

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Hurják Boglárka

**Új információk a XIII-as véralvadási faktor
struktúrájával, hiányával és végstádiumú vese betegekben
bekövetkezett változásaival kapcsolatban**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Új információk a XIII-as véralvadási faktor
struktúrájával, hiányával és végstádiumú vese betegekben
bekövetkezett változásaival kapcsolatban**

Hurják Boglárka

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László

akadémikus



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések	4
2	Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
2.1	A vérárvadás vázlatos mechanizmusa	7
2.2	A XIII-as vérárvadási faktor szerkezete	8
2.3	FXIII-A ₂ röntgen krisztallográfiás struktúrája	10
2.4	FXIII-B szerkezete	12
2.5	A FXIII aktivációja	14
2.6	Az aktivált FXIII működése	15
2.7	A FXIII deficiencia osztályozása, klinikai tünetei	18
2.8	FXIII ellenes antitestek	20
2.9	FXIII szint változásai egyes kórképekben	22
2.10	Hemodialízis és hemodiafiltráció	24
3	Célkitűzés	25
4	Betegek és módszerek	26
4.1	FXIII-B alegység totál glikán profiljának vizsgálata	26
4.1.1	FXIII-B preparálás	26
4.1.2	FXIII-B szénhidrát komponensének detektálása	26
4.1.3	FXIII-B deglikozilációja natív körülmények között	27
4.1.4	FXIII-B deglikozilációja denaturáló körülmények között	28
4.1.5	N-glikánok fluorofór jelölése	28
4.1.6	N-glikánok szekvenálása	29
4.1.7	Kapilláris elektroforézis-lézer indukálta fluoreszcens detektálással	30
4.1.8	Molekulatömeg meghatározás gélszűréssel	30
4.1.9	F13B knock-out egérvonal létrehozása és a genotipizálási stratégia	30
4.1.10	A deglikozilált FXIII-B clearance vizsgálata	31
4.1.11	FXIII-B koncentráció meghatározása	32
4.2	FXIII hiányos beteg autoantitestjének karakterizálása	32
4.2.1	Esetleírás	32
4.2.2	FXIII aktivitás meghatározás	34
4.2.3	FXIII antigén meghatározás	36
4.2.4	FXIII-A Western-blot analízise	36
4.2.5	A FXIII keresztköti aktivitásának vizsgálata	37
4.2.6	A FXIII ellenes antitestek gátló hatásának kimutatása	37
4.2.7	A FXIII ellenes autoantitest gátló hatásának osztályozása	40

4.2.8	Kötődési vizsgálatok.....	41
4.2.9	FXIII és fibrinogén szintek meghatározása ESRD betegekben	42
4.2.10	FXIII aktivitás meghatározás.....	43
4.2.11	FXIII antigén meghatározás.....	43
4.2.12	Fibrinogén koncentráció meghatározása	43
4.2.13	C-reaktív protein (CRP) koncentráció meghatározása.....	44
4.2.14	Az eredmények albumin koncentrációra történő korrigálása.....	44
5.1	FXIII-B alegység totál glikán profiljának vizsgálata	45
5.2	FXIII deficiens beteg autoantitest karakterizálás	53
5.2.1	A beteg FXIII aktivitásának és fibrin keresztkötő képességének vizsgálata.....	53
5.2.2	FXIII-ellenes antitest detektálása és karakterizálása.....	54
5.2.3	Az autoantitest kötődése a FXIII-A alegységéhez	55
5.2.4	Az autoantitest gátló kapacitása.....	55
5.2.5	Az autoantitest gátló hatásának karakterizálása.....	56
5.2.6	A beteg monitorozása	58
5.3	FXIII és fibrinogén szintek meghatározása ESRD betegekben	60
5.3.1	ESRD betegek plazma fibrinogén és CRP koncentrációi	60
5.3.2	FXIII aktivitás és antigén koncentrációk ESRD betegekben.	62
5.3.3	Fibrinogén koncentráció változása a HDF és HD kezelések alatt az ESRD betegekben.....	64
5.3.4	FXIII aktivitás értékek változása A HDF és HD kezelések alatt az ESRD betegekben.....	66
6	Megbeszélés.....	68
7	Összefoglalás	73
8	Summary	75
9	Irodalomjegyzék	77
10	Tárgyszavak	86
11	Keywords.....	86
12	Köszönetnyilvánítás.....	87
13	Függelék	88

1 Rövidítések

α2-PI	α_2 -plazmin inhibitor
ADP	adenozin-difoszfát
AFM	atomic force microscopy-atomerő mikroszkópia
ALL	akut limfoid leukémia
AMML-M4	akut mielomonocitás leukémia
AML-M5	akut monocitás leukémia
AP-FXIII	XIII-as véralvadási faktor A alegység aktivációs peptid
APTI	aktivált parciális tromboplasztin idő
APTS	8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate-8-aminopirén-1,3,6-triszulfonát
CAD	coronary artery disease-koszorúér-betegség
cFXIII	celluláris XIII-as faktor
CAS	coronary atherosclerosis- koronária ateroszklerózis
CE-LIF	kapilláris elektroforézis-lézer indukálta fluoreszcens detektálással
CRP	C-reaktív protein
d.FXIII-B	deglikozilált XIII-as véralvadási faktor B-alegység
ESRD	end stage renal disease-végstádiumú vesebetegség
FPLC	fast protein liquid chromatography- gyors fehérje folyadékkromatográfia
FV	V-ös véralvadási faktor
FVII	VII-es véralvadási faktor
FVIIa	aktivált VII-es véralvadási faktor
FVIII	VIII-as véralvadási faktor
FIX	IX-es véralvadási faktor
FIXa	aktivált IX-es véralvadási faktor

FX	X-es véralvadási faktor
FXa	aktivált X-es véralvadási faktor
FXI	XI-es véralvadási faktor
FXIa	aktivált XI-es véralvadási faktor
FXII	XII-es véralvadási faktor
FXIII	XIII-as véralvadási faktor
FXIIIa	aktivált XIII-as véralvadási faktor
FXIII-A	XIII-as faktor A alegysége
FXIII-A₂	XIII-as faktor A-alegység homodimer
FXIII-A*₂	trombinnal és Ca ²⁺ -mal aktivált A-alegység dimer
FXIII-A*	trombinnal és Ca ²⁺ -mal aktivált A-alegység monomer
FXIII-A₂'	trombin által proteolitikusan hasított XIII-as faktor A alegység
FXIII-A₂[°]	nem proteolitikusan aktivált FXIII-A alegység dimer
FXIII-A*A[°]	trombin által proteolitikusan hasított és nem proteolitikusan aktivált FXIII-A alegységek dimere
FXIII-A₂B₂	XIII-as faktor heterotetramer szerkezetű formája
FXIII-B	XIII-as faktor B alegysége
GEÉ	glicin-etilészter
GDH	glutamát dehidrogenáz
HD	hemodialízis
HDF	hemodiafiltráció
HF	hemofiltráció
HRPO	torma-peroxidáz
IAA	jódacetamid
IQR	interquartile range- interkvartilis tartomány

KO	knock-out
MEA	β -merkaptoetanol
MI	miokardiális infarktus
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NSCLC	non small cell lung carcinoma-nem kissejtes tüdőrák
PAD	peripheral artery disease- perifériás artériás betegség
PAI-2	plazminogén aktivátor inhibitor-2
PD	peritoneális dialízis
pFXIII	plazma XIII-as faktor
pFXIIIA₂B₂	plazma XIII-as faktor heterotetramer szerkezetű formája
PI	protrombin idő
PNGase F	peptid-N4-(N-acetil-béta-glükózaminil) aszparagin amidáz
PVDF	polivinilidén fluorid
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis- nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis
SPR	surface plasmon resonance-felületi plazmon rezonancia
TAFI	trombin aktiválható fibrinolízis inhibitor
TF	tissue factor-szöveti faktor
TG	transzglutamináz
THF	tetrahidrofurán
TI	trombin idő
TMB	tetrametilbenzidin
uPA	urokináz plazminogén aktivátor
VTE	vénás tromboembólia

2 Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1 A véralvadás vázlatos mechanizmusa

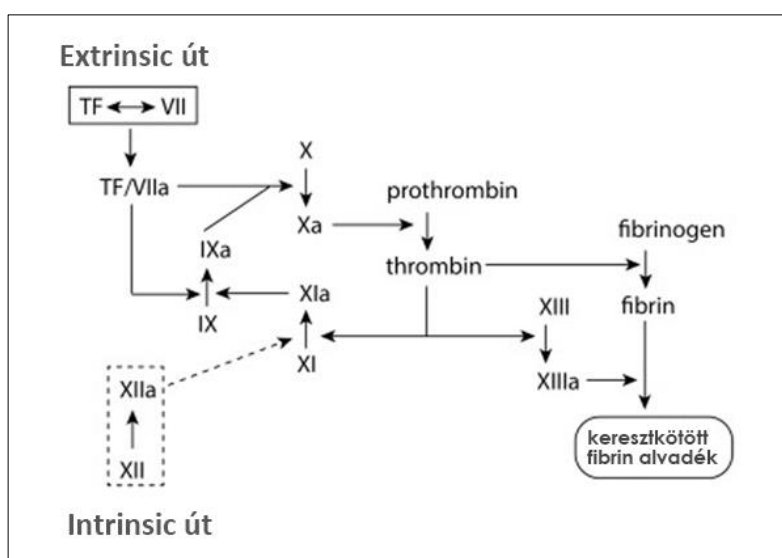
A hemosztázis egy bonyolultan szabályozott rendszer, melynek kettős feladata van. Egyrészt biztosítja, hogy a vér az érpályán belül folyékony maradjon, másrészt megakadályozza az elvérzést érsérülés esetén. A trombohemorrhágiás egyensúly fenntartása a koagulációs és fibrinolitikus rendszer, valamint a vérlemezkék és az érfal közötti összetett kölcsönhatások eredményeként valósul meg (1).

A véralvadási rendszer a véralvadási fehérjék (faktorok) működésén alapul. Ezek olyan reakciók sorozatát indítják el, ill., vesznek részt ezekben, melyeket összefoglalóan véralvadási kaszkádnak nevezünk. Az alvadási faktorok többségét a máj szintetizálja és juttatja a plazmába, egy részük zimogén, másik részük ún. prokofaktor (FV, FVIII). Utóbbiak proteolitikusan aktivált formájukban nem vesznek részt a katalitikus reakciókban, csak rendkívül felgyorsítják a folyamatot (FX, illetve a protrombin aktivációját). Fiziológias körülmények között az érfal sérülése során a plazmával kontaktusba kerülő szöveti faktor indítja be a proteolitikus véralvadási kaszkádot, melynek során az egyes faktorok egymást hasítva katalitikusan aktív proteázokat hoznak létre. Ezen lépések láncolata vezet el a protrombin aktiválásához, azaz a trombin képződéshez. Utóbbi a plazmában oldott állapotban lévő fibrinogénből a fibrinopeptidek lehasításával oldhatatlan fibrint képez. A fibrin szálak polimerizációja, valamint a fibrin polimerek kovalens keresztkötése stabil fibrinháló kialakulásához vezet.

A véralvadási kaszkád hagyományosan intrinsic és extrinsic útvonalakra osztható, melyek azonban csak in vitro választhatók szét egymástól. A két útvonal közös pontja a X-es faktor (FX) aktiválódása. Utóbbi elindításához szükséges a szöveti faktor (tissue factor; TF), amely a szubendoteliális szövetekben expresszálódik (2). Fiziológias körülmények között az érendotélium minimálisra csökkenti a TF és a plazmában lévő faktorok érintkezését, azonban az érfal sérülése során a TF elérhetővé válik és VII-es faktorhoz (FVIIa) és kalciumhoz kötődve elősegíti a zimogén FX aktív X-es faktorrá (FXa) való átalakulását. In vivo a TF-FVIIa komplex a IX-es faktort (FIX) is aktiválja. A faktor XI (FXI) csak a keletkezett trombin hatására aktiválódik és vesz részt a folyamatban (3). Az intrinsic út a XII-es faktor (FXII) aktiválódásával indul, mely adszorbeálódik a kollagénnel vagy más aktív felületre és hasítja a FXI-et. Az aktivált FXI (FXIa), csakúgy, mint a TF-FVIIa komplex a FIX-et aktiválja, mely kofaktorával (VIII-as faktor (FVIII)) létrehozza a tenáz komplexet és foszfolipid felszínen

aktiválja a FX-et. (1). In vivo a FXII normál körülmények között egyáltalán nem vesz részt a folyamatban.

A közös útvonalon az FXa kofaktorával (V-ös faktor; (FV), szöveti és aktivált vérlemezke foszfolipid felszíneken, Ca^{2+} jelenlétében létrehozza a protrombináz komplexet, amely a protrombint trombinná alakítja. Az így keletkezett trombin egyrészt hasítja a keringésben lévő fibrinogént, melynek során oldhatatlan fibrin keletkezik, másrészt kalcium jelenlétében a XIII-as faktort (FXIII) is aktiválja, amely ezáltal képes a fibrin polimerek kovalensen keresztkötésére. A folyamat eredményeként létrejön a fibrinháló, mely stabilizálja az alvadékot (1, 4). (1. ábra.)



1. ábra. A véralvadás mechanizmusa. Az extrinsic és intrinsic útvonalak az FX aktivációját eredményezik. Az FXa kofaktorával, az FV-el létrehozza a protrombináz komplexet, mely a protrombint trombinná alakítja. Az így képződött trombin aktiválja a FXIII-at. A keletkező FXIIIa kovalens keresztkötések kialakításával stabilizálja a fibrin alvadékot. Az ábra az (5) szám alatt idézett közlemény egyik ábrájának módosított változata.

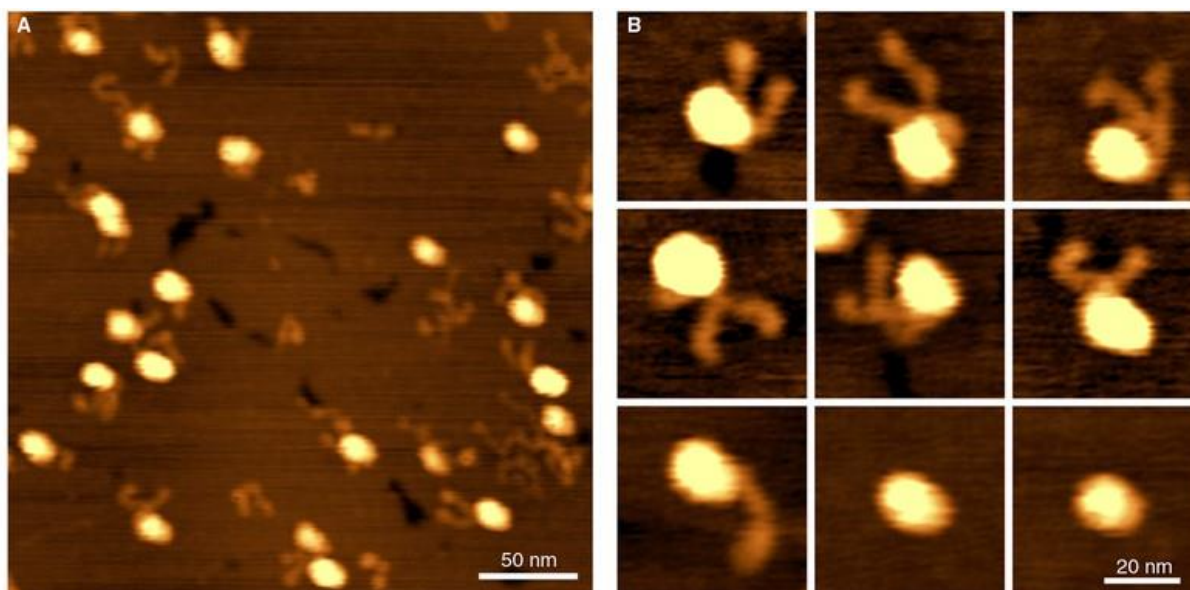
2.2 A XIII-as véralvadási faktor szerkezete

A véralvadás XIII-as faktora egy protranszglutamináz, mely in vivo inaktív formában van jelen (6). Két formája ismert. A plazma FXIII (pFXIII) szerkezetét tekintve egy 326 kDa molekulatömegű heterotetramer (FXIII-A₂B₂), mely két katalitikus A-alegységből (FXIII-A) és

két gátló/stabilizáló B-alegységből (FXIII-B) áll. A FXIII-A₂B₂ komplex referencia tartománya a humán plazmában 14-28 mg/L (7). A FXIII celluláris formája (cFXIII), FXIII-A₂ homodimerként van jelen bizonyos sejtek citoplazmájában (8, 9). A cFXIII megtalálható a trombocitákban, megakariocitákban, monocitákban és makrofágokban is.

A FXIII-A₂B₂ szerkezetéről rendelkezésre állnak alacsony felbontású transzmissziós elektronmikroszkópos képek, azonban a komplex atomszerkezete ismeretlen (10). Ezen vizsgálatok alapján a FXIII-B alegységek körül ölelik a FXIII-A dimereket. Ezt a hipotézist alátámasztja az a tény, hogy a FXIII-B védi az A-alegységet az inaktivációtól (11). Sokáig általánosan elfogadott volt, hogy a FXIIIa aktív formáját FXIII-A*₂ dimerek alkotják (12, 13). Ennek az állításnak ellent mond egy a közelmúltban megjelent tanulmány, melyben azt találták, hogy a FXIII-A₂ aktivációja során a komplex FXIII-A* monomerekké disszociál (14). Annak ellenére, hogy ez a feltételezés ellentmond a korábbi vizsgálatok eredményeinek (12, 13), összhangban van az aktivált cFXIII monomer kristályszerkezetével (15) és a molekuláris dinamikai szimulációkkal, melyek azt sugallják, hogy a pFXIII aktivációja során a FXIII-A alegységek közötti kapcsolat meggyengül (16) így az, hogy az aktív FXIIIa dimer (FXIII-A*₂) vagy monomer (FXIII-A*) továbbra sem bizonyult tisztázottnak. Nem lehetetlen, hogy a dimer asszociációja, disszociációja koncentráció függő.

Ezen ellentmondásokat igyekszik tisztázni, alátámasztva az utóbbi feltételezést egy nem rég megjelent tanulmány, mely atomerő-mikroszkópiát (atomic force microscopy; AFM) alkalmazva új információkat szolgáltat az inaktív pFXIII-A₂B₂ szerkezetéről, valamint az aktiválás során az alegységek összetételében bekövetkezett változásokról (17). Bizonyítottá vált, hogy az inaktív pFXIII-nak három szerkezeti variánsa létezik. Az AFM képeken megjelenő FXIII molekulák 67%-ánál két monomer B-alegység volt megfigyelhető, melyek jellemzően a globuláris formát alkotó FXIII-A₂ homodimerek egyik oldalán jelentek meg, 14%-ánál csak egy B alegység volt látható, míg a molekulák 19%-ánál a globuláris mag részhez egyáltalán nem kapcsolódott B-alegység (**2. ábra**). Ez a strukturális diverzitás a B alegységek FXIII-A₂ dimerről történő disszociációja és asszociációja közötti egyensúlyi állapotokra utal.



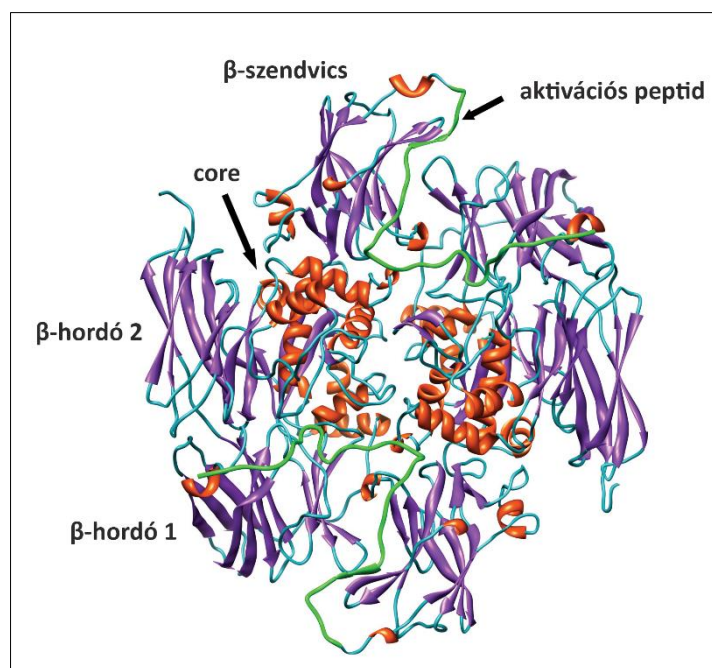
2. ábra. Az inaktív pFXIII AFM képe, valamint morfometriai jellemzése. (A) A pFXIII reprezentatív széles látószögű AFM képe. A képen globuláris alakként jelenik meg a FXIII-A₂ homodimer, melyhez egy vagy két szalagszerű B-alegység kapcsolódik. (B) A különálló pFXIII molekulák három különféle szerkezeti elrendeződést mutatnak. A vizsgált molekulák 67%-ához kettő, 14%-ához egy szalagszerű B-alegység kapcsolódott, míg 19%-uk esetében egy sem. Az ábra a (17) szám alatt idézett közlemény egyik ábrája.

2.3 FXIII-A₂ röntgen krisztallográfiás struktúrája

A csontvelői eredetű sejtek által szintetizált, transzglutaminázok családjába tartozó FXIII-A egy 83 kDa tömegű, egy polipeptid láncból felépülő molekula, melyet 731 aminosav alkot. A FXIII-A az egyetlen transzglutamináz, mely dimer formában van jelen. A fehérje kilenc cisztein reziduuma közül egyik sem képez diszulfid kötést. A 314-es pozícióban lévő ciszteinnek (Cys314) kiemelkedő szerepe van, ugyanis a molekula aktív centrumában helyezkedik el (18). A molekula hat potenciális N-glikozilációs hellyel rendelkezik, azonban szénhidrátot nem detektáltak rajta (19).

A katalitikus FXIII-A szerkezete jól karakterizált. A rekombináns FXIII-A₂ röntgen krisztallográfiával kapott háromdimenziós szerkezetét először Yee és munkatársai írták le 29 évvel ezelőtt (19). Mind a zimogén, mind az aktivált FXIII-A-t kikristályosították (15, 20), ezáltal mindkét szerkezeti forma ismertté vált. A krisztallográfiás vizsgálatok alapján elmondható, hogy a FXIII-A öt szerkezeti doménből áll, melyek az alábbi aminosav

reziduumokat tartalmazzák: aktivációs peptid (AP-FXIII): 1-37; β -szendvics domén: 38-184; katalitikus központi „core” domén: 185-515; β -hordó domén 1: 516-628; β -hordó domén 2: 629-731. A core domén β -redőket és hélixeket is tartalmaz, míg a szendvics és hordó domének szinte kizárólag β -redőkből állnak. A katalitikus core domén tartalmazza a katalitikus triádot (Cys314, His373 és a Asp396). Az összes rendelkezésre álló atomi felbontású három-dimenziós szerkezetben az aktív centrum ciszteinje (Cys314) el van fedve a AP-FXIII és a Tyr560 oldallánc által, mely utóbbi a β -hordó domén 1-en helyezkedik el (18). Ezért a AP-FXIII trombin által történő lehasítása és a Tyr560 elmozdulása szükséges az enzimaktivitás eléréséhez. Az oldószertől elzárt felület túlnyomó részt negatív töltésű, egyetértésben a FXIII-A nettó negatív töltésével. Figyelemre méltó kivétel a trombin hasítási helye, az Arg37 körüli erősen pozitív potenciál, amely illeszkedik a trombin katalitikus helyének negatív potenciáljához (18). A FXIII-A szerkezeti doménjeit a **(3. ábra.)** szemlélteti.

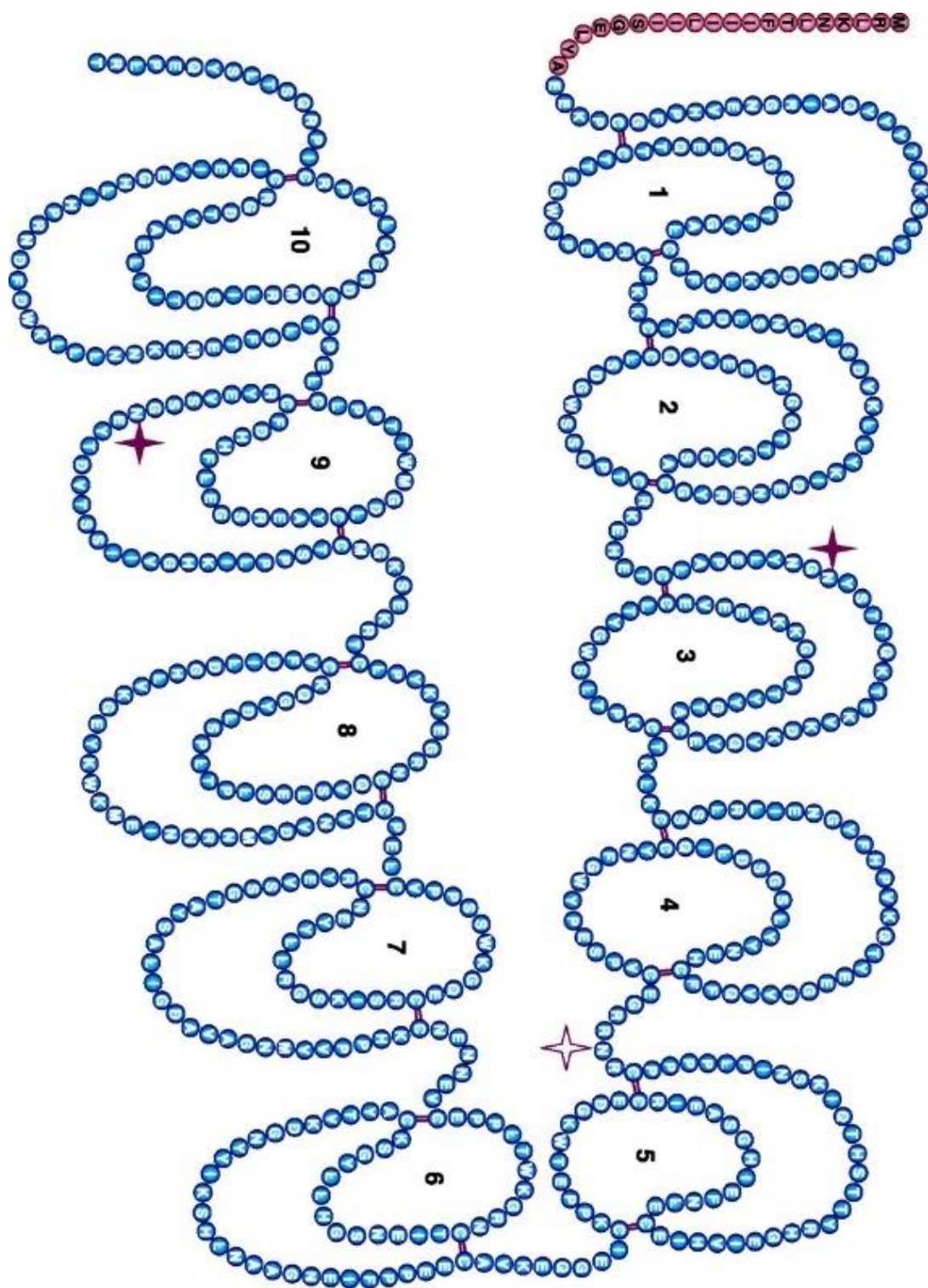


3. ábra. Szalag modell ábrázolás az inaktív FXIII-A₂ homodimer röntgen krisztallográfiás szerkezete alapján. A szalagok a másodlagos szerkezet alapján vannak színezve (β -szalagok, hélixek, lilával ill. narancssárgával vannak jelölve). A rendezetlen szerkezeti elemek és hurkok türkiz, az aktivációs peptideket világos zöld színben láthatjuk. A képek a Chimera modellező és vizualizációs szoftvercsomaggal készültek. Az ábra a (8) szám alatt idézett közlemény egyik ábrájának módosított verziója.

2.4 FXIII-B szerkezete

A FXIII-B egy glikoprotein, melyet a hepatociták szintetizálnak és szekretálnak (21, 22). Fő szerepe, hogy meghosszabbítsa a katalitikus FXIII-A alegység élettartamát a keringésben, valamint megóvjja azt a lassú nem proteolitikus aktivációtól. Tipikus mozaikfehérje, 10 tandem ismétlődő, úgynevezett sushi doménből áll, melyek mindegyikét körülbelül 60 aminosav alkotja és 2-2 diszulfid-híd tartja össze. Hasonló szerkezeti elrendeződést írtak le több mint 50 más fehérje, mint például a β 2-glikoprotein I vagy a komplement rendszer fehérjéi esetében is (23, 24). Az érett fehérje 641 aminosavból áll és 8,5% szénhidrátot tartalmaz, molekulatömege 80 kDa. 3 potenciális N-glikozilációs hellyel rendelkezik, melyből azonban csak kettő, az Asn142 és Asn525 glikozilált (25, 26). A FXIII-B szerkezetét és N-glikozilációs helyeit az (5. ábra) szemlélteti.

