. [77]

Az aberráns fenotípusnak több megnyilvánulási formája létezik: bilinearitás, cross-lineage antigén expresszió, antigén overexpresszió, aszinkron antigén expresszió, aberráns fényszórási kép. [60]

A bilineáris akut leukémiákban két blast populáció található két különböző sejtvonall-marker expresszióval. Ritkán három sejtvonall-antigénjei is expresszálódhatnak.

Az ún. cross-lineage antigén expresszió során a sejtek a sejtvonallra jellemző specifikus markerek mellett attól eltérő, más sejtvonallnak megfelelő differenciálódási antigéneket is expresszálnak, pl. myeloblastok CD7, CD5, CD2 (T-lymphocyta marker)

pozitivitással. [61] Egy vagy két cross-lineage marker megjelenése azonban nem elég a bifenotípusos akut leukémia diagnózishoz.

A bifenotípusos akut leukémiák (BAL) esetén a sejtvonal egyértelműen nem állapítható meg, mert több olyan antigén expresszió detektálható, melyek egynél több sejtvonalra jellemző. Az EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) egy pontrendszer alkalmazását ajánlja, melyben 0,5, 1 vagy két pontot érő markerek megjelenése alapján, 2 vagy több pont elérésekor mondható ki a bifenotípusos akut leukémia diagnózis [62]. Az esetek egy részében a pontrendszer nem volt alkalmazható. A WHO 2008-as ajánlásában a BAL elnevezést felváltotta a kevert-fenotípusú akut leukémia (MPAL=mixed-phenotype acute leukemia) terminus.

A bifenotípusos leukémia prognózisa kedvezőtlennek tűnik, különösen felnőtt korban, pl. a t(4;11) vagy Philadelphia kromoszóma pozitivitás esetén. [63, 68]

Az aszinkron antigén expresszió a kóros sejteken a különböző érési stádiumoknak megfelelő markerek együttes megjelenését jelenti, pl. CD34+/CD11b+, CD117+/CD15+, CD13-/CD15+.

Az antigén overexpresszió során a normál myeloid sejteken is megjelenő markerek kórosan nagymértékű expressziója figyelhető meg, pl. CD13, CD33, CD15 vagy CD14 AML-ek esetén. Az AML-ek nagy részében tehát az aberráns fenotípus felismerése igen hasznos az MRD keresésében.

Akut lymphoid leukémia (ALL) esetén hasonló jelentőséggel bír az aberráns fenotípus felismerése. Az akut myeloid leukémiákban általunk vizsgált FXIII-A markert intézetünk munkatársai is azonosították prekursor B-sejtes ALL esetekben. Elsőként bizonyították, hogy leukémia-asszociált immunfenotípusról van szó, mely igen hasznos MRD keresésekor.

A LAIP jelentősége az AML-ek prognosztikájával kapcsolatban is felmerült. Bár a prognosztika szempontjából a citogenetikai eltérés a leginkább elfogadott független rizikófaktor, ismert, hogy az AML-ek kb. felében nincs kromoszóma eltérés. Számos retrospektív analízis készült, melyben több száz AML-es beteg marker expressziós képét vetették össze a terápiára adott válasszal, a komplett remisszió és relapszus arányával. Az eredmények változatosak. A tanulmányok egy részében nem találtak szignifikáns összefüggést az immunfenotípus és a túlélés között, más esetekben kedvezőtlennek bizonyult pl. a TdT, CD7, CD9, CD13, CD34 vagy a CD56 pozitivitás.

A tanulmányok másik részében kedvező összefüggést mutattak a CD7 vagy (APL kivételével) a CD56 pozitivitás esetén. [64,65] Az analízisek többsége megállapította, hogy a CD34+/HLA-DR+ betegek esélye a komplett remisszióra kisebb, mint ha a CD34 vagy HLA-DR vagy mindkettő negatív, különösen, ha előrehaladott az életkor és hiányoznak a kedvező citogenetikai eltérések. Összefüggést a myeloid markerek (CD13, CD33, CD117) és a prognózis között legtöbb esetben nem találtak. [66]

A felnőttkori AML-ek többsége még ma is viszonylag kedvezőtlen kimenetelű, az átlagos túlélés mindössze az esetek 24,5%-ban éri el az 5 évet (www.seer.cancer.gov). Mivel az esetek felében nincs citogenetikai eltérés, egyéb alternatív prognosztikai faktorok kutatása is előtérbe került. Többek között kemoterápia rezisztenciát okozó két transzmembrán fehérje: a P-glikoprotein és az FLT3 tirozin kináz. A kemoterápia hatástalansága szignifikánsan rövidebb túlélést, rossz prognózist jelent. [67]

A munkánk során vizsgált FXIII-A pozitív AML-es eseteink között kettő volt, melyeket az M4, M5 és M7 szubtypusok közül egyikbe sem tudunk besorolni az immunfenotípus eredmények alapján. Az egyik M0, a másik M3 típusú leukémiának bizonyult. Az M0 leukémia esetén nem túl meglepő a FXIII-A pozitivitás, mert kóros, differenciálatlan blastok sok esetben myeloid, B-sejt vagy T-sejt markereket együttesen is expresszálhatnak. Az M3, akut promyelocytás leukémia esetén szokatlan volt az eredményül kapott FXIII-A pozitivitás, így további APL-es betegmintákat vizsgáltunk meg.

14 de novo APL-es beteg közül 10 beteg mintáinak áramlási citometriás vizsgálata során mutattuk ki a FXIII-A antigént a leukémiás promyelocyta sejtekben. A leukémiás sejtek immunfenotípusa a jellegzetes, marker hiányon alapuló képet mutatta: CD34-/CD15- és HLA-DR negativitás. A CD45-dim sejtek intenzív autofluoreszcenciát, MPO, CD33 és CD117-dim pozitivitást mutattak. A konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálataink is alátámasztották a FXIII-A jelenlétét a sejtekben. A sejten belül intracitoplazmatikus lokalizációt detektáltunk.

A különböző sejtek FXIII-A fehérje tartalma eltérő. A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a FXIII-A pozitív kóros promyelocyta sejtekben a fehérje tartalom nagy mennyiségű, a thrombocyta FXIII-A tartalmához hasonló és 10x több, mint pl. leukémiás lymphoblastokban.

Az A alegység sejten belüli struktúráját vizsgálták thrombocytákban és kimutatták, hogy A₂ dimer formában található meg. Feltételezhető, hogy más sejt típusokban is ebben a formában van jelen.

A FXIII aktivációjának folyamata a plazma és celluláris FXIII esetén különbözik. A plazmában thrombin és Ca²⁺ hatására proteolitikus úton lehasad az aktivációs peptid és kialakul a FXIIIa forma. A celluláris aktiváció sokkal lassúbb folyamat, nem szükséges proteolízis, a Ca²⁺ hatására alakul ki az aktív forma. [45]

Az inaktiváció során nem ismertünk olyan mechanizmust, amely szabályozná a folyamatot. Munkatársaink nemrég bizonyították, hogy a humán neutrophil elasztáz (HNE) szerepet játszik az inaktivációban. [69,70]

Az APL-es mintáinkban Western blot analízissel vizsgáltuk a FXIII-A fehérje megjelenési formáit. A Western blot képen a betegek promyelocytá sejtlyúzátumából származó, FXIII-A-nak megfelelő sávot detektáltunk 82 kD-nál, valamint több, kisebb tömegű fehérjének megfelelő sávot. Összehasonlítva a hasítási termékek által adott sávokat a HNE által proteolízis útján hasított, tisztított FXIII_{A2}-ből származó sávokkal, egyező mintázatot kaptunk. Így arra következtettünk, hogy az APL-es mintákban talált FXIII-A-ból származó kisebb tömegű fehérje molekulák a HNE által végzett intracelluláris proteolízis következtében jönnek létre. A betegek kezelését követő sejtlyúzis FXIII-A felszabadulással jár, az így létrejövő FXIII-A aktivitás nagymértékben függhet a HNE általi degradáció mértékétől.

Azok a vizsgálatok, melyeket sejtvonalakon végeztünk, azt bizonyítják, hogy a myeloblast eredetű sejtek az érés egyik stádiumában sem expresszálnak FXIII-A antigént. A normál promyelocytákat vizsgálva is azt tapasztaltuk, hogy FXIII-A nem detektálható a sejtekben. Mindebből megállapíthatjuk, hogy a leukémiás promyelocytákban expresszáldó FXIII-A leukémia-asszociált immunfenotípust jelent.

Az APL a 2008-as WHO klasszifikáció alapján önálló entitás a jellegzetes t(15;17) transzlokációval. Az APL sejtek eredete nem teljesen tisztázott. Korábban detektáltak monocytákon is megjelenő markereket a sejteken, pl. CD9 vagy CD68 markert, de CD14 markert nem. [71-73] A csak APL-ben pozitív markerek megtalálása azért lenne jelentős, mert jelenleg az immunfenotípus vizsgálatok eredménye marker negativitásokon alapul, nem pedig jól meghatározott, pozitív markerek detektálásán. Az általunk vizsgált viszonylag alacsony betegszám miatt nem ítélnénk meg, hogy vajon

létezik-e kapcsolat a FXIII-A expresszió és az APL-ben sokszor kialakuló disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC) és vérzéses folyamatok között. A vérzés többféle ok következménye, az egyik az elasztáz enzim [74]. A súlyos vérzéses folyamathoz sok esetben hozzájárul a betegek kifejezett thrombocytopeniája.

A betegeink állapotát követve megfigyeltük, hogy azoknál, akik nem reagáltak a kezelésre vagy relapszus alakult ki, a FXIII-A markert nem detektáltuk. Esetükben az átlagos túlélési idő 1 hónap volt. A FXIII-A markert expresszáló betegek pedig a mai napig életben vannak.

Eredményeink szerint az AML differenciál diagnosztikai problémák megoldásában és MRD keresése esetén is rendkívül hasznosnak bizonyul a FXIII-A marker vizsgálata. AML M3 esetén pedig a FXIII-A marker leukémia-asszociált immunfenotípust jelent, ami a prognózissal is összefüggést mutathat.

ÖSSZEFOGLALÁS

A véralvadás XIII-as faktora egy protranszglutamináz, melynek aktív formája a véralvadás utolsó fázisában kialakuló fibrinhálót stabilizálja. A vérplazmában heterotetramer (A₂B₂) formában kering, a sejtekben két A alegységből álló homodimerként (A₂) van jelen.

A csontvelői és perifériás vér sejtek közül a megakaryocyt/thrombocyt és monocyt/macrophag rendszer sejtjeiben található meg a FXIII-A, valamint ezen sejtvonalakhoz tartozó sejtek malignusan transzformálódott alakjai is expresszálják.

A véralvadás XIII-as faktorának megjelenését vizsgáltuk akut myeloid leukémiás sejtekben. Az alábbiakban összefoglalom azokat a megállapításokat és következtetéseket, melyek a munkám során kapott eredményeken alapulnak.

- A FXIII A és B alegységei ellenes, fluoreszcens festékekkel jelölt monoklonális antitestek és áramlási citométer alkalmazásával megállapítottuk, hogy normál perifériás vér és csontvelő mintában a FXIII alegységei közül kizárólag az A alegység van jelen, ami intracellulárisan található meg a monocyt sejtvonall sejtjeiben.
- Sejtvonalat vizsgálva azt találtuk, hogy a granulocyt irányú érés során egyik fázisban sem detektelhető FXIII, a monocyt irányú érés során a kezdetektől kimutatható a FXIII-A, a CD14 később detektálható a sejt felszínen. Az érés során a sejtekre jellemző antigének közül az intracelluláris markerek hamarabb expresszálódnak, mint a sejt felszíni markerek.
- Akut myeloid leukémiás minták esetén az M4 (myelomonocytás) és M5 monoblastos/monocytás) altípusokban a FXIII-A alapján akkor is azonosíthatók a monocyt sejtvonallhoz tartozó sejtek, amikor azok felszínükön még nem expresszálják CD14 monocyt markert. Mindez megkönnyíti a differenciáldiagnózist.

- Vizsgálataink során FXIII-A antigént találtunk akut promyelocita leukémiás sejtekben. Sejten belül a citoplazmában helyezkedik el és az intakt fehérjén kívül hasítási termékei is azonosíthatók.
- Normál promyelocytákban FXIII-A nem expresszálódik, így a FXIII-A pozitivitás leukémia-asszociált immunfenotípusnak bizonyult. Az APL diagnosztika immunfenotípus vizsgálattal korábban egyes markerek negativitásán alapult, a FXIII-A új markerként alkalmazható a leukémia differenciáldiagnosztikában.
- A FXIII-A+ APL-es betegek kedvezőbb túlélése kapcsán a FXIII-A prognosztikai jelentősége is felmerül, melynek kutatása jelenleg folyamatban van.

SUMMARY

Factor XIII of blood coagulation is a protransglutaminase, its active form stabilizes the fibrin network in the final phase of blood coagulation. In the peripheral blood it is circulating as a heterotetramer (A_2B_2) while its cellular form is a homodimer (A_2). It is present in the megakaryocytes /platelets and a monocyte/macrophage cell lines and was also detected upon malignant transformation of these cells.

In our studies we investigated the expression of Factor XIII in acute myeloid leukemias. Below is a summary of the conclusions obtained during my studies.

- By using fluorescently labelled monoclonal antibodies to the A and B subunits of FXIII we established by flow cytometry that in normal peripheral blood and bone marrow only the A subunit is present intracellularly in cells of monocytic origin.
- By investigating relevant cell lines we found that during granulocytic differentiation FXIII does not appear at any stage, but is present during monocyte maturation starting from the most immature cells and CD14 appears only in the more mature forms. During maturation intracellular markers appear earlier than surface markers.
- In M4 (myelomonocytic) and M5 (monoblastic and monocytic) AML subtypes, cells belonging to the monocytic lineage could be identified based on their FXIII-A content while the surface CD14 was still negative.
- During our studies we identified FXIII-A antigen in acute promyelocytic leukemia cells. The enzyme was localized in the cytoplasm and beside the intact protein, fragmented forms were identified by Western-blotting.
- FXIII-A was not expressed in normal promyelocytes, thus can be regarded as a leukemia associated immunophenotype. Formally the diagnostics of APL was

based on negativity of certain markers but FXIII-A positivity can be used in the differential diagnostics.

- Based on the limited number of investigated APL cases a favourable survival of FXIII-A positive cases is suggested, that requires further research.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Muszbek L, Laki K. Interaction of thrombin with proteins other than fibrinogen (thrombin susceptible bonds). Activation of factor XIII. In: Machovich R, ed. The thrombin. Pp. 83-102. Boca Raton, FL: CRC Press, 1984.
2. Lóránd L. Activation of blood coagulation factor XIII. *Ann NY Acad Sci* 1986; 485:144-158.
3. Muszbek L, Adany R, Mikkola H. Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996; 33: 357-421.
4. Muszbek L, Bagoly Z, Bereczky Z, Katona E. The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:190-205.
5. Drach D, Drach J, Glassl H, Gattringer C, Huber H. Flow cytometric detection of cytoplasmic antigens in acute leukemias: implications for lineage assignment. *Leuk Res* 1993;17:455-461.
6. Buccheri V, Matutes E, Dyer MJ, Catovsky D. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia* 1993; 7: 919-927.
7. Lanza F, Latorraca A, Moretti S, Castagnari B, Ferrari L, et al. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells. *Cytometry* 1997;30:134-144.
8. Groeneveld K, Te Marvelde JG, Van den Beemd, MW, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia* 1996;10:1383-1389.
9. Jacobberger JW. Flow cytometric analysis of intracellular epitopes. In: NJ Stewart CC, ed. *Immunophenotyping*. Wiley-Liss; 2000.
10. Robbins KC. A study on the conversion of fibrinogen to fibrin. *Am J Physiol* 1944; 142:581-588.
11. Laki K, Lóránd L. On the solubility of fibrin clots. *Science* 1948; 108: 280.

12. Lóránd L. A study on the solubility of fibrin clots in urea. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1948; 1: 192-196.
13. Lóránd L. Fibrin clots. *Nature* 1950;166: 694-695.
14. Loewy AG, Veneziale C, Forman M. Purification of the factor involved in formation of urea-insoluble fibrin. *Biochim Biophys Acta* 1957; 26: 670-671.
15. Loewy AG, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger HL Jr. Fibrinase. I. Purification of substrate and enzyme. *J Biol Chem* 1961; 236: 2625-2633.
16. Loewy AG, Dahlberg A, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger HL Jr. Fibrinase. II. Some physical properties. *J Biol Chem* 1961; 236: 2634-2643.
17. Loewy AG, Dunathan K, Gallant JA, Gardner B. Fibrinase. III. Some enzymatic properties. *J Biol Chem* 1961; 236: 2644-2647.
18. Loewy AG, Gallant JA, Dunathan K. Fibrinase. IV. Effect on fibrin solubility. *J Biol Chem* 1961; 236: 2648-2655.
19. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999; 94: 271-305.
20. Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJM. Human factor XIII: fibrin stabilizing factor, *Prog Hemost Thromb* 1980; 5: 245-290.
21. Miloszewski KJM, Losowsky MS. The half life of factor XIII in vivo. *Br J Haematol* 1978; 38: 267-271.
22. Nagy JA, Henriksson P, McDonagh J. Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* 1986; 68: 1272-1279.
23. Buluk K. [An unknown action of blood platelets; preliminary communication.]. *Pol Tyg Lek (Wars)* 1955; 10: 191.
24. Kiesselbach TH, Wagner RH. Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a fluorescent antibody technique. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 202: 318-328.
25. Muszbek L, Adany R, Szegedi G, Polgár J, Kávai M. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res* 1985; 37: 401-410.
26. Adany R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbek L. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol* 1985; 38: 171-173.
27. Henriksson P, Becker S, Lynch G, McDonagh J. Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest* 1985; 76: 528-534.

28. Adany R, Kiss A, Muszbek L. Factor XIII: a marker of mono- and megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol* 1987; 67: 167-172.
29. Kappelmayer J, Bacskó G, Kelemen E, Adany R. Onset and distribution of factor XIII containing cells in the mesenchyme of chorionic villi during early phase of human placentation. *Placenta* 1994; 15: 613-623.
30. Kappelmayer J, Bacskó G, Birinyi L, Zákány R, Kelemen E et al. Consecutive appearance of coagulation factor XIII subunit A in macrophages, megakaryocytes and liver cells during early phase of human development. *Blood* 1995;86: 2191-2197.
31. Ádány R, Antal M. Three different cell type can synthesize factor XIII subunit A in the human liver. *Thromb Haemost* 1996; 76: 74-79.
32. Rosenthal AK, Masuda I, Gohr CM, Derfus BA, Le M. The transglutaminase, Factor XIII A, is present in articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartilage* 2001; 9: 578-581.
33. Nurminskaya M, Kaartinen MT. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci* 2006;11:1591-1606.
34. Katona E, Ajzner E, Toth K, Kárpáti L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 2001; 258: 127-135.
35. Ádány R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbek L. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol* 1985; 38: 171-173.
36. Ádány R, Bárdos H, Antal M, Módis L, Sárváry A, et al. Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost* 2001; 85: 845-851.
37. Sarvary A, Szucs S, Balogh I, Becsky A, Bardos H et al. Possible role of factor XIII subunit A in Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis. *Cell Immunol* 2004;228:81-90.
38. Törőcsik D, Bárdos H, Nagy L, Ádany R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2132-2139.

39. Zhu Y, O'Neill S, Saklatvala J, Tassi L, Mendelsohn ME. Phosphorilated HSP27 associates with the activation dependent cytoskeleton in human platelets. *Blood* 1994;84: 3715-3723.
40. Zhu Y, Tassi L, Lane W, Mendelsohn ME. Specific binding of the transglutaminase, platelet factor XIII, to HSP27. *J Biol Chem* 1994; 269: 22379-22384.
41. Kappelmayer J, Simon A, Katona E, Szanto A, Nagy L et al. Coagulation factor XIII-A. A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias. *Thromb Haemost* 2005;94:454-459.
42. Ádány R, Nemes Z, Muszbek L. Characterization of factor XIII containing-macrophages in lymph nodes with Hodgkin's disease. *Br J Cancer*. 1987; 55: 421–426.
43. Nemes Z, Thomazy V. Factor XIIIa and the classic histiocytic markers in malignant fibrous histiocytoma: A comparative immunohistochemical study. *Human Pathology* 1998; 19: 822-829.
44. Nemes Z, Thomazy V, Adany R, Muszbek L. Identification of histiocytic reticulum cells by the immunohistochemical demonstration of factor XIII (F-XIIIa) in human lymph nodes. *J Pathol* 1986; 149: 121–132.
45. Nemes Z, Adany R, Thomazy V. Selective visualization of human dendritic reticulum cells in reactive lymphoid follicles by the immunohistochemical demonstration of the subunit A of factor XIII (F-XIIIa). *Virchows Arch Pathol* 1987; 52: 453–466.
46. Invernizzi R, De Fazio P, Iannone AM, Zambelli LM, Rastaldi MP et al. Immunocytochemical detection of factor XIII A-subunit in acute leukemia. *Leuk Res* 1992; 16: 829–836.
47. Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. Human factor XIII from plasma and platelets. *J Biol Chem* 1973;248:1395-1407.
48. McDonagh J, Waggoner WG, Hamilton EG, Hindenbach B, McDonagh RP. Affinity chromatography of human plasma and platelet factor XIII on organomercurial agarose. *Biochim Biophys Acta* 1976;446:345-357.
49. Bohn H, Schwick HG. Isolierung und Charakterisierung eines fibrinstabilisierenden Faktor aus menschlichen Plazenten. *Arz Forschung* 1971;21:1432-1439.

50. Katona É, Haramura G, Kárpáti L, Fachel J, Muszbek L. A simple quick one-step ELISA assay for determination of complex plasma factor XIII (A₂B₂). *Thromb Haemost* 2000;83:268-273.
51. Polgar J, Hidasi V, Muszbek L. Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J* 1990; 267: 557-560.
52. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U et al; Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:1952-1958.
53. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996;10:877-895.
54. Qadir M, Barcos M, Stewart CC, Sait SN, Ford LA et al. Routine immunophenotyping in acute leukemia: Role in lineage assignment and reassignment. *Cytometry* 2006;70:329-334.
55. Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, Falk M, Renziehausen A et al. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *Br J Haematol* 1999;105:241-245.
56. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A* 2004;58:62-71.
57. Chan LC , Pegram SM , Greaves MF. Contribution of immunophenotype to the classification and differential diagnosis of acute leukaemia. *The Lancet* 1985;325: 475 – 479.
58. Kiss F, Hevessy Z, Veszprémi A, Katona É, Vereb G et al. Leukemic lymphoblasts: a novel expression site for coagulation factor XIII subunit A. *Thrombosis and Haemostasis* 2006;96:176-182.
59. Falini B, Tiacci E, Martelli MP, Ascani S, Pileri SA. New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues. *Discov Med* 2010; 10:281-292.

60. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Valverde B et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Haematol* 1995;70:189-194.
61. Del Vecchio L, Finizio O, Pardo C, Pane N, Schianove EM et al. Coordinate expression of T-cell antigens on acute myelogenous leukemia and of myeloid antigens on T-acute lymphoblastic leukemia. Speculation on a highly balanced bilinearity. *Leukemia* 1991;5:815-818.
62. The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukemia. EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) *Leukemia* 1998;12:2038.
63. Legrand O, Perrot JY, Simonin G, Baudard M, Cadiou M et al. Adult biphenotypic acute leukaemia: an entity with poor prognosis which is related to unfavourable cytogenetics and P-glycoprotein over-expression. *Br J Haematol* 1998;100:147-155.
64. Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 2004;28:43-48.
65. Repp R, Schaekel U, Helm G, Thiede C, Soucek S et al. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry Part B* 2003;53B:11-19.
66. Webber BA, Cushing MM, Li Sh. Prognostic significance of flow cytometric immunophenotyping in acute myeloid leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* 2008;1:124-133.
67. Kappelmayer J, Udvardy M, Antal-Szalmás P. PgP and FLT3: Identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia *Current Medicinal Chemistry* 2007;14:519-530.
68. Matutes E, Pickl WF, van't Veer M, Morilla R, Swinsbury J et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. 2011;117:3163-3171.
69. Bagoly Zs, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost* 2007;98:359-367.