A plazmában a FXIII-B feleslegben található, kb. 50%-a szabad, nem komplex formában kering (27). A FXIII-A alegységgel ellentétben atomszerkezeti adatok nem állnak rendelkezésre, azonban transzmissziós elektronmikroszkópiával végzett vizsgálatokban (10), az izolált FXIII-B alegységet vékony, felxibilis kb. 30 nm hosszú és 2-3 nm széles szálakként írták le. A szedimentációs analízis alapján a szabad B-alegységek monomerként vannak jelen, azonban ennek ellentmondó eredményeket is közöltek (12). Tisztított FXIII-B-vel végzett gélfiltrációs és elektroforetikus kísérletekben a FXIII-B dimer formában való jelenlétét erősítették meg (28). Ezt 2008-ban egy másik kutatócsoport, rekombináns FXIII-B gélfiltrációs vizsgálatával szintén megerősítette (11). Utóbbi tanulmányban a FXIII-B dimerizációját vizsgálták, oly módon, hogy a molekulát N- és C-terminálisan is trunkálták. A kapott eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a 4. és 9. sushi domének esszenciálisak a dimerizációhoz. Annak eldöntésére, hogy ezek a tisztított fehérjékkel kapott eredmények extrapolálhatók-e a plazmában lévő szabad FXIII-B alegységre még további vizsgálatok szükségesek.



4. ábra. A FXIII-B alegység sematikus struktúrája. A FXIII-B-alegység 10 sushi doménből áll, melyek 2-2 diszulfid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A leader (vezető) szekvenciát alkotó aminosavakat lila színnel, míg az érett fehérjében lévőket kékkel jelölték. A 3. és 9. sushi doménon megjelenő színes csillagok az N-glikozilációs helyeket jelölik Asn142 és Asn525 pozíciókban. Az üres csillag pedig azt a potenciális glikozilációs helyet mutatja, melyhez nem kapcsolódik szénhidrát. Az ábra a (8) szám alatt idézett közlemény egyik ábrája.

Egy nemrég megjelent tanulmányban, melyben AFM technikát használtak, azt találták, hogy a heterotetramer FXIII komplexben a FXIII-B alegységek monomer formában vannak jelen és a FXIII-A alegységgel való kötődésben feltehetően az 1. 2. és 3. sushi domének vehetnek részt. A FXIII trombinnal és Ca^{2+} -mal történő aktiválása után a B-alegységek disszociáltak és B₂-homodimereket képeztek, míg az aktiválódott FXIII-A₂ homodimerből álló globuláris része FXIII-A monomerekké esett szét (17).

2.5 A FXIII aktivációja

A pFXIII aktivációja a véralvadási kaszkád utolsó fázisában trombin és Ca^{2+} együttes hatására következik be. Azonban a trombin nem az egyetlen szerin proteáz, amely képes hasítani és Ca^{2+} jelenlétében aktiválni a FXIII-t. Proteázok, köztük a batroxobin marajoensis (29), a trombocitin (30), a tripszin (31) és az aktivált X-es faktor (FXa) esetében is (32) beszámoltak arról, hogy képesek aktiválni a FXIII-at. Bár ezen enzimek hasítási helyét még nem azonosították, szubsztrát specifitásuk és a hasított FXIII-A Mr értéke alapján feltételezhető, hogy ugyanazt a Arg37-Gly38 peptidkötést hasítják el, mint a trombin. Egy 2008-as tanulmányban kimutatták, hogy a humán neutrofil elasztáz a FXIII-A N-terminális részén lévő Val39-Asn40 közötti peptidkötést hasítva, mind a pFXIII-at mind a cFXIII-at képes aktiválni, a trombin által aktivált FXIII TG aktivitásának 50%-át eredményezve (33). A pFXIII proteolitikus aktivációjának kezdeti szakaszában, a trombin az Arg37-Gly38 közötti peptidkötés hidrolízise révén lehasítja az aktivációs peptidet a FXIII-A N-terminális részéről (34, 35). Ca^{2+} jelenlétében a gátló B-alegységek disszociálnak, amely előfeltétel a trunkált FXIII-A dimer (FXIII-A₂') enzimatisan aktív konformációjának eléréséhez (FXIII-A₂*). Érdekes módon a teljes aktiváció eléréséhez elegendő a FXIII-A₂ dimer egyik alegységéről lehasítani a AP-FXIII-et, azaz a hasított és hasítatlan A alegységekből álló dimer (FXIII-A*A°) rendelkezik a teljes enzimatisus aktivitással (13).

Korábbi tanulmányok eredményei egyértelműen azt sugallják, hogy a FXIII-A₂B₂, valamint a FXIII-A₂ Ca^{2+} -mal és trombinnal történő aktivációját követően a két aktív alegység (FXIII-A₂*) egymáshoz kötötten, dimer formában marad és így fejt ki transzglutamináz aktivitását. Ma már ez az elmélet megoldni látszik. A FXIII-A₂ monomerekké történő disszociációját mind a proteolitikus, mind a nem proteolitikus aktiváció esetén analitikai ultracentrifugálással alátámasztották (14). Egy nemrég megjelent közleményben AFM technika alkalmazásával arra az eredményre jutottak, hogy a FXIII-A* monomer formában van jelen (17). A

molekulamodellőzés eredményei szintén a FXIII-A* monomer szerkezetét támasztják alá (16, 28). Az összes többi aktív transzglutamináz monomer szerkezete szintén összhangban van ezekkel a megállapításokkal (15, 18).

Fiziológiás körülmények esetén a pFXIII általában a trombin és Ca^{2+} összehangolt működése eredményeként aktiválódik, azonban a proteolitikus hasítás nem feltétlenül szükséges a tetramer molekula aktiválásához (8). Nem fiziológiás körülmények között, azaz extrém magas Ca^{2+} koncentráció esetén (100 mM) az A_2B_2 komplex disszociál és a hasítatlan FXIII-A₂ aktív TG-zá alakul (FXIII-A₂^o) (36, 37). Magas ionerőnél (pl. fiziológiás NaCl koncentráció esetén) jóval alacsonyabb Ca^{2+} koncentráció is elegendő az aktív konformáció kialakításához (38). Extracelluláris körülmények között a cFXIII trombinnal és Ca^{2+} -mal a pFXIII-mal azonos módon aktiválódik, leszámítva a FXIII-B disszociációját. Intracellulárisan azonban a B alegységgel nem rendelkező cFXIII nem igényel proteolitikus hasítást az aktivációjához (39, 40). Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció sejtaktiváció során bekövetkező emelkedése elegendő, hogy kialakuljon az enzimatikusan aktív konfiguráció (FXIII-A₂^o). A nem proteolitikus úton történő aktiváció a cFXIII fiziológiás aktivációját képviseli a vérlemezékben (39, 40) és nagy valószínűséggel a monocitákban is (41).

2.6 Az aktivált FXIII működése

A FXIIIa a transzglutaminázok (TG) családjába tartozik. A TG-ok, acil transzfer reakciókat katalizálnak, amely két fő lépésből állnak (42). Először a peptid-kötött glutamin szubsztrát bináris komplexet képez az enzimmel. Ammónia képződéssel járó tioészter kötés jön létre a glutamin γ -karboxamid csoportja és az aktív centrum ciszteinje között. Ezt követően egy nukleofil szubsztitúciós reakcióban a primer amin izopeptid kötésen keresztül hozzákapcsolódik a glutamin donor peptid szubsztráthoz, eközben az enzim aktív centruma szabadabbá válik. A FXIIIa által katalizált acil-transzfer reakcióban egy peptidláncban található glutamin γ -karboxamid csoportja az acil donor és egy primer amin az acil akceptor (43, 44). Ha a szubsztrátként szolgáló primer amin egy peptid láncban lévő lizin ϵ -amino csoportja, akkor a reakció eredménye két peptidlánc kovalens keresztkötése. A létrejött kötés, egy a peptid láncra merőleges peptid kötés, melyet izopeptid kötésnek nevezünk. A FXIIIa szubsztrát specifitása sokkal szűkebb, mint a szöveti transzglutaminázé (TG2). Elsődleges fiziológiás szubsztrátjai a fibrin és az α_2 -plazmin inhibitor (α_2 -PI) (45, 46). Huszonhárom további FXIIIa fehérje szubsztrátot találunk a TRANSDAB adatbázisban. (<http://genomics.dote.hu/wiki/>). A

szubsztrát fehérjék az alábbi csoportokra oszthatóak: véralvadási faktorok, a fibrinolitikus rendszer komponensei, adhezív és extracelluláris mátrix fehérjék, intracelluláris citoskeletális fehérjék és egyéb kategóriába tartozó fehérjék. Ezek közül csak néhány fehérjével való FXIIIa kölcsönhatásnak van fiziológias jelentősége (8).

A FXIII hemosztázisban betöltött szerepe jelentős. A fibrin α - és γ -láncok FXIII által történő keresztbe kötése fibrin γ -lánc dimerek és nagy molekulásúlyú α -lánc polimerek kialakulását eredményezi, melynek köszönhetően az alvadék mechanikailag sokkal stabilabbá válik. Ezen kívül a FXIIIa részt vesz a fibrinolízis gátlásában is az alábbi módon:

1.) A fibrin α -láncok keresztkötésével nagy molekulatömegű α -lánc polimerek keletkeznek, amelyek ellenállóbbá teszik az alvadékot a fibrinolízissel szemben.

2.) A fibrinolízis fő inhibitorának, az α_2 -PI-nak, valamint egyéb plazmakomponenseknek a fibrinhez való kötésével megakadályozza a fibrin alvadék fibrinolitikus rendszer által történő gyors eliminációját (8).

Más kölcsönhatások is ismertek a FXIIIa és a fibrinolitikus rendszer komponensei között. Kimutatták, hogy az urokináz plazminogén aktivátor (uPA) inhibitorát, a plazminogén aktivátor inhibitor-2-t (PAI-2) a FXIIIa szintén keresztköti a fibrinogénhez (47, 48). A trombin aktiválható fibrinolízis inhibitor (TAFI) szintén fontos szerepet játszik a fibrinolízis szabályozásában (49). A TAFI-t szintén azonosították mint FXIIIa szubsztrát (50), melynek polimerizációja és fibrinhez való keresztkötsége szintén a FXIIIa-on keresztül valósul meg. Összességében elmondható, hogy a FXIIIa által katalizált keresztkötések kialakulása döntő fontosságú a véralvadék mechanikus stabilitása és fibrinolízissel szemben való ellenállása szempontjából és a veleszületett FXIII hiány vérzési rendellenességekkel társul (51). Azonban a FXIII emelkedett aktivitása miatt, a túlzott mértékben keresztkött fibrinláncok, valamint az egyéb fehérjék és a fibrinláncok között kialakuló nagymértékű keresztkötések gátolhatják a trombus megfelelő eliminációját (52, 53).

A FXIII-B alegység védő/stabilizáló szerepével jelentősen meghosszabbítja a FXIII-A félélet idejét a keringésben (54). A FXIII-B ezen funkciója összefüggésben lehet a FXIII-A lassú progresszív aktivációjának gátlásával, amely plazmatikus körülmények között FXIII-B hiány esetén előfordulhat (38). FXIII-B-hiányban szenvedő betegek esetén a plazma FXIII-A₂-koncentrációja jelentősen csökken, így ezek a betegek enyhe vérzéses tüneteket mutatnak (54, 55).

Izoelektromos fókuszálással végzett kísérletek alapján három fő populációhoz kapcsolódó fenotípust írtak le FXIII-B*1, FXIII-B*2 és FXIII-B*3, mely az európai, afrikai és ázsiai populációkra jellemző (8). Egy tanulmányban melyben PCR-SSCP-vel vizsgálták a FXIII-B génjét, három gyakori nukleotid polimorfizmust azonosítottak: A8259G, C29470T és A30899G. Ezek közül az A8259G His95Arg cserét eredményez a második sushi doménben (56). Az Arg95 hordozók gyakorisága az egészséges kaukázusi populációban 15%, az afrikaiak körében gyakoribb, az ázsiai populációból pedig hiányzik (56, 57). Egy 444 személy bevonásával végzett tanulmányban, azt találták, hogy a polimorfizmus nem befolyásolja FXIII-A, FXIII-B vagy pFXIII antigén szinteket és a FXIII aktivitásban sem találtak különbséget. Az Arg allélel rendelkező személyek plazmájában fokozott alegység disszociációt írtak le. Azonban a FXIII-A-FXIII-B kölcsönhatás K_d értékében nem volt különbség a His95 és Arg95 tisztított FXIII-B variánsok esetén (56).

2009-ben egy újabb polimorfizmusról számoltak be, mely az intron K 29756-os pozíciójában létrejövő C-G nukleotid csere következtében alternatív splicingot eredményez (57, 58). Ennek következménye, hogy az utolsó 10 aminosav kicserélődik egy 25 aminosavból álló alternatív szekvenciára. A variáns szekvenciája két további lizint és egy glutaminsavat tartalmaz. Ezek a töltéssel rendelkező aminosavak a fehérje izoelektromos pontjának megváltozását okozzák. A polimorfizmus jellemzően az ázsiai populációban fordul elő, gyakorisága a kaukázusi populációban kisebb, és úgy tűnik az afrikaiak körében nincs jelen (8). Habár azt várnánk, hogy az ilyen mélyreható szerkezeti változás, megváltoztatja a molekula egyes biokémiai jellemzőit, a két fő FXIII-B polimorfizmus biokémiai következményeit csak részlegesen tárták fel.

Egy 2015-ben 237 kontroll és 450 koszorúér-betegségben szenvedő (coronary artery disease; CAD) beteg bevonásával végzett tanulmányban, azt találták, hogy a FXIII-B His95Arg polimorfizmus nem befolyásolja a koronária ateroszklerózis (coronary atherosclerosis; CAS) vagy a miokardiális infarktus (MI) kockázatát, míg a FXIII-B intron K nt29756 G allél jelenléte szignifikáns védelmet nyújt a CAS-sal és MI-vel szemben azokban a betegekben, akiknek a fibrinogén szintje a felső harmadban van. Érdekes módon az intron K nt29756 G allél védő hatása kizárólag a FXIII-A Leu34 allél jelenlétében érvényesült és a két polimorfizmus közötti szinergizmust is igazolták. Az intron K nt29756 G allél hordozókban szignifikánsan alacsonyabb plazma FXIII aktivitás és antigén értékeket mértek. Mivel az alacsony FXIII szint szignifikáns védelmet nyújt az MI-vel szemben, feltételezhető, hogy a kombinált, FXIII-B

intron K nt29756 G és FXIII-A Leu34 allélt hordozók esetében a védő hatás a csökkent FXIII szintekkel van összefüggésben (59).

A FXIIIA₂B₂ komplex kialakulása, azaz a FXIII-A és a FXIII-B között létrejövő kapcsolat mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Több tanulmány is megerősíti azt a felvetést miszerint a FXIII-B N-terminális része felelős a FXIII-A alegységgel való kötődésért. Souri és mtsai trunkált, rekombináns FXIII-B alegységek alkalmazásával arra a következtetésre jutottak, hogy feltehetően az 1. sushi domén felelős a FXIII-B alegységek FXIII-A₂-höz történő kötődéséért (11). Katona és mtsai. előállítottak egy, a FXIII-B 2. sushi doménjén található peptid szakasz ellenes monoklonális antitestet, mely reagált a szabad FXIII-B-vel és megakadályozta a FXIII-A-val történő komplex képződését (60). Egy újonnan megjelenet tanulmányban AFM technikát alkalmazva, szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az első két sushi domén játszhat szerepet a komplex kialakulásában (17). Leírták továbbá, hogy a 4. és 9. sushi domének megléte szükséges a FXIII-B dimerek kialakulásához (11), azonban azt nem vizsgálták, hogy a FXIII-B 3. és 9. sushi doménjein jelenlévő N-glikánoknak van-e szerepe a dimer képződésben. Tisztázatlan az N-glikánoknak a FXIIIA₂B₂ komplex kialakulásában, a fehérje félélet idejének meghatározásában játszott szerepe is. Mindemellett a FXIII-B-hez kapcsolódó N-glikánok szerkezete is feltáratlan.

2.7 A FXIII deficiencia osztályozása, klinikai tünetei

A FXIII deficienciát és klinikai tüneteit először 1960-ban írták le (61) és azóta már több mint 500 FXIII-hiányos esetet azonosítottak világszerte. A FXIII hiány diagnózisának felismerése speciális jártasságot igényel, ugyanis a hagyományos véralvadási szűrőtesztek, mint a protrombin idő (PI), az aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) vagy a trombin idő (TI) nem jelzik.

A FXIII hiánynak öröklött és szerzett formája egyaránt ismert, melyek mind a FXIII-A mind FXIII-B alegységeket érinthetik.

Az öröklött FXIII-A hiány egy rendkívül ritka kórkép, mely autoszomális recesszív módon öröklődik. Gyakorisága az általános populációban 1:2 millióhoz (62, 63). Előfordulása akár 10-20-szor is magasabb azokban az országokban, ahol elterjedt a rokonházasság. Ahol a rokonházasság mellett alapító hatás is érvényesül, elterjedése még gyakoribb, például Iránban (63-65). Az I-es típusú hiány a kvantitatív defektust jelenti, melyet a csökkent fehérjeszintézis

jellemez, ezzel szemben a II-es típusú hiányban a funkcionálisan hibás FXIII szintetizálódik normál vagy közel normál koncentrációban. Megkülönböztetünk súlyos, $<0,05$ IU/ml, mérsékelt $0,05-0,3$ IU/ml és enyhe $0,3-0,5$ IU/ml FXIII hiányt (66, 67). Mivel a $0,03-0,1$ IU/ml FXIII szint már elegendő a spontán hemorrágiás történések kivédéséhez, ezért valójában a legtöbb súlyosan vérzékeny FXIII hiányos beteg FXIII szintje $0,01$ IU/ml (1%) alatt van. A kezeletlen, súlyos veleszületett FXIII-A hiány az esetek döntő többségében súlyos vérzéses tünetekkel jár együtt, mint az intrakraniális vérzés, amely az esetek 30%-ában jelentkezik és halálozás leggyakoribb okaként szerepel. A FXIII-A deficiencia legjellemzőbb tünete a születést követő néhány napban fellépő köldökcsomk vérzés, mely az esetek 80%-ában megfigyelhető (63). Az izom és szubkután lágyyszöveti vérzések szintén a súlyos szövődmények közé tartoznak. Száj- és ínyvérzés az esetek 30%-ában fordul elő (68, 69). Az izomban és az ízületekben fellépő vérzések előzetes trauma nélkül, kisebb trauma, vagy megerőltető gyakorlatok végzését követően szintén viszonylag nagy gyakorisággal fordulnak elő (69). A FXIII-A deficiencia gyakran társul károsodott sebgyógyulással, terhes nők esetében pedig a magzat elvesztéshez vezethet. Az ismételt spontán vetélések, még abban az esetben is, ha csak enyhe vérzéses tünetekkel társul, szükségessé teszik a FXIII-A hiány kivizsgálását (70). Hangsúlyozni kell, hogy az életveszélyes, esetenként halálos kimenetelű vérzéses szövődmények, hosszú vérzéses tünet nélküli periódus után váratlanul jelentkezhetnek ezért, ha a súlyos veleszületett FXIII hiány diagnózisa megerősítést nyer, a profilaktikus pótló terápia nélkülözhetetlen.

A veleszületett FXIII-B deficiencia viszonylag ritkán okoz vérzékenységgel járó tüneteket. Ezekben a betegekben a FXIII-B teljesen hiányzik, míg a FXIII-A aegység szignifikánsan, a normál érték 5-40%-ára csökken a plazmában. A vérlemezkékben lévő FXIII-A szintje azonban normál (71). A FXIII-A plazma szintjének jelentős csökkenése, jól mutatja a FXIII-B védő, stabilizáló szerepét, ugyanis FXIII-B hiányában a FXIII-A instabil és viszonylag gyorsabban eltűnik a keringésből (55, 72). A vérzéses tünetek a FXIII-A hiánnyal összehasonlítva jóval enyhébbek. Kevesebb mint 10 esetben írtak le jelentősebb hemorrágiás tüneteket.

A szerzett FXIII hiány két fő csoportba sorolható. Az egyik csoportba tartoznak a FXIII ellen termelődő autoantitestek következtében kialakuló esetek, a másik csoportba pedig azok az esetek, melyben autoantitestek megjelenése nélkül, valamilyen oknál fogva szignifikánsan csökken a FXIII szint. Számos kórképben beszámoltak szignifikánsan csökkent FXIII szintekről, ilyen a nagy műtéti beavatkozások, tüdőembólia, stroke, leukémia, Crohn-betegség,

fekélyes vastagbélgyulladás, Henoch Schönlein purpura, májcirrózis, szepszis, és disszeminált intravaszkuláris koaguláció. Ezekben a szerzett FXIII hiányos állapotokban a FXIII-A alegység szintje 20-70%-ra csökken, melynek hátterében vagy csökkent szintézis vagy fokozott felhasználás áll (70).

2.8 FXIII ellenes antitestek

A FXIII ellenes antitestek egyaránt lehetnek allo- és autoantitesteket. Megjelenésük a terápia szempontjából óriási kihívást jelent, ugyanis többnyire nehezen uralható vérzésekkel járnak együtt. Az alloantitestek kialakulása meglehetősen ritka, a pótlóterápia kapcsán jelenhetnek meg veleszületett FXIII hiányos betegekben. Az alloantitest jelenlétére a korábban hatékony FXIII koncentráttal történő profilaxis hatástalansága utal. Ez idáig négy olyan esetről számolt be a szakirodalom, ahol FXIII-A ellenes alloantitestek jelentek meg. Mind a négy beteg esetében súlyos vérzéses tüneteket észleltek, amiket rendkívül nehéz volt uralni (73-76). Az autoantitestek gyakran valamilyen autoimmun (77) vagy daganatos (78) kórképhez társulnak de különböző gyógyszerek (mint például: izoniazid, fenitoin, ciprofloxacin) hosszútávú alkalmazása esetén is megjelenhetnek (79). Különösen idős betegeknél az autoantitestek mindenféle kórelőzmény nélkül, idiopátiásan is kialakulhatnak (80), súlyos szerzett FXIII hiányt okozva. A megjelenő antitest általában IgG típusú (81). A vérzések leggyakrabban intramuszkulárisan, szubkután és intraperitoneálisan jelentkeznek, szemben az öröklött FXIII hiánnyal, ahol az intrakraniális vérzés a gyakoribb.

A FXIII ellenes antitestek lehetnek neutralizáló vagy nem neutralizáló antitestek (82, 83). A neutralizáló FXIII-A ellenes antitestek esetében a FXIII aktivitás alacsony, de a FXIII-A antigén szint normális. A neutralizáló antitestek gátolhatják a trombin és/vagy Ca^{2+} -indukált FXIII aktivációt (84) (I. típus), a már aktivált FXIII transzglutamináz aktivitását (78, 85-87) (II. típus) és a FXIIIa-fibrin közötti interakciót (III. típus). Az antitest összetett hatással is bírhat (IV. típus). Az antitestek alcsoportba való besorolását az **(1. táblázat)** mutatja (76). A nem neutralizáló antitestek nem gátolják az aktivációt vagy aktivitást, azonban immunkomplexet képeznek a fehérjével és ezáltal fokozzák a keringésből történő kiürülését (88). A kombinált csoportba tartozó antitestek a FXIII-hoz kötődnek és felgyorsítják annak eliminációját a keringésből, valamint gátolják a FXIII aktivációját/aktivitását. Ebben az esetben mind az aktivitás, mind az antigén szint csökkent. A nem neutralizáló antitestek különböző kötődési

vizsgálatokkal detektálható például dot blot, ELISA vagy felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance; SPR) módszerekkel.

A katalitikusan inaktív FXIII-B ellenes antitesteknek nincs közvetlen gátló funkciója, ezért nem neutralizáló antitestnek minősülnek. Ezek az antitestek képesek mind szabad, mind komplexben lévő FXIII-B alegységhez kötődni és ezáltal fokozzák a FXIII keringésből történő kiürülését (82).

Alegység specifititás	Alcsoport	Hatás
FXIII-A ellenes	Neutralizáló	I-es típus: FXIII aktiváció gátlása Ia típus: Az AP-FXIII trombin által történő lehasításának gátlása Ib típus: A hasított FXIII Ca^{2+} indukálta aktivációjának gátlása II-es típus: FXIIIa gátlása III-as típus: Fibrinhez való kötődés gátlása IV-es típus: Összetett neutralizáció
	Nem-neutralizáló	Felgyorsítja a FXIII eliminációját a keringésből
	Kombinált hatású	Felgyorsítja az eliminációt és gátolja a FXIII aktivitást/aktivációt
FXIII-B ellenes	Nem-neutralizáló	Felgyorsítja a FXIII eliminációját a keringésből

1. táblázat. FXIII ellenes antitestek alcsoportba való besorolása. A táblázat a (88) szám alatt idézett közlemény egyik táblázatának módosított változata.

Autoimmun FXIII deficiencia esetén a vérzéses tünetek kezelése rendkívül nehéz. Sajnálatos módon minden erőfeszítés ellenére a halálozási arány 20-30% között van (89, 90). Tekintettel a betegség ritka előfordulására, bizonyítékokon alapuló ajánlások nem állnak rendelkezésre. Kezdeti erőfeszítésként az autoantitestek hatásának leküzdésére és a vérzés kontrolálására nagy dózisú FXIII koncentrátum (50-150 U/kg), valamint FXIII tartalmú vérkészítmények alkalmazásával próbálkoztak (89). Sajnálatos módon az inhibitor magas titerben való jelenléte miatt ez a megközelítés hatástalannak bizonyult (88).

Tekintettel a vérzés jelentős kockázatára, az autoantitestek eradikációja ajánlott. A legtöbb esettanulmányban immunszuppresszív terápiát alkalmaztak, amely kortikoszteroidok és/vagy ciklofoszfamid alkalmazását jelentette (79, 89, 91, 92). Beszámoltak sikeres kezelésekről,

melynek során rituximabot, cyclosporint és intravénásan adott immunglobulint alkalmaztak (79, 82, 89, 93-96). Rövidtávú megoldásként az autotantitestek plazmaferézis és immunadszorpció révén történő eltávolítása is szóba jöhet, ez azonban csak átmeneti megoldást jelent, ugyanis az autoantitestek szintézise továbbra is megmarad (88). Az autoimmun FXIII hiány hosszútávú kimenetele változó. Az érintett személyek körülbelül 50-68%-ánál sikeresen el tudták hagyni az immunszuppresszív terápiát, visszatérő vérzéses események kialakulása nélkül (89, 92). A többi betegben ismételten megjelentek az autoantitestek vagy az immunszuppresszív kezelés ellenére sem tűntek el a keringésből (91).

2.9 FXIII szint változásai egyes kórképekben

A XIII-as véralvadási faktor hemosztázisban betöltött kulcsfontosságú szerepét jól mutatja, hogy hiányában vérzéses komplikációk lépnek fel, míg megemelkedett szintje, fokozott trombózis rizikóval jár együtt (97, 98). Több tanulmányban igazolták, hogy a FXIII egy multifunkcionális fehérje. A hemosztázisban betöltött funkciója mellett létfontosságú a terhesség megtartásában, de a sebgyógyulásban, és az angiogenesis folyamatában betöltött szerepe is jelentős (8, 99-103). Figyelembe véve a FXIII szerepét a fibrin szerkezet kialakításában és a fibrinolízis szabályozásában nem meglepő, hogy a szívkoszorúér-betegséggel és más aterotrombotikus megbetegedésekkel való összefüggése intenzíven tanulmányozott (104). Kimutatták, hogy az emelkedett FXIII szint növeli az MI, a CAS és a perifériás artériás betegség (peripheral artery disease; PAD) kockázatát nőkben, férfiaknál azonban ez nem volt megfigyelhető (105, 106). A FXIII-A öt aminosav cserét eredményező polimorfizmusa közül a FXIII-A p.Val34Leu (c.103G> T, rs5985) polimorfizmus hatását vizsgálták intenzíven. Ez a mutáció növeli a FXIII aktiváció sebességét (107-109), és a fibrinháló szerkezetét is befolyásolja (108); utóbbi hatást a fibrinogén koncentráció modulálja (110). Az első tanulmányban melyben a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus és a CAD közötti összefüggést vizsgálták, kimutatták a Leu34 allél védő hatását a MI-vel szemben (111). A Leu34 allél CAD-vel szembeni tényleges védő hatását, a témában született eredmények metaanalízisével bizonyították (112).

A FXIII-B alegységet érintő p.His95Arg polimorfizmust a vénás tromboembólia (VTE) rizikó faktoraként írták le (56). Az Arg95 allél fokozza a mortalitást az artériás eredetű cerebrális iszkémia után (113). Kimutatták, hogy az Arg95 allél homozigóta formában való

megjelenése csökkenti a nem fatális MI kockázatát posztmenopauzás nőknél (114). Egy másik tanulmányban az találták, hogy a FXIII-B p.His95Arg polimorfizmus nem befolyásolta a CAS vagy MI kockázatát, míg a FXIII-B egy másik polimorfizmusa, az intron K nt29756 G allél jelentős védelmet nyújt a CAS-sal és MI-vel szemben, azoknál a betegeknél, akiknek a fibrinogén szintje a felső harmadban volt. Érdekes módon az intron K nt29756 G allél védő hatása csak a FXIII-A Leu34 allél jelenlétében érvényesült. Az intron K nt29756 G allél hordozók jelentősen alacsonyabb FXIII aktivitás és antigén szintekkel rendelkeztek (59).

Kóros FXIII szintet és/vagy aktivitást találtak leukémiás és szolid tumoros betegekben. A sejtek FXIII-A₂ expressziója szignifikánsan emelkedett akut mielomonocitás leukémiában (AMML-M4) és akut monocitás leukémiában (AML-M5) szenvedő betegeknél. Nem kissejtes tüdőrákban (non small cell lung carcinoma; NSCLC) szenvedő betegek esetében kimutatták, hogy az előrehaladott stádiumban lévők FXIII aktivitás értékei magasabbak voltak, mint a korai stádiumú vagy egészséges kontroll egyéneké (115).