70. Bagoly Zs, Fazakas F, Komáromi I, Haramura G, Tóth E et al. Cleavage of factor XIII by human neutrophil elastase results in a novel active truncated form of factor XIII-A subunit. *Thromb Haemost* 2008;99:668-674.
71. De Rossi G, Avvisati G, Coluzzi S, Fenu S, LoCoco F et al. Immunological definition of acute promyelocytic leukemia (FAB M3): a study of 39 cases. *Eur J Haematol* 1990;45:168-171.
72. Erber WN, Asbahr H, Rule SA, Scott CS. Unique immunophenotype of acute promyelocytic leukaemia as defined by CD9 and CD68 antibodies. *Br J Haematol* 1994; 88: 101-104.
73. Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D, Fenu S, Vegna ML et al. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J Haematol* 1998; 102: 1035-1041.
74. Oudijk EJ, Nieuwenhuis HK, Bos R, Fijnheer R. Elastase mediated fibrinolysis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Haemost* 2000; 83: 906-908.
75. Betz BL, Hess JL. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:1427-1433.
76. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:44-54.
77. Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2011;153:421-436.

Iktatószám: DEENKÉTK/253/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Simon Ágnes
Neptun kód: ASA63K
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Simon, Á.**, Bagoly, Z., Hevessy, Z., Csáthy, L., Katona, É., Vereb, G., Ujfalusi, A., Szerafin, L., Muszbek, L., Kappelmayer, J.: Expression of coagulation factor XIII subunit A in acute promyelocytic leukemia.
Cytom. Part B. Clin. Cytom. 82B (4), 209-216, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21019>
IF:2.525 (2011)
2. Kappelmayer, J., **Simon, Á.**, Katona, É., Szántó, A., Nagy, L., Kiss, A., Kiss, C., Muszbek, L.: Coagulation factor XIII-A. A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias.
Thromb. Haemost. 94 (2), 454-459, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH05-03-0206>
IF:3.056



További Közlemények

3. Kiss, F., **Simon, Á.**, Csáthy, L., Hevessy, Z., Katona, É., Kiss, C., Kappelmayer, J.: A coagulation factor becomes useful in the study of acute leukemias: Studies with blood coagulation factor XIII.
Cytometry A. 73A (3), 194-201, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20485>
IF:3.259
4. Jakó, J., Szerafin, L., Nagy, P., **Simon, Á.**, Kappelmayer, J.: Familial Malignant Blood Diseases: Lessons Learned from a 20-year Period.
Leuk. Lymphoma. 45 (1), 109-111, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/1042819031000149359>
IF:1.147
5. Kappelmayer, J., **Simon, Á.**, Kiss, F., Hevessy, Z.: Progress in defining multidrug resistance in leukemia.
Expert Rev. Mol. Diagn. 4 (2), 209-217, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.4.2.209>
6. Szegezdi, É., Kiss, I., **Simon, Á.**, Blaskó, B., Reichert, U., Michel, S., Sándor, M., Fésüs, L., Szondy, Z.: Negative Selection of Thymocytes by Inhibiting Ligation of Retinoic Acid Receptor a Regulates both DNA Binding of nur77 and Synthesis of Bim.
J. Immunol. 170, 3014-3022, 2003.
IF:6.702

Összesített impakt faktor: 16,689

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5,581

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.07.31



Magyar folyóiratokban megjelent közlemények:

- **Simon Á**, Kissné Sziráki V, Sarudi S, Kappelmayer J. Retikulocita meghatározási módszerek összehasonlító elemzése, Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 2:47-52, 2000.
- Méhes L, **Simon Á**, Rejtő L, Kiss A, Reményi Gy, Batár P, Telek B, Udvardy M. CD38 sejtfelszíni marker prognosztikai jelentősége krónikus lymphoid leukémiában. Orvosi Hetilap 31:1531-35, 2003.

Konferencia prezentációk:

	Előadás	Poszter
Nemzetközi	1	2
Hazai	5	6

TÁRGYSZAVAK

XIII-as véralvadási faktor

Akut myeloid leukémia

Áramlási citometria

Immunfenotipizálás

Leukémia-asszociált immunfenotípus

Akut promyelocytás leukémia

KEYWORDS

Coagulation factor XIII

Acute myeloid leukemia

Flow cytometry

Immunophenotyping

Leukemia associated immunophenotype

Acute promyelocytic leukemia

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek Kappelmayer János professzornak a munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati irányítást. Köszönöm korábbi intézetvezetőmnek Muszbek László akadémikusnak, hogy mindig biztosította a kutatási lehetőségeket és hogy kiemelten támogatta az Áramlási Citometriai Részleg munkáját.

Az áramlási citometriai vizsgálatok közvetlen kivitelezésében Kissné Sziráki Valéria és Dr. Csáthy László nyújtott segítséget. Az adatok értékelésében Dr. Hevessy Zsuzsanna docensnek tartozom köszönettel.

A CLSM analízisek kivitelezésében Dr. Vereb Györgynek (Biofizika és Sejtbiológiai Intézet) míg az elasztázos kísérletek elvégzésében Dr. Bagoly Zsuzsának (Klinikai Kutató Központ) tartozok köszönettel.

Hálás vagyok családomnak a megértő támogatásukért.

FÜGGELÉK

A függelék az értekezés témájában megjelent közlemények különnyomatát tartalmazza.

Original Article

Expression of Coagulation Factor XIII Subunit A in Acute Promyelocytic Leukemia

Ágnes Simon,¹ Zsuzsa Bagoly,² Zsuzsanna Hevessy,¹ László Csáthy,¹
Éva Katona,² György Vereb,³ Anikó Ujfalusi,⁴ László Szerafin,⁵ László Muszbek,²
and János Kappelmayer^{1*}

¹Department of Laboratory Medicine, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

²Thrombosis and Haemostasis Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Clinical Research Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

³Department of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

⁴Department of Pediatrics, Clinical Genetics Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

⁵Department of Hematology, Jóna András Teaching Hospital, Nyíregyháza, Hungary

Leukemic cells often express markers, which are not characteristic of their particular cell lineage. In this study, we identified the “A” subunit of coagulation factor XIII (FXIII-A) in leukemic promyelocytes in *de novo* AML M3 cases. The cytoplasmic presence of factor XIII-A has previously been shown only in platelets/megakaryocytes and monocytes/macrophages. Furthermore, more recently we described the presence of FXIII-A in leukemic lymphoblasts.

We studied 14 patients with this rare type of acute leukemia in a period of 4 years and investigated their bone marrow samples by 3-color flow cytometry upon diagnosis, mainly focusing on FXIII-A expression of leukemic cells. We detected FXIII-A also by ELISA, Western-blot, and confocal laser scanning microscopy.

This was a homogenous group of AML M3 patients with translocation t(15;17)(q22;q21) detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). In 10 out of 14 samples, FXIII-A was detectable by flow cytometry and was coexpressed with markers characteristic for leukemic promyelocytes (CD45dim/CD13+/CD33+/CD117+/cyMPO+ and HLA-DR-/CD34-/CD14-/CD15-). Staining for the markers GPIIb and GPIX were negative, and FXIII-A was identified in the cytoplasm of the cells by confocal microscopy in a relatively high quantity, as measured by ELISA. By Western blot analysis we could identify FXIII-A in the native 82 kDa form and in cleaved forms corresponding to cleavage products observed when purified FXIII-A was treated by human neutrophil elastase.

This novel expression site of FXIII-A in AML M3 can be considered as a leukemia associated immunophenotype and may have pathophysiological significance. © 2012 International Clinical Cytometry Society

Key terms: coagulation factor XIII; acute promyelocytic leukemia; flow cytometry

How to cite this article: Simon Á, Bagoly Z, Hevessy Z, Csáthy I, Katona E, Vereb G, Ujfalusi A, Szerafin L, Muszbek L, Kappelmayer J. Expression of coagulation factor XIII subunit A in acute promyelocytic leukemia. *Cytometry Part B* 2012; 00B: 000–000.

Grant sponsor: OTKA; Grant number: K-75199; Grant sponsor: OTKA-NKTH; Grant number: NI-69238; Grant sponsor: The János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences; Grant sponsor: University of Debrecen, MHSC; Grant number Mec-1/2011 and Lajos Szodoray Prize; Grant sponsor: New Hungary Development Plan, co-financed by the European Social Fund; Grant numbers: TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 and TÁMOP 4.2.2./B-10/1-2010-0024.

*Correspondence to: János Kappelmayer, Department of Laboratory Medicine, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei krt 98. H-4032, Debrecen, Hungary.
E-mail: kappelmayer@med.unideb.hu.

Received 9 September 2011; Revision 5 March 2012; Accepted 8 March 2012

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/cyto.b.21019

INTRODUCTION

Factor XIII (FXIII) of blood coagulation, a protransglutaminase, becomes activated by the proteolytic action of thrombin in the presence of calcium. The activated form of the enzyme is responsible for crosslinking fibrin strands, thus stabilizing the clot in the final stage of the coagulation process [1,2]. It is present in two forms in the human body; one of that circulates in the plasma as a heterotetramer comprising of two potentially active A and two carrier/inhibitory B subunits (A₂B₂). The other one is an intracellular homodimer made up by two A subunits (A₂) [3].

Intracellular FXIII-A has first been described in platelets and megakaryocytes [4,5] and later in monocytes and macrophages [6-8]. Platelets contain huge amounts of FXIII-A, 150-fold more per volume than plasma, while FXIII-A concentration in monocytes is at least one magnitude less than that in platelets [9]. It has been demonstrated that normal bone marrow precursor cells of monocytes and megakaryocytes also express FXIII-A [10]. The function of the intracellular enzyme has not yet been elucidated.

We and others have described that FXIII-A was a sensitive intracellular marker for the monocytic and megakaryocytic series and a useful diagnostic tool in AML immunophenotyping [11-13].

Acute Promyelocytic Leukemia (APL) is the M3 type of acute myeloid leukemia characterized by an accumulation of abnormal promyelocytes in the bone marrow, a severe bleeding tendency and the presence of the chromosomal translocation *t*(15;17). The immunophenotype of leukemic promyelocytes has been well characterized over the past and they usually coexpress the myeloperoxidase (MPO), CD9, CD117, CD13, and CD33 markers in the absence of reactivity for HLA-DR, CD34, and CD15 [14-16]. In this study, we investigated only *de novo* APL cases. We wanted to explore the presence of FXIII-A in leukemic promyelocytes. In addition, we did some initial evaluation on FXIII-A expression with survival data. We established, that FXIII-A is not present in normal promyelocytes, but it can be used as a diagnostic marker in APL and its presence may identify a favorable prognostic subgroup within this cytogenetically and morphologically homogenous APL group.

MATERIALS AND METHODS

Patient Specimens

Bone marrow and peripheral blood of 14 newly diagnosed APL patients have been analyzed by three-color flow cytometry and bone marrow samples were anticoagulated with EDTA and heparin. The bone marrow smears contained >70% blast cells. All APL cases were classified as hypergranular form and all were positive for *t*(15;17) observed by FISH. Ten patients were male and 4 were female with a mean age of 48 years; the range was from 25 to 68 years. All cases were studied upon diagnosis before any treatment was initiated.

Flow Cytometry Immunophenotyping Studies

Generation and labeling of mouse monoclonal antibody against FXIII subunits was carried out as previously described [12] utilizing a fluorescein isothiocyanate (FITC) labeling kit (Sigma, St. Louis, MO). The other monoclonal antibodies used in the three-color panels were the following (PE = phycoerythrin, PE/Cy5 [Cyanine5] fluorochrome tandem, PerCP = peridinin chlorophyll protein): CD4-FITC, CD8-PE, CD13-PECy5, CD34-PE, CD34-PerCP, CD19-PECy5, CD14-FITC, CD33-PE, HLA-DR-PerCP, glycophorin-FITC, CD45-PerCP, CD45-FITC, CD15-FITC, CD117-PE, CD135-PE, CD7-FITC (all purchased from Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA) and CD13-FITC, CD41-PE, MPO-PE (all purchased from Dako Glostrup, Denmark), the Intrastain permeabilizing kit was the product of Dako.

Surface staining of whole blood and bone marrow cells were carried out according to standard procedures. Fifty microliters of whole blood or bone marrow sample adjusted to leukocyte count of 10 G/L by phosphate buffered saline (PBS) was incubated by saturating concentrations of directly conjugated antibodies for 15 min at room temperature in the dark with antibodies against different cell surface epitopes. Red cells were lysed by FACS lysing solution (Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA) and samples were washed (300g, 5 min) in PBS and finally resuspended in PBS containing 1% paraformaldehyde (PFA). For intracytoplasmic staining, the procedure described for Intrastain was strictly followed. Surface staining was executed before permeabilization and intracytoplasmic staining. FXIII-A antibody was used at a 2 µg/ml final concentration with appropriately matched isotype control. PFA fixed samples were kept at 4°C for maximum 24 h. Flow cytometric measurement was performed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA) using the same setting for all investigated samples. Data obtained on 10,000 cells in *de novo* leukemias were stored in list-mode data files and analyzed by Cell Quest 3.2 software.