Mára számos tanulmány alátámasztotta, hogy a végstádiumú vesebetegség (end stage renal disease; ESRD) hiperkoagulábilis állapotnak tekintendő. Egy 1997-ben megjelent tanulmányban szignifikánsan magasabb FXIII szintet találtak a peritoneális dialízisben részesülő betegek plazma mintáiban a kontroll csoporthoz viszonyítva (116). Egy másik tanulmányban a nefrózisos betegekben szignifikánsan emelkedett FXIII szinteket találtak (117). Krónikus vesebetegek, konzervatív terápiában részesülő krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek, hemodializált urémiás betegek és akut veseelégtelenségben szenvedő betegek plazma FXIII szintjét vizsgálva azt találták, hogy az első 3 csoportban szignifikánsan emelkedett értékek mérhetők, akut veseelégtelenségben viszont a FXIII szintje jelentősen csökkent (118). A témában eddig született eredmények alapján elmondható, hogy a trombózis a krónikus veseelégtelen betegek morbiditásának és mortalitásának egy fontos tényezője. Az emelkedett FXIII szint fokozhatja a trombotikus események kockázatát, azonban ennek megerősítéséhez még további vizsgálatokra van szükség.

2.10 Hemodialízis és hemodiafiltráció

ESRD-ben a vesék működése visszafordíthatatlanul károsodik, a betegeknek veseátültetésre vagy folyamatos vesepótló kezelésre van szükségük. A művese kezelés fajtáját tekintve lehet hemodialízis (HD), hemofiltráció (HF), hemodiafiltráció (HDF) vagy peritoneális dialízis (PD).

A HD eljárás során a beteg vérének egy dializátor nevű eszközön áramoltatják keresztül, amelyben egy vékony membrán választja el a vért a dializáló oldattól. A membrán segítségével diffúzió és ozmózis révén a toxinok, ionok és felesleges folyadék átjutnak a dializáló oldatba, míg a létfontosságú elemek, mint például a vörsejtek és a megfelelő mennyiségű folyadék a vérben marad.

Ezzel szemben a HDF egy kombinált tisztítási eljárás, amely diffúziót és konvekciót is alkalmaz a méreganyagok eltávolítására. A konvekció révén a nagyobb méretű molekulák is hatékonyabban távolíthatók el. A HDF alkalmazása során a diffúzió és a konvekció kombinációja segít a hatékonyabb méreganyag eltávolításban. A diffúzió által a kisebb molekulák távolítódhatnak el, míg a konvekció révén a nagyobb molekulák is sikeresen eltávolíthatók, amelyekre a diffúzió kevésbé hatékony megoldást jelent. A HDF kezelés a HD-vel összehasonlítva szignifikánsan magasabb clearance-t biztosít a kis, közép és nagy méretű anyagok, mint az urea, kreatinin, foszfát, β 2-mikroglobulin, citokinek és a homocisztein tekintetében (119-122). Ezáltal a HDF jobb tisztítási hatékonyságot kínálhat a hagyományos HD módszerekhez képest, és potenciálisan javíthatja a kezelés eredményeit és a betegek egészségi állapotát.

3 Célkitűzés

Vizsgálataink célja a FXIII szerkezetének és egyes betegségekben bekövetkezett változásainak jobb megismerése.

1) Míg a FXIII-A struktúráját és funkcióját meglehetősen alaposan ismerjük, a FXIII-B-vel kapcsolatos ismereteink eléggé hiányosak. Különösen feltűnő volt számunkra, hogy nem ismerjük a kapcsolódó glikánok összetételét, ill. azt, hogy a szénhidrát oldalláncoknak mi a funkciója. Mindezek behatóbb megismerése érdekében célkitűzésünk volt olyan deglikozilált FXIII-B-t előállítani, melynek segítségével lehetőségünk nyílt egyrészt a glikán struktúra részletes elemzésére, másrészt a deglikoziláció okozta funkcióvesztés analízisére.

1.1. Célunk volt tehát, hogy a FXIII-B alegységet natív körülmények között deglikoziláljuk, majd az így kinyert szénhidrát nélküli fehérje FXIII-A-val való kötődését tanulmányozzuk.

1.2. További céljaink közt szerepelt, hogy FXIII-B knock-out egerekben deglikozilált és natív FXIII-B alkalmazása mellett vizsgáljuk és összehasonlítsuk a pFXIII féléletidejét.

1.3. Végül szeretnénk volna tisztázni, hogy a szénhidrát komponensek szerepet játszanak-e a FXIII-B dimer képződésben.

2) A FXIII hemosztázisban és egyéb fiziológiás folyamatokban játszott szerepének megismeréséhez lényegesen hozzájárult a FXIII hiányos betegek tanulmányozása, ami emellett természetesen hozzájárult a betegség diagnosztikájának, preventív és pótló terápiájának a fejlődéséhez is. Francia kollaborációs partnerek felkérésére lehetőségünk nyílt egy olyan autoantitest okozta FXIII hiányos beteg vizsgálatára, amely új ismeretekkel gazdagította a FXIII ellenes antitestek patológiás jelentőségét leíró irodalmat.

2.1. Az antitest titer meghatározására szolgáló Nijmegen-Bethesda módszer mellett, a farmakológiában használt 50%-os gátlást (IC_{50}) meghatározó módszert is alkalmaztuk az antitest okozta gátlás erősségének mérésére.

2.2. Elvégeztük a betegben megjelenő antitest pontos alosztályba sorolását.

2.3. További módszertani újításként felületi plazmon rezonancia SPR technikával meghatároztuk az antitest FXIII-A alegységhez való kötődésének affinitását.

3) A FXIII szerepet játszhat egyes nem primeren hemosztázis rendellenesség tüneteinek kialakulásában. Mivel a végstádiumú vesebetegekben gyakoriak a trombohemorrágiás komplikációk és hemodialízissal történő krónikus kezelésük befolyásolhatja a hemosztázis működését, FXIII-mal kapcsolatos vizsgálatainkat erre a betegcsoportra is kiterjesztettük. E vizsgálatokat a fibrinogén szintek meghatározásával is kiegészítettük.

3.1. A vizsgált alvadási paraméterek követése a dialízis időtartama alatt, valamint a hemodiafiltrációs (HDF) és hemodialízis (HD) kezelések összehasonlítása a vizsgált paraméterek tekintetében.

4 Betegek és módszerek

4.1 FXIII-B alegység totál glikán profiljának vizsgálata

4.1.1 FXIII-B preparálás

A tisztított FXIII-B-t egészséges, önkéntes véradók plazmájából intézetünk laboratóriumában állítottuk elő, Lóránd és mtsai., valamint Chung és mtsai. módszerének alapján (12, 123). A leírt módszer szerint ismételt fagyasztás-olvasztás hatására a FXIII-A leválik a komplexről, így a FXIII-B kromatográfiás eljárással tovább tisztítható. Intézetünkben erre a célra a gyors fehérje-folyadékkromatográfiás (fast protein liquid chromatography; FPLC) technikát használtuk.

4.1.2 FXIII-B szénhidrát komponensének detektálása

A FXIII-B szénhidrát komponensét Pierce Glycoprotein Staining Kit (ThermoFisher scientific) segítségével detektáltuk. Ez az eljárás a perjódsav-Schiff (PAS) reakción alapuló, egyszerű, gyors és érzékeny kolorimetriás módszer, mely glikozilált fehérjék festésére alkalmas poliakrilamid gélben és nitrocellulóz membránon egyaránt. A festést minden esetben SDS-

PAGE-t követően 10%-os gélben végeztük el. Pozitív kontrollként tormaperoxidázt, negatív kontrollként szójabab tripszin inhibitort használtunk. Az elektroforézist követően a gél 50% etanol, 5% ecetsav oldatban 30 percig fixáltuk, majd 2-szer mostuk 100 ml 3%-os ecetsavban 10 percig. Utána a gél 25 ml oxidáló reagensbe helyeztük 15 percig, majd ismételt mosási lépés következett 100 ml 3%-os ecetsavban 3 x 5 percig. Ezt követően a gél 25 ml glikoproteint festő reagens-be helyeztük 15 percig, melyet 25 ml redukáló reagens követett, mellyel 5 percig inkubáltuk. A szénhidrát komponensek magenta színnel váltak láthatóvá. A festést követően a gél a háttér eltüntetése céljából 3%-os ecetsavban majd desztillált H₂O-ban mostuk.

4.1.3 FXIII-B deglikozilációja natív körülmények között

A FXIII-B alegység glikán komponenseit, egy speciális, célzottan az N-glikánok eltávolítására szolgáló peptid-N4-(N-acetil-béta-glükózaminil) aszparagin amidáz enzimmel (PNGase F; 500 mU; Asparia Glycomics, San Sebastian, Spain) távolítottuk el. Ehhez 80 µg tisztított FXIII-B-t feloldottunk 50 µl, 20 mmol/l NaHCO₃ pufferben (pH 7,00), majd ezt követően hozzáadtunk 10 µl, 8,1 mU PNGase F enzimet, ami azt jelenti, hogy 10-szer magasabb koncentrációt alkalmaztunk, mint amit általában a denaturált fehérjék emésztésekor használnak. Ezt követően a reakcióelegyet egy 10 kDa-os spin filterrel ellátott csőbe (VWR, Radnor, PA) pipettáztuk és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. Másnap 100 µl HPLC tisztaságú vizet (Millipore, Darmstadt, Németország) adtunk a keverékhez és 10 percig 11270 x g-n centrifugáltuk, így a felszabadult N-glikánok átjutottak a szűrőn és a cső aljába gyűltek, ezt SpeedVac készülék (Thermo Scientific) segítségével a fluorofór jelölés előtt beszárítottuk. A szűrőn visszamaradt fehérjéket 50 µl 20 mmol/l NaHCO₃ (pH 7,00) pufferben feloldottuk és 1 µl (0,81 mU) PNGase F enzimmel 37°C -on egy éjszakán át ismét inkubáltuk. Ezt követően a fent említett lépéseket ismételve 100 µl HPLC tisztaságú vizet adtunk a keverékhez és 10 percig 11270 x g-n centrifugáltuk, így a cső aljában összegyűlt, felszabadult N-glikánokat SpeedVac készülékben beszárítottuk további fluorofór jelölés céljából.

4.1.4 FXIII-B deglikozilációja denaturáló körülmények között

A 4.1.3.-as részben leírtakkal megegyezően emésztettük a natív fehérjét, majd a visszamaradt FXIII-B-t tartalmazó fehérjéket denaturáltuk és PNGase F-fel ismételtlen megemésztettük. Ennek során a visszamaradt fehérjéket 10 µl HPLC tisztaságú vízben oldottuk és 1 µl denaturáló puffert (400 mmol/l DTT, 5% SDS) adtunk az elegyhez egy 10 kDa-os spin filteren. Ezt követően 65°C-on 10 percig inkubáltuk, majd 100 µl HPLC tisztaságú vizet adtunk a reakcióelegyhez melyet 10 percig 11270 x g-n centrifugáltunk annak érdekében, hogy a denaturáló puffer maradványait teljes egészében eltávolítsuk. A szűrőn visszamaradt FXIII-B-t tovább emésztettük, ennek érdekében 49 µl 20 mmol/l NaHCO₃ puffert (pH 7,00) és 1 µl (0,81 mU) PNGase F enzimet adtunk a fehérjéhez. A reakcióelegyet 37°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Ezt követően 100 µl HPLC tisztaságú vizet adtunk az elegyhez és a felszabadult N-glikánokat 10 perces 11270 x g-n történő centrifugálással összegyűjtöttük a cső aljában. Az így kapott mintát SpeedVac-ben beszáritottuk, majd az N-glikánokat a 4.1.5-ös részben leírtaknak megfelelően, 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsavval (8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate; APTS) jelöltük. A denaturáló körülmények között, PNGase F-fel történő emésztése során kapott eredményeket arra használtuk, hogy összehasonlítsuk a natív körülmények között történő deglikoziláció hatékonyságával, ill. eredményével.

4.1.5 N-glikánok fluorofór jelölése

Az előzetesen SpeedVac készülékben beszáritott glikán mintákhoz 6 µl 20 mmol/l APTS anionos fluoreszcens festéket (15%-os ecetsavban oldva) és 2 µl 1 mol/l NaCNBH₃-at (tetrahidrofuránban (THF) oldva) adtunk, majd az így kapott elegyet egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. A jelölt mintákat CleanSeq mágneses gyöngyök (Beckman Coulter A29154, Indianapolis, USA) segítségével tisztítottuk meg a feleslegben adott jelölőanyagtól, egy korábban már közölt, a Horváth laboratóriumban kidolgozott módszer segítségével (124). A tisztítási lépést követően a minták azonnal alkalmasak voltak kapilláris elektroforézis-lézer indukálta fluoreszcens detektálással (CE-LIF) történő vizsgálatra. Amennyiben nem került sor az azonnali analízisre a mintákat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.1.6 N-glikánok szekvenálása

A glikánok pontos, szerkezeti meghatározása szekvenálással történt. Az eljáráshoz a monoszacharidokra, valamint kötésekre specifikus exoglikozidázokra van szükség, amelyek a következők: $\alpha(2-3,6,8,9)$ -szialidáz A, a szíálsavak eltávolításához; $\alpha(1-2,3,4,6)$ -fukozidáz, a fukózok; $\beta(1-4,6)$ -galaktozidáz, a galaktózok; és $\beta(1-2,3,4,6)$ -N-acetilhexóزامинидáz, az N-acetilglükózaminok lehasításához. A szekvenálást az enzimek mátrix szerűen történő hozzáadásával végeztük, melyet a **(2. táblázat)** szemléltet. Ehhez 4 különböző reakcióelegyet állítottunk össze az alábbiak szerint: 4 μ l HPLC tisztaságú vizet és 1 μ l 50 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ puffert (pH 7,4) adtunk 5 μ l APTS jelölt N-glikán mintákhoz, majd a mátrix elrendezésnek megfelelően az első mintához csak szialidáz enzimet, a másodikhoz szialidázt és galaktozidázt, a harmadikhoz szialidázt, galaktozidázt és fukozidázt, a negyedikhez szialidázt, galaktozidázt, fukozidázt és hexóзаминидázt adtunk, mindegyiket 0,5 U mennyiségben. Ezt követően a keverékeket 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd az emésztett mintákat SpeedVac-ben beszáritottuk és CE-LIF-fel analizáltuk.

Exoglikozidáz specificitás	A	B	C	D	E
$\alpha(2-3,6,8,9)$ -szíálsav	-	+	+	+	+
$\beta(1-4,6)$ -galaktóz	-	-	+	+	+
$\alpha(1-2,3,4,6)$ -fukóz	-	-	-	+	+
$\beta(1-2,3,4,6)$ -N-acetilglükózamin	-	-	-	-	+

2. táblázat. A szekvenáláshoz használt exoglikozidázok specificitása és mátrix szerű alkalmazása a pontos glikán struktúra meghatározásához. (A) kontroll minta, csak PNGase F-fel emésztve; (B) szialidáz; (C) szialidáz + galaktozidáz; (D) szialidáz + galaktozidáz + fukozidáz; (E) szialidáz + galaktozidáz + fukozidáz + hexóзаминидáz. A táblázat a (125) szám alatt idézett közlemény egyik táblázatának módosított változata.

4.1.7 Kapilláris elektroforézis-lézer indukálta fluoreszcens detektálással

A kapilláris elektroforézissel történő analízist a P/ACE MDQ System készülékkel (SCIEX) végeztük. Az egyes glikánok identifikálására lézer indukálta fluoreszcens detektálást alkalmaztunk. A gerjesztési hullámhossz 488 nm volt, melyet Ar-ion lézer biztosított, az emittált fény detektálása egy 520 nm-es sávszűrő segítségével történt. A glikánok elválasztásához, 50 cm effektív hosszúságú (totál hossz 60 cm), 50 µm belső átmérőjű kifejezetten az N-glikánok elválasztására szolgáló (NCHO) kapillárist használtunk (SCIEX), melyet minden esetben NCHO szeparáló géllal töltöttünk fel (SCIEX). A mintákat 1 psi nyomással injektáltuk 5 másodpercig és az elválasztások fordított polaritású üzemmódban, 30 kV elektromos potenciál mellett történtek. Az adatok gyűjtése és feldolgozása a 32 Karat 9.1 szoftverrel (SCIEX) valósult meg.

4.1.8 Molekulatömeg meghatározás gélszűréssel

A natív és a deglikozilált FXIII-B gélfiltrációs analíziséhez az ÄKTA kromatográfiás rendszert használtuk (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország). A méret kizárásos kromatográfiához HiPrep™ 16/60 Sephacryl®S-300 HR oszlopot használtunk (GE-Healthcare, Chicago, IL). A kalibrációs görbéhez az alábbi fehérje standardokat alkalmaztuk: tiroglobulin (TG; 669 kDa), ferritin (F; 440 kDa), aldoláz (A; 158 kDa), konalbumin (CoA; 75 kDa), ovalbumin (O; 43 kDa) (GE-Healthcare, Chicago, IL). A standardok futtatása során az alábbi fehérje mennyiségeket használtuk: TG: 130 µg, F: 60 µg, A: 110 µg, CoA: 120 µg, O: 130 µg. A mintákat minden esetben 500 µl 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4 pufferben injektáltuk az oszlopra. A natív és deglikozilált FXIII-B-vel való mérések során minden esetben 160 µg fehérjét vittünk fel az oszlopra. Az elúció szobahőmérsékleten, 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4 pufferben, 0,5 ml/perc áramlási sebességgel ment végbe. A detektálás 214 nm-en történt.

4.1.9 F13B knock-out egérvonal létrehozása és a genotipizálási stratégia

Az F13B knock-out egereket a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben állítottuk elő. Ennek során az F13B gén kiütésére CRISPR/Cas9 technológiát használtunk oly módon, hogy inframe-stop-kodonokat juttattunk a második exonjába. A módosított gén transzlációja az első

exon transzlációs iniciációs helyéről indult, de miután az összes 669 aminosavból 29 beépült, leállt. A módosítás a Cas9 enzim révén a cr/tracr RNS-ek (IDT) által irányított kétszálú hasításon és a homológiára épülő javításon alapul, amelyhez a kívánt mutációt tartalmazó templátot egy egyszálú oligodezoxinukleotid (ssODN) templáton (IDT) biztosítottuk. A crRNS célspecifikus szekvenciája a következő volt: ATCCTTCCATTTTCCACGGT. Cas9 fehérjét (30 ng/μl), cr/tracrRNS-t (1-1 pmol/μl) és ssODN-t (15 ng/μl) mikroinjektáltunk a C57Bl/6NTac egerek megtermékenyített petéinek pronukleuszaiba. Az ssODN-templát sorrendje (a módosított bázisok félkövér és dőlt betűvel vannak szedve): CCTCTCAGGAGAACTCTATGCAGAAGAGAAACAGTGTGATTTTCCT***TAGTGAGGA*** AAATGGAAGGATTGCCCAATATTATTATACGTTTAAAAGCTTTT. A genotipizáláshoz polimeráz láncreakciót (PCR) használtunk. Először az alapító egerekből amplifikáltuk a célrégiót PCR-rel, F13B specifikus forward (TGCAAAGTGAAGATCTGCCG) és reverz (TGTAGCACCTTGGGTTTGGAG) primerekkel, és ellenőriztük a szekvenciát. A szekvenálást megismételtük az F1 generációban. Vad típusú és knock out (KO) specifikus forward primereket (AACAGTGTGATTTTCCTACCGTG és AACAGTGTGATTTTCCTTAGTG) a reverz primerekkel együtt használtuk a genetikai módosítást hordozó egerek azonosítására.

4.1.10 A deglikozilált FXIII-B clearance vizsgálata

A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta. A natív és deglikozilált FXIII-B keringésből való kiürülésének vizsgálata és összehasonlítása céljából 100 μl 300 μg/ml natív, nem deglikozilált ill. deglikozilált FXIII-B-t injektáltunk hét, illetve hat FXIII-B knock out egér farokvénájába. A deglikozilált FXIII-B előállítása a 4.1.3 részben leírtaknak megfelelően történt. Mindkét csoportban 2-2 hímnemű egér volt. A kísérletben résztvevő egerek 8-12 hetesek voltak. A nem deglikozilált és a deglikozilált FXIII-B-t kapó egerek testtömeg értékei $22,3 \pm 2,6$ ill. $22,2 \pm 2,3$ g volt. Az egerektől a FXIII-B alegységek beadását követően 1, 48 és 120 órával később izofuránnal végzett anesztézia mellett heparinizált kapillárisban, 150 μl vért vettünk a retro-orbitális sinusból. A levett vérmintákból a plazmát 1300 x g-n, 15 percig tartó centrifugálással nyertük. Az összegyűjtött plazmamintákat az analízisig -20°C-on tároltuk.

4.1.11 FXIII-B koncentráció meghatározása

A KO egerektől begyűjtött plazma mintákból a FXIII-B koncentrációját egy az intézetünkben korábban kifejlesztett, egy lépéses ELISA technikával határoztuk meg (82). Ennek során a sztreptavidinnel fedett mikrolemezeken 0,5 mol/l NaCl-ot, 0,05% Tween 20-at és 5 g/l szarvasmarha szérumalbumint (BSA) tartalmazó 0,15 mol/l (pH: 7,2) foszfát pufferrel hígított plazma mintákhoz, biotinált FXIII-B ellenes elfogó és torna-peroxidázzal (HRPO) jelzett FXIII-B ellenes detektáló monoklonális antitesteket adtunk. A két FXIII-B ellenes antitest különböző epitópok ellen irányult és a szabad, ill. komplexben lévő FXIII-B-hez egyformán kötődött. A keveréket 1 órán keresztül inkubáltuk, majd 3 x 300 μ l foszfát pufferrel történő mosást követően tetrametilbenzidint (TMB, 200 μ l, 0,1 mg/l) és 0,006%-os H_2O_2 -t tartalmazó foszfát puffert (0,05 mol/l, pH: 5) adtunk a mikrolemez vályúiba. 30 perc múlva a reakciót H_2SO_4 -gyel (2 mol/l, 50 μ l) állítottuk le és az abszorbanciát 450 nm-en iEMS Reader MF microplate készüléken (Labsystem, Budapest, Magyarország) mértük.

4.2 FXIII hiányos beteg autoantitestjének karakterizálása

4.2.1 Esetleírás

Az általunk vizsgált minták egy 67 éves francia nemzetiségű nőtől származnak, akinek kórtörténetében magas vérnyomás, kóros elhízás (súly 114 kg) és térdízületi gyulladás szerepelt. A korábban elvégzett vakbélműtét, 3 császármetszés és egy nemrégiben elvégzett szürkehályog műtétek során vérzéses komplikációk nem léptek fel. Kórelőzményében spontán vérzés nem fordult elő. A laboratóriumi vizsgálatok a kollaborációban résztvevő francia klinikusok kérésére történtek.

A beteg 2017 novemberében rövid időre kórházba került a térdébe kapott kortizon injekció miatt. A kórházi kezelése során egy minor traumát követően néhány nappal később nagyméretű muskuláris hematóma alakult ki mindkét combján (a jobb oldalon 220x97mm, a bal oldalon 195x55mm). A 8 vörösvérsejt transzfúzió ellenére, a hemoglobinja továbbra is alacsony maradt. Ebben az időszakban 45 napot töltött kórházban, melynek során a helyes diagnózist nem sikerült felállítani.

2018 januárjában orvosi konzultációra érkezett a Dijoni egyetemi kórház hemofília központjába. A kiterjesztett hemosztázis vizsgálatok során mérsékelten csökkent FXIII szintet

igazoltak a betegnél. Berichrom assay-vel (Dade, Behring Marburg, Németország) 17% FXIII aktivitást mértek. Elvégezték a FXIII mutációs génanalízisét (exonok és határoló intron régiók kétirányú szekvenálása), azonban mutációt nem detektáltak. Keveréses vizsgálatot is végeztek, melynek eredménye felvetette a FXIII ellenes antitest jelenlétét. Bethesda Nijmegen assay-vel 1,51 BU antitest titert igazoltak. Egyéb alvadási faktor defektust nem találtak. A klinikai, radiológiai és laboratóriumi vizsgálatok nem tárták fel a FXIII ellenes antitest jelenlétének okát. Nem találtak bizonyítékot más autoimmun betegségekre, fertőző betegségekre vagy neopláziára.

2018 májusában hasi fájdalom miatt komputertomográfias vizsgálatot végeztek, melynek során egy nagyméretű hematómát azonosítottak a rekeszizom jobb szárában. A FXIII szubsztitúciót 5000 IU (44 UI/kg) Fibrogammin®-nal (CSL Behring, Marburg, Németország) kezdték, majd ezt 6 órával később megismételték. A beteg FXIII aktivitás értékeit az infúzió után 30 perccel, 1- majd 2 órával levett mintáiból 17-20%-nak mérték Berichrom assay-vel. Intervenciós radiológia segítségével embolizációt végeztek a vérzés megállítása céljából. Ezen kívül a beteg naponta háromszor 1 g tranexámsavat és két vörösvérsejt transzfúziót kapott.

2018 júniusában a beteg ismét kórházba került spontán kialakult hematómákkal a rekeszizom bal szárában és a rectus abdominis izomban (45 mm x 116 mm x 65 mm). A FXIII szubsztitúció ellenére a vérzést nem tudták kontrollálni, ezért egy újabb embolizációt végeztek a vérzés megállítása céljából. A beteg 11 vérlemezke- és 4 vörösvérsejt transzfúziót kapott. Az autoantitestek felszámolása céljából az alábbi stratégiát alkalmazták: 2018 májusában a második vérzéses tünet megjelenését követően, az 1. naptól a 14. napig 1 mg/kg/nap prednizolont kapott, amelyet a 15. naptól folyamatosan csökkentettek. Emellett 0,7 g/kg immunglobulint adtak 2 egymást követő napon (1. és 2. nap) és a beteg 1 g Rituximab®-ot is kapott. A 2018. júniusában a második kórházi kezelés során 3 egymást követő napon (13.-tól 15.-ig nap) 0,7 g/kg immunglobulinnal kezelték. Emellett 6 ciklusban kapott 10 mg/kg ciklofoszfamidot (21., 35., 49., 70., 91. és 112. napokon), valamint 1 g Rituximab®-ot a 18. napon. Az alkalmazott kezelések azonban nem befolyásolták a beteg FXIII szintjét. 4 hónappal az utolsó vérzéses komplikációt követően a beteg váratlanul mélyvénás trombózist kapott, mely pulmonáris embóliával társult.

A beteg mintái ezt követően kerültek tanszékünkre, ahol az intézetünkben kifejlesztett Technochrom FXIII assay-vel elvégeztük a FXIII aktivitás meghatározásokat, továbbá detektáltuk és karakterizáltuk a betegben jelenlévő FXIII ellenes autoantitesteket (126).

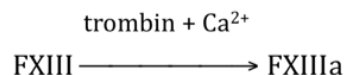
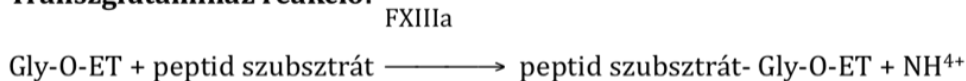
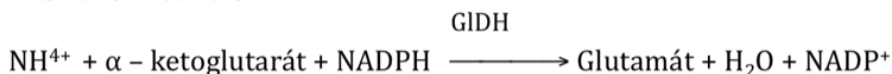
A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történt (azonosító: RKEB/IKEB 5414-2020).

4.2.2 FXIII aktivitás meghatározás

A beteg citráttal alvadásgátolt vérmintáiból centrifugálással kinyert plazma mintáit a Debrecenbe történő szállításig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A fagyasztott plazma mintákat a mérések előtt $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on olvasztottuk fel, 10 percen keresztül. Tanszékünkön a plazma XIII-as faktor aktivitás meghatározásához a Technochrom FXIII assay-t (Technoclone, Bécs, Ausztria) használtuk (126). A méréseket a Modular EVO P800 (Hitachi, Roche) készülékkel végeztük. Kalibrátorként a WHO (World Health Organization) Human Standard Factor XIII Plasma-t (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Egyesült Királyság) használtuk.

A FXIII aktivációja során aktív transzglutaminázzá alakul. A módszer az aktív transzglutamináz hatására felszabaduló ammónia enzimatis, kinetikus, spektrofotometriás mérésén alapszik. A plazmában lévő FXIII trombin és Ca^{2+} együttes hozzáadására aktiválódik. A trombin hatására képződött fibrin polimerizációját egy tetrapeptiddel (G-P-R-P) gátoljuk. A FXIIIa az amin szubsztrát glicin-etilészter (GEÉ) és a specifikus glutamin donor PI(1-12) peptid szubsztrát izopeptid kötéssel történő összekapcsolódását katalizálja. Ez a peptid szubsztrát az α_2 -plazmin inhibitor N-terminális végének megfelelő dodekapeptid.

A reakció során ammónia szabadul fel, a keletkezett ammónia mennyiségét pedig a glutamát dehidrogenáz (GIDH) által katalizált, $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ átalakulással járó reakcióban mérjük fotometriásan. A NADPH fogyasztásának sebessége, azaz a 340 nm mért abszorbancia csökkenése egyenesen arányos a FXIII aktivitással (5. ábra).

FXIII aktiválása:**Transzglutamináz reakció:****Indikátor reakció:**

5. ábra. FXIII-as faktor aktivitásának meghatározása. A FXIII trombin és Ca^{2+} együttes hatására aktiválódik, majd ezt követően a FXIIIa a GEÉ és PI(1-12) összekapcsolódását katalizálja, mely során NH_4^+ szabadul fel, ami α -ketoglutaráttal lép glutamát dehidrogenáz által katalizált NADPH függő reakcióba. A NADPH 340 nm-en mért fogyása arányos a FXIII aktivitással.

A mérések kivitelezése 340 nm-en, 37°C-on történt. A NADPH oldat koncentrációja 3 ml desztillált vízben történő feloldása után: 0,8 mmol/l. Az aktivátor reagens összetétele a 3 ml NADPH oldatban történő feloldása után: Hepes puffer (115 mmol/l), trombin (46,2 kU/l), fibrin inhibitor tetrapeptid (4,6 mmol/l), polibrén (11,5 mg/l), ditiotreitol (0,26 mmol/l), CaCl_2 (25,0 mmol/l), NADPH (0,8 mmol/l). A detektáló oldat összetétele 3 ml desztillált vízben történő feloldása után: Hepes puffer (23,1 mmol/l), glicin-etilészter (11,6 mmol/l), α -ketoglutarát (16,2 mmol/l), PI (1-12) peptid szubsztrát (10,1 mmol/l), adenzin-difoszfát (ADP) (1,4 mmol/l), GIDH (50 kU/l). A reagens keveréket az aktiváló és detektáló oldatot 1:1 arányban történő összemérésével állítottuk elő. Az inhibitor reagens feloldását 1 ml stabilizáló oldatban végeztük. A feloldás után az inhibitor oldat összetétele: 2-jódacetamid (IAA) (23,2 mmol/l), Na-azid (5,8 g/L). Vak reagens munkaoldatok: 1 térfogat reagens keverékhez 1/20-ad térfogat inhibitor oldatot adtunk. Minta reagens munkaoldatok: 1 térfogat reagens keverékhez 1/20-ad térfogat stabilizátor oldatot adtunk. A készülék küvettájában lezajló reakciót 10 percig 340 nm-en monitoroztuk. Az első 5 perc (lag fázis) alatt történt meg a FXIII aktiválás és a mintában lévő endogén ammónia felhasználása. A FXIII aktivitást az 5-10 perc alatt lezajló abszorbancia csökkenésből határoztuk meg. A fotométer közvetlenül az egy percre eső átlagos abszorbancia-csökkenést ($\Delta A/\text{min}$) adta meg. Ezt követően a kalibrációs plazma %-os értékére és a hozzá tartozó $\Delta A/\text{min}$ -re vonatkoztatva megadtuk a FXIII aktivitást.

A Dijoni Hemofília Centrumban a FXIII aktivitást a Berichrom assay (Siemens, Marburg, Németország) segítségével határozták meg, mely a kinetikus ammónia felszabadulás mérésének másik, kereskedelmi forgalomban elérhető módosított változata (127). Ebben az assay-ben a fibrin polimerizáció gátlására egy öt tagú peptidet (G-P-R-P-A) használnak. További különbség a Technochrom assay-hez képest, hogy oligopeptid szubsztrátként a β -kazeinben lévő FXIIIa szubsztrát Gln körüli szekvenciájához hasonló peptidet, az indikátor reakcióban pedig redukált nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NADH) alkalmaznak. A Berichrom assay nagy hátránya, hogy nem tartalmazza a plazma vak meghatározásához szükséges jód-acetamidot. Az inhibitor reagensre történő korrekció hiánya pedig a FXIII aktivitás felülmérését eredményezi. Ez különösen az alacsony aktivitás értékek esetén lényegesen torzíthatja az eredményt.

4.2.3 FXIII antigén meghatározás

A FXIII-A₂B₂, a FXIII-A és FXIII-B antigén meghatározások a 4.1.11 -es fejezetben leírtakban megfelelően egy lépéses szendvics ELISA módszerrel történtek, azzal a különbséggel, hogy a FXIII-A₂B₂ detektálása során a biotinált elfogó antitest FXIII-B ellenes, míg a HRPO jelzett detektáló antitest FXIII-A ellenes monoklonális antitestek voltak (7). A FXIII-A detektálása esetén szintén streptavidinnel fedett mikrolemezt használtunk, azonban itt mind a biotinált elfogó és a HRPO jelzett detektáló monoklonális antitestek két különböző FXIII-A epitóppal reagáltak (128).

4.2.4 FXIII-A Western-blot analízise

A betegtől származó és a kontrollként szolgáló normál plazma minták 7,5 %-os gélben végzett SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis-nátrium dodecil szulfát- poliakrilamid gélelektroforézis) analízisét követően, a gélből a fehérjéket 25 V áramerősség mellett, 45 percig a Trans-Blot SD Semi-DryTransfer Cell (Bio-Rad) készülék segítségével polivinilidén fluorid (PVDF) membránra blottoltuk. Az aspecifikus kötődések elkerülése érdekében a membránt 3%-os zselatin-TBS (tris puffertelt sóoldat) oldattal blokkoltuk, majd 1:1000 szerezre hígított, birkában termelt poliklonális humán FXIII-A ellenes antitest (Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada) hozzáadását követően 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. 3 x 5 perces 0,1%-os Tween-20 poliszorbát detergenst

tartalmazó TBS-es mosást követően, 1:1000-szeresre hígított biotinált birka FXIII-A ellenes antitesttel 30 percig inkubáltuk a membránt. Jelölőrendszerként a Vectastain cég ABC kit-jét (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, USA) használtunk. Az előhívást DAB-CoCl₂-H₂O₂ detektáló oldattal végeztük.

4.2.5 A FXIII keresztkötő aktivitásának vizsgálata

A beteg plazmájában lévő FXIII keresztkötő képességének vizsgálatát a beteg plazma mintájának alvasztásával, majd a keletkezett fibrin alvadék SDS-PAGE analízisével végeztük el. Ennek céljából 100 µl beteg plazmához hozzáadtunk 50 µl 40 mmol/l CaCl₂-t (100 mmol/l HEPES, 50 mmol/l NaCl pufferben) és 50 µl 4 U/ml human trombint, majd 37°C-on 1 órán keresztül inkubáltuk, végül 100 µl 8mM IAA-val leállítottuk a fibrin szálak keresztkötését. A kísérlet során kontrollként normál plazmát használtunk, melyet a beteg plazmával azonos módon kezeltünk. Az alvadék kinyerése céljából 5 percig 10.000 g-n centrifugáltuk a mintákat. A felülúszót leszívtuk, a csőben maradt alvadékot háromszor mostuk 2 ml (150 mmol/l NaCl, 2 mmol/l IAA) mosófolyadékkal. A mosások között a mintákat 5 percig, 10.000 g-n centrifugáltuk. Az utolsó mosási lépés után leszívtuk a felülúszót és 800 µl egyszeres töménységű β-merkaptóetanolt (MEA) tartalmazó denaturáló oldatot adtunk az alvadékhoz, melyet 5 percig forraltunk, majd egy éjszakán át rázattunk. Ezt követően a mintákat SDS-PAGE-el analizáltuk (10%-os gél). Az elektroforézis befejeztével a fibrin α- és γ-láncok keresztkötését Coomassie brilliant blue R 250 festékkel tettük láthatóvá.

4.2.6 A FXIII ellenes antitestek gátló hatásának kimutatása

4.2.6.1 IgG preparálás

A beteg, illetve normál plazmából HiTrap protein G HP oszlop segítségével preparáltuk az IgG-t. A tisztítás első lépéseként az oszlop átmosását végeztük el 20 mM Na-foszfát; pH 7,0 kötőpufferrel. Ezt követte a szérum minták oszlopon történő átengedése. A mintákat az oszlopra történő felvitel előtt 0,22 µm pórusméretű membránszűrőn átszűrtük és kötőpufferrel 5-szörösére hígítottuk, az áramlási sebesség minden esetben 0,5 ml/perc volt. 10-szeres mintatérfogatnyi kötőpufferrel történő mosási lépést követően az eluálás következett, melyet

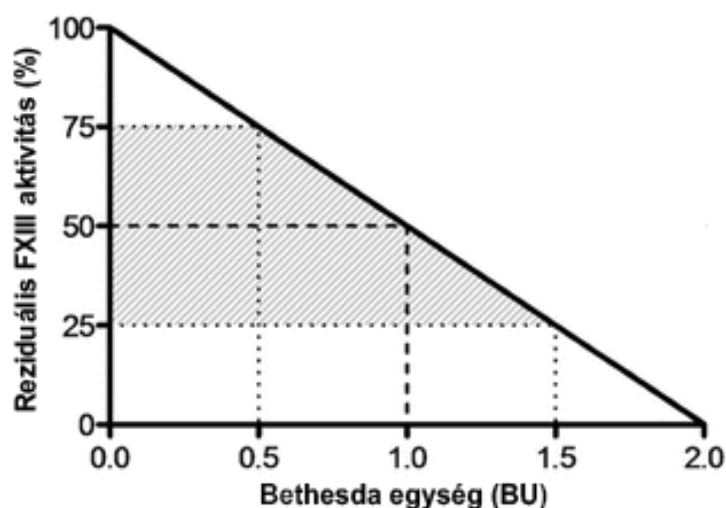
0,1 M, pH 2,7 glicin-HCl-lel végeztünk. A mintákat 13 cseppenként, 50-50 µl 1M TRIS/HCl-t pH 9,0 tartalmazó kémcsövekbe gyűjtöttük. Ezt követően a minták fehérje koncentrációját 280 nm-en, fotometriásan határoztuk meg. Az így preparált IgG-t fiziológias só koncentrációt tartalmazó foszfát pufferben (PBS, pH 7,2) egy éjszakán, át 4 °C-on dializáltuk.

4.2.6.2 Bethesda-Nijmegen módszer

A FXIII-A ellenes neutralizáló antitest kimutatására és mennyiségi megállapításra keverésvizsgálat javasolt a Bethesda módszer Nijmegen féle módosítása alapján (70, 129). Ennek során a beteg plazma (1. cső) és a FXIII-deficiens plazma (2. cső), gyűjtött normál plazmával történő 1:1 arányú keverékét állítjuk elő. Az elegyek 2 órán át 37°C-on történő inkubálását követően, mérjük a FXIII aktivitását. Neutralizáló antitest jelenlétére utal, ha az 1. csőben legalább 10%-kal alacsonyabb FXIII aktivitás értéket kapunk, mint a 2. cső esetén. Ebben az esetben az ellenanyag titer meghatározása indokolt. Ennek során a beteg plazmáját különböző hígításokban normál plazmával (melynek ismert a FXIII aktivitás értéke) 1:1 arányban keverjük és mérjük a keverékek FXIII aktivitását. Ezt követően a kapott értékekből az alábbi képlet segítségével kiszámítjuk a reziduális aktivitást:

$$\text{Reziduális FXIII aktivitás} = (1. \text{ cső FXIII aktivitása} / 2. \text{ cső FXIII aktivitása}) \times 100$$

A kapott értéket Bethesda egységben (Bethesda Unit; BU) fejezzük ki és a **(6. ábrán)** szereplő grafikon segítségével olvassuk le. 1 BU-nak 50%-os reziduális faktor aktivitás felel meg. A BU kiszámításához 25 és 75% közötti reziduális FXIII aktivitás tartományt használjuk. A grafikonról leolvasott értéket szorozzuk a hígítás fokával (130).



6. ábra. Diagram a Bethesda egység kiszámításhoz a reziduális FXIII aktivitás alapján. Az ábra a (130) számú idézet egyik ábrájának módosítása.

4.2.6.3 IC_{50} érték meghatározása

Az 50%-os gátlás eléréséhez tartozó koncentráció érték (IC_{50}) meghatározása alkalmas a FXIII aktiválódást/aktivitást gátló immunglobulinok mennyiségének megállapítására. Az IC_{50} meghatározáshoz a beteg plazmájából kinyert IgG-t, valamint kontrollként egészséges egyénektől származó normál IgG-t használtunk (50 mM HEPES, 100 mM NaCl; pH: 7,4 pufferben). 8,3 $\mu\text{g/ml}$ tisztított FXIII-A₂B₂-t inkubáltunk a beteg, valamint a normál IgG-k különböző koncentrációival 37°C-on, 60 percig. Ezt követően trombin (20 U/ml) és CaCl₂ (10 mM) hozzáadásával aktiváltuk a FXIII-at és mértük a transzglutamináz aktivitást. A méréseket a Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Svájc) fotométert segítségével 340 nm-en végeztük. Az abszorbanciákat 20 másodpercenként detektáltuk, 10 percen keresztül. Az 1 percre eső abszorbancia változásokat ($\Delta A/\text{min}$) a mérés 6. percétől számítottuk ki, mely értékek alapján meghatároztuk a FXIII aktivitást. A normál IgG jelenlétében mért aktivitás értéket 100%-nak véve a kapott FXIII aktivitás értékeket %-ban adtuk meg. Az IC_{50} érték kiszámításához a www.ic50.tk szoftvert használtuk.

4.2.7 A FXIII ellenes autoantitest gátló hatásának osztályozása

4.2.7.1 A beteg IgG hatása az AP-FXIII trombin által történő lehasítására

A beteg IgG-jének hatását a FXIII trombin általi proteolitikus aktivációjára Western blot technikával vizsgáltuk. Ennek során 8,3 µg/ml FXIIIA₂B₂ preparátumot a beteg, valamint normál egyénektől származó 300 µg/ml IgG-vel inkubáltuk 60 percig 37°C-on (50 mM HEPES 100 mM NaCl pH 7,4 pufferben). Az inhibitor erősségének mérése alapján, azt az IgG koncentrációt használtuk, mely maximális gátló hatást váltott ki. Ezt követően 50 µl aktiváló oldatot adtunk a mintákhoz, mely 15 U/ml trombint és 30 mM CaCl₂-t tartalmazott (50 mM HEPES 100 mM NaCl pH 7,4 pufferben). 37°C-on történő 2,5-5-10 és 20 percig tartó inkubációs időket követően 30 µl mintát vettünk ki a reakcióelegyből, melyhez 30 µl kétszeres töménységű, 2% MEA-t tartalmazó mintapuffert (20% glicerin, 4% SDS, 125 mM Tris-puffer; pH: 6,8) adtunk. A különböző időpontokban kivett mintákból 7,5%-os gélben SDS-PAGE-t végeztünk, majd a fehérjéket a gélből a 4.2.4. részben leírtaknak megfelelően PVDF membránra elektroblottoltuk és detektáltuk.

4.2.7.2 A beteg IgG kombinált hatásának vizsgálata a FXIII Ca²⁺ indukálta aktivációjára és a FXIIIa aktivitására nézve

Ez a kísérlet a betegben jelenlévő antitestek FXIII-B Ca²⁺ indukálta disszociációjára, a FXIII-A'-nak a Ca²⁺ indukálta konformáció változásra, valamint a FXIIIa aktivitására kifejtett kombinált hatását mutatja. Első lépésként elvégeztük az AP-FXIII trombinnal történő proteolitikus lehasítását. ennek során 11,9 µg/ml FXIIIA₂B₂-t 20 U/ml trombinnal inkubáltuk 10 percig 37°C-on (50 mM HEPES 100 mM NaCl, pH 7,4 pufferben). Ezt követően a trunkált FXIII-hoz 300 µg/ml beteg, valamint kontrollként normál IgG-t adtunk és további 60 percig inkubáltuk 37°C-on. Ez után 20 mM CaCl₂-t tartalmazó detektáló oldatot adtunk a rendszerhez majd mértük a minták FXIII aktivitását. A kísérlet elvégzéséhez módosítottuk a detektáló oldat összetételét, oly módon, hogy a CaCl₂-t a detektáló oldat tartalmazta és a NADPH-t is ebben oldottuk fel. A mérések során használt negatív kontrollok aktivitását 1mM IAA jelenlétében mértük. A méréseket Tecan Infinite M200 készüléken végeztük. A beteg IgG-vel történt

előinkubáció után mért FXIII aktivitást a normál IgG-vel történő előinkubációt követően mért FXIII aktivitás %-ában fejeztük ki.

4.2.7.3 A beteg IgG hatása a trombinnal és Ca^{2+} -mal aktivált FXIIIa aktivitására

Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a betegben jelenlévő autoantitest, hogy befolyásolja a FXIIIa aktivitását. Ennek során 11,9 $\mu\text{g/ml}$ FXIIIA₂B₂-öt 20 U/ml trombinnal és 10 mM CaCl_2 -dal 37°C-on, 10 percig inkubáltuk, majd 300 μg normál és beteg IgG-t adtunk a mintákhoz és újabb inkubáció következett, 37°C-on, 60 percig, majd mértük a FXIIIa transzglutamináz aktivitását Tecan Infinite M200 készüléken. Az aktivitás méréshez használt aktiváló és detektáló oldatok összetételét módosítottuk, így az aktiváló oldat tartalmazta a szükséges CaCl_2 -t és a NADPH feloldása CaCl_2 -t már nem tartalmazó detektáló oldatban történt. A beteg IgG-vel történt előaktiváció után mért FXIII aktivitást a normál IgG-vel történő előaktivációt követően mért FXIII aktivitás %-ában fejeztük ki.

4.2.8 Kötődési vizsgálatok

A beteg plazmamintájából preparált IgG és a FXIII-A₂ (Novo Nordisk, Måløv, Dánia) kötődési vizsgálatát SPR technikával végeztük. A mérések Biacore 3000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) készüléken történtek. A kísérletekhez karboximetilált dextrán mátrixot hordozó chipeket (CM5: GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) használtunk. A ligandok immobilizálása aminocsoportokon keresztül kovalensen történt a dextrán mátrixhoz az „amine coupling protocol” szerint. 1-etil-3-(dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) és N-hidroxiszukcinimid (NHS) 1:1 arányú keverékével történő felszínaktiválást követően reaktív szukcinimid észterek keletkeznek, melyek spontán reagálnak a ligand aminocsoportjaival. A szabadon maradt aktív észtereket ezt követően etanolaminnal blokkoltuk (131). A kapott eredmények kiértékelése a Biacore Evaluation szoftverrel (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) történt. Az értékelés során görbét illesztettünk a szenzorgram asszociációs és disszociációs szakaszaira. Az illesztett görbék segítségével megkaptuk a vizsgált kölcsönhatás kinetikáját, mely alapján meghatároztuk a reakcióra jellemző asszociációs sebességi állandót (k_a), disszociációs sebességi állandót (k_d), egyensúlyi asszociációs állandót (K_A) és egyensúlyi disszociációs állandót (K_D) (132).

A pontos eredmény érdekében 7 különböző koncentrációt alkalmazva végeztük el a méréseket. A kapott állandók átlagát véve adtuk meg a molekulák közötti interakciókat. Az SPR mérésekhez, valamint az analitok hígításához 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA és 0,005v/v% surfactans (pH 7,4) összetételű futtatópuffert használtunk, mely minden esetben HPLC tisztaságú vízzel készült. A puffert a használat előtt 0,22 µm pórusú szűrőn átszűrtük és 10 percig tartó ultrahangos kezeléssel buborékmentesítettük. A mérések során az aspecifikus jelek kiszűrése érdekében kontroll cellákat alkalmaztunk, melyre BSA-t (bovine serum albumin) immobilizáltunk. A kontroll cellákon kapott RU értékeket a BIAEvaluation szoftver segítségével kivontuk a mérő cellákon kapott RU értékekből. Minden méréssorozatot legalább kétszer végeztünk el és 10 µl/perc áramlási sebességet alkalmaztunk.

4.2.9 FXIII és fibrinogén szintek meghatározása ESRD betegekben

4.2.9.1 Betegek

A vizsgálatba 30 (15 férfi, 15 nő) legalább három hónapja hemodiafiltrációs (HDF) kezelésben részesülő, 18-70 év közötti (median: 57 év, IQR: 41,5-64,5 év) végstádiumú vesebeteget választottunk be. Kizárási kritériumnak számított a cukorbetegség, valamint a malignus megbetegedés, ezen betegek fokozott trombózis rizikója miatt. Továbbá a trombocita gátló terápiában részesülő betegek is kizárásra kerültek.

A kísérlet alatt modalitás váltás történt, melynek során a betegeket két hétig tartó hagyományos hemodialízis kezelésre (HD) állították át, a kezelések összehasonlíthatósága érdekében. A két hét leteltét követően a betegeket ismét visszaállították a HDF kezelésre. A betegektől az aktuális HDF majd a modalitás váltást követően a HD kezelések során is közvetlenül a kezelések megkezdése előtt (0. óra), illetve azok megkezdése után 1 és 4 órával történtek a mintavételek. A citráttal alvadásgátolt vérmintákat 4°C-on, 2300 rpm-en, 20 percig centrifugáltuk. Az így nyert trombocita szegény plazmákat a felhasználásig -70°C-on tároltuk. A fagyasztott mintákat a mérések előtt 37°C-os vízfürdőben olvasztottuk fel 10 percen keresztül.

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történt (azonosító: RKEB/IKEB 3990-2013). A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsink Deklaráció etikai elveinek, minden

egyen írásos és szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

4.2.10 FXIII aktivitás meghatározás

A minták FXIII aktivitását a 4.2.2 részben leírtaknak megfelelően határoztuk meg.

4.2.11 FXIII antigén meghatározás

A minták FXIII antigén értékeit a 4.2.3 részben leírtaknak megfelelően határoztuk meg.

4.2.12 Fibrinogén koncentráció meghatározása

A plazma fibrinogén koncentrációjának Clauss-módszerrel történő meghatározása a FIBRINOGEN LX in vitro diagnosztikai reagens készlettel (Labexpert Kft., Debrecen) történt. A méréseket SIEMENS BCS készülékkel végeztük. A módszer lényege, hogy a citráttal alvadásgátolt, hígított plazmát nagy koncentrációjú trombinnal megalvasztjuk, az így mért alvadási idő a minta fibrinogén koncentrációjának függvénye. A reagensben található egy antiheparin komponens, mely a plazmában 20 U/ml koncentrációig jelenlévő heparin gátló hatását képes felfüggeszteni. A készlet az alábbi reagenzeket tartalmazza:

- Trombin: liofilizált szarvasmarha trombin, oldás után 30 NIH U/ml koncentrációban.
- Puffer oldat (pH 7,4): imidazolt (50 mmol/l), Na-kloridot (100 mmol/l). heparin inhibitort és stabilizátort tartalmaz.

A munkaoldat elkészítése az alábbiak szerint történt. A trombint a 4 ml Puffer oldatban feloldottuk, majd 15 percig 20-25°C-on állni hagytuk. A meghatározáshoz szükséges további anyagok: Standard Human Plasma, Control Plasma N és Control Plasma P (Siemens, Marburg). A fibrinogén koncentrációt g/l-ben fejeztük ki, melyet a mért alvadási idők és a plazma hígítási fokának ismeretében 5 pontos kalibrációs görbe segítségével számoltunk ki. A kalibrációs görbe felvétele a Standard Human Plasma hígításainak meghatározásával történt. A kétszintű minőségbiztosítást gyári normál és patológiás kontrollok mérésével végeztük. A

fibrinogén/fibrin degradációs termékek és a heparin jelenléte a meghatározást 400 mg/l koncentráció, ill. 20 U/ml koncentráció alatt a meghatározást biztosan nem befolyásolja.

4.2.13 C-reaktív protein (CRP) koncentráció meghatározása

A CRP mennyiségi meghatározása latex részecskék által felerősített immunturbidimetriás módszerrel történt, nagy érzékenységű CRP (HS) reagenskészlet (Diagnosticum Zrt. Budapest) használatával. A méréseket a Modular EVo P800 (Hitachi, Roche) spektrofotométer készülékkel 570 nm-en végeztük.

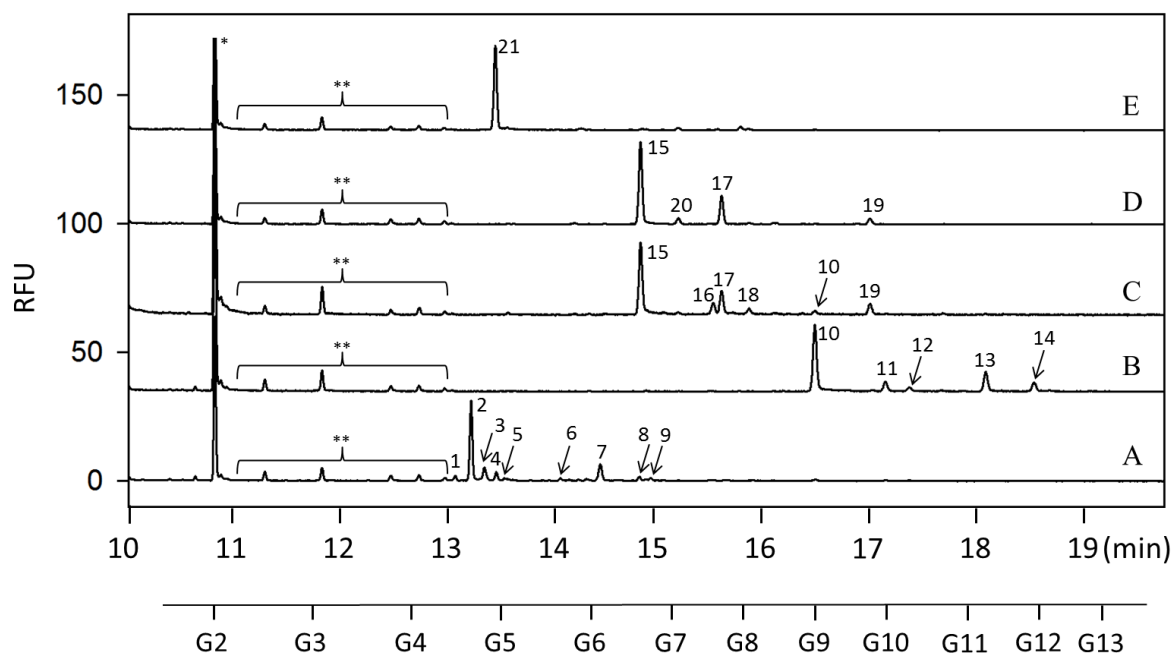
4.2.14 Az eredmények albumin koncentrációra történő korrigálása

Az előzetes eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a dialízis kezelés előrehaladtával bekövetkező fibrinogén és FXIII szintek fokozatos emelkedését a betegek vérének kezelés alatt történő bekonzentrálódása okozza. Ennek tisztázása érdekében az egyes mintákhoz tartozó albumin értékekkel elvégeztük az adatok normalizálását a 0 perces értékre.

A plazma minták albumin koncentrációjának meghatározása kolorimetriás módszerrel történt a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben, Roche Modular P 800 kémiai automatával, Roche reagens felhasználásával.

5.1 FXIII-B alegység totál glikán profiljának vizsgálata

A FXIII-B glikán struktúrájának karakterizálása érdekében először a denaturált fehérje aszparaginhoz kötött szénhidrát komponenseinek átfogó analízisét végeztük el. A denaturált FXIII-B alegységről az N-glikánokat PNGase F-fel vágtuk le, a felszabadult cukor komponenseket APTS-szel jelöltük és a mágneses gyöngyökkel történő tisztítási lépést követően CE-LIF technikával analizáltuk (133). A fehérje denaturálására azért volt szükség, hogy a glikoprotein teljesen ki tudjon tekeredni, ezáltal biztosítva az endoglikozidáz enzim teljes hozzáférését az N-kapcsolt cukor struktúrák hasításához. A **(7. A ábra)** mutatja a denaturált majd PNGase F-fel emésztett FXIII-B totál glikán profilját, mely kilenc, jól elkülönülő csúcsot tartalmaz. Az 1. csúcs előtt megjelenő kis méretű csúcsok nem reagáltak az exoglikozidáz kezelésre, ezért a méréseink során nem tekintettük őket oligoszacharidoknak. Az elválasztott csúcsok GU (glycan unit) értékeit a GUcal szoftver (GUcal.hu) (133) segítségével határoztuk meg. A GU értékeknek megfelelő glikán struktúrákat a beépített adatbázisból nyertük.



7. ábra. A denaturált humán XIII-as véralvadási faktor B alegységének exoglikozidáz array alapú szekvenálása. (A) PNGase F által hasított, APTS jelölt N-glikán pool. Ez a jelölt glikán pool volt tovább emésztve (B) szialidázzal, (C) szialidázzal + galaktozidázzal, (D) szialidázzal + galaktozidázzal + fukozidázzal, (E) szialidázzal + galaktozidázzal + fukozidázzal + hexózaminidázzal. RFU: relatív fluoreszcencia unit. Elválasztási körülmények: 50 cm effektív

hosszúságú (totál hossz 60 cm), 50 µm belső átmérőjű (N-CHO) kapilláris; N-CHO elválasztó puffer, hőmérséklet: 25°C; feszültség: 30 kV fordított polaritás; injektálás: nyomással, 1,0 psi és 0,5 s. *Belső standard; **csúcsok, amelyek nem reagálnak az exoglikozidáz kezelésekre.

Az adatbázis alapján kapott struktúrákat az N-glikánok szekvenálásával erősítettük meg. A **(7. ábra B-E)** elektroferogramjai a denaturált FXIII-B, APTS-szel jelölt N-glikán pool-ját mutatja, melyet a különböző exoglikozidázok, mátrix szerűen történő hozzáadását követően kaptunk. **(B)** a szialidázzal emésztett, **(C)** a szialidázzal + β-galaktozidázzal emésztett, **(D)** a szialidázzal + β-galaktozidázzal + fukozidázzal emésztett, **(E)** a szialidázzal + β-galaktozidázzal + fukozidázzal + hexózaminidázzal emésztett glikán profilokat mutatja. A szialidáz kezelés **(7. ábra, B)** az összes α(2-3,6,8) kötéssel kapcsolt szíálsavat felszabadította a glikánokról és a megállapítás miszerint az **(7. ábra A)** elektroferogramján szereplő összes csúcs (1-9) eltolódott a semleges szénhidrát migrációs régióba, azaz a 10-14-es csúcsokba. Ez azért történt, mert a szíálsavaknak köszönhető extra töltések elvesztése miatt az oligoszacharidok elektroforetikus mobilitása csökkent, így a migrációs idejük megnőtt. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a FXIII-B alegységen jelenlévő, kilenc glikán struktúra mindegyike szialilált volt.