FXIII-A expression was tested on normal bone marrow promyelocytes, therefore four patients with iron deficiency were selected and their samples were stained with FXIII-FITC, CD117-PE, HLA-DR-PerCp-Cy5.5, CD33-PE-Cy7, CD15-APC, CD14-APC-H7, CD45-Pacific Orange combination according to the previously described protocol. Normal samples were measured in a FACSCanto II flow cytometer equipped with three lasers (Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA).

Cytogenetic and FISH Analysis

Conventional cytogenetic analysis was performed on bone marrow samples cultured for 24 h, prepared using standard procedures. For each patient 20 G-banded metaphases were analyzed. The karyotypes were described according to the International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2009). Fluorescence *in situ* hybridization was carried out on cell suspension originated from chromosome preparation

according to the manufacturer's instructions using PMLRARA dual color, single fusion translocation probe (Abbot/Vysis, Downers Grove, IL). Cells were counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). In general, 200 interphase cells were counted in each case. The images were captured by Zeiss Axioplan2 (Carl Zeiss, Jena, Germany) fluorescence microscope and analyzed by ISIS software (Metasystems, Altlusheim, Germany).

ELISA Assay

Detection of FXIII-A in cell lysates from APL samples was carried out as described earlier, by Katona et al. [9] with slight modification. To avoid platelet contamination, promyelocytic cells were washed three times in PBS containing 20 mM of EDTA at 1,100g for 4 min. To inhibit serine and cysteine proteases a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) was added to the washing buffer. The exact cell count was measured before sonication in order to calculate the amount of FXIII-A/cell. Solubilization of cells was carried out with sonication at 4°C for 3 × 30 s in PBS.

Immunoblotting

After determining the FXIII-A content of platelet-free APL blast cells, remaining cells were centrifuged and dissolved in 100 µL of SDS PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 4.5% mercaptoethanol amine). Denatured cell suspensions were boiled for 5 min. Samples (containing 18 ng FXIII-A/well, adjusted to 60 µL with sample buffer) were loaded onto 7.5% SDS polyacrylamide gel and electrophoresed under reducing conditions. Western blotting was carried out using Immobilon P membrane (Millipore, Bedford, MA). Nonspecific binding of membranes was blocked using Tris-buffered saline (0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; TBS) containing 3% gelatin at room temperature and an overnight incubation at 4°C in the blocking buffer containing 1% of gelatin. Sheep polyclonal anti-human FXIII-A antibody was used as primary antibody (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada). The immunoreaction was developed by biotinylated rabbit anti-sheep IgG and avidin-biotinylated peroxidase complex (components of Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, CA) and visualized by enhanced chemiluminescence (ECL Plus+, Amersham, Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's instructions. Granulocytes and their cell lysates were used as negative controls, not showing any detectable FXIII-A antigen as investigated by flow cytometry, ELISA or Western blot (data not shown).

Samples demonstrating FXIII-A cleavage by human neutrophil elastase (HNE) were processed by incubating 2 µg/mL purified FXIII-A₂ with 2 µg/mL purified HNE in the presence of 2.85 mM Ca²⁺ for various intervals at 37°C. Reaction was stopped by the addition of equal volume of SDS Laemmli buffer. FXIII-A₂ was prepared from human placenta as described previously [17], highly purified HNE (20-22 units/mg) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Platelet-free promyelocyte cell

lysates purified from peripheral blood of two patients and from the bone marrow of Patient B were denatured; SDS-PAGE was carried out in reducing conditions loading equal amounts (18 ng) of purified and cell lysate FXIII-A₂ per lanes.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Cytospin preparations were thawed, fixed in 4% PFA for 10 min and washed three times in PBS. FITC-conjugated anti-FXIII-A monoclonal antibody was dissolved at 15 µg/ml in PBS containing 1 mg/ml BSA (Sigma, Schnelldorf, Germany) and 0.1% Triton X-100 and added to the cells for 30 min at room temperature. During the last 5 min of incubation propidium iodide (PI) was added to the labeling solution at 0.5 µg/ml final concentration. Next, cytopins were washed three times with PBS containing 1 mg/ml BSA and 0.05% Triton X-100. Finally, the samples were washed again in PBS, and mounted in 10 µl Mowiol [0.1M Tris-HCl, pH 8.5, 25 (w/v%) glycerol and 10% Mowiol 4-88, Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany].

For CLSM, a Zeiss (Göttingen, Germany) LSM 510 systems and a CApochromat 63×/1.25 NA water immersion objective were used. Fluorescein was excited with a 488 nm Ar ion laser and detected through a 505-550 nm band pass filter. PI was excited with a 543 nm HeNe laser and detected through a 560 nm long pass filter. Pinholes were set to obtain 1 µm optical slices and 512 × 521 pixel images were taken with pixel times of 6.4 µs, and 2× line-averaging. All images were obtained in multitrack mode to avoid crosstalk between channels.

Statistical Analysis

Statistical comparison of the FXIII positive and FXIII negative population survival was performed by GraphPad Prism 4.0 software.

RESULTS

Analysis of FXIII-A Expression by Flow Cytometry

Leukemic promyelocytes are large cells that possess numerous granules, thus are characterized with a high side-scatter and enhanced autofluorescence. These characteristics were also observed in samples from our patients (data not shown). In the case of these APL samples staining for myeloid markers (MPO, CD13, CD33, CD14, CD15), blast markers (CD34, CD117), HLA-DR, and FXIII-A expressions were studied. The CD45dim MPO+ and CD33+ leukemic promyelocytes expressed cytoplasmic FXIII-A (Fig. 1). In addition, stainings for GPIIb (CD41) and GPIX (CD42a) platelet markers were studied in selected cases and these promyelocytes did not show any CD41 and CD42a positivity (Fig. 2). In clinical samples 30% value was defined for positivity as a cut off for all markers including FXIII-A expression.

All the 14 APL cases were positive for MPO, and CD33, the mean percent positivity were 83% (41-99%)

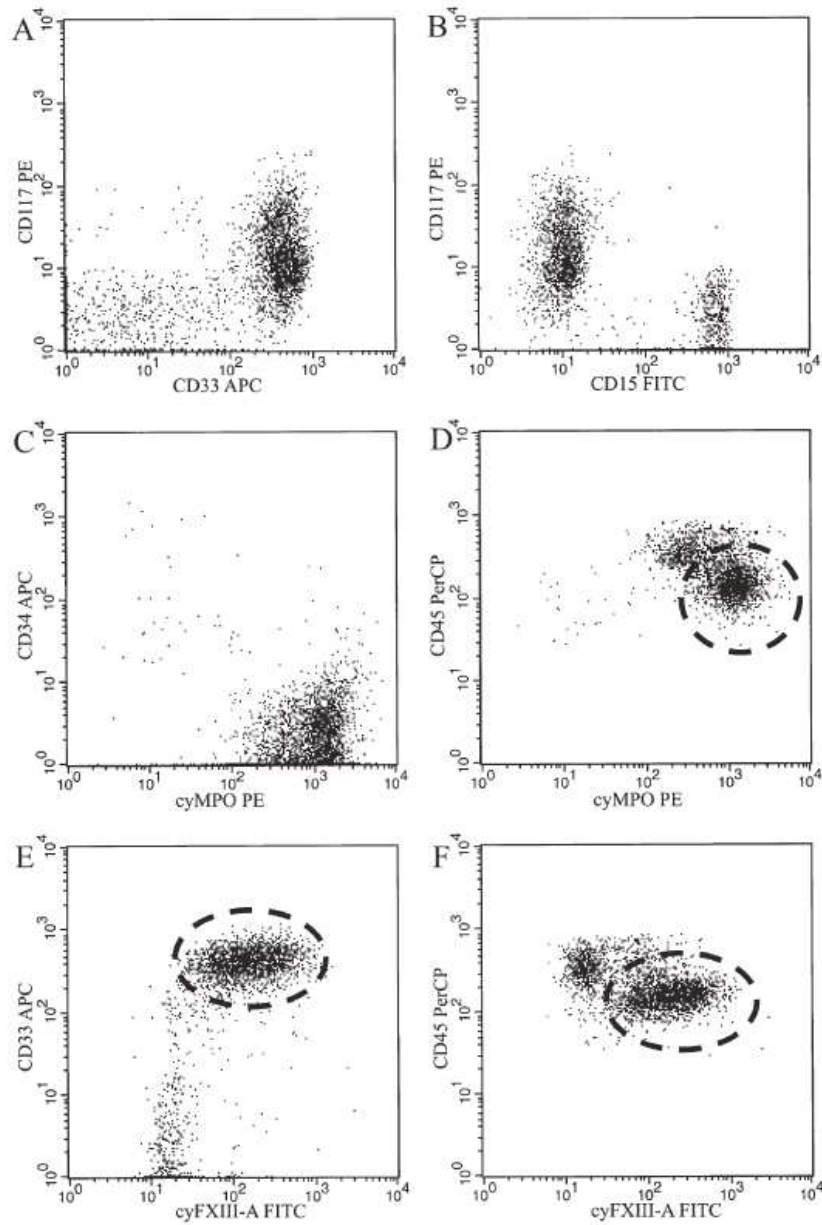


Fig. 1. Representative dot plots of an APL sample. In the peripheral blood sample most cells are abnormal promyelocytes displaying intense CD33 and MPO labeling, CD34 and CD15 negativity and dim CD117 positivity (A-D). The promyelocytes contain FXIII-A (panels E and F). APL samples were labeled by FITC conjugated monoclonal anti FXIII-A antibody.

and 90% (74-99%), respectively while CD13 positivity mean value was somewhat lower (59%). All but one sample were positive for CD117, mean of positivity was 63% (40-96%). One of the 14 APL cases showed expres-

sion of CD15 marker, in 13 cases CD15 was absent (mean: 8%). No APL cases expressed HLA-DR and CD34 (Fig. 3A), but 10 out of the 14 APL cases had FXIII-A staining that exceeded the 30% limit (Fig. 3B).

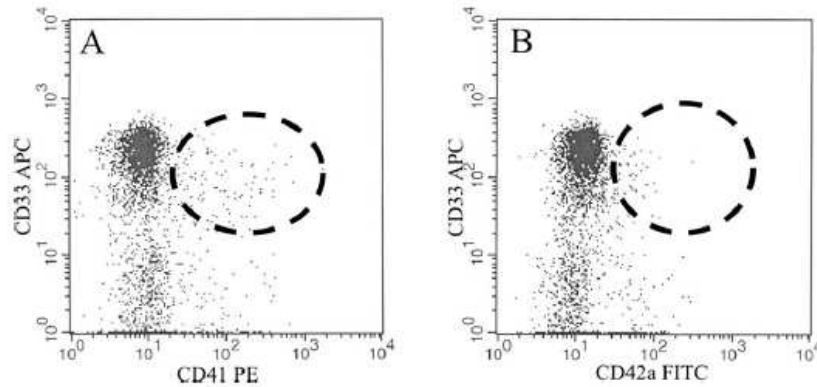


FIG. 2. To rule out potential platelet contamination CD41 and CD42a platelet markers were investigated. In the APL samples the cells show intracytoplasmic FXIII-A positivity, but based on the lack of CD41 and CD42a, the FXIII-A positive signal is not derived from platelet or platelet microparticle contamination (circles with broken line).

Detection of FXIII-A in APL Cells by CLSM

To investigate the intracellular localization of FXIII-A in leukemic promyelocytes, 3 FXIII-A positive APL samples were further analyzed by CLSM. APL cells were analyzed on cytospin preparations (Fig. 4). In leukemic promyelocytes, FXIII-A was detected in the cytoplasm of the cells. On the overview pictures (Figs. 4A and 4D) it is evident that a large proportion of the investigated cells were FXIII-A positive. These samples were negative for the platelet markers GPIIb and GPIX. To rule out technical artifacts, blasts were also investigated in an indirect labeling system with the same polyclonal anti-human FXIII-A as used for immunoblotting. The staining characteristics were similar to that previously observed for leukemic lymphoblasts [18].