A kontroll glikán pool szialidáz és β (1-4,6)-galaktozidáz keverékével történő emésztése **(7. ábra, C)** az összes szíálsavat és galaktózt együttesen eltávolította a glikánokról, mely a 10-14 csúcsok 15-19-es csúcsokba történő eltolódását eredményezte. Ezt a lépést a szialidázt, β (1-4,6)-galaktozidázt és α(1-2,3,4,6) fukozidázt tartalmazó reakcióeleggyel történő emésztés követte. A fukóz egységek elvesztése a csúcsok 15., 17., 19. és 20. csúcsokba történő eltolódását eredményezte, melyet jól szemléltet a **(7. ábra, D)**. Végül szialidázt, β (1-4,6)-galaktozidázt, α(1-2,3,4,6) fukozidázt és hexózaminidázt tartalmazó eleggyel emésztettük a denaturált FXIII-B-ről felszabadított glikánokat, melynek eredményeként az összes szíálsavat, galaktózt, fruktózt és N-acetil-glükózamint eltávolítottuk a struktúrákról **(7. ábra, E)**. Ennek következtében a 15., 17., 19. és 20. csúcsok a ClcNAc elvesztése miatt a 21. csúcsba mozdultak el. A 21-es csúcsot 4,829-es GU értéke alapján az N-glikánokra jellemző core pentaszacharidként azonosítottuk.

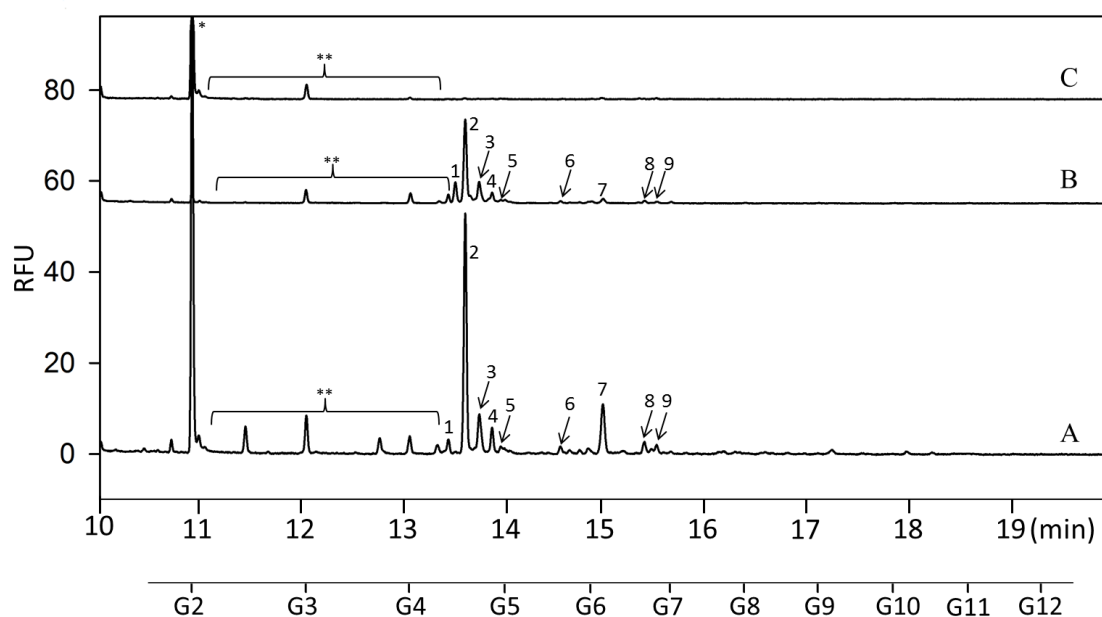
Az exoglikozidáz enzimekkel végzett szekvenálás eredményeként az alábbi struktúrákat azonosítottuk: egy trisialo (A3G(4)3S(6,6,6)3), egy bisialo (A2G(4)2S(6,6)2), egy diszialo bisecting (A2BG(4)2S(6,6)2), egy disialo core-fukozilált (F(6)A2G(4)2S(6,6)2), egy disialo

core-fukozilált bisecting (F(6)A2BG(4)2S(6,6)), egy monoszialilált bisecting (2A2[3]BG(4)1S(6)1), egy monoszialilált (A2G(4)2S(6)1) és két monoszialilált core-fukozilált (F(6)A2[6]G(4)2S(6)1), F(6)A2[3]G(4)2S(6)1. A kapott glikán struktúrák szerkezeti rajzát a **(3. táblázat)** szemlélteti. A rövidített glikán szerkezeti elnevezések és jelölések Harvey és munkatársai által javasolt nomenklatúra alapján történtek (134).

Csúcsok	Migrációs idő (min)	GU _{CE} -unit	Glikán szerkezetek Oxford típusú formátuma	Glikán szerkezet
1	11,99	4,407		A3G(4)3S(6,6,6)3
2	12,16	4,584		A2G(4)2S(6,6)2
3	12,3	4,733		A2BG(4)2S(6,6)2
4	12,43	4,867		F(6)A2G(4)2S(6,6)2
5	12,52	4,956		F(6)A2BG(4)2S(6,6)2
6	13,13	5,647		A2[3]BG(4)1S(6)1
7	13,56	6,151		A2G(4)2S(6)1
8	13,99	6,676		F(6)A2[6]G(4)2S(6)1
9	14,11	6,828		F(6)A2[3]G(4)2S(6)1

3. táblázat. A FXIII-B alegységről felszabaduló glikánok szerkezete. A csúcsok számai a (7. ábra, A) számozott csúcsainak felelnek meg. GU_{CE}: a kapillaris elektroforézissel meghatározott glükóz-unit értékek. A glikán szerkezetek rövidítéséhez Harvey és munkatársai jelölését használtuk (134). ★: szialsav, ◇: galaktóz, ○: mannóz, ■: N-acetil-glükózamin, ◆: fukóz

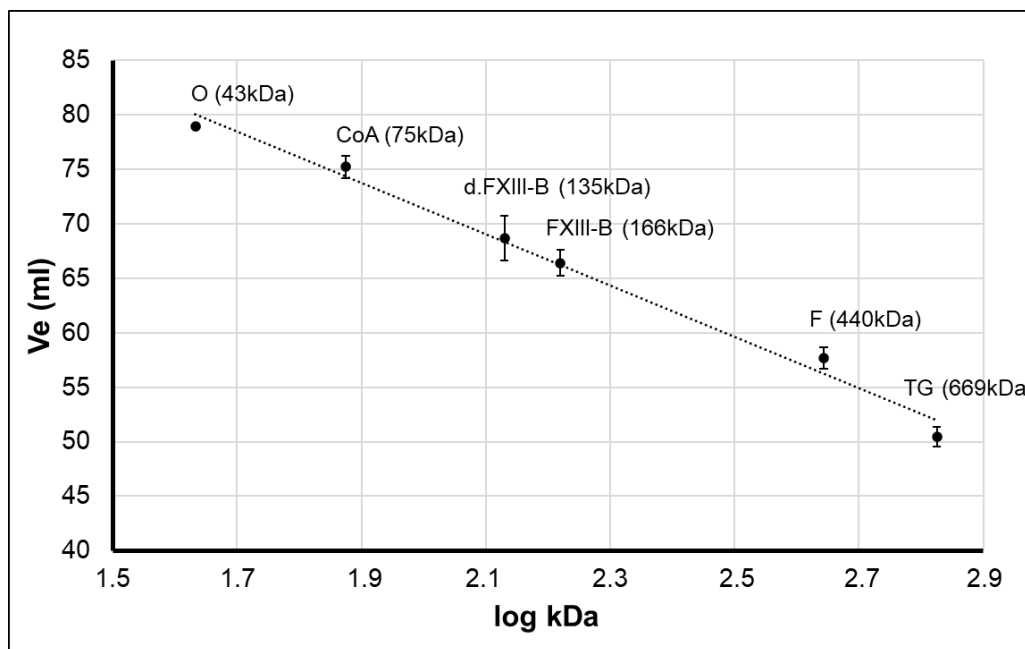
Mivel szintén kíváncsiak voltunk a FXIII-B nem-denaturáló körülmények között történő deglikozilációjának hatékonysága is, ezért a natív fehérjét denaturálás nélkül, egy kétlépeses protokoll segítségével PNGase F-fel emésztettük. Ennek első lépéseként a fehérjét a denaturált körülmények esetén alkalmazott PNGase F 10-szeres mennyiségével emésztettük. Ezt a lépést a PNGase F normál koncentrációval történő emésztése követte, melyet az anyagok és módszerek részben részletesen leírásra került. A **(8. ábra, A-B)** jól szemlélteti, hogy a PNGase F emésztés hatékonyan működött a nem-denaturált FXIII-B esetén is. A natív fehérje ismételt PNGase F emésztése két különböző koncentrációban sikeres deglikozilációt eredményezett, amely a fehérjéhez kapcsolódó szénhidrát struktúrák hiányának igazolásával nyert megerősítést. Ebben a kísérletben a nem-denaturált FXIII-B-t, mely a kétlépeses emésztési protokollt követően visszamaradt, denaturáltuk és ezt követően alávetettük egy ismételt PNGase F emésztésnek **(8. ábra, C)**.



8. ábra. A natív, nem denaturált FXIII-B deglikozilációja ismételt PNGase F emésztéssel. **(A)** Glikánok, melyek a nem denaturált FXIII-B alegységről szabadultak fel 10-szer magasabb koncentrációjú PNGase F-fel történő emésztés hatására, mint amit általában a denaturált fehérjék emésztésekor használnak. **(B)** A második, hagyományos mennyiségű PNGase F-fel végzett emésztést követően felszabaduló glikánok. **(C)** A második lépés után megmaradt fehérje denaturálása majd normál koncentrációjú PNGase F-fel történő kezelés hatására felszabaduló glikán profil. Az elválasztás feltételei ugyanazok voltak, mint a **(7. ábra)** jelmagyarázatában szereplők. *Belső standard; **csúcsok, amelyek nem reagálnak az exoglikozidáz kezelésekre.

Az első, nem denaturáló körülmények között végzett PNGase F emésztés a szénhidrát komponensek körülbelül 70%-át távolította el a FXIII-B glikozilációs helyeiről. A második, szintén natív körülmények között történő PNGase F kezelés láthatóan eltávolította a cukorstruktúrákat. A visszamaradt pellet denaturálása és újbóli PNGase F emésztése már nem eredményezett detektálható glikánokat, bizonyítva ezzel a natív fehérje teljes deglikozilációját.

Röviden összefoglalva az eddigi eredményeket, teljeskörűen karakterizáltuk a FXIII-B glikán profilját és kidolgoztunk egy protokollt a natív fehérje PNGase F-fel történő teljes deglikozilációjára. Az ezzel az eljárással deglikozilált fehérjét fel tudtuk használni olyan további biokémiai kísérletekben, mely segít megérteni a FXIII-B alegység N-glikozilációjának biológia jelentőségét. A FXIII-B dimer képződésében részt vevő szakaszok a 4. és 9. sushi doméneken találhatóak (11). A glikán struktúrák közelsége ezekhez a szakaszokhoz feltételezi, hogy befolyásolhatják a FXIII-B dimerizációját. Gélfiltrációs kísérleteink alapján a deglikozilált FXIII-B molekulatömege valamivel kevesebbnek bizonyult, mint az N-glikánokat tartalmazó formáé. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen a cukorkomponensek el lettek távolítva a fehérjéről (**9. ábra**). A két forma molekulatömegének közelsége jól jelzi, hogy a FXIII-B dimer szerkezete a deglikozilációt követően is megmaradt.



9. ábra. Natív és deglikozilált FXIII-B (FXIII-B, d.FXIII-B) gél szűrési analízise. Az alábbi molekulatömeg standardokat használtuk a kalibráláshoz: ovalbumin (O), konalbumin (CoA), ferritin (F), tiroglobulin (TG). Az ábrán három független kísérlet eredményeinek átlaga $\pm$ szórása látható. Ve: elúciós térfogat.

A deglikoziláció hatását a FXIII-B keringésben való élettartamára nézve FXIII-B knock-out egerekben vizsgáltuk. A fajok közötti különbség, azaz, hogy humán FXIII-B-t injektáltunk egérbe, valószínűleg befolyásolta és fel is gyorsította az elimináció sebességét. Humán vonatkozásban nem állnak rendelkezésre adatok a szabad FXIII-B plazmában való félélet idejére nézve. A natív humán FXIII-B eliminációs rátája a FXIII-B knock-out egerekben gyorsabb volt a vártnál (**4. táblázat**), a gyorsabb fehérje elimináció betudható a fajok közötti különbségeknek. Azonban az erőteljes különbség a natív és a deglikozilált humán FXIII-B₂ eliminációs sebessége között, azt sugallja, hogy a szénhidrát komponensek jelenléte meghosszabbítja a fehérje félélet idejét a keringésben.

Glikozilált FXIII-B (µg/ml)				
FXIII-B beadása után eltelt idő				
FXIII-B KO egér	1 óra	48 óra	120 óra	Egér súlya (g)
1nD	10,97	0,570	0,019	20,3
2nD	10,22	0,677	0,045	23,8
3nD	12,48	0,762	0,049	22,0
4nD	12,68	0,609	0,040	24,9
5nD	9,78	0,585	0,032	25,9
6nD	12,17	0,673	0,040	19,8
7nD	11,42	0,635	0,049	19,3
átlag	11,39	0,644	0,039	22,3
SD	1,13	0,070	0,010	2,6

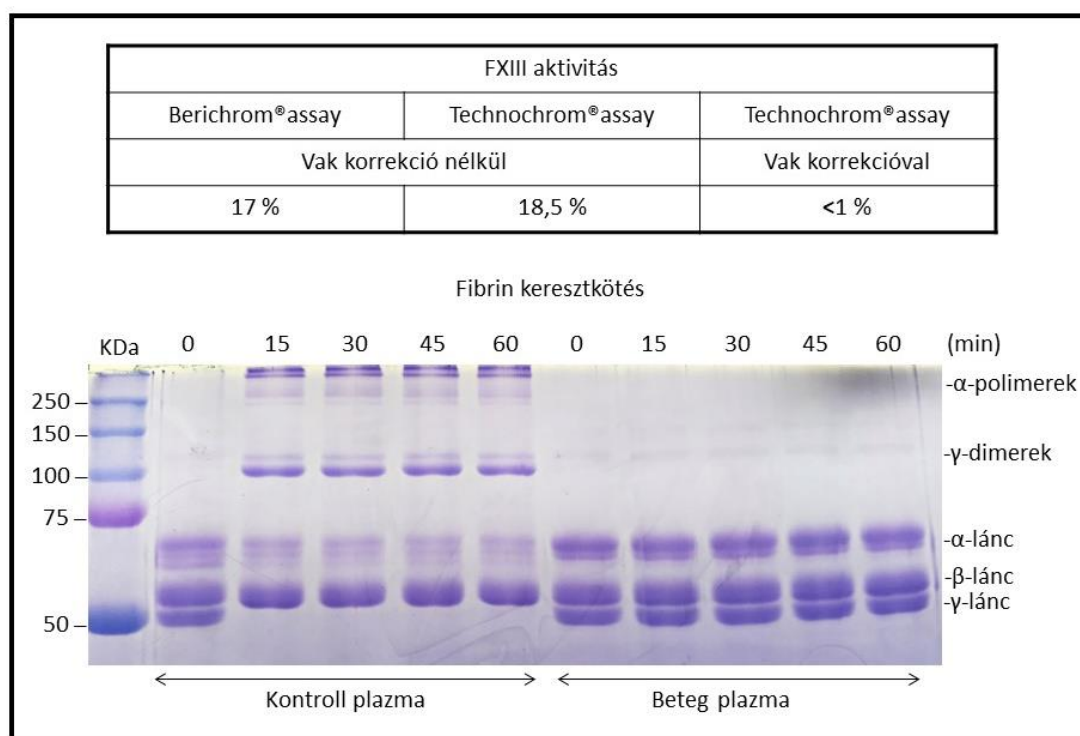
Deglikozilált FXIII-B (µg/ml)				
FXIII-B beadása után eltelt idő				
FXIII-B KO egér	1 óra	48 óra	120 óra	Egér súlya (g)
1D	5,18	0,0064	<0,001	22,0
2D	4,17	0,0059	<0,001	22,4
3D	3,68	0,0060	<0,001	23,8
4D	4,11	0,0078	<0,001	25,6
5D	4,05	0,0055	<0,001	19,9
6D	4,89	0,0066	<0,001	19,4
átlag	4,35	0,0064	<0,001	22,2
SD	0,57	0,0010		2,3

4. táblázat. A nem deglikozilált és deglikozilált FXIII-B clearance vizsgálata FXIII-B knock-out egerek plazmájából. (A) natív, glikozilált (nem deglikozilált) FXIII-B-vel (nD) injektált egerek. **(B)** deglikozilált FXIII-B-vel **(D)** injektált egerek. A FXIII-B értékeket a különböző időpontokban nyert plazmákból határoztuk meg natív, glikozilált (nem deglikozilált) FXIII-B beadását **(A)**, valamint deglikozilált FXIII-B beadását követően **(B)**. A FXIII-B meghatározásához alkalmazott ELISA módszer (82) a deglikozilált és nem deglikozilált FXIII-B-t ugyanolyan mértékben, egyaránt felismerte. D: deglikozilált FXIII-B-t kapott egér, nD: nem deglikozilált FXIII-B-t kapott egér, KO:knock-out.

5.2 FXIII deficiens beteg autoantitest karakterizálás

5.2.1 A beteg FXIII aktivitásának és fibrin keresztkötő képességének vizsgálata

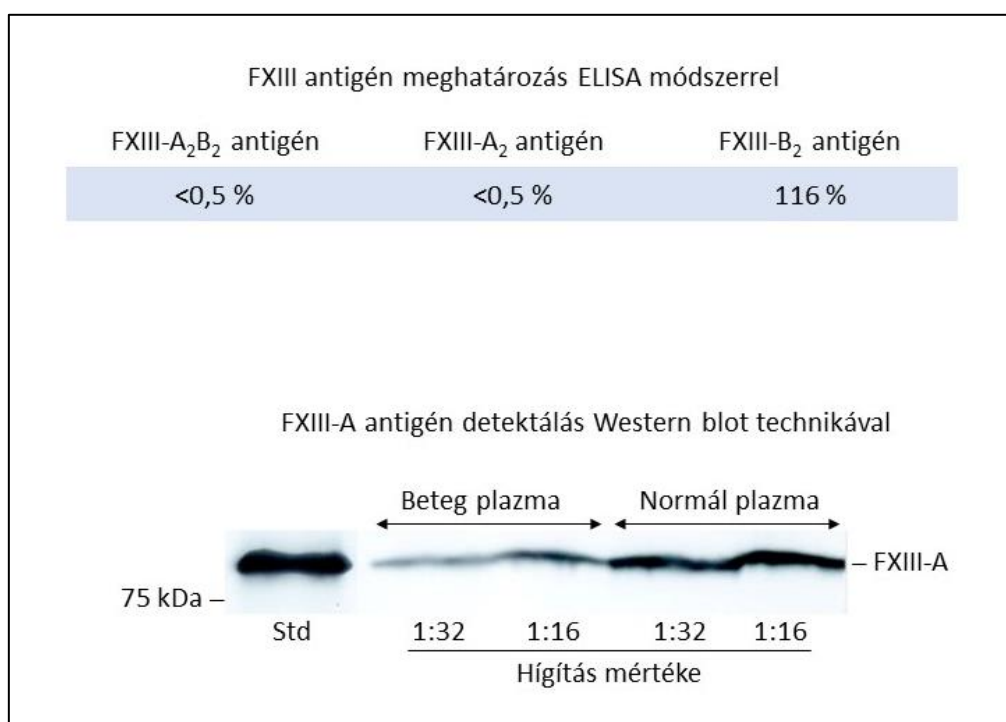
A 67 éves nő FXIII aktivitás értékeit először a Dijoni Egyetemi Kórház Hemofília Központjának felkérésére vizsgáltuk. Ekkor a beteg már 45 napot töltött kórházban a pontos diagnózis hiányában. A kiterjesztett hemosztázis vizsgálatok során Berichrom assay-vel csökkent, 17%-os FXIII szintet igazoltak a betegnél. Az ilyen mértékű FXIII deficiencia azonban nem magyarázza a betegnél jelentkező súlyos vérzéses komplikációkat (135). Ezért intézetünkben Technochrom assay-vel a beteg mintáiból ismételtelen elvégeztük a FXIII aktivitás meghatározásokat. Vak korrekció nélkül mi is hasonló, 18,5%-os FXIII aktivitást mértünk, azonban a vak korrekció alkalmazásával végzett mérések egyértelműen igazolták, hogy a beteg valódi FXIII aktivitása a detektálhatósági határ alatt volt. A beteg mérhetetlenül alacsony FXIII aktivitás értékeit, a FXIII fibrin keresztkötő képességének teljes hiánya szintén alátámasztotta (10. ábra).



10. ábra. FXIII aktivitás és fibrin keresztkötő képesség vizsgálata. A FXIII aktivitást a beteg plazmájából ammónia felszabaduláson alapuló teszt segítségével határoztuk meg, vak korrekció mellett és anélkül (ábra felső része). A fibrin keresztkötések kialakulását SDS-PAGE technikával értékeltük. A beteg mintájában a fibrin γ - és α -láncok keresztkötése nem jött létre.

5.2.2 FXIII-ellenes antitest detektálása és karakterizálása

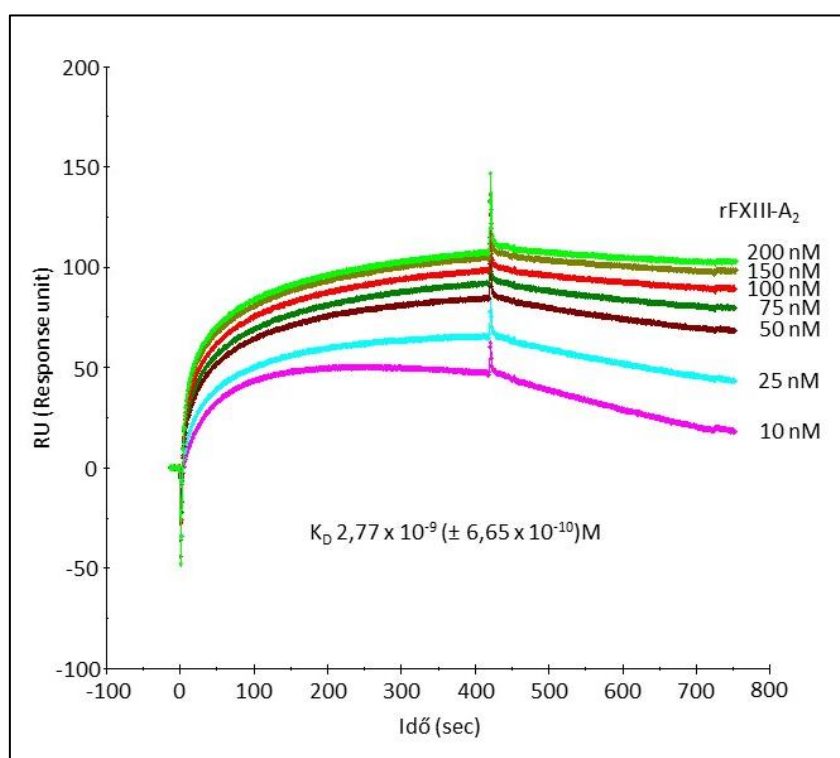
A betegben jelenlévő FXIII ellenes gátló hatású autoantitesteket keverékes vizsgálattal detektáltuk és a Bethesda-Nijmegen assay alapján 74 Bethesda egységnek (unitnak; BU) mértük (129). ELISA technikával sem FXIII-A₂B₂-antigént sem FXIII-A₂-antigént nem tudtunk detektálni a beteg plazmájából (7, 128). Ezzel szemben a FXIII-B antigén szintje a referencia intervallumon belül volt. A Western-Blot analízis során ellentmondó eredményre jutottunk, ugyanis jelentős mennyiségű FXIII-A-t tudtunk detektálni a beteg plazma mintájából. Ezen eredmények háttérében az állt, hogy a beteg plazmájában jelenlévő autoantitest interferált az ELISA módszerben alkalmazott monoklonális FXIII-A ellenes antitestekkel (**11. ábra**).



11. ábra. FXIII antigén szintek meghatározása. A FXIII antigént a beteg plazmájából ELISA, valamint Western blot technikával határoztuk meg. ELISA technikával mind a FXIII-A₂B₂ mind a FXIII-A₂ antigén szinteket <5% alattinak találtuk, azonban a FXIII-B₂ antigén szintje 116% volt, mely a referencia tartományba esik. Ezzel szemben Western blot analízissel jelentős mennyiségű FXIII-A-t detektáltunk.

5.2.3 Az autoantitest kötődése a FXIII-A alegységéhez

A beteg plazmájából preparált IgG FXIII-A₂-höz való kötődését SPR technikával vizsgáltuk, Biacore 3000 készüléken. A mérések során ligandként a beteg IgG-t, analitként a rFXIII-A₂ különböző koncentrációit használtuk (10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM). Ahogy az várható volt a beteg autoantitestje nagy affinitást mutatott a rekombináns FXIII-A₂-vel. A K_D értéke $2,77 \pm 0,66 \times 10^{-9}$ mol/l-nek adódott. Egészséges egyénektől származó IgG esetében, nem jött létre kötődés (12. ábra).

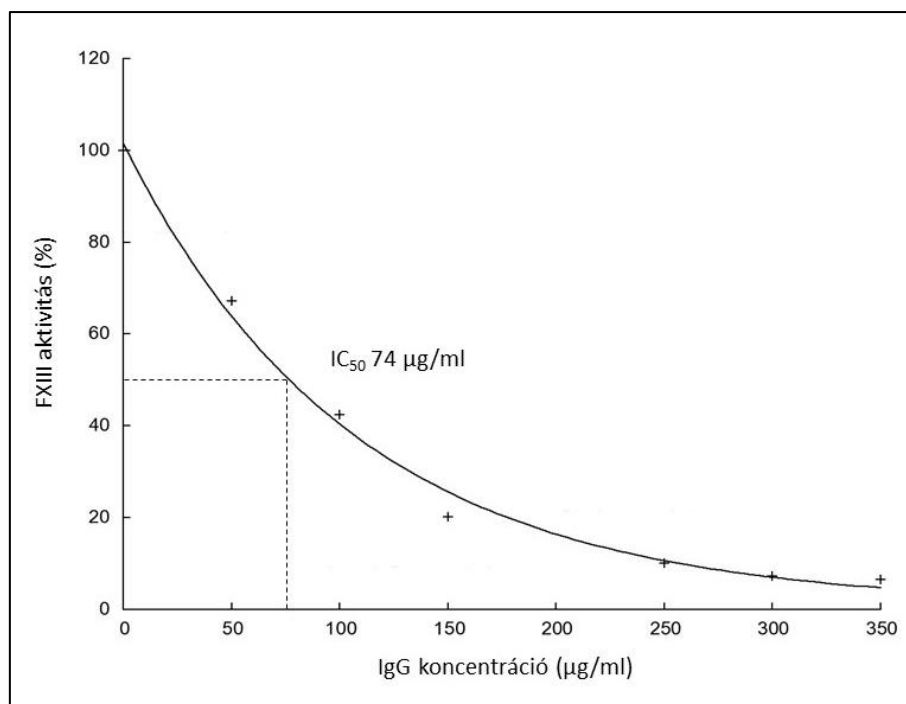


12. ábra. FXIII-A ellenes autoantitest kötődési vizsgálata. Az autoantitest FXIII-A₂-höz való kötődését SPR technikával vizsgáltuk. A K_D értéke $2,77 \pm 0,66 \times 10^{-9}$ mol/l-nek adódott.

5.2.4 Az autoantitest gátló kapacitása

Az inhibitor titer Bethesda-Nijmegen meghatározása mellett, elvégeztük a beteg IgG-jének 50 %-os gátló hatását eredményező koncentráció (IC_{50}) értékének meghatározását is. Véleményünk szerint az IC_{50} érték pontosabban mutatja az autoantitest gátló erejét, mint a Bethesda egység. Méréseink során az 50%-os gátló hatást $74 \pm 8,6$ µg/ml IgG koncentrációnál

értük el, míg 300 µg/ml-es koncentráció felett a FXIII aktivitás csaknem teljes gátlása volt megfigyelhető. Egészséges egyénektől származó IgG esetén még a legmagasabb koncentráció mellett sem tapasztaltunk gátló hatást (**13. ábra**).

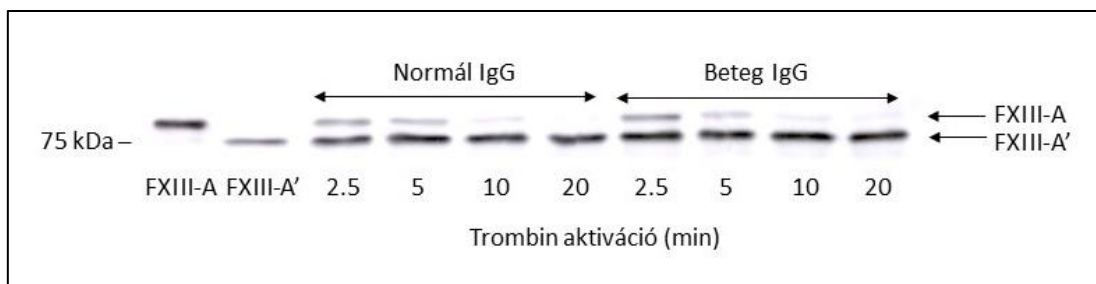


13. ábra. A betegből származó IgG IC₅₀ értékének meghatározása.

5.2.5 Az autoantitest gátló hatásának karakterizálása

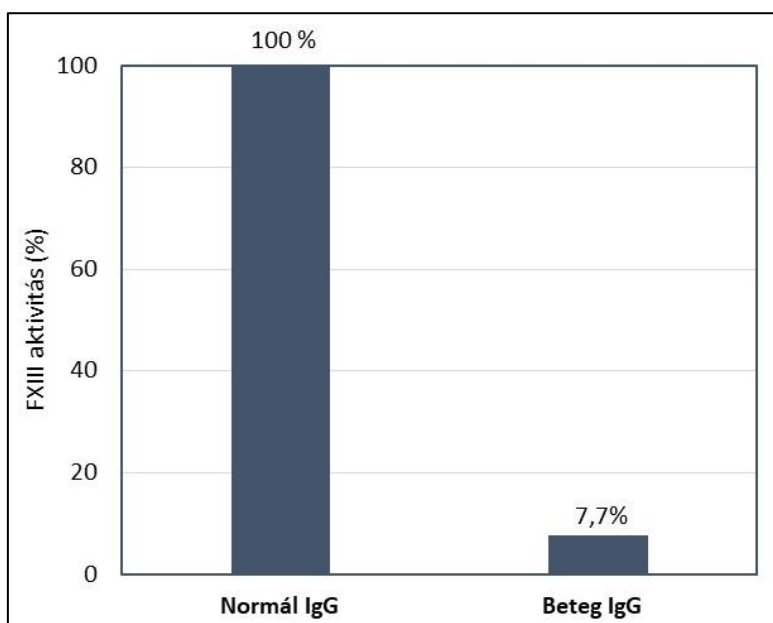
A betegben megjelenő autoantitestek gátolhatják a FXIII-A trombin által történő hasítását, a Ca²⁺ indukálta strukturális átrendeződést és a FXIIIa transzglutamináz aktivitását. Az autoantitest kombinált gátló hatás kifejtésére is képes lehet. Ezért az autoantitest gátló hatásának jellemzése céljából külön-külön megvizsgáltuk ezeket a lehetőségeket.

A beteg IgG hatását a FXIII-A trombin általi proteolitikus hasítására nézve Western-blot technikával vizsgáltuk. Az idő előrehaladtával a FXIII-A hasítása normál és a beteg IgG jelenlétében, arra utalt, hogy az inhibitor az AP-FXIII trombin által történő lehasítását nem gátolta, ugyanis a nem hasított FXIII-A-nak megfelelő sávok intenzitása azonos mértékben csökkent a beteg, illetve a normál IgG jelenlétében (**14. ábra**).



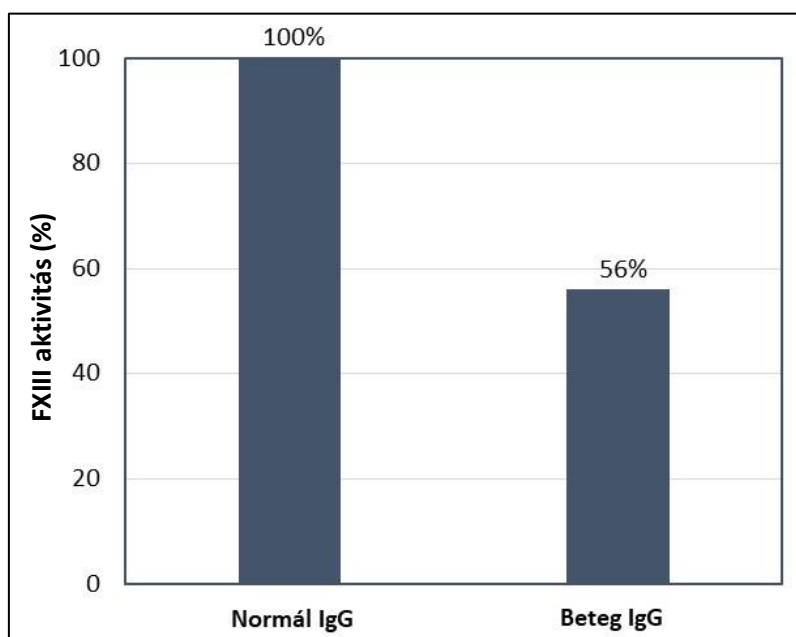
14. ábra. A beteg IgG hatása a FXIII-A trombin általi proteolitikus hasítására. A FXIII-A a hasítatlan, míg a FXIII-A' a trombin által hasított fehérje sávoknak felel meg. Az idő előrehaladtával (2,5-5-10-, valamint 20 perc elteltével) a normál és beteg IgG jelenlétében a FXIII-A-nak megfelelő sávok intenzitása azonos mértékben csökkent, mely egyértelműen mutatja, hogy az inhibitor az AP-FXIII trombin által történő lehasítását nem gátolta.

A további kísérlet sorozatban a betegben jelenlévő autoantitestek FXIII-B Ca^{2+} indukálta disszociációjára, a FXIII-A'-nak a Ca^{2+} indukálta konformáció változásra, valamint a FXIIIa aktivitására kifejtett kombinált hatását vizsgáltuk. Első lépésként elvégeztük az AP-FXIII trombinnal történő proteolitikus lehasítását. Ezt követően a betegtől származó, valamint kontrollként normál IgG-t adtunk a FXIII-A' mintákhoz és így mértük a FXIII aktivitást. A beteg IgG-je jelentős, a normál IgG-vel végzett mérésekhez viszonyítva közel teljes, 92,3 %-os gátlást idézett elő (15. ábra).



15. ábra. Az autoantitestek hatása a FXIII-B Ca^{2+} indukálta disszociációjára, valamint a FXIII-A' Ca^{2+} indukálta konformáció változásra.

Végezetül megvizsgáltuk a beteg IgG FXIIIa-ra kifejtett hatását. Ebben az esetben a FXIIIa beteg IgG által történő gátlása mérsékelt volt: 300 µg/ml IgG a transzglutamináz aktivitását 44%-kal csökkentette (**16. ábra**), mely arra utal, hogy a transzglutamináz aktivitás gátlása csak részben járul hozzá a Ca^{2+} indukálta aktiváció és a FXIIIa aktivitás együttes gátlásához. Ezen eredmények és az ajánlott klasszifikációs séma alapján a neutralizáló FXIII-A ellenes autoantitest kombinált típusú (IV. típus) (136).

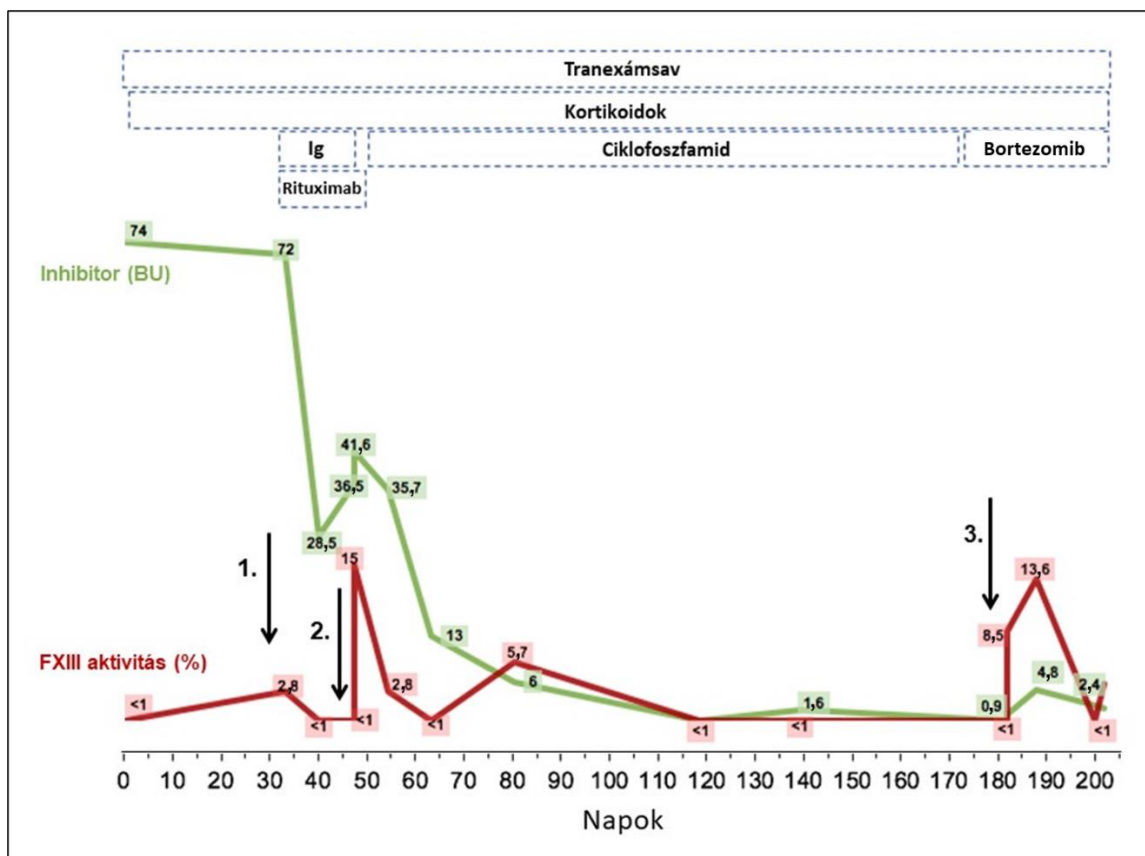


16. ábra. A beteg IgG FXIIIa-ra kifejtett hatásának vizsgálata. Ebben az esetben a FXIII Ca^{2+} -mal és trombinnal történő teljes aktivációját követően adtuk a rendszerhez beteg IgG-jét, majd mértük a FXIII aktivitását. Az IgG által kifejtett gátló hatás mérsékelt volt, a transzglutamináz aktivitását 44%-kal csökkentette.

5.2.6 A beteg monitorozása

A diagnózis időpontjától kezdődően a beteg FXIII aktivitás és inhibitor szintjeinek változását, valamint az alkalmazott terápiákat a (**17. ábra**) mutatja. A beteg a megfigyelt időszak alatt tranexámsavat és kortikoidokat kapott. Ez idő alatt két alkalommal volt súlyos vérzéses komplikációja. Az első a jobb rekeszizom szárban megjelenő nagyméretű hematóma volt, melyet később bal rekeszizom szár hematóma és rectus abdominis izom hematóma követett. Fibrogammin® adásával nem tudták megállítani a vérzést, a FXIII aktivitás csak kis mértékben és csak átmenetileg emelkedett meg. A vérzéseket végül intervenciós radiológiai

technikával történő embolizációval sikerült elállítani. Az első vérzéses epizódot követően eradikációs terápia indult Rituximab és immunglobulin, később pedig ciklofoszfamid vagy bortezomid adásával. Az eradikáció jelentősen csökkentette az inhibitor titer, de az teljesen soha nem eliminálódott; a legalacsonyabb titerek 0,9-4,0 BU voltak és a FXIII aktivitás értékek is a detektálhatósági határ alatt maradtak. 4 hónappal az utolsó vérzéses komplikációt követően a beteg váratlanul mélyvénás trombózist kapott, mely pulmonáris embóliával társult.



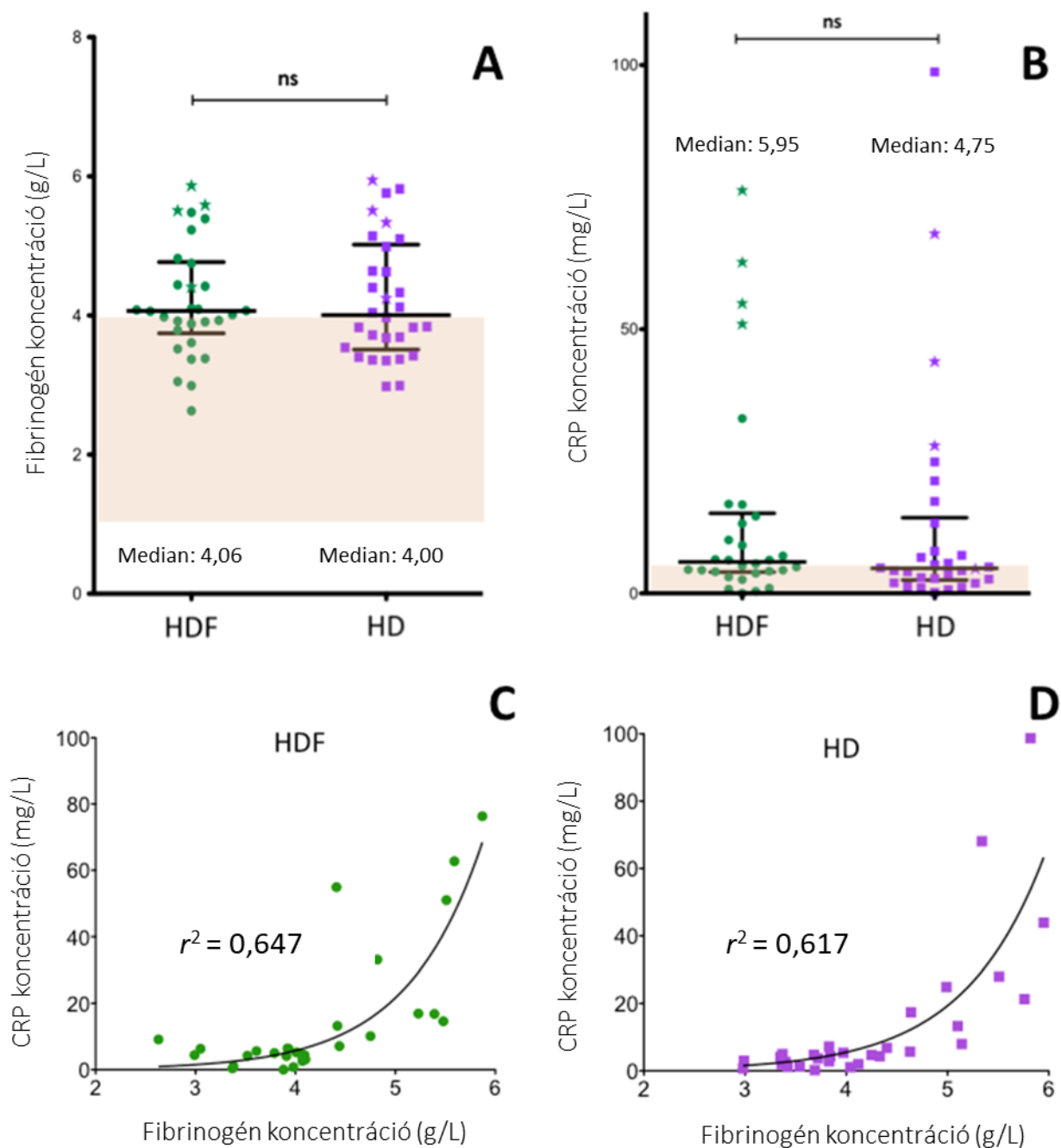
17. ábra. A beteg FXIII aktivitás és inhibitor szintjeinek változása az alkalmazott terápiaik során. A FXIII aktivitás értékeit piros, az inhibitor titer változásait zöld színnel jelöltük. A mért, számbeli értékek a vonalak fölött vannak feltüntetve. Az 1. számú nyíl a rekeszizom jobb szárában kialakuló hematómát és a 44 IU/kg Fibrogammin beadásának időpontját jelöli. A 2. számú nyíl a rekeszizom bal szárában kialakuló hematóma és a nagyméretű rectus abdominis izomban kialakult hematóma időpontját jelöli. Ekkor a beteg 22 IU/kg Fibrogammint kapott. A 3. számú nyíl a betegben kialakult mélyvénás trombózis időpontját jelöli, mely pulmonáris embóliával társult, ekkor a beteg vena cava inferior filtert és 22 IU/kg Fibrogammint kapott.

5.3 FXIII és fibrinogén szintek meghatározása ESRD betegekben

5.3.1 ESRD betegek plazma fibrinogén és CRP koncentrációi

A HDF kezelésben részesülő betegek 56,6%-ában a fibrinogén koncentrációk a referencia tartomány (1,5-4,0 g/l) fölé estek. Az átlagos fibrinogén koncentráció $4,21 \pm 0,82$ g/l-nek adódott **(18. ábra, A)**. A HDF-ről HD kezelésre történő modalitás váltás nem befolyásolta szignifikánsan a fibrinogén koncentrációt. A HD kezelésben részesülő betegek 50%-ában az továbbra is a referencia tartomány fölé esett $4,23 \pm 0,87$ g/l átlagértékkel. Megjegyzendő, hogy a referencia tartományon belüli fibrinogén értékek túlnyomó része is a referencia tartomány felső részébe esett. Mivel a fibrinogén egy akut fázis fehérje és köztudott, hogy az ESRD betegek gyakran szenvednek valamilyen gyulladásos kórképben így annak kizárására, hogy az emelkedett fibrinogén értékek háttérben nem valamilyen gyulladásos folyamat áll, a betegek mintáiból CRP meghatározást is végeztünk **(18. ábra, B)** mely értékeket korreláltattuk a fibrinogén koncentrációkkal **(18. ábra, C-D)**. A HDF kezelt betegek 56,6%-ában a CRP koncentráció a referencia tartomány (nők esetén: 4,6 mg/l, férfiak esetén: 5,2 mg/l) fölött volt. Az ESRD betegek CRP koncentrációjának mediánja 5,95 mg/l-nek adódott (interkvartilis tartomány (IQR-Interquartile range): 4,02-15,15 mg/l). Négy, HDF kezelésben részesülő beteg CRP értéke 50 mg/l fölötti volt, melynek háttérben akut gyulladás állt. Ezen betegek mért paramétereit csillaggal jelöltük, nem csak a fibrinogén és CRP koncentrációk, de a FXIII koncentrációk és antigén értékek esetében is.

Annak ellenére, hogy a két hétig tartó HD kezelés alatt a CRP szintek individuális változásokat mutattak, általánosságban elmondható, hogy ezek a változások nem voltak szignifikánsak. A betegek 53%-ában az értékek továbbra is a referencia tartomány fölött maradtak (medián: 4,75 mg/l, IQR: 2,52-14,33 mg/l). A **(18. ábra, C-D)** látható magas determinációs koefficiensek (r^2 : 0,647, ill. 0,671 HDF és HD kezelésben részesülő betegek esetén), jól demonstrálják a szignifikáns korrelációt ($p < 0,001$) a gyulladásos folyamatok és a fibrinogén szintek között. Sem a HDF-kezelés időtartama (r^2 : 0,018, $p = 0,590$), sem a betegek életkora (r^2 : 0,035, $p = 0,267$) nem mutatott szignifikáns korrelációt a fibrinogén szintekkel (nem szerepel a 18. ábrán). Továbbá nem volt szignifikáns különbség a nemek között a dialízis kezelés előtt mért fibrinogén és CRP koncentrációkban.



18. ábra. Fibrinogén koncentráció, CRP szint és ezek összefüggései ESRD betegekben.

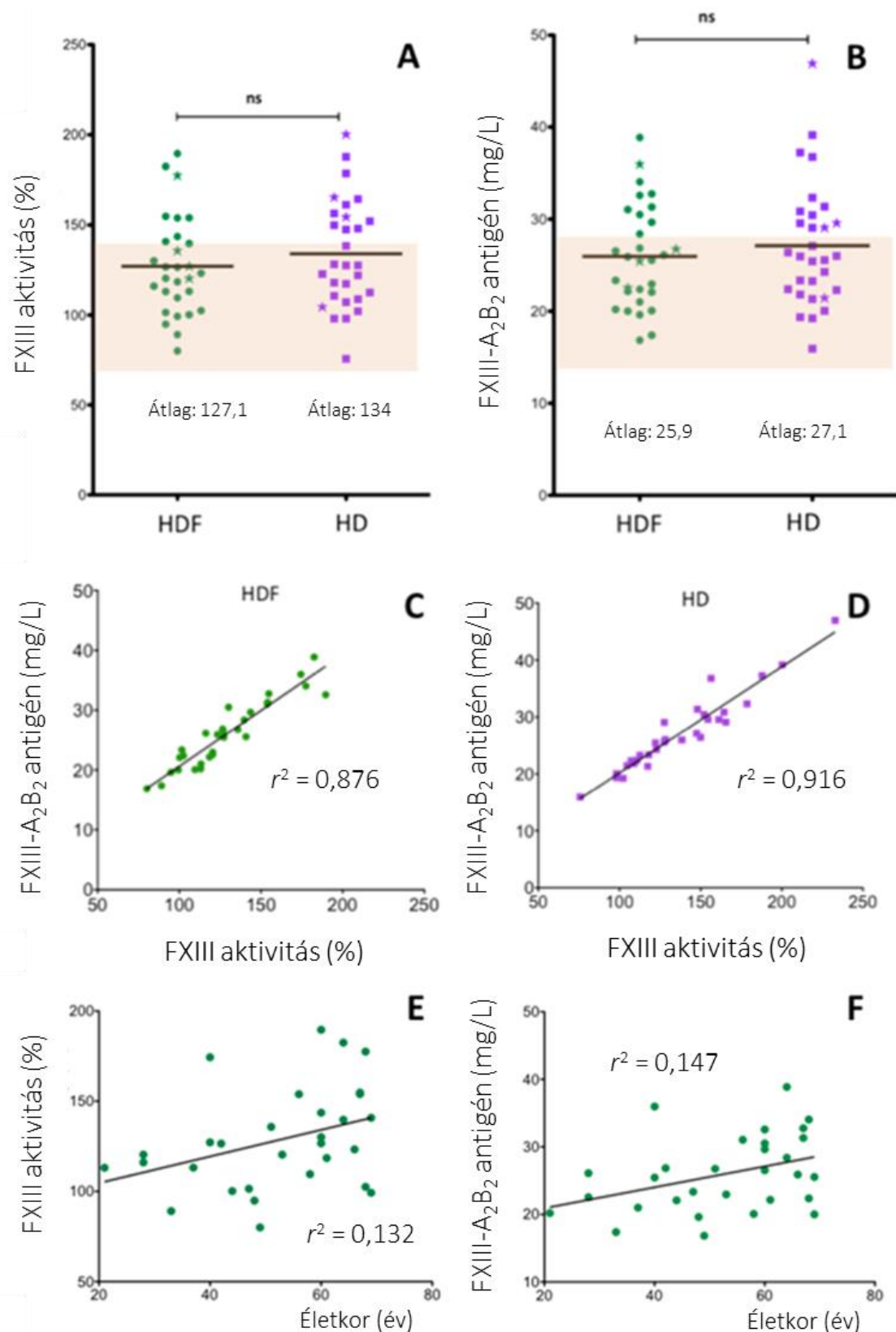
(A) Fibrinogén koncentráció és (B) CRP szint tartós HDF-kezelésben részesülő és két hétig tartó HD-kezelésre történő átállás után. A sárga sávok az (A és B ábrán) a referencia tartományt jelölik. A hosszabb vízszintes vonalak a medián értékeket mutatják (a számértékek is láthatók), a rövidebb vízszintes vonalak az interkvartilis tartomány felső és alsó határát jelölik. Az 50 mg/l-nél magasabb CRP-szintet mutató négy egyén kiugró értékeit a HDF csoportban csillaggal jelöltük mind az (A, B) ábrákon. (C, D) ábrák a HDF és HD kezelésben részesülő betegek CRP

szintje és a fibrinogén koncentrációja közötti összefüggéseket mutatja. CRP: C-reaktív protein; HDF: hemodiafiltráció; HD: hemodialízis; ns: nem szignifikáns; r^2 : determinációs koefficiens.

5.3.2 FXIII aktivitás és antigén koncentrációk ESRD betegekben.

A véralvadási kaszkád utolsó fázisának kulcsfontosságú szereplője a FXIII, mely a keringésben fibrinogénhez kötve kering, aktív formában pedig keresztkötéseket alakít ki a fibrinláncok között, valamint hozzákapcsolja az α_2 PI-t a fibrinhez. Az alábbi kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a normál hemosztázis fenntartásában, valamint a trombotikus megbetegedések patomechanizmusában fontos szerepet játszó FXIII szintek hogyan változnak az ESRD betegekben. A FXIII szinteket funkcionális teszttel **(19. ábra, A)**, és antigén meghatározással is mértük **(19. ábra, B)**. Hasonló eredményeket figyeltünk meg mindkét mérési módszerrel, mind a HDF mind a HD kezelések során, melyet jól mutatnak a determinációs koefficiens értékei. A HDF csoportban (r^2 : 0,876, $p < 0,001$) a HD csoportban (r^2 : 0,916, $p < 0,001$) **(18. ábra C-D)**. A HDF csoportban az átlagos FXIII aktivitás $127,1 \pm 27,3$ %, az átlagos antigén koncentráció pedig $25,9 \pm 5,6$ mg/l-nek adódott **(19. ábra, A-B)**. A két hétig tartó hemodialízis kezelés alatt nem történt szignifikáns változás a FXIII értékekben (FXIII aktivitás: $134,0 \pm 29,8$ %, FXIII antigén: $27,1 \pm 6,7$ mg/l). Az átlagok minden esetben a referencia intervallum felső harmadába estek. A HDF csoportban az egyéni FXIII aktivitás értékek 27 %-a és a FXIII antigén értékek 33%-a meghaladta a referencia tartomány felső értékét. A HD csoportban az aktivitás értékek 43%-a, az antigén értékeknek pedig a 40%-a esett a referencia tartomány fölé.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy az ESRD betegben az egészséges egyénekhez viszonyítva emelkedett FXIII koncentrációk figyelhetők meg. Mind a FXIII aktivitás (r^2 : 0,132, $p = 0,061$), mind az antigén (r^2 : 0,147, $p = 0,070$) gyenge, nem szignifikáns korrelációt mutatott a betegek korával **(19. ábra, E-F)**.



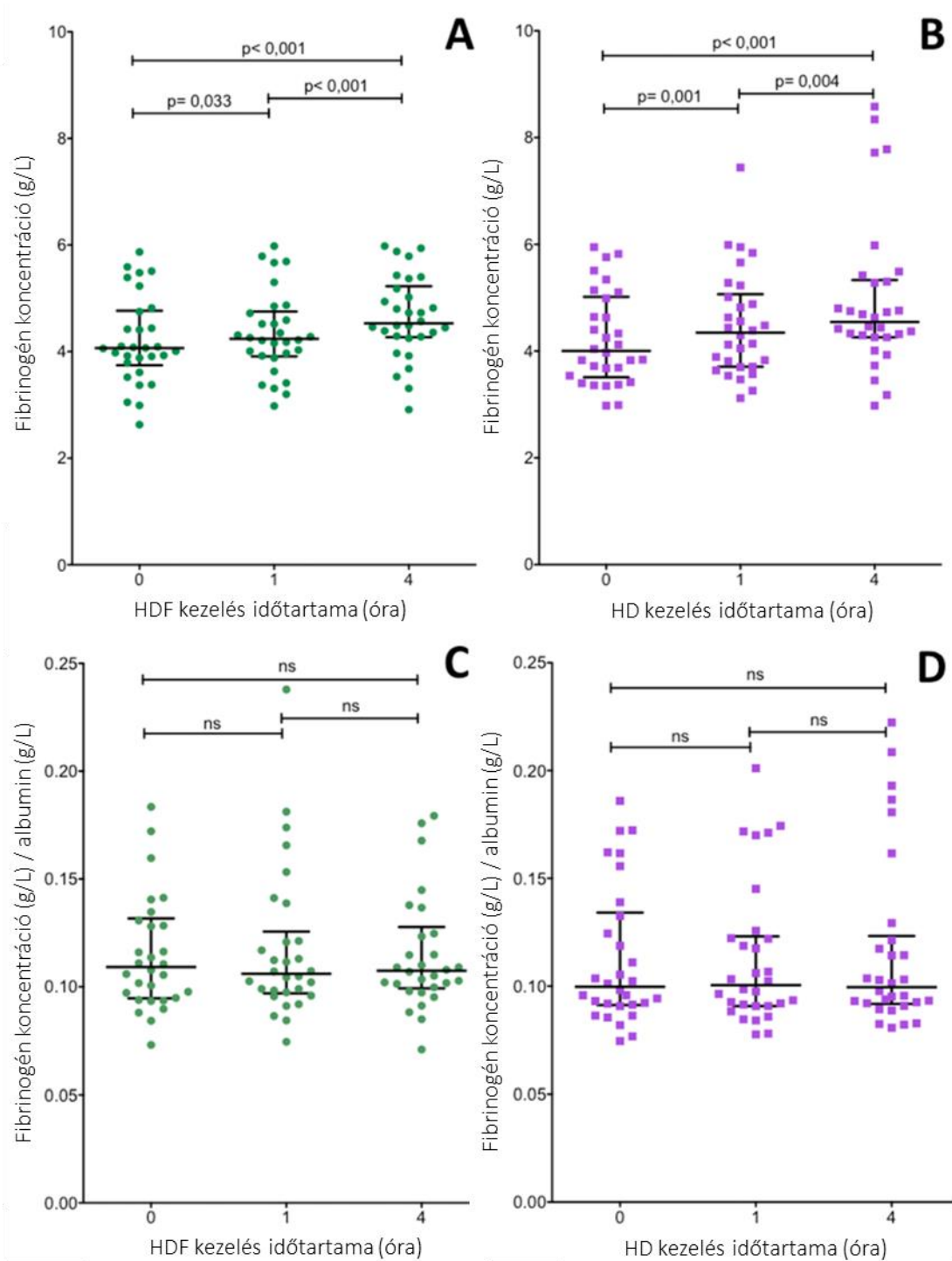
19. ábra. FXIII aktivitás és antigén szintek ESRD betegekben. Plazma FXIII aktivitás **(A)** és antigén koncentráció **(B)** értékek a krónikus HDF kezelés alatt álló vagy a kéthetes HD kezelésben részesülő betegekben. **(C)** és **(D)** ábrák szemléltetik az aktivitás és antigén értékek

korrelációját. Az **(E)** és **(F)** ábrák a FXIII szintek és az ESRD betegek életkora közötti korrelációt mutatják. A sárga sávok az **(A és B ábrán)** a referencia tartományt jelölik. HDF: hemodiafiltráció, HD: hemodialízis, ns: nem szignifikáns, r^2 : determinációs koefficiens. A csillagok az **(A)** és **(B)** ábrákon azt a négy beteget jelölik, akiknek a legmagasabb volt a CRP szintje.