Detection of FXIII-A by ELISA and Immunoblotting

Western blot analysis with a highly sensitive chemiluminescent developing system was utilized to detect FXIII-A antigen in blast cells. A single FXIII-A positive band at 82 kDa was detected in APL blasts that comi-

grated with FXIII-A in the positive control (platelet lysate) and with the FXIII-A isolated from human placenta macrophages. The negative control cells—isolated human neutrophil granulocytes—contained no FXIII-A protein (data not shown).

Bands, which represent FXIII-A and cleaved products of FXIII-A in promyelocyte cell lysates of APL patients, are similar to bands that can be detected on the Western blot image of purified FXIII-A₂ proteolytically degraded by HNE (Fig. 5).

These two APL samples were also analyzed by ELISA in order to measure the amount of FXIII-A as an antigen in cell lysates. These samples contained over 90% promyelocytes and no measurable monocytes at diagnosis by both flow cytometry and hematology analyzer, therefore, the possibility that the measured FXIII-A originated from monocytes was excluded. In these selected APL samples the following amounts of FXIII-A were measured: 29 and 80 fg/cell; thus in these cases leukemic promyelocytes contained FXIII-A antigen in amounts similar to that described previously in platelets (mean: 60 ± 10 fg/platelet) [9].

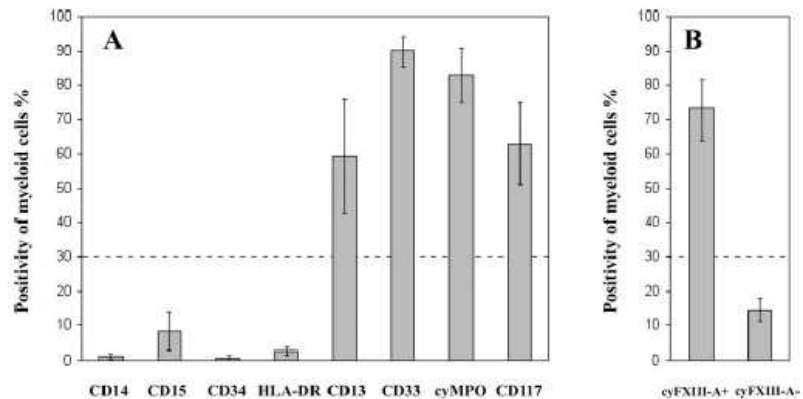


FIG. 3. Expression of surface and intracellular antigens in APL cells. Mean percent positivity and standard errors of means are shown (n = 13, mean values ± standard deviations are displayed). CD14, CD15, CD34, and HLA-DR markers are consistently negative while CD13, CD33, CD117, and cytoplasmic MPO markers are positive (Fig. 3A). FXIII-A was positive in 9 and negative in 4 cases (Fig. 3B).

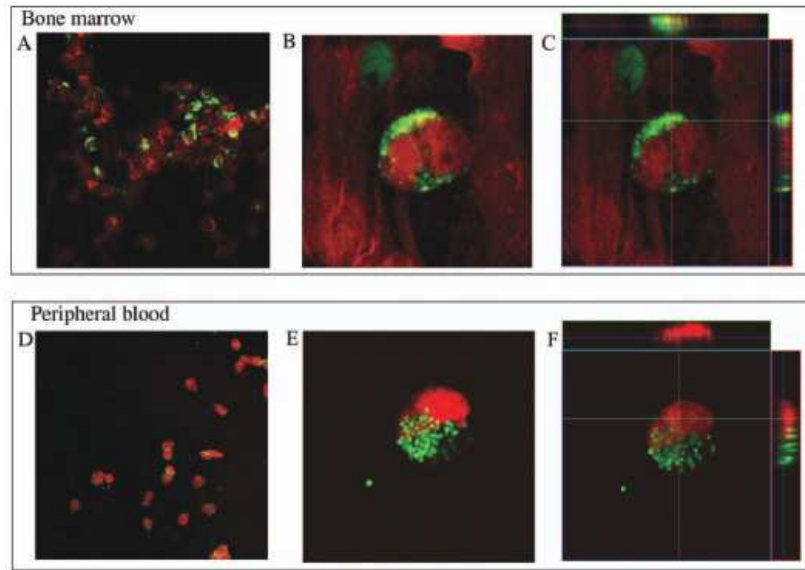


Fig. 4. Detection of FXIII-A protein by CLSM. FXIII-A(FITC) appears in green, nuclei are stained with PI in red. In the bone marrow (A) and peripheral blood sample (D) numerous FXIII-A positive promyelocytes can be seen. The enlarged pictures (B, E) and 3D images (C, F) show cytoplasmic localization of FXIII-A. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://www.wileyonlinelibrary.com).]

These values corresponded to the mean fluorescence intensity values obtained in flow cytometric labeling (data not shown).

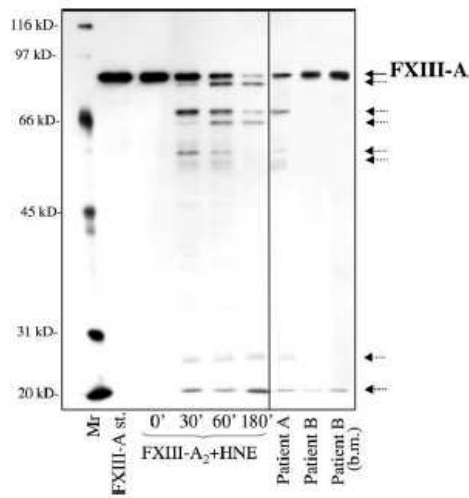


Fig. 5. Western blotting of FXIII-A and FXIII-A cleavage products in promyelocyte cell lysates of AML M3 patients as compared to purified FXIII-A₂ proteolytically degraded by human neutrophil elastase (HNE). Solid arrow indicates intact, uncleaved FXIII-A, dotted arrows indicate FXIII-A split products cleaved by HNE. Mr: molecular weight marker, FXIII-A st.: 18 ng FXIII-A standard purified from placenta, b.m.: sample purified from bone marrow. From "patient A" a bone marrow sample, from "patient B" both peripheral blood and bone marrow samples were analyzed.

Whether normal promyelocytes are a source of cellular FXIII-A was investigated by a seven-color technique using the BD FACS Canto II 3 laser flow cytometer. Three bone marrow samples with no leukemia associated changes were included in this study. Normal promyelocytes were identified by the CD15, CD33, and CD117dim positive staining and HLA-DR negativity. As can be seen compared to normal monocytes these promyelocytes lack FXIII-A expression.

DISCUSSION

The intracellular presence of FXIII-A has been known for more than 50 years in platelets and megakaryocytes [4] and it is also known for decades that monocytes and macrophages express FXIII-A as well [6]. In later studies, this cytoplasmic enzyme proved useful in the identification of leukemic samples and it differentiated myeloblasts from monoblasts and promonocytes [12]. More recently, we have also identified leukemic lymphoblasts as a source of FXIII-A [18]. Whether this marker is a prognostic factor in childhood B-ALL is presently under investigation. In this study FXIII-A was identified in leukemic promyelocytes derived from *de novo* AML M3 cases. The presence of FXIII-A antigen was proved by flow cytometry and confocal microscopy. It was also important to establish the amount of FXIII-A since in our previous studies the FXIII-A content of various cell types was largely different [9,18]. We obtained sufficient cell number from two clinical cases that showed a high FXIII-A content, on average the amount of FXIII-A was in the range of blood platelets and 10-fold higher than that

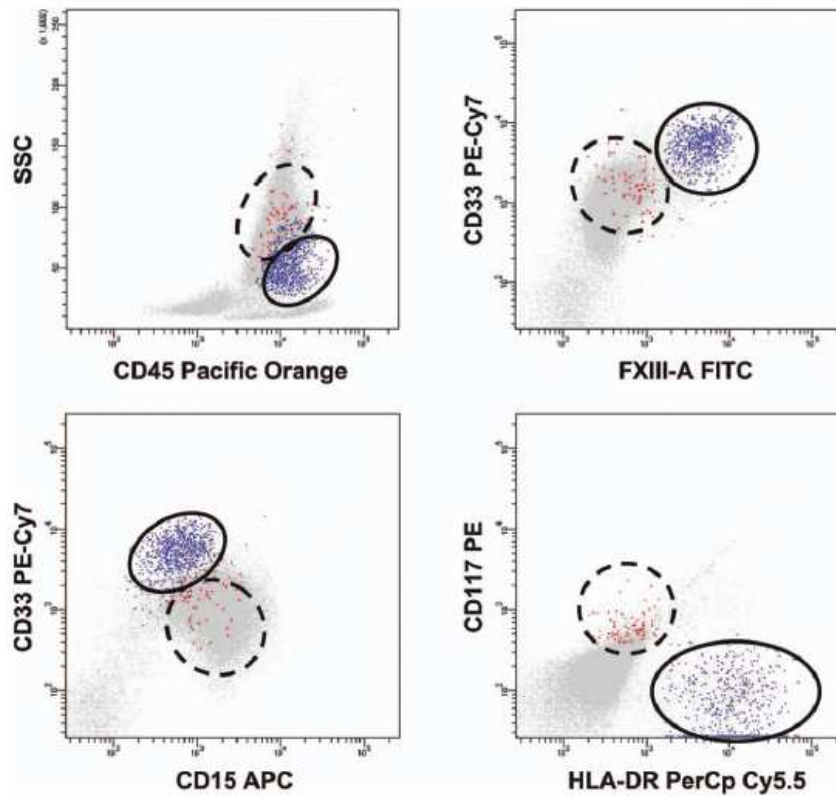


Fig. 6. Representative dot plots from normal bone marrow samples analyzed with a seven-color combination. Blue dots encircled with continuous line show FXIII-A, CD33, HLA-DR expressing monocytes, whereas red dots encircled with dashed line represent CD15, CD33, CD117dim positive, and HLA-DR negative promyelocytes, which lack FXIII-A expression. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

described previously for leukemic lymphoblasts [18]. Although, it should be noted that APL blasts are much larger than platelets thus the intracellular concentration of FXIII-A is considerably lower. The intracellular A subunit structure has long been investigated by gel filtration

and electrophoresis techniques and has been shown to occur in a dimeric (A_2) form in platelets [19]. In later studies, subsequent cellular expression sites were identified and a similar A_2 structure was suggested but was never directly investigated.

The modulation of FXIII activity is an important aspect whether related to plasma or cytoplasmic factor XIII. In the case of plasma FXIII, usually thrombin and calcium activates the zymogen and their action results in the proteolytic cleavage of an activation peptide. The activation of cellular FXIII is a much slower process and it does not require proteolytic splitting, since the increase of cellular Ca^{++} is sufficient to induce the activation process [1,17]. The inactivation of FXIII is also not very well known since—unlike many other clotting factors—no down-regulating mechanisms have been known in the past. More recently, we have shown that the activity of FXIII-A can be modulated by HNE [20,21]. In this recent study, we used similar concentrations of HNE as previously that can temporarily activate and then downregulate cellular FXIII-A activity. We think that the degraded FXIII-A observed in APL samples was due to intracellular proteolytic degradation by HNE and the extent to which these leukemic promyelocytes may contribute to FXIII-A

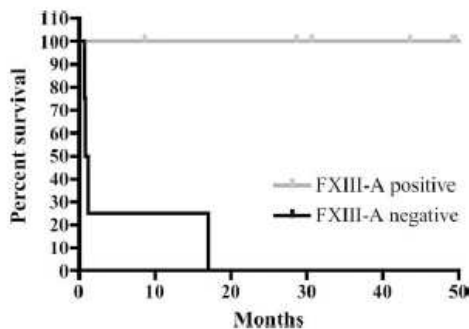


Fig. 7. Survival plot of FXIII-A positive and negative APL cases showed significant difference ($P < 0.0001$ as compared by logrank test, median survival of FXIII negative patients was 1 month).

activity when APL cells are lysed upon treatment, may depend largely on their degradation by HNE.

In our previous studies [12] we found that the myeloblastic PLB-985 cell line never expressed FXIII-A throughout its development to mature neutrophilic granulocyte, thus we hypothesized that the presence of FXIII-A in leukemic promyelocytes is a leukemia associated immunophenotype. This notion was confirmed when FXIII-A was undetectable in normal promyelocytes in our series of measurements on nonleukemic bone marrow samples (Fig. 6).