5.3.3 Fibrinogén koncentráció változása a HDF és HD kezelések alatt az ESRD betegekben

A fenti eredményekből megtudtuk, hogy a HDF és HD kezelések hogyan befolyásolják a fibrinogén és FXIII szinteket hosszútávon, azonban további érdekes kérdés maradt, hogy ezen paraméterek hogyan változnak a négy órán keresztül tartó HDF és HD kezelések alatt. Mivel mind a plazmavíz mind a plazma fehérjék szintje jelentősen változik a dialízis kezelések során, így a torzítás elkerülése végett az egyes mintákhoz tartozó albumin értékekkel elvégeztük az adatok korrigálását. Ahogyan az várható volt az albumin koncentráció fokozatosan emelkedett a 4 órás HDF és HD kezelések során.

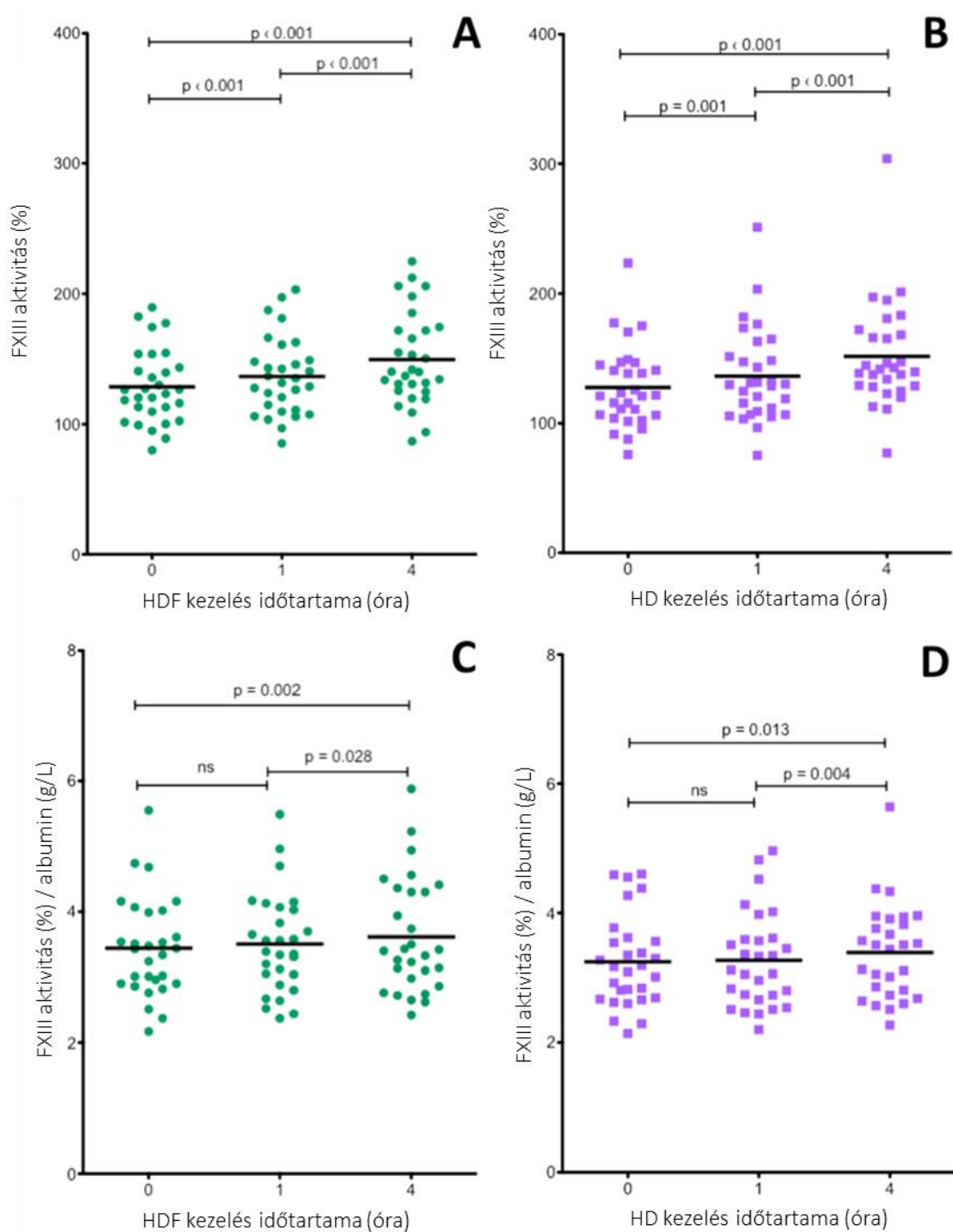
A HDF kezelésben részesülő betegek dialízis előtt mért albumin koncentrációja (median: 37 g/l, IQR: 35-40 g/l) szignifikánsan megemelkedett a 4 órás HDF kezelés következtében (median: 42 g/l, IQR: 38-44 g/l, $p < 0,001$). A HD csoportban hasonló emelkedés volt megfigyelhető (median albumin koncentráció a dialízis előtt: 39 g/l IQR: 36-41 g/l, a dialízis után 44 g/l, IQR: 40-48 g/l, $p < 0,001$). Hasonlóan, a plazma fibrinogén koncentrációja is szignifikánsan megemelkedett a 4 órás kezelések alatt **(20. ábra, A, B)**. Az albuminra történő korrigálást követően a dialízis előtt és a 4 órás kezelés után mért fibrinogén értékek közötti különbségek eltűntek **(20. ábra, C, D)**, ami egyértelműen bizonyítja, hogy a fibrinogén koncentrációk kezelése során bekövetkezett emelkedése a plazma bekonzentrálásának volt az eredménye.



20. ábra. A fibrinogén koncentrációk változása ESRD betegekben a 4 órán át tartó HDF (A, C) és HD (B, D) kezelések alatt. A két felső ábra az albuminra nem korrigált fibrinogén értékeket mutatja (A, B), a két alsó ábra pedig az albuminra korrigált fibrinogén értékeket szemlélteti (C, D). Az ábrákon látható hosszú és rövid vízszintes vonalak a medián értékeket és az interkvartilis tartományok alsó és felső határait jelölik. A szignifikáns különbségeket a vízszintes vonalak fölött feltüntetett p értékek mutatják. HDF: hemodiafiltráció, HD: hemodialízis, ns: nem szignifikáns.

5.3.4 FXIII aktivitás értékek változása A HDF és HD kezelések alatt az ESRD betegekben

A FXIII értékek estében más volt a helyzet **(21. ábra)**. Az albuminra nem korrigált FXIII aktivitás értékek jelentős emelkedést mutattak mind a HDF mind a HD kezelések hatására **(21. ábra, A-B)**, azonban a statisztikailag szignifikáns emelkedés a korrigálást követően továbbra is megmaradt **(21. ábra C-D)**. A FXIII antigén értékek változása hasonló volt, mint a FXIII aktivitás értékeké.



21. ábra. FXIII aktivitás értékek változása a 4 órás HDF (A, C) és HD (B, D) kezelések alatt.

A felső két ábra az albuminra nem korrigált FXIII aktivitás értékeket mutatja (A, B), az alsó két ábrán pedig az albuminra korrigált FXIII aktivitás értékeket láthatjuk (C, D). A vízszintes vonalak az átlagos FXIII aktivitás értékeket jelölik. A szignifikáns különbségeket a kezelések előtt és után mért értékek között az ábrák felső részén látható vízszintes vonalak fölötti p értékekkel adtuk meg. HDF: hemodiafiltráció, HD: hemodialízis, ns: nem szignifikáns.

6 Megbeszélés

Összefoglalva a FXIII-B glikoproteinnel végzett kísérleteinket, elmondhatjuk, hogy sikerült a FXIII N-glikán profiljának teljeskörű karakterizálása, továbbá kifejlesztettünk egy olyan protokollt, mely lehetővé tette a fehérje PNGase F enzimmel történő teljes deglikozilációját. Az ilyen módon deglikozilált fehérje további biokémiai kísérletekben használható, melyek segítenek megérteni a FXIII-B N-glikozilációjának biológiai jelentőségét. Az aminosav szekvencia két glikozilált aszparagint tartalmaz a FXIII-B fehérjében, amely megfelel a konszenzus szekvenciának Asn-X-Ser/Thr-Y ($X \neq \text{Pro}$), a 142. Asn-Tyr-Ser-Thr és az 525. Asn-Gly-Ser-Ser pozícióban. A Glikoziláció hatékonysága szintén függ az Y pozícióban lévő aminosav típusától, ilyen szempontból a Ser és Thr a legkedvezőbbek (137, 138). Ezen aminosavak jelenléte az Y pozícióban a FXIII-B alegység hatékony glikozilációját jelzi.

A FXIII-B szoros szerkezeti evolúciós kapcsolatot mutat a komplement aktivációt szabályozó gén klaszter más fehérjéivel (139). A FXIII-B legközelebbi evolúciós rokona a komplement faktor H. A faktor H egy 155 kDa molekulatömegű fehérje, mely a komplement alternatív útvonalának szabályozásában játszik szerepet. 8 N-glikozilációs hellyel rendelkezik, ezek közül mindegyik a FXIII-B-hez hasonlóan követi az N-X-S/T szekvenciát. A faktor H-hoz kapcsolódó N-glikánoknak úgy tűnik sokkal inkább strukturális, mint funkcionális szerepe van (140).

Csak egyetlen olyan közleményről van tudomásunk, melyben megkísérelték a FXIII-B deglikozilációját, azonban ebben az esetben sem a deglikoziláció mértékét, sem a felszabaduló szénhidrát komponensek összetételét, sem a deglikoziláció sikerességét nem vizsgálták (11). A natív FXIII-B teljes deglikozilációja, ahogyan ebben a tanulmányban leírtuk, lehetőséget kínál a fehérjéhez kapcsolódó N-glikánok funkcionális és strukturális szerepének feltárására.

Mi vizsgáltuk először, hogy a deglikoziláció befolyásolja-e a FXIII-B dimer szerkezetét. A FXIII-B dimerek kialakulásáért felelős szakaszok a 4. és a 9. sushi doméneken találhatók (11) és figyelembe véve a glikán struktúrák közelségét ezekhez a helyekhez, az egyik feltevésünk az volt, hogy befolyásolhatják a FXIII-B dimerizációját. A deglikozilált FXIII-B molekulasúlya, valamivel kevesebb volt, mint a natív formáé, ez annak a következménye, hogy a szénhidrát komponenseket eltávolítottuk a fehérjéről. Azonban a deglikozilált és a natív

FXIII-B meghatározott molekulatömegének közeli értéke azt mutatja, hogy a dimer struktúra a deglikozilációt követően is megmarad.

A deglikoziláció hatását a FXIII-B keringésben eltöltött élettartamára nézve FXIII-B knock-out egerekben vizsgáltuk. A fajok közötti különbség, azaz a humán FXIII-B egerekbe történő injektálása nagy valószínűséggel befolyásolta és fel is gyorsította az elimináció sebességét. Nincs elérhető adat a szabad, humán FXIII-B plazmában eltöltött félélet idejére vonatkozóan. FXIII-A hiányos betegekben, a FXIII-A₂B₂ komplex-, valamint a rekombináns FXIII-A₂ (amely a keringésben összekapcsolódik a betegek FXIII-B alegységével) félélet ideje 6,2 és 16 nap között változott (88, 141-144). Azonban a komplexben lévő FXIII-B₂ félélet ideje jelentősen eltérhet a nem komplexben lévő fehérje keringésben eltöltött idejétől. A natív humán FXIII-B₂ eliminációs sebessége a FXIII-B KO-egerekben gyorsabb volt a vártnál, amely betudható annak, hogy a beadott fehérjék nem azonos fajtából származtak. Azonban az erőteljes különbség a natív és a deglikozilált FXIII-B₂ eliminációs sebessége között azt sugallja, hogy a glikán struktúra meghosszabbítja a FXIII-B₂ élettartamát a keringésben.

PhD értekezésem további célja volt egy FXIII-A ellenes autoantitest okozta, szerzett FXIII hiányban szenvedő beteg kórtörténetének és korrekt diagnózisának részletes ismertetése, mellyel gyarapítani tudjuk a FXIII ellenes antitestek patológiás jelentőségét leíró irodalmat.

Az öröklött FXIII-A hiányban szenvedő betegek súlyos, vérzéses tünetei jól jelzik a FXIII normál hemosztázis fenntartásában való fontosságát (145). Az általános populációban a FXIII-A hiány az egyik legritkább öröklött véralvadási zavar (egy a kétmillióhoz), de azokban az országokban, ahol magas a rokonházasságok száma, különösen, ha ez alapító mutációval is társul, a gyakorisága sokkal magasabb lehet (64). A FXIII alegységei ellen termelődő autoantitestek szintén súlyos, akár életet veszélyeztető vérzéses komplikációkat okozhatnak 25% körüli mortalitással (89). A FXIII ellenes autoantitestek okozta vérzéses hajlam szintén egy ritka állapot, egy 2018-as átfogó tanulmányban 48 már korábban közölt, jól definiált esetet foglaltak össze, 47 betegnél FXIII-A ellenes, 1 betegnél FXIII-B ellenes autoantitesteket azonosítottak (136). Az autoantitestek megjelenése összefüggésben lehet autoimmun kórképekkel, azonban különösen idős betegeknél gyakori az idiopátiás előfordulás. A képződött autoantitest zavarhatja a FXIII aktivációját, gátolhatja a FXIIIa TG aktivitását, és immunkomplexet képezve a fehérjével, felgyorsíthatja annak kiürülését a keringésből.

A trombotikus komplikációk ritkaságnak számítanak a FXIII ellenes autoantitesttel rendelkező betegekben, csupán néhány esetet írtak le (93, 95, 146, 147) és egy részüket hatalmas hematóma miatti vénakompresszióknak tulajdonították (93, 147). A mi esetünkhöz hasonlóan két további olyan esetet írtak le, melyben a betegeknél pulmonáris embólia alakult ki (95, 147). Megjegyzendő, hogy a mi esetünkhöz hasonlóan viszonylag gyors rekanalizációról számoltak be, mely feltehetően a nem keresztköött fibrinszálak fokozott lízisének volt köszönhető (95, 146).

A FXIII-A ellenes autoantitestek következtében kialakuló, szerzett FXIII hiány diagnózisa és klinikai kezelése meglehetősen nagy kihívást jelent. Az általunk bemutatott eset jól demonstrálja, hogy a váratlan eltérések a laboratóriumi eredmények értékelésben jelentősen megnehezíthetik a korrekt diagnózis felállítását és az előre nem látható klinikai történések bonyolíthatják a klinikai lefolyást.

Az általunk leírt eset kapcsán az alábbi következtetések vonhatóak le:

1. a FXIII aktivitás vak korrekció nélkül történő meghatározása jelentősen félrevezethet a faktor hiány súlyosságának megítélésében.
2. a betegben jelenlévő FXIII-A ellenes autoantitest interferálhat az immunoassay során használt antitesttel, ezáltal a FXIII-A₂ és FXIII-A₂B₂ antigén szintek nagyfokú alámérését eredményezheti.
3. a Nijmegen-Bethesda assay mellett, az IC₅₀ és a disszociációs konstans meghatározása szintén hasznos az autoantitest megfelelő karakterizálása céljából.
4. a megfelelő klasszifikációhoz szükséges azonosítani a mechanizmust, amely alapján az autoantitest interferál a FXIII aktivációjával/aktivitásával.
5. a gátló hatású FXIII-A ellenes autoantitest nem védi meg a beteget a tromboembóliás szövődeményektől.

Már több tanulmányban is vizsgálták, hogy az emelkedett FXIII szintek hogyan befolyásolják a miokardiális infarktus, valamint a perifériás érbetegségek kialakulását és azt találták, hogy az emelkedett FXIII szintek nők esetében fokozott kockázatot jelentenek a fent említett kórképekre nézve. Férfiak esetében ilyen jellegű összefüggést azonban nem találtak. Fiatal, szívinfarktuson átesett betegeknél emelkedett FXIII aktivitás és antigén szinteket írtak le (148). Hasonlóan az aterotrombotikus megbetegedésekhez a megemelkedett FXIII aktivitás

és antigén szintek, növelték a vénás tromboembólia kockázatát nőknél (149). Ezzel szemben a férfiak esetén csak egy gyenge kapcsolatot találtak.

ESRD betegekben a trombotikus és a vérzéses kórképek kialakulásának kockázata egyaránt jelentős. A véralvadási rendszerben bekövetkező változások hozzájárulhatnak ezen elváltozások patogeneziséhez. Ezért az alvadási és fibrinolitikus faktorok vizsgálata segíthet felfedni az okokat, melyek ezen paradox helyzet háttérében állnak. Érdekes kérdés, hogy az emelkedett FXIII szint az ESRD betegekben hozzájárul-e az aterotrombotikus vagy tromboembóliás kórképekhez. Ezt a feltevést már néhány tanulmányban vizsgálták, de ezek alapján általános következtetést nem lehetett levonni.

A hemodialízisben részesülő ESRD betegeken végzett tanulmányunk során kettős célt tűztünk ki. Egyrészt, hogy megvizsgáljuk a hemodialízis kezelés hosszútávú hatását a véralvadás utolsó szakaszában kulcsszerepet játszó komponensek aktivitására és koncentrációjára nézve, és e tekintetben összehasonlítani a két hemodialízis kezelést, a HDF-t és HD-t. Másrészt, ezen kezelések rövid távú hatásainak tanulmányozása, azaz az egyéni változások nyomon követése a négyórás dialízis kezelése során.

A fibrinogén, a fibrin prekursor fehérjéje, mely a hemosztázisban betöltött kulcsfontosságú szerepe mellett, a sebgyógyulás folyamatában is jelentős szerepet játszik. Az emelkedett fibrinogén koncentráció az aterotrombotikus megbetegedések, mint a hemorrágiás stroke és az iszkémiás szívbetegség független rizikó faktora (150-153). A krónikus HD kezelésben részesülő ESRD betegeken végzett néhány tanulmány, a dialízis kezelés előtt levett vérmintákból mért emelkedett fibrinogén koncentrációról számolt be (154-159), habár egy részüknél az emelkedés mértéke nem érte el a statisztikailag szignifikáns értéket (160, 161). Méréseink során hasonlóan a korábban közölt tanulmányok eredményeihez, emelkedett fibrinogén értékeket kaptunk a dialízis előtt levett mintákból. HDF kezelés esetén a betegek 56,6%, HD kezelés esetében a betegek 50,0%-ában a plazma fibrinogén koncentrációja a referencia tartomány fölé esett. Nem találtunk szignifikáns különbséget a HD és a HDF hatása között. Mindkét kezelési típus esetében a dialízis előtti fibrinogén és CRP szintek szoros összefüggést mutattak és a magas determinációs koeficiensek is arra utaltak, hogy legalább részben az akut fázis fehérjék emelkedett szintézise felelős az emelkedett fibrinogén szintekért. Egyéb vizsgált változók, mint a dialízis kezelés hossza, a kor és a nem, nem befolyásolta a dialízis előtt mért fibrinogén koncentrációt. A kezelés előtti emelkedett értékeket feltehetően a fibrinogén szintézisre gyakorolt hosszabb ideje tartó hatások határozzák meg, egyetlen dialízis kezelés akut hatását nagy valószínűséggel más, gyorsan ható tényezők is befolyásolják. Mind a

HDF mind a HD kezelések során a fibrinogén koncentrációk fokozatos emelkedését figyeltük meg. Azt feltételeztük, hogy ezek az emelkedő értékek a betegek plazmájának dialízis kezelés alatti bekonzentrálódásának voltak tulajdoníthatók, ezt a feltevésünket alátámasztotta, hogy az egyes minták albumin értékeivel történő korrigálását követően a fibrinogén szintek már nem mutattak fokozatos emelkedést a kezelések során.

A hemodialízis kezelés ESRD betegek FXIII szintjére kifejtett hatását csupán néhány tanulmányban vizsgálták. FXIII aktivitást funkcionális assay-vel csak egyetlen esetben határoztak meg (162), három esetben pedig FXIII-A antigén koncentrációt mértek (118, 159, 162). Kolb és munkatársai normál FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szinteket mértek dialízis kezelés előtt levett mintákból (162), további két tanulmányban azonban szignifikánsan emelkedett FXIII-A koncentrációkról számoltak be (118, 159).

Esetünkben a FXIII aktivitást és a FXIII-A₂B₂ komplex koncentrációját párhuzamosan határoztuk meg. A HDF csoportban az egyéni FXIII aktivitás értékek 27 %-a és a FXIII antigén értékek 33%-a meghaladta a referencia tartomány felső értékét. A HD csoportban az aktivitás értékek 43%-a, az antigén értékeknek pedig a 40%-a esett a referencia tartomány fölé. A kapott eredmények azt mutatják, hogy az ESRD betegek egy jelentős részében az egészséges egyénekhez viszonyítva emelkedett FXIII koncentrációk figyelhetők meg. A 4 órás HDF és HD kezelések alatt a FXIII aktivitás szignifikáns emelkedést mutatott. A fibrinogén szintekkel ellentétben az albumin koncentrációval történő korrekciót követően a FXIII értékek továbbra is emelkedettek maradtak, habár a szignifikancia szintje valamelyest csökkent. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a kezelések alatt a betegek plazmájának bekonzentrálódása nem magyarázza az emelkedett FXIII szinteket és további vizsgálatok szükségesek annak érdekében, hogy feltárjuk azt a mechanizmust, amely a FXIII szintek emelkedéséhez vezet ESRD betegekben a hemodialízis kezelés során.

7 Összefoglalás

A FXIII véralvadási faktor védő/stabilizáló funkciót ellátó B-alegysége egy 80 kDa molekulásúlyú glikoprotein, mely két N-glikozilációs helyet tartalmaz. A glikánok FXIII-B szerkezetében és funkciójában betöltött szerepét ezidáig még nem vizsgálták. Ezért célunk volt a FXIII-B-hez kapcsolódó glikánok felszabadítása, majd ezt követően a pontos szerkezetük azonosítása, valamint egy olyan módszer kidolgozása, mely lehetővé teszi a fehérje natív körülmények között történő deglikozilációját, hogy megvizsgáljuk milyen hatása van a glikánoknak a FXIII-B dimer szerkezetére, valamint keringésben eltöltött félélet idejére nézve. Az aszparaginhoz kapcsolódó szénhidrátokat a humán FXIII-B-ről PNGase F enzimmel vágtuk le. A felszabadult N-oligoszacharidokat fluoroforral jelöltük és kapilláris elektroforézissel vizsgáltuk. A glikánok pontos szerkezetének azonosításához exoglikozidáz alapú szekvenálást és adatbázist használtunk. A deglikozilált FXIII-B szerkezetét gélfiltrációval vizsgáltuk. A deglikozilált és natív FXIII-B plazmából történő kiürülését FXIII-B knock-out egerekben vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. A PNGase F emésztés teljesen eltávolította az N-glikánokat a denaturált fehérjéről. A natív fehérje deglikozilációját emelt koncentrációjú ismételt PNGase F emésztéssel értük el. A FXIII-B alegységen 9 cukorstruktúrát azonosítottunk, melyből 3 fukozilált volt és mindegyik struktúra legalább 1 szíálsavat tartalmazott. A deglikoziláció nem változtatta meg a FXIII-B natív dimer szerkezetét, de felgyorsította kiürülését a FXIII-B knock out egerek keringéséből. Mi írtuk le először a FXIII-B-n jelenlévő N-glikánok szerkezetének részletes jellemzését. Sikeresen végrehajtottuk a natív fehérje teljes deglikozilációját. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy kapcsolódó glikánok nem szükségesek a FXIII-B dimer képződéséhez, de nagy valószínűséggel meghosszabbítja a FXIII-B felezési idejét a keringésben.

A FXIII ellenes autoantitestek okozta vérzési hajlam egy ritka de súlyos rendellenesség. A diagnózis és kezelés kihívásait jól mutatja a 67 éves női betegünk esete, akinek a kórelőzményeiben vérzéses komplikációt nem írtak le, azonban váratlanul egy hatalmas muszkuláris hematómája alakult ki. Vak korrekció nélkül a FXIII aktivitást 17%-nak mértük, azonban a vakkal történő korrekciót követően a beteg FXIII aktivitás értéke a detektálhatósági határ alatt volt, ezt az eredményt szintén alátámasztotta, hogy a beteg plazmájában a fibrin láncok között keresztkötések nem alakultak ki. A FXIII-A-t ELISA technikával nem tudtuk detektálni, azonban Western blot technikával szemmel látható volt a FXIII-A jelenléte. A betegben jelenlévő autoantitestek nagy affinitással kötődtek a FXIII-A₂-höz. Az inhibitor

jelentős gátló hatását jól mutatja a magas inhibitor titer, melyet Bethesda egységben adtunk meg, valamint az, hogy a betegből származó IgG már alacsony koncentrációban is nagymértékű gátlást fejtett ki. Fő biokémiai hatását a Ca^{2+} által kiváltott aktiváció gátlásán keresztül fejtette ki. A betegnél alkalmazott eradikációs terápia sajnos csak részben volt sikeres. Négy hónappal az utolsó vérzéses komplikációt követően a beteg pulmonáris embóliával komplikált mélyvénás trombózist kapott.

A végstádiumú vesebetegségben szenvedők esetében a hemosztázis zavara gyakori, mely vérzéses és trombotikus szövődményként egyaránt megnyilvánulhat. Az alvadási és fibrinolitikus faktorok vizsgálata segíthet felfedni az okokat, melyek ezen paradox helyzet hátterében állnak. Ennek érdekében a fibrin képződéshez és stabilizációjához nélkülözhetetlen komponenseket vizsgáltunk HDF- és HD kezelésben részesülő ESRD betegeknél. A dialízis előtt mért fibrinogén, FXIII antigén koncentráció és FXIII aktivitás emelkedett értékeket mutatott. A betegeknél zajló gyulladásos állapotok, melyet a CRP koncentrációk mérésével jellemeztünk kulcsfontosságúak voltak a fibrinogén koncentrációk esetén. A négy órán keresztül tartó HDF és HD kezelések alatt a fibrinogén koncentrációk és a FXIII szintek fokozatos emelkedést mutattak. Azonban az albuminra történő korrekciót követően már csak a FXIII szintek mutattak jelentős emelkedést a kezelések előrehaladtával. A két kezelési típus között nem találtunk szignifikáns különbséget. Ennek alapján elmondható, hogy ez ESRD betegeknél megfigyelt emelkedett fibrinogén és FXIII szintek hozzájárulhatnak a fokozott trombózis rizikóhoz.

8 Summary

The protective/inhibitory B subunits of coagulation factor XIII (FXIII-B) is a ~80 kDa glycoprotein containing two N-glycosylation sites. Neither the structure nor the functional role of the glycans on FXIII-B has been explored. We attempted to reveal the glycan structures linked to FXIII-B, to design a method for deglycosylating the native protein, to find out if deglycosylation influences the dimeric structure of FXIII-B and its clearance from the circulation. Asparagine-linked carbohydrates were released from human FXIII-B by PNGase F digestion. The released N-linked oligosaccharides were fluorophore labeled and analyzed by capillary electrophoresis. Structural identification utilized glycan database search and exoglycosidase digestion based sequencing. The structure of deglycosylated FXIII-B was investigated by gel filtration. The clearance of deglycosylated and native FXIII-B from plasma was compared in FXIII-B knock out mice. PNGase F completely removed N-glycans from the denatured protein. Deglycosylation of the native protein was achieved by repeated digestion at elevated PNGase F concentration. The total N-glycan profile of FXIII-B featured nine individual structures; three were fucosylated and each structure contained at least one sialic acid. Deglycosylation did not change the native dimeric structure of FXIII-B, but accelerated its clearance from the circulation of FXIII-B knock out mice. Characterization of the glycan moieties attached to FXIII-B is reported for the first time. Complete deglycosylation of the native protein was achieved by a deglycosylation workflow. The associated glycan structure is not required for FXIII-B dimer formation, but it very likely prolongs the half-life of FXIII-B in the plasma.

Hemorrhagic diathesis due to anti-factor XIII (FXIII) autoantibody is a rare but severe disorder. Challenges of the diagnosis and treatment is demonstrated by the case of a 67-year-old female without previous bleeding history, who suffered a huge muscular hematoma. Without blank subtraction 18% plasma FXIII activity was measured; however, after correction for blank the activity was below the limit of detection and the lack of fibrin cross-linking in the patient's plasma confirmed the latter result. FXIII-A₂ antigen was not detectable by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); however, it was well detected by western blotting. The autoantibody showed high affinity toward FXIII-A₂. Its considerable inhibitory activity was demonstrated by high titer in Bethesda units and the low immunoglobulin G concentration required for inhibition. The main biochemical effect was the inhibition of Ca²⁺-induced FXIII-A activation. Eradication therapy was only partially successful. Four months after the last

hemorrhagic event the patient suffered deep vein thrombosis complicated by pulmonary embolism.

Hemostasis disorder in patients with end-stage renal disease (ESRD) is frequently associated with bleeding diathesis but it may also manifest in thrombotic complications. Analysis of individual coagulation and fibrinolytic factors may shed light on the background of this paradox situation. Here we explored components essential for fibrin formation/stabilization in ESRD patients being on maintenance hemodiafiltration (HDF) or hemodialysis (HD). Pre-dialysis fibrinogen, factor XIII (FXIII) antigen concentrations and FXIII activity were elevated. The inflammatory status, as characterized by C-reactive protein (CRP) was a key determinant of fibrinogen concentration. During a 4-h course of HDF or HD, fibrinogen concentration and FXIII levels gradually elevated. When compensated for the change in plasma water, i.e., normalized for plasma albumin concentration, only FXIII elevation remained significant. There was no difference between HDF and HD treatments. Elevated fibrinogen and FXIII levels in ESRD patients might contribute to the increased thrombosis risk.