The origin of APL cells is not yet settled. There is a growing body of evidence that APL cells have a basophilic affiliation. Indeed in previous studies, some monocyte-associated antigens (CD9 and CD68) but not others (CD14) were found in APL cells [22-24]. Identifying marker positivity in APL is also of importance since it is now widely accepted that APL is mostly characterized by negativity for stainings instead of well-defined positivities. The best such negative predictive markers that were established are CD11a, CD18, and HLA-DR. Because of the low patient number we do not speculate on the potential association of FXIII-A expression with disseminated intravascular coagulation and subsequent bleeding that are attributes of AML M3. Bleeding is multicausal in this disorder and one contributing factor is elastase [25]; however, judging its effect on bleeding is hampered by the fact that several patients are also severely thrombocytopenic. An interesting phenomenon however, that may need attention is that all FXIII-A negative patients were nonresponsive to treatment or relapsed, while all FXIII-A positive APL patients are still alive (Fig. 7).

In conclusion, we have provided immunochemical and morphological evidence for the presence of cellular FXIII-A in leukemic promyelocytes in cleaved and uncleaved forms. Further studies are required to evaluate whether the cellular FXIII-A also have prognostic implications in APL.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank, Valéria Sziráki Kiss, Gizella Haramura, and Ildikó Beke Debreceni for technical assistance and Csaba Antal and Ildikó Kópis for administrative help. This study was supported by grants OTKA K-75199 (JK), OTKA-NKTH NI-69238 (LM) and the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (ZsH and ZsB). Grant sponsor: University of Debrecen, MHSC, Grant number: Mec-1/2011 and Lajos Szodoray Prize (ZsB). Grant sponsor: New Hungary Development Plan, co-financed by the European Social Fund. Grant number: TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 and TÁMOP 4.2.2./B-10/1-2010-0024.

LITERATURE CITED

- Muszbeck L, Adany R, Mikkola H. Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:357-421.
- Muszbeck L, Bagoly Z, Bereczky Z, Katona E. The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:190-205.
- Muszbeck L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: Structure and function. *Thromb Res* 1999;94:271-305.
- Buluk K. An unknown action of blood platelets; preliminary communication. *Pol Tyg Lek (Wars)* 1955;10:191.
- Kiesselbach TH, Wagner RH. Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a fluorescent antibody technique. *Ann N Y Acad Sci* 1972;202:318-328.
- Muszbeck L, Adany R, Szegedi G, Polgár J, Kávai M. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res* 1985;57:401-410.
- Adany R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbeck L. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol* 1985;38:171-173.
- Henriksson P, Becker S, Lynch G, McDonagh J. Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest* 1985;76:528-534.
- Katona EE, Ajzner E, Tóth K, Kárpáti I, Muszbeck L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 2001;258:127-135.
- Adany R, Kiss A, Muszbeck L. Factor XIII: A marker of mono- and megakaryocytogenesis. *Br J Haematol* 1987;67:167-172.
- Invernizzi R, De Fazio P, Iannone AM, Zambelli LM, Rastaldi MP, Ippoliti G, Ascari E. Immunocytochemical detection of factor XIII A—Subunit in acute leukemia. *Leuk Res* 1992;16:829-836.
- Kappelmayer J, Simon A, Katona E, Szanto A, Nagy L, Kiss A, Kiss C, Muszbeck L. Coagulation factor XIII-A. A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias. *Thromb Haemost* 2005;94:454-459.
- Kiss E, Simon A, Csathy L, Hevessy Z, Katona E, Kiss C, Kappelmayer J. A coagulation factor becomes useful in the study of acute leukemias: studies with blood coagulation factor XIII. *Cytometry Part A* 2008;73A:194-201.
- Paietta E. Expression of cell-surface antigens in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:369-385.
- Paietta E, Goloubeva O, Neuberger D, Bennett JM, Gallagher R, Racevskis J, Dewald G, Wiernik PH, Tallman MS. A surrogate marker profile for PML/RAR alpha expressing acute promyelocytic leukemia and the association of immunophenotypic markers with morphologic and molecular subtypes. *Cytometry Part B Clin Cytom* 2004;59B:1-9.
- Orfao A, Chillón MC, Bortolucci AM, López-Berges MC, García-Sanz R, González M, Tabernero MD, García-Marcos MA, Basillo AI, Hernández-Rivas J, et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica* 1999;84:405-412.
- Polgár J, Hidasi V, Muszbeck L. Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J* 1990;267:557-560.
- Kiss E, Hevessy Z, Veszprémi A, Katona E, Kiss C, Vereb G, Muszbeck L, Kappelmayer J. Leukemic lymphoblasts, a novel expression site of coagulation factor XIII subunit A. *Thromb Haemost* 2006;96:176-182.
- Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. The subunit structures of human plasma and platelet factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *J Biol Chem* 1971;246:5851-5854.
- Bagoly Z, Haramura G, Muszbeck L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost* 2007;98:359-367.
- Bagoly Z, Fazakas F, Komaromi I, Haramura G, Tóth E, Muszbeck L. Cleavage of factor XIII by human neutrophil elastase results in a novel active truncated form of factor XIII A subunit. *Thromb Haemost* 2008;99:668-674.
- De Rossi G, Avvisati G, Coluzzi S, Fenu S, LoCoco F, Lopez M, Nanni M, Pasqualetti D, Mandelli F. Immunological definition of acute promyelocytic leukemia (FAB M3): A study of 39 cases. *Eur J Haematol* 1990;45:168-171.
- Erber WN, Asbahr H, Rule SA, Scott CS. Unique immunophenotype of acute promyelocytic leukaemia as defined by CD9 and CD68 antibodies. *Br J Haematol* 1994;88:101-104.
- Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D, Fenu S, Vegna ML, Cantù-Rajnoldi A, Biondi A, Cocito MG, Del Vecchio L, Tabilio A, et al. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: Correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J Haematol* 1998;102:1035-1041.
- Oudijk EJ, Nieuwenhuis HK, Bos R, Fijnheer R. Elastase mediated fibrinolysis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Haemost* 2000;83:906-908.

New Technologies and Diagnostic Tools

Coagulation factor XIII-A

A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias

János Kappelmayer¹, Ágnes Simon¹, Éva Katona², Attila Szanto³, László Nagy³, Attila Kiss⁴, Csongor Kiss⁵, László Muszbek^{1,2}

Departments of ¹Clinical Biochemistry and Molecular Pathology, ²Clinical Research Center, ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, ⁴2nd Department of Medicine and ⁵Department of Pediatrics, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Summary

The association of coagulation factors with leukocytes have been demonstrated in several previous studies. This study was designed to study the sensitivity and specificity of factor XIII subunit A (FXIII-A) labelling in cultured myeloblastic and monoblastic cell lines and to investigate the intracytoplasmic expression of FXIII-A in *de novo* acute myeloid leukemia (AML) samples. Myeloblastic and a monoblastic cell lines were cultured and investigated for lineage specific maturation markers and FXIII-A expression. Furthermore, FXIII-A expression was investigated in 12 normal samples (7 bone marrow and 5 peripheral blood), 86 *de novo* AML samples and 6 chronic myelomonocytic leukemia (CMML) samples. In the monoblastic MonoMac6 cell

line the appearance of FXIII-A preceded that of CD14 while it remained negative in the myeloblastic PLB-985 cell line throughout its maturation period. Among the AML samples the average frequency of FXIII-A positive cells in myeloblastic leukemia samples was below 10%, while in M4 and M5 AML samples it was above 50% and was significantly higher than the generally used CD14 marker ($p < 0.0001$). In the AML M4 and M5 cases, FXIII-A proved sensitive for the identification of monoblasts. FXIII-A can be considered as a reliable intracytoplasmic marker for the monocytic and megakaryocytic series and its presence is highly predictive for mono- and megakaryocytic AML and for CMML.

Keywords

Factor XIII, flow cytometry, acute myeloid leukemia classification

Thromb Haemost 2005; 94: 454-9

Introduction

Blood coagulation factor XIII (FXIII) is a pro-transglutaminase the active form of which cross-links fibrin strands in the final phase of blood coagulation (1). It exists in two forms: the tetrameric plasma FXIII consists of A (FXIII-A) and B (FXIII-B) subunits (A_2B_2), while the cellular form is a dimer of A subunits (A_2). FXIII-A is responsible for the catalytic activity while FXIII-B exerts an inhibitory/carrier function. Plasma FXIII is transformed into an active transglutaminase by thrombin and Ca^{2+} . An activation peptide is cleaved off from the N-terminal end of FXIII-A by thrombin, then in the presence of Ca^{2+} the B subunits dissociate and the A subunits assume active configuration. The intracellular activation of FXIII does not seem to require proteolytic cleavage, the rise of Ca^{2+} concentration is sufficient to bring about the active configuration (2, 3).

Intracellular FXIII-A has first been described in platelets and megakaryocytes (4, 5) and later in monocytes and macrophages (6–8). Platelets contain huge amounts of the FXIII-A, 150 fold more per volume than plasma, while FXIII-A concentration in monocytes is at least one magnitude less than that in platelets (1). It has been demonstrated that normal bone marrow precursor cells of monocytes and megakaryocytes also express FXIII-A (9). Furthermore, previously we have demonstrated the presence of FXIII-A in fetal macrophages, megakaryocytes and liver cells (10, 11). FXIII-A is essentially of intracytoplasmic localization although during cell activation or damage, a small amount of FXIII-A might be exposed to the surface (12, 13).

Since in acute leukemias the earliest and most specific markers are intracellular while surface markers may still be negative, we tested if intracellular staining for FXIII-A could be utilized as a flow cytometric marker reaction in the diagnosis and

Correspondence to:
János Kappelmayer MD PhD
Department of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology
Medical and Health Science Centre
University of Debrecen
PO Box 70, H-4012 Debrecen, Hungary
Tel: +36-52-340-006, Fax: +36-52-417-631
E-mail: kappelmayer@dote.hu

Received March 25, 2005
Accepted after revision June 4, 2005

Financial support:
The study was supported by the following OTKA grants: TS 044796, 043086, T 038307 and T 049392.

Prepublished online July 13, 2005 DOI: 10.1160/TH05-03-0206

monitoring of acute myeloid leukemias (AML). Using a newly developed monoclonal antibody, FXIII-A-containing cells were detected in normal and leukemic peripheral blood and bone marrow samples and they were identified by three-color analysis. In addition, two cell lines of myeloblastic and monoblastic origin were induced to mature and investigated for FXIII-A expression. The results suggest, that FXIII-A is a suitable intracellular marker for the identification of leukemias of monocytic and megakaryocytic origin.

Patients and methods

Reagents

Plasma FXIII was prepared from outdated human plasma as previously described (14). To isolate FXIII-B, the A subunits were removed from the tetrameric complex by repeated freezing and thawing (15) followed by chromatography on organomercurial agarose (16). Crude FXIII-A was prepared from human placenta (17). The preparation was further purified by ion exchange chromatography, gel filtration and finally by affinity chromatography (2). FITC labelling kit was obtained from Sigma (St. Louis, MO). The following monoclonal antibodies were utilized in the 3-color panels: CD4-FITC, CD8-PE, CD34-PE, CD19-PerCP, CD14-FITC, CD33-PE, HLA-DR-PerCP, CD45-PerCP, CD45-PerCP, CD15-FITC, CD117-PE, CD7-FITC, CD34-PerCP, (all purchased from Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA, USA) and CD13-FITC, CD13-PerCP, glycophorin-FITC, CD41-PE, MPO-PE, TdT-FITC (all purchased from Dako Glostrup, Denmark), the Intrastain permeabilizing kit was the product of Dako.

Cell culturing

The Mono-Mac6 cells were a kind gift from Ernő Duda (Biological Research Center, Szeged, Hungary) and the PLB-985 cell line was obtained from K. Németh (Institute of Hematology and Immunology, National Medical Center, Budapest, Hungary). Cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 mmol glutamine, penicillin and streptomycin (Sigma). Monocytic differentiation was induced by 30 nM vitamin D₃ (Biomol, Plymouth Meeting, PA) and 1 μM all trans retinoic acid (ATRA-Sigma) and 1.25% dimethyl-sulfoxide (DMSO-Sigma) were used for granulocytic maturation. The expression of surface markers on the cells were analyzed in every 24 hour for 3 days.

Clinical samples

Patient samples were gathered between December 2000 and December 2004 and the patients were treated at the Medical and Health Science Center, University of Debrecen. All bone marrow samples were investigated by morphology, cytochemistry and immunophenotyping. Peripheral blood samples were collected into EDTA anticoagulant in closed vacutainer system (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). Bone marrow samples were obtained by sternal biopsy and anticoagulated with heparin. All samples were stained the same day or stored at room temperature for a maximum of 16 hours. Overall 86 AML samples (76 bone marrow and 10 peripheral blood), 12 normal (7 bone

marrow and 5 peripheral blood) samples and 6 peripheral blood samples of CMML patients were analysed. Leukemic samples were obtained at the onset of the disease before any treatment was initiated. The distribution of AML FAB types were as follows: M0:8, M1: 13, M2:9, M3:4, M4:25, M5:19, M6:3, M7:5.

Generation and labelling of mouse monoclonal antibodies against FXIII subunits

The generation of mouse monoclonal antibodies against FXIII subunits has been extensively described elsewhere (18–21). Both antibodies to FXIII-A and FXIII-B respectively were conjugated to FITC in alkaline medium by using FITC labelling kit according to the manufacturer's instruction (Sigma St Louis, MO). Fluorescein and protein concentrations were determined by spectrophotometry and F/P ratios were in the range of 3–6.

Surface and intracellular staining of leukocytes

Surface staining of whole blood and bone marrow cells were carried out according to standard procedures. Fifty μl of whole blood or bone marrow sample adjusted to a leukocyte count of 10 G/L by phosphate buffered saline (PBS) was incubated by saturating concentrations of directly conjugated antibodies for 20 minutes at room temperature in the dark. Red cells were lysed by FACS lysing solution (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) and samples were washed twice in PBS and finally resuspended in 1% paraformaldehyde. For intracytoplasmic staining the procedure described for Intrastain was strictly followed. Surface stainings were executed before permeabilization and intracytoplasmic staining. In all experiments anti-FXIII-A antibody was used at a 2 μg/ml final concentration with appropriately matched isotype control. Paraformaldehyde fixed samples were kept at 4°C until analysis. All samples were analysed on a FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) flow cytometer. Data obtained on 10 000 cells were stored in list-mode data files and analysed by Cell Quest software. In bone marrow samples, investigated for minimal residual disease a minimum of 100 000 events were acquired and analysed. In clinical samples derived from acute leukemic samples, blast cells were identified by their low SSC and dim CD45 staining, as described previously (22, 23).

Statistical method

For the comparison of percentages of positive cells in AML M4 and M5 cases, the normality of the data was checked by the Kolmogorov Smirnov test. Since this set of data proved a gaussian distribution in both groups, the results were evaluated by the paired t-test. The mean fluorescence intensity of positive cells in normal and leukemic samples did not have a gaussian distribution, thus the unpaired Mann-Whitney U test was used for statistical evaluation. Values below 0.05 were reported as statistically significant.

Results

Flow cytometric detection of FXIII-A in normal peripheral blood and bone marrow cells

As a first step, staining in whole blood was performed to identify FXIII subunits in normal peripheral blood leukocytes. After sur-

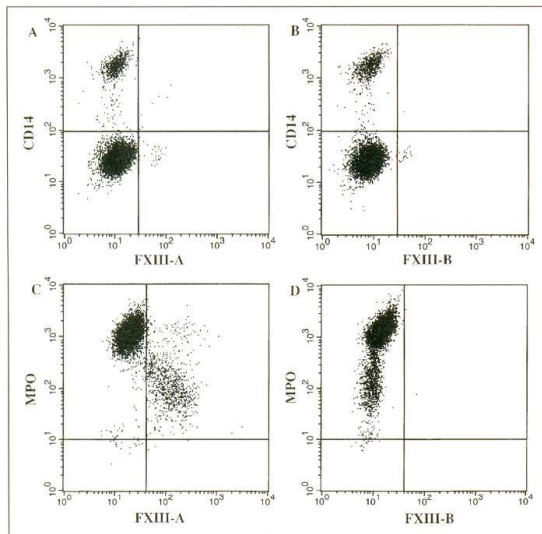


Figure 1: FXIII-A and FXIII-B staining of myeloid cells in peripheral blood. Normal peripheral blood leukocytes were labelled by FITC-conjugated monoclonal anti FXIII-A and FXIII-B antibodies. Surface labelling of normal myeloid cells for CD14 clearly distinguished monocytes from the rest of myeloid cells. No surface positivity was obtained by anti-FXIII-A or anti-FXIII-B antibodies in either cell population (panels A and B). After permeabilization the myeloid cells were labelled by PE-conjugated antibody against MPO. In MPO-dim monocytes, a definite positivity was found for FXIII-A but MPO bright neutrophils remained negative (C). All myeloid cells were negative for FXIII-B (D).

face staining with phycoerythrin conjugated CD14 (CD14-PE) and FITC labelled anti-FXIII-A and anti-FXIII-B antibodies in the myeloid gate, monocytes showed positivity for CD14 but no reaction was obtained for any of the FXIII subunits (Fig. 1A, B). Thus, in normal peripheral blood FXIII can not be detected on the surface of myeloid cells. After permeabilization by Intrastain, monocytes characteristically dim for myeloperoxidase (MPO), showed FXIII-A positivity, but FXIII-B was completely negative (Fig. 1C, D). MPO bright polymorphonuclear granulocytes (PMN) were basically negative for both subunits. Lymphocytes were totally negative after staining for surface FXIII-A, however after permeabilization, a very small proportion (<2%) of cells in the lymphocyte gate showed intense reaction for FXIII-A (data not shown). In double labelling experiments for FXIII-A and for the intracytoplasmic B-cell marker cyCD79a or the T-cell marker cyCD3 it became obvious that FXIII-A labelling was not associated to B-cells or T-cells. The FXIII-A bright population showed total co-localization with surface CD41, i.e. with staining for the integrin glycoprotein IIb/IIIa. This finding demonstrated that the low percent but high intensity staining derived from contaminating platelets or platelet derived micro-particles.

In the normal bone marrow samples, FXIII-A was detectable in the myeloid gate in two subpopulations, a CD45^{bright} (mature monocyte) subset and a CD45^{dim} (monoblast) subset. The mean FXIII-A positivity in these bone marrow samples was $5.7 \pm 1.8\%$,

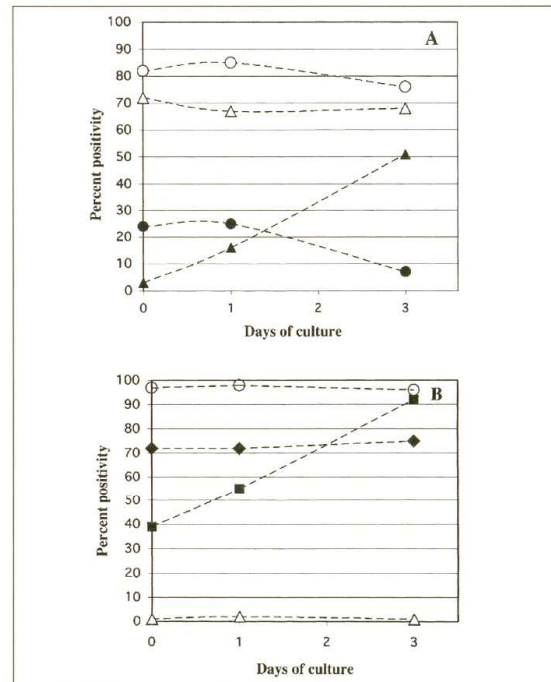


Figure 2: The expression of myeloid, granulocytic and monocytic markers in Mono-Mac6 and PLB-985 cell lines. Mono-Mac6 cells (panel A) were cultured and labelling was investigated for the monocytic marker CD64 (closed circle), CD14 (closed triangle), FXIII-A (open triangle) and the myeloid marker CD33 (open circle). In the PLB-985 myeloid cell line (panel B), the surface expression of CD11b staining continuously increased under the effect of DMSO (closed squares). Surface CD33 (open circles) and the cytoplasmic labelling for myeloperoxidase (closed diamonds) were positive in all samples, but no staining was obtained for FXIII-A (open triangles).

while the mean CD14 labelling was $3.6 \pm 0.8\%$. The localization of FXIII-A and CD14 positivity labelled bone marrow cell with identical scatter properties. Megakaryocytes that are present at 1% or less in normal bone marrow samples only contribute insignificantly to the total marrow FXIII-A positivity.

Detection of FXIII-A in cell lines

Cytoplasmic FXIII-A was expressed in the monoblastic (M5) Mono-Mac6 cell line already at day 0 and remained stably expressed to the same extent throughout the culturing period. Surface CD14 was initially negative, however upon induction with vitamin-D, an inducer of monocytic differentiation, it became positive already after 24 hours. In the PLB-985 cell line, surface CD33 and cytoplasmic myeloperoxidase were continuously expressed. Upon induction with DMSO, CD11b appeared on the cell surface indicating myeloid maturation, however FXIII-A remained negative (Fig. 2). Similar results were obtained when PLB-985 cells were treated with ATRA. These data suggest that the more monocytic committed Mono-Mac6 cells express FXIII-A which – unlike CD14 expression – cannot be further in-

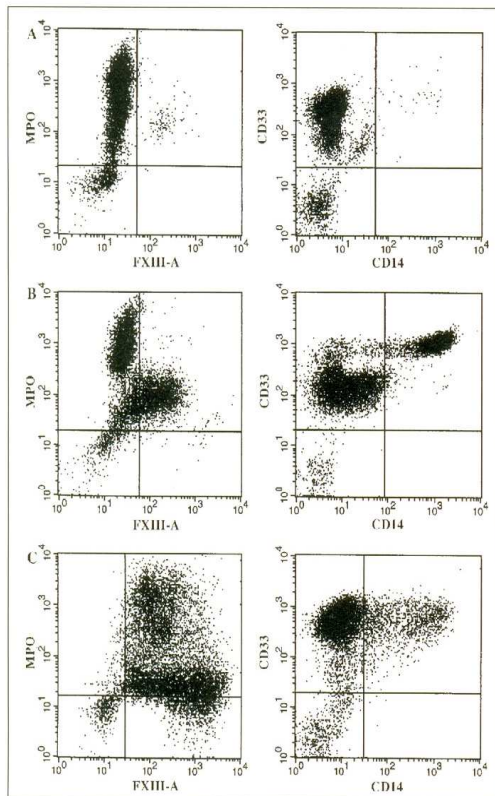


Figure 3: Representative dot plots of AML samples. Staining pattern for FXIII-A in the bone marrow of M1 (A) and M5 (B, C) AML patients. In all panels the right plot demonstrates surface staining for CD33 and CD14, left plot shows cytoplasmic staining for MPO and FXIII-A. In a representative AML M1 sample, cells clearly showed positivity for cytoplasmic MPO but only a few cells were labelled for FXIII-A. Similarly, only a few cells were surface labelled for the monocyte marker CD14 (panel A, see upper right quadrants). In an AML M5 sample MPO-dim and CD33-bright cells were positive for FXIII-A and CD14, respectively (panel B). The proportion of FXIII-A and CD14 positive cells were practically identical. In another AML M5 sample only 15% of the CD33-bright cells were positive for CD14 however nearly all cells displayed FXIII-A (panel C).

creased upon maturation and the less committed PLB-985 cells express negligible levels of FXIII-A which did not increase upon induction of granulocytic differentiation.

Detection of FXIII-A in *de novo* leukemic samples

Based on the data described above, FXIII-A can be considered as an early marker that is induced in the monocytic but not in the granulocyte lineage upon differentiation. In further studies three-color analyses were performed on bone marrow samples derived from 86 AML patients to identify and characterize FXIII-A containing cells. In addition, peripheral blood samples of 6 CMML patients were investigated. It was found that leukemic blasts derived from myeloblastic (M0, M1, M2) and ery-

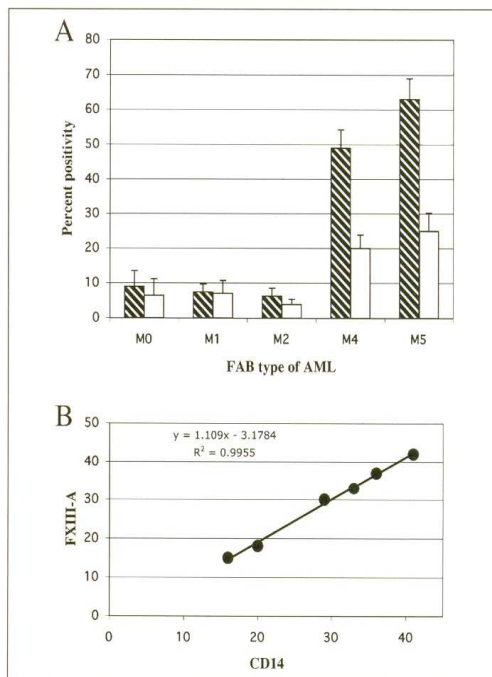


Figure 4: Comparison of CD14 and FXIII-A staining. Panel A displays the mean percent positivity and standard deviation for FXIII-A (striped bars) and CD14 staining (open bars) in bone marrow samples from patients with AML of myeloblastic and monoblastic origin. The number of samples in the displayed groups were the following: M0:8, M1:13, M2:9, M4:25, M5:19. There was a significant difference between CD14 and FXIII-A labelling in M4 and M5 cases ($p < 0.0001$). Panel B shows that in CMML samples staining for FXIII-A and CD14 gave similar results.

throblastic (M6) AML were either negative for FXIII-A or the degree of labelling was insignificant. Similar low level labelling was observed in the promyelocytic leukemia (AML M3) cases. In acute leukemias, 20% positive events for a selected marker among bone marrow cells is usually defined as the cut-off value for declaring positivity for any staining. From this aspect it is important, that out of 37 cases with M0, M1, M2, M3 and M6 AML, only 2 patients had FXIII-A staining that exceeded the 20% limit. In M4 and M5 AML samples FXIII-A labelling was either equal to, or exceeded the extent of labelling for CD14 (Fig. 3). In M4 and M5 AML, the mean percentage of FXIII-A positive cells was significantly higher than that of CD14 labelling ($p < 0.0001$) (Fig. 4A). Staining for FXIII-A was especially dominant in cases where more immature cells were present, thus the mean percent positivity was the highest (68%) in M5a cases (Fig. 4A). Contrary to AML M4 and M5 cases it was striking, that in 6 cases with chronic myelomonocytic leukemia the proportion of FXIII-A and CD14 positive cells was identical (Fig. 4B), suggesting that in more mature monocytes the 2 markers gave similar results. Comparing myeloblastic and monoblastic leukemias FXIII-A was 100% sensitive and 95% specific for subtypes with monocytic involvement (AML M4 and M5).

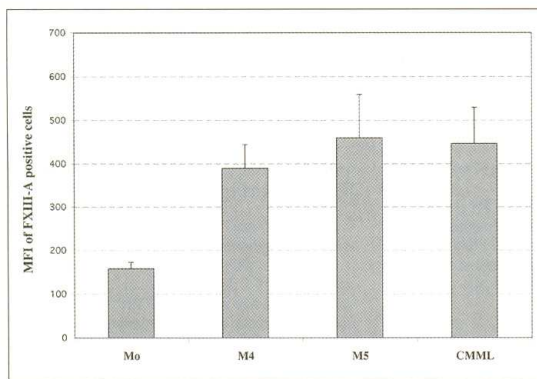


Figure 5: Labelling intensity of FXIII-A staining in normal monocytes and leukemic samples. Mean fluorescence intensity values (MFI) and standard errors of mean are shown. MFI values of FXIII-A positive cells in AML M4 (n=25), AML M5 (n=19) and CMML (n=6) were significantly higher ($p < 0.05$ in all cases) than in normal peripheral blood monocytes (n=5).

A unique feature of FXIII-A labelling was, that in the case of M4, M5 AML and CMML the intensity of staining for FXIII-A was higher than FXIII-A staining of normal peripheral blood monocytes ($p < 0.05$ for both AML subtypes and CMML) (Fig. 5). All M7 cases were positive for glycoprotein IIb/IIIa. Although the mean FXIII-A positivity was 30% lower than labelling for glycoprotein IIb/IIIa (24% versus 33%), a very bright staining was observed for FXIII-A.

Discussion

In this study we carried out a systematic flow cytometric evaluation of labelling for FXIII-A in normal and malignant hematopoiesis using recently evaluated and characterized monoclonal antibodies. Based on previous immuno-morphological studies it was expected that FXIII-A could be a marker of monocytic and megakaryocytic lineages and its detection could be useful in the classification of several types of haematological malignancies. In previous studies only the A subunit was described intracellularly and the inhibitory B subunit was found only in the plasma enzyme. In agreement with these results we also showed that FXIII-B could not be detected in normal peripheral blood and bone marrow cells. The intracellular presence of FXIII-A has been demonstrated in a number of studies, however in some studies the expression of FXIII-A on the cell surface has also been suggested (12, 24). Here we present evidence that in intact peripheral blood monocytes FXIII-A does not appear on the surface, while a clear-cut intracytoplasmic staining was observed.

Comparing with other intracytoplasmic markers of the myeloid lineage, FXIII-A shows a different pattern. The MPO staining is brighter in granulocytes and dimmer in monocytes, while the intracytoplasmic CD68 staining is brighter in monocytes and dimmer in neutrophils (25). However, FXIII-A staining is basically negative in neutrophils and positive in monocytes making it an ideal marker to differentiate the two cell types.

Flow cytometric analyses of the monocytic Mono-Mac6 cell line showed, that FXIII-A appeared well before CD14 staining – a generally used surface marker of the monocyte lineage – was evident. Similarly to a previous microscopic study (26) we also showed that in several cases of AML M4 and M5 significantly more cells were labelled for FXIII-A than for CD14. Thus, FXIII-A positivity can be considered as an early marker of the monocytic lineage. FXIII-A shows a different pattern than other intracytoplasmic markers in case of hematological malignancies. In a previous study, we found that the expression of other cytoplasmic markers decreased during malignant transformation (23). In contrast to other cytoplasmic antigen markers, the mean fluorescence intensity of FXIII-A positive cells was higher in M4 and M5 AML and CMML than in normal peripheral blood monocytes, that enables us to use FXIII-A for the identification of residual leukemic blasts in appropriate three color combinations in AML samples.

Out of the two patients that exceeded the 20% labelling limit by FXIII-A in AMLs with no monocytic involvement, one patient had AML M0 and the other had AML M3. It is well known that immature blasts often display myeloid, B-cell or T-cell markers, thus, the appearance of FXIII-A in selected AML M0 cases is not surprising. The other bone marrow sample was derived from a patient with promyelocytic leukemia. Here, though the FXIII-A positivity was 44%, the fluorescence intensity of the positive cells was much smaller than in M4 or M5 cases and did not result in a differential diagnostic dilemma. Similar observations in promyelocytic leukemias have been described previously in case of CD64 (27).

FXIII-A labelling would allow a more reliable identification of AML M4 and M5 leukemias particularly with multi-color flow cytometry that emerged as the standard for immunophenotyping. Since FXIII-A is a platelet marker as well, it is important that the enhanced FXIII-A expression in these cases was not a result of enhanced platelet association since the CD41 labelling was not different from FXIII-A negative AML cases. Furthermore, FXIII-A positivity was only detectable after permeabilization and never on the cell surface. Staining for FXIII-A was demonstrated to be a useful tool in the diagnosis and classification of leukemia type M7, as well. Cells of megakaryocytic lineage were characterized by a very bright staining.

During myeloid hematopoietic development the dissection of differences in surface and cytoplasmic marker expression is particularly important at the early stages of development. We recently described a differential expression pattern for CD162 (P-selectin glycoprotein ligand-1) on the surface of leukemic blasts derived from myeloblastic and monoblastic leukemias (28) by using quantitative flow cytometry. Here we demonstrated, that an intracytoplasmic protein FXIII-A is an early marker of hematopoietic development of the megakaryocytic and monocytic lineage. There are several publications describing the association of FXIII-A with monocytes and monocyte derived macrophages but only a few microscopic studies were published on its potential diagnostic utilization (26, 29–31). To our knowledge this is the first study where the cellular detection of a clotting factor by flow cytometry was shown useful as a diagnostic tool in leukemias.

Acknowledgements

The skilful technical assistance of Valéria Sziráki Kiss and Anikó Veszprémi are acknowledged.

References

- Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999; 94: 271–305.
- Polgár J, Hidasi V, Muszbek L. Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J* 1990; 267: 557–60.
- Muszbek L, Haramura G, Polgár J. Transformation of cellular factor XIII into an active zymogen transglutaminase in thrombin-stimulated platelets. *Thromb Haemost* 1995; 74: 702–5.
- Buluk K. An unknown function of blood platelets. *Polski Tygodnik Lekarski* 1955; 10: 191–7.
- Kieselbach TH, Wagner RH. Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by fluorescent antibody technique. *Ann NY Acad Sci* 1972; 202: 318–28.
- Muszbek L, Ádány R, Szegedi G et al. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res* 1985; 37: 401–10.
- Ádány R, Belkin A, Vasilevskaia T et al. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol* 1985; 38: 171–3.
- Henriksson P, Becker S, Lynch G et al. Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest* 1985; 76: 528–34.
- Ádány R, Kiss A, Muszbek L. Factor XIII: a marker of mono- and megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol* 1987; 67: 167–72.
- Kappelmayer J, Bacskó G, Kelemen E et al. Onset and distribution of factor XIII containing cells in the mesenchyme of chorionic villi during early phase of human placentation. *Placenta* 1994; 15: 613–23.
- Kappelmayer J, Bacskó G, Birinyi L et al. Consecutive appearance of coagulation factor XIII subunit A in macrophages, megakaryocytes and liver cells during early phase of human development. *Blood* 1995; 86: 2191–7.
- Kreager JA, Devine DV, Greenberg CS. Cytofluorometric identification of plasmin-sensitive factor XIIIa binding to platelets. *Thromb Haemost* 1988; 60: 88–93.
- Conkling PR, Achyuthan KE, Greenberg CS et al. Human mononuclear phagocyte transglutaminase activity cross-links fibrin. *Thromb Res* 1989; 55: 57–68.
- Lorand L, Credo RB, Janus TJ. Factor XIII (fibrin stabilizing factor). *Methods Enzymol* 1981; 80: 333–41.
- Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL et al. Human factor XIII from plasma and platelets. *J Biol Chem* 1973; 248: 1395–407.
- McDonagh J, Waggoner WG, Hamilton EG et al. Affinity chromatography of human plasma and platelet factor XIII on organomercurial agarose. *Biochim Biophys Acta* 1976; 446: 345–57.
- Bohn H., Schwick, HG. Isolierung und Charakterisierung eines fibrinstabilisierenden Faktor aus menschlichen Plazenten. *Arz Forschung* 1971; 21: 1432–9.
- Katona É, Haramura G, Kárpáti L et al. A simple quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A₂B₂). *Thromb Haemost* 2000; 83: 268–73.
- Katona É, Ajzner É, Tóth K et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 2001; 258: 127–35.
- Stahli C, Staehelin T, Miggiano V et al. High frequencies of antigen specific hybridomas: Dependence on immunisation parameters and prediction by spleen cell analysis. *J Immunol Methods* 1980; 32: 297–309.
- Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495–506.
- Lacombe F, Durrieu F, Briais A et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1878–86.
- Kappelmayer J, Gratama JW, Karázi É et al. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a. Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols *J Immunol Methods* 2000; 242: 53–65.
- Kradin RL, Lynch GW, Kurnick JT et al. Factor XIII A is synthesized and expressed on the surface of U937 cells and alveolar macrophages. *Blood* 1987; 69: 778–85.
- Strobl H, Scheinecker C, Csmarits B et al. Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. *Br J Haematol* 1995; 90: 774–82.
- Invernizzi R, De Fazio P, Iannone AM et al. Immunocytochemical detection of factor XIII A-subunit in acute leukemia. *Leuk Res* 1992; 16: 829–36.
- Krasinskas AM, Wasik MA, Kamoun M, et al. The usefulness of CD64, other monocyte-associated antigens and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 797–805.
- Kappelmayer J, Kiss A, Karázi É et al. Identification of P-selectin glycoprotein ligand-1 as a useful marker in acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2001; 115: 903–9.
- Adany R, Nemes Z, Muszbek L. Characterization of factor XIII containing – macrophages in lymph nodes with Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1987; 55: 421–6.
- Nemes Z, Thomazy V, Adany R et al. Identification of histiocytic reticulum cells by the immunohistochemical demonstration of factor XIII (FXIII-a) in human lymph nodes. *J Pathol* 1986; 149: 121–32.
- Toida M, Okumura Y, Swe Win KK et al. Characterization of cells containing factor XIII subunit a in benign and malignant buccal lesions. *Histochem J* 1995; 27: 449–56.