9 Irodalomjegyzék

1. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. 2011. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus* 9:120-38.
2. Lasne D, Jude B, Susen S. 2006. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth* 53:S2-11.
3. Owens AP, 3rd, Mackman N. 2010. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost* 104:432-9.
4. Babiker3. RSCSMUHM. 2020. Physiology, Coagulation Pathways.
5. Arnhold J. 2020. Acute-Phase Proteins and Additional Protective Systems, p 205-228. *In* Arnhold J (ed), *Cell and Tissue Destruction Academic Press*.
6. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. 1999. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 94:271-305.
7. Katona E, Haramura G, Kárpáti L, Fachet J, Muszbek L. 2000. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost* 83:268-73.
8. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. 2011. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 91:931-72.
9. Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. 1971. The subunit structures of human plasma and platelet factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *J Biol Chem* 246:5851-4.
10. Carrell NA, Erickson HP, McDonagh J. 1989. Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *J Biol Chem* 264:551-6.
11. Souri M, Kaetsu H, Ichinose A. 2008. Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry* 47:8656-64.
12. Chung SI, Lewis MS, Folk JE. 1974. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. *J Biol Chem* 249:940-50.
13. Hornyak TJ, Shafer JA. 1991. Role of calcium ion in the generation of factor XIII activity. *Biochemistry* 30:6175-82.
14. Anokhin BA, Stribinskis V, Dean WL, Maurer MC. 2017. Activation of factor XIII is accompanied by a change in oligomerization state. *Febs j* 284:3849-3861.
15. Stieler M, Weber J, Hils M, Kolb P, Heine A, Büchold C, Pasternack R, Klebe G. 2013. Structure of active coagulation factor XIII triggered by calcium binding: basis for the design of next-generation anticoagulants. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:11930-4.
16. Gupta S, Biswas A, Akhter MS, Kretzler C, Reinhart C, Dodt J, Reuter A, Philippou H, Ivaskevicius V, Oldenburg J. 2016. Revisiting the mechanism of coagulation factor XIII activation and regulation from a structure/functional perspective. *Sci Rep* 6:30105.
17. Protopopova AD, Ramirez A, Klinov DV, Litvinov RI, Weisel JW. 2019. Factor XIII topology: organization of B subunits and changes with activation studied with single-molecule atomic force microscopy. *J Thromb Haemost* 17:737-748.
18. Komáromi I, Bagoly Z, Muszbek L. 2011. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost* 9:9-20.
19. Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. 1994. Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7296-300.
20. Fox BA, Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. 1999. Identification of the calcium binding site and a novel ytterbium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography. *J Biol Chem* 274:4917-23.

21. Nagy JA, Henriksson P, McDonagh J. 1986. Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* 68:1272-9.
22. Ichinose A, McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. 1986. Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments. *Biochemistry* 25:4633-8.
23. Bork P, Downing AK, Kieffer B, Campbell ID. 1996. Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q Rev Biophys* 29:119-67.
24. Ichinose A, Bottenus RE, Davie EW. 1990. Structure of transglutaminases. *J Biol Chem* 265:13411-4.
25. Chen R, Jiang X, Sun D, Han G, Wang F, Ye M, Wang L, Zou H. 2009. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J Proteome Res* 8:651-61.
26. Liu T, Qian WJ, Gritsenko MA, Camp DG, 2nd, Monroe ME, Moore RJ, Smith RD. 2005. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J Proteome Res* 4:2070-80.
27. Yorifuji H, Anderson K, Lynch GW, Van de Water L, McDonagh J. 1988. B protein of factor XIII: differentiation between free B and complexed B. *Blood* 72:1645-50.
28. Seelig GF, Folk JE. 1980. Noncatalytic subunits of human blood plasma coagulation factor XIII. Preparation and partial characterization of modified forms. *J Biol Chem* 255:8881-6.
29. Walter M, Nyman D, Krajnc V, Duckert F. 1977. The activation of plasma factor XIII with the snake venom enzymes ancrod and batroxobin marajoensis. *Thromb Haemost* 38:438-46.
30. Niewiarowski S, Kirby EP, Brudzynski TM, Stocker K. 1979. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry* 18:3570-7.
31. Kopeć M, Latallo ZS, Stahl M, Wegrzynowicz Z. 1969. The effect of proteolytic enzymes on fibrin stabilizing factor. *Biochim Biophys Acta* 181:437-45.
32. McDonagh J, McDonagh RP. 1975. Alternative pathways for the activation of factor XIII. *Br J Haematol* 30:465-77.
33. Bagoly Z, Fazakas F, Komáromi I, Haramura G, Tóth E, Muszbek L. 2008. Cleavage of factor XIII by human neutrophil elastase results in a novel active truncated form of factor XIII A subunit. *Thromb Haemost* 99:668-74.
34. Greenberg CS, Miraglia CC, Rickles FR, Shuman MA. 1985. Cleavage of blood coagulation factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting. *J Clin Invest* 75:1463-70.
35. Schroeder V, Vuissoz JM, Caflisch A, Kohler HP. 2007. Factor XIII activation peptide is released into plasma upon cleavage by thrombin and shows a different structure compared to its bound form. *Thromb Haemost* 97:890-8.
36. Credo RB, Curtis CG, Lorand L. 1978. Ca²⁺-related regulatory function of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4234-7.
37. Lorand L, Credo RB, Janus TJ. 1981. Factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *Methods Enzymol* 80 Pt C:333-41.
38. Polgár J, Hidasi V, Muszbek L. 1990. Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J* 267:557-60.
39. Muszbek L, Haramura G, Polgár J. 1995. Transformation of cellular factor XIII into an active zymogen transglutaminase in thrombin-stimulated platelets. *Thromb Haemost* 73:702-5.
40. Muszbek L, Polgár J, Boda Z. 1993. Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thromb Haemost* 69:282-5.

41. AbdAlla S, Lothar H, Langer A, el Faramawy Y, Quitterer U. 2004. Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell* 119:343-54.
42. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. 2009. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev* 89:991-1023.
43. Muszbek L, Adány R, Mikkola H. 1996. Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit Rev Clin Lab Sci* 33:357-421.
44. Folk JE. 1983. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed epsilon-(gamma-glutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 54:1-56.
45. Sakata Y, Aoki N. 1980. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest* 65:290-7.
46. Lorand L, Konishi K, Jacobsen A. 1962. Transpeptidation mechanism in blood clotting. *Nature* 194:1148-9.
47. Jensen PH, Lorand L, Ebbesen P, Gliemann J. 1993. Type-2 plasminogen-activator inhibitor is a substrate for trophoblast transglutaminase and factor XIIIa. Transglutaminase-catalyzed cross-linking to cellular and extracellular structures. *Eur J Biochem* 214:141-6.
48. Ritchie H, Robbie LA, Kinghorn S, Exley R, Booth NA. 1999. Monocyte plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) inhibits u-PA-mediated fibrin clot lysis and is cross-linked to fibrin. *Thromb Haemost* 81:96-103.
49. Mosnier LO, Bouma BN. 2006. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2445-53.
50. Valnickova Z, Enghild JJ. 1998. Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases. Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem* 273:27220-4.
51. Duckert F. 1972. Documentation of the plasma factor XIII deficiency in man. *Ann N Y Acad Sci* 202:190-9.
52. Francis CW, Marder VJ. 1988. Increased resistance to plasminic degradation of fibrin with highly crosslinked alpha-polymer chains formed at high factor XIII concentrations. *Blood* 71:1361-5.
53. Francis CW, Marder VJ. 1987. Rapid formation of large molecular weight alpha-polymers in cross-linked fibrin induced by high factor XIII concentrations. Role of platelet factor XIII. *J Clin Invest* 80:1459-65.
54. Rodeghiero F, Tassetto A, Di Bona E, Castaman G. 1991. Clinical pharmacokinetics of a placenta-derived factor XIII concentrate in type I and type II factor XIII deficiency. *Am J Hematol* 36:30-4.
55. Saito M, Asakura H, Yoshida T, Ito K, Okafuji K, Yoshida T, Matsuda T. 1990. A familial factor XIII subunit B deficiency. *Br J Haematol* 74:290-4.
56. Komanasin N, Catto AJ, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Ariëns RA. 2005. A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 3:2487-96.
57. Iwata H, Kitano T, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Kemkes-Matthes B, Ichinose A. 2009. Distinct C-terminus of the B subunit of factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and fibrinolytic systems. *J Thromb Haemost* 7:1084-91.

58. Ryan AW, Hughes DA, Tang K, Kelleher DP, Ryan T, McManus R, Stoneking M. 2009. Natural selection and the molecular basis of electrophoretic variation at the coagulation F13B locus. *Eur J Hum Genet* 17:219-27.
59. Mezei ZA, Bereczky Z, Katona É, Gindele R, Balogh E, Fialat S, Balogh L, Czuriga I, Ádány R, Édes I, Muszbek L. 2015. Factor XIII B subunit polymorphisms and the risk of coronary artery disease. *Int J Mol Sci* 16:1143-59.
60. Katona E, Péntzes K, Csapó A, Fazakas F, Udvardy ML, Bagoly Z, Orosz ZZ, Muszbek L. 2014. Interaction of factor XIII subunits. *Blood* 123:1757-63.
61. Duckert F, Jung E, Shmerling DH. 1960. A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. *Thromb Diath Haemorrh* 5:179-86.
62. Ivaskevicius V, Seitz R, Kohler HP, Schroeder V, Muszbek L, Ariens RA, Seifried E, Oldenburg J. 2007. International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data. *Thromb Haemost* 97:914-21.
63. Karimi M, Bereczky Z, Cohan N, Muszbek L. 2009. Factor XIII Deficiency. *Semin Thromb Hemost* 35:426-38.
64. Dorgalaleh A, Naderi M, Hosseini MS, Alizadeh S, Hosseini S, Tabibian S, Eshghi P. 2015. Factor XIII deficiency in Iran: a comprehensive review of the literature. *Semin Thromb Hemost* 41:323-9.
65. Dorgalaleh A, Naderi M, Shamsizadeh M. 2016. Morbidity and mortality in a large number of Iranian patients with severe congenital factor XIII deficiency. *Ann Hematol* 95:451-5.
66. Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Siboni SM, Halimeh S, Faeser B, Pergantou H, Platokouki H, Giangrande P, Peerlinck K, Celkan T, Ozdemir N, Bidlingmaier C, Ingerslev J, Giansily-Blaizot M, Schved JF, Gilmore R, Gadisseur A, Benedik-Dolničar M, Kitanovski L, Mikovic D, Musallam KM, Rosendaal FR. 2012. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. *J Thromb Haemost* 10:615-21.
67. Carcao M, Fukutake K, Inbal A, Kerlin B, Lassila R, Oldenburg J, Garly ML, Nugent D. 2017. Developing the First Recombinant Factor XIII for Congenital Factor XIII Deficiency: Clinical Challenges and Successes. *Semin Thromb Hemost* 43:59-68.
68. Anwar R, Miloszewski KJ. 1999. Factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 107:468-84.
69. Lak M, Peyvandi F, Ali Sharifian A, Karimi K, Mannucci PM. 2003. Pattern of symptoms in 93 Iranian patients with severe factor XIII deficiency. *J Thromb Haemost* 1:1852-3.
70. Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. 2011. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 9:1404-6.
71. Souri M, Koseki-Kuno S, Takeda N, Degen JL, Ichinose A. 2008. Administration of factor XIII B subunit increased plasma factor XIII A subunit levels in factor XIII B subunit knock-out mice. *Int J Hematol* 87:60-8.
72. Hashiguchi T, Saito M, Morishita E, Matsuda T, Ichinose A. 1993. Two genetic defects in a patient with complete deficiency of the b-subunit for coagulation factor XIII. *Blood* 82:145-50.
73. Lorand L, Urayama T, De Kiewiet JW, Nossel HL. 1969. Diagnostic and genetic studies on fibrin-stabilizing factor with a new assay based on amine incorporation. *J Clin Invest* 48:1054-64.
74. Seiving B, Henriksson P, Stenberg P, Nilsson IM. 1992. A reversed activity staining procedure for detection of an acquired antibody against factor XIII in a girl with factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 82:414-6.

75. Wada H, Souri M, Matsumoto R, Sugihara T, Ichinose A. 2013. Alloantibodies against the B subunit of plasma factor XIII developed in its congenital deficiency. *Thromb Haemost* 109:661-8.
76. Péntzes K, Vezina C, Bereczky Z, Katona É, Kun M, Muszbek L, Rivard GE. 2016. Alloantibody developed in a factor XIII A subunit deficient patient during substitution therapy; characterization of the antibody. *Haemophilia* 22:268-275.
77. Lorand L, Velasco PT, Hill JM, Hoffmeister KJ, Kaye FJ. 2002. Intracranial hemorrhage in systemic lupus erythematosus associated with an autoantibody against factor XIII. *Thromb Haemost* 88:919-23.
78. Hayashi T, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H, Souri M, Ichinose A. 2012. A case of acquired FXIII deficiency with severe bleeding symptoms. *Haemophilia* 18:618-20.
79. Tone KJ, James TE, Fergusson DA, Timmouth A, Tay J, Avey MT, Kilty S, Lalu MM. 2016. Acquired Factor XIII Inhibitor in Hospitalized and Perioperative Patients: A Systematic Review of Case Reports and Case Series. *Transfus Med Rev* 30:123-31.
80. Tassetto A, Rodeghiero F, Gatto E, Manotti C, Poli T. 1995. An acquired hemorrhagic disorder of fibrin crosslinking due to IgG antibodies to FXIII, successfully treated with FXIII replacement and cyclophosphamide. *Am J Hematol* 48:34-9.
81. Yan MTS, Rydz N, Goodyear D, Sholzberg M. 2018. Acquired factor XIII deficiency: A review. *Transfus Apher Sci* 57:724-730.
82. Ajzner E, Schlammadinger A, Kerényi A, Bereczky Z, Katona E, Haramura G, Boda Z, Muszbek L. 2009. Severe bleeding complications caused by an autoantibody against the B subunit of plasma factor XIII: a novel form of acquired factor XIII deficiency. *Blood* 113:723-5.
83. Souri M, Osaki T, Ichinose A. 2015. Anti-factor XIII A subunit (FXIII-A) autoantibodies block FXIII-A2 B2 assembly and steal FXIII-A from native FXIII-A2 B2. *J Thromb Haemost* 13:802-14.
84. Lorand L, Maldonado N, Fradera J, Atencio AC, Robertson B, Urayama T. 1972. Hemorrhagic syndrome of autoimmune origin with a specific inhibitor against fibrin stabilizing factor (factor XIII). *Br J Haematol* 23:17-27.
85. Lorand L, Velasco PT, Rinne JR, Amare M, Miller LK, Zucker ML. 1988. Autoimmune antibody (IgG Kansas) against the fibrin stabilizing factor (factor XIII) system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:232-6.
86. Luo YY, Zhang GS. 2011. Acquired factor XIII inhibitor: clinical features, treatment, fibrin structure and epitope determination. *Haemophilia* 17:393-8.
87. Fukue H, Anderson K, McPhedran P, Clyne L, McDonagh J. 1992. A unique factor XIII inhibitor to a fibrin-binding site on factor XIIIa. *Blood* 79:65-74.
88. Muszbek L, Katona É. 2016. Diagnosis and Management of Congenital and Acquired FXIII Deficiencies. *Semin Thromb Hemost* 42:429-39.
89. Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C. 2013. Acquired FXIII inhibitors: a systematic review. *J Thromb Thrombolysis* 36:109-14.
90. Ichinose A, Osaki T, Souri M. 2015. Clinical features of 32 new Japanese cases with autoimmune haemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. *Haemophilia* 21:653-8.
91. Ichinose A. 2017. Autoimmune acquired factor XIII deficiency due to anti-factor XIII/13 antibodies: A summary of 93 patients. *Blood Rev* 31:37-45.
92. Kessel R, Hu C, Shore-Lesserson L, Rand J, Manwani D. 2013. A child with acquired factor XIII deficiency: case report and literature review. *Haemophilia* 19:814-26.
93. Miesbach W. 2005. Rituximab in the treatment of factor XIII inhibitor possibly caused by Ciprofloxacin. *Thromb Haemost* 93:1001-3.

94. Nijenhuis AV, van Bergeijk L, Huijgens PC, Zweegman S. 2004. Acquired factor XIII deficiency due to an inhibitor: a case report and review of the literature. *Haematologica* 89:Ecr14.
95. Boehlen F, Casini A, Chizzolini C, Mansouri B, Kohler HP, Schroeder V, Reber G, de Moerloose P. 2013. Acquired factor XIII deficiency: a therapeutic challenge. *Thromb Haemost* 109:479-87.
96. Ngo Sack F, Galinat H, Egreteau PY, Mollard LM, Fortin H, Berthou C, Abgrall JF, Pan-Petes B. 2013. Efficacy of rituximab in acquired factor XIII inhibitor after arterial rFVIIa-induced thrombosis. *Haemophilia* 19:e93-4.
97. Peyvandi F, Menegatti M, Palla R. 2013. Rare bleeding disorders: worldwide efforts for classification, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost* 39:579-84.
98. Byrnes JR, Wolberg AS. 2016. Newly-Recognized Roles of Factor XIII in Thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 42:445-54.
99. Dorgalaleh A, Rashidpanah J. 2016. Blood coagulation factor XIII and factor XIII deficiency. *Blood Rev* 30:461-475.
100. Mitchell JL, Mutch NJ. 2019. Let's cross-link: diverse functions of the promiscuous cellular transglutaminase factor XIII-A. *J Thromb Haemost* 17:19-30.
101. Inbal A, Muszbek L. 2003. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. *Semin Thromb Hemost* 29:171-4.
102. Inbal A, Lubetsky A, Krapp T, Castel D, Shaish A, Dickneite G, Modis L, Muszbek L, Inbal A. 2005. Impaired wound healing in factor XIII deficient mice. *Thromb Haemost* 94:432-7.
103. Dardik R, Loscalzo J, Inbal A. 2006. Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J Thromb Haemost* 4:19-25.
104. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Shemirani AH, Katona E. 2010. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin Thromb Hemost* 36:18-33.
105. Bereczky Z, Balogh E, Katona E, Czuriga I, Edes I, Muszbek L. 2007. Elevated factor XIII level and the risk of myocardial infarction in women. *Haematologica* 92:287-8.
106. Shemirani AH, Szomják E, Csiki Z, Katona E, Bereczky Z, Muszbek L. 2008. Elevated factor XIII level and the risk of peripheral artery disease. *Haematologica* 93:1430-2.
107. Ariëns RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. 2000. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* 96:988-95.
108. Balogh I, Szôke G, Kárpáti L, Wartiovaara U, Katona E, Komáromi I, Haramura G, Pfliegler G, Mikkola H, Muszbek L. 2000. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 96:2479-86.
109. Wartiovaara U, Mikkola H, Szôke G, Haramura G, Kárpáti L, Balogh I, Lassila R, Muszbek L, Palotie A. 2000. Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIII-A. *Thromb Haemost* 84:595-600.
110. Lim BC, Ariëns RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. 2003. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 361:1424-31.
111. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. 1998. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 79:8-13.
112. Vokó Z, Bereczky Z, Katona E, Adány R, Muszbek L. 2007. Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 97:458-63.

113. Pruissen DM, Rosendaal FR, Frijns CJ, Kappelle LJ, Vos HL, Algra A. 2011. Prothrombotic gene variants and mortality after cerebral ischemia of arterial origin. *Neuroepidemiology* 37:109-13.
114. Reiner AP, Heckbert SR, Vos HL, Ariëns RA, Lemaitre RN, Smith NL, Lumley T, Rea TD, Hindorff LA, Schellenbaum GD, Rosendaal FR, Siscovick DS, Psaty BM. 2003. Genetic variants of coagulation factor XIII, postmenopausal estrogen therapy, and risk of nonfatal myocardial infarction. *Blood* 102:25-30.
115. Lee SH, Suh IB, Lee EJ, Hur GY, Lee SY, Lee SY, Shin C, Shim JJ, In KH, Kang KH, Yoo SH, Kim JH. 2013. Relationships of coagulation factor XIII activity with cell-type and stage of non-small cell lung cancer. *Yonsei Med J* 54:1394-9.
116. Kobayashi M, Yorioka N, Yamakido M. 1997. Hypercoagulability and secondary hyperfibrinolysis may be related to abnormal lipid metabolism in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 76:56-61.
117. Vaziri ND, Gonzales E, Barton CH, Chen HT, Nguyen Q, Arquilla M. 1991. Factor XIII and its substrates, fibronectin, fibrinogen, and alpha 2-antiplasmin, in plasma and urine of patients with nephrosis. *J Lab Clin Med* 117:152-6.
118. Carmassi F, Mariani G, Palla R, Fusani L, Bionda A, Molea N, Bianchi R. 1980. Coagulation factor XIII in patients with acute and chronic renal disease. *Nephron* 25:179-83.
119. Kerr PB, Argilés A, Flavier JL, Canaud B, Mion CM. 1992. Comparison of hemodialysis and hemodiafiltration: a long-term longitudinal study. *Kidney Int* 41:1035-40.
120. Canaud B, Bosc JY, Leblanc M, Garred LJ, Vo T, Mion C. 1998. Evaluation of high-flux hemodiafiltration efficiency using an on-line urea monitor. *Am J Kidney Dis* 31:74-80.
121. Spalding EM, Chamney PW, Farrington K. 2002. Phosphate kinetics during hemodialysis: Evidence for biphasic regulation. *Kidney Int* 61:655-67.
122. Zehnder C, Gutzwiller JP, Renggli K. 1999. Hemodiafiltration--a new treatment option for hyperphosphatemia in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 52:152-9.
123. Lorand L, Jeong JM, Radek JT, Wilson J. 1993. Human plasma factor XIII: subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol* 222:22-35.
124. Váradi C, Lew C, Guttman A. 2014. Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies. *Anal Chem* 86:5682-7.
125. Hurjác B, Kovács Z, Dönczö B, Katona É, Haramura G, Erdélyi F, Housang Shemirani A, Sadeghi F, Muszbek L, Guttman A. 2020. N-glycosylation of blood coagulation factor XIII subunit B and its functional consequence. *J Thromb Haemost* 18:1302-1309.
126. Kárpáti L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vámosi G, Muszbek L. 2000. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* 46:1946-55.
127. Fickenscher K, Aab A, Stüber W. 1991. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* 65:535-40.
128. Katona EE, Ajzner E, Tóth K, Kárpáti L, Muszbek L. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 258:127-35.
129. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. 1995. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 73:247-51.
130. Muszbek L, Katona É, Kerényi A. 2017. Assessment of Factor XIII. *Methods Mol Biol* 1646:277-293.

131. De Mol Nico J. MJEF. 2010. Surface Plasmon Resonance Methods and Protocols. Humana Press Inc., New York.
132. Schasfoort RBM. 2008. Handbook of Surface Plasmon Resonance. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
133. Jarvas G, Szigeti M, Guttman A. 2015. GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis. *Electrophoresis* 36:3094-6.
134. Harvey DJ, Merry AH, Royle L, Campbell MP, Rudd PM. 2011. Symbol nomenclature for representing glycan structures: Extension to cover different carbohydrate types. *Proteomics* 11:4291-5.
135. Menegatti M, Palla R, Boscarino M, Bucciarelli P, Muszbek L, Katona E, Makris M, Peyvandi F. 2017. Minimal factor XIII activity level to prevent major spontaneous bleeds. *J Thromb Haemost* 15:1728-1736.
136. Muszbek L, Péntzes K, Katona É. 2018. Auto- and alloantibodies against factor XIII: laboratory diagnosis and clinical consequences. *J Thromb Haemost* 16:822-832.
137. Shakin-Eshleman SH, Spitalnik SL, Kasturi L. 1996. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J Biol Chem* 271:6363-6.
138. Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, Shakin-Eshleman SH. 1998. The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* 37:6833-7.
139. Krushkal J, Bat O, Gigli I. 2000. Evolutionary relationships among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. *Mol Biol Evol* 17:1718-30.
140. Fenaille F, Le Mignon M, Groseil C, Ramon C, Riandé S, Siret L, Bihoreau N. 2007. Site-specific N-glycan characterization of human complement factor H. *Glycobiology* 17:932-44.
141. Nugent DJ, Ashley C, García-Talavera J, Lo LC, Mehdi AS, Mangione A. 2015. Pharmacokinetics and safety of plasma-derived factor XIII concentrate (human) in patients with congenital factor XIII deficiency. *Haemophilia* 21:95-101.
142. Lovejoy AE, Reynolds TC, Visich JE, Butine MD, Young G, Belvedere MA, Blain RC, Pederson SM, Ishak LM, Nugent DJ. 2006. Safety and pharmacokinetics of recombinant factor XIII-A2 administration in patients with congenital factor XIII deficiency. *Blood* 108:57-62.
143. Inbal A, Oldenburg J, Carcao M, Rosholm A, Tehranchi R, Nugent D. 2012. Recombinant factor XIII: a safe and novel treatment for congenital factor XIII deficiency. *Blood* 119:5111-7.
144. Brand-Staufner B, Carcao M, Kerlin BA, Will A, Williams M, Tornøe CW, Sandberg Lundblad M, Nugent D. 2015. Pharmacokinetic characterization of recombinant factor XIII (FXIII)-A2 across age groups in patients with FXIII A-subunit congenital deficiency. *Haemophilia* 21:380-385.
145. Muszbek L, Bagoly Z, Cairo A, Peyvandi F. 2011. Novel aspects of factor XIII deficiency. *Curr Opin Hematol* 18:366-72.
146. Tang N, Li D, Wang X, Yang J. 2020. Concurrent hematoma and venous thrombosis in a patient with autoimmune acquired factor XIII deficiency. *Int J Lab Hematol* 42:e4-e6.
147. Ogawa Y, Yanagisawa K, Soury M, Mihara M, Naito C, Takizawa M, Ishizaki T, Mitsui T, Handa H, Osaki T, Nojima Y, Ichinose A. 2017. Successful Management of a Patient with Autoimmune Hemorrhaphilia due to Anti-Factor XIII/13 Antibodies Complicated by Pulmonary Thromboembolism. *Acta Haematol* 137:141-147.
148. Balogh L, Katona É, Mezei ZA, Kállai J, Gindele R, Édes I, Muszbek L, Papp Z, Bereczky Z. 2018. Effect of factor XIII levels and polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young patients. *Mol Cell Biochem* 448:199-209.

149. Mezei ZA, Katona É, Kállai J, Bereczky Z, Somodi L, Molnár É, Kovács B, Miklós T, Ajzner É, Muszbek L. 2017. Factor XIII levels and factor XIII B subunit polymorphisms in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 158:93-97.
150. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. 1998. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *Jama* 279:1477-82.
151. Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. 2019. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 15:1-10.
152. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB, Wilson AC, Folsom AR, Wu K, Benderly M, Goldbourt U, Willeit J, Kiechl S, Yarnell JW, Sweetnam PM, Elwood PC, Cushman M, Psaty BM, Tracy RP, Tybjaerg-Hansen A, Haverkate F, de Maat MP, Fowkes FG, Lee AJ, Smith FB, Salomaa V, Harald K, Rasi R, Vahtera E, Jousilahti P, Pekkanen J, D'Agostino R, Kannel WB, Wilson PW, Tofler G, Arocha-Piñango CL, Rodriguez-Larralde A, Nagy E, Mijares M, Espinosa R, Rodriguez-Roa E, Ryder E, Diez-Ewald MP, Campos G, Fernandez V, Torres E, Marchioli R, Valagussa F, Rosengren A, Wilhelmsen L, et al. 2005. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *Jama* 294:1799-809.
153. de Lau LM, Leebeek FW, de Maat MP, Koudstaal PJ, Dippel DW. 2010. A review of hereditary and acquired coagulation disorders in the aetiology of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 5:385-94.
154. Nishimoto K, Yamagami S, Katoh Y, Kishimoto T, Maekawa M, Okada K, Matsuo O. 1986. Coagulation and fibrinolysis in chronic renal failure. Change in tissue-type plasminogen activator activity. *ASAIO Trans* 32:478-81.
155. Kirmizis D, Tsiandoulas A, Pangalou M, Koutoupa E, Rozi P, Protopappa M, Barboutis K. 2006. Validity of plasma fibrinogen, D-dimer, and the von Willebrand factor as markers of cardiovascular morbidity in patients on chronic hemodialysis. *Med Sci Monit* 12:Cr55-62.
156. Raj DS, Dominic EA, Wolfe R, Shah VO, Bankhurst A, Zager PG, Ferrando A. 2004. Coordinated increase in albumin, fibrinogen, and muscle protein synthesis during hemodialysis: role of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E658-64.
157. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Seminara G, Stancanelli B, Nicocia G, Buemi M. 2003. Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage renal failure. *J Intern Med* 254:132-9.
158. Prinsen BH, Rabelink TJ, Beutler JJ, Kaysen GA, De Boer J, Boer WH, Hagen EC, Berger R, De Sain-Van Der Velden MG. 2003. Increased albumin and fibrinogen synthesis rate in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 64:1495-504.
159. Vaziri ND, Gonzales EC, Wang J, Said S. 1994. Blood coagulation, fibrinolytic, and inhibitory proteins in end-stage renal disease: effect of hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 23:828-35.
160. Sabovic M, Salobir B, Preloznik Zupan I, Bratina P, Bojec V, Buturovic Ponikvar J. 2005. The influence of the haemodialysis procedure on platelets, coagulation and fibrinolysis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 34:274-8.
161. Gäckler A, Rohn H, Lisman T, Benkö T, Witzke O, Kribben A, Saner FH. 2019. Evaluation of hemostasis in patients with end-stage renal disease. *PLoS One* 14:e0212237.
162. Kolb G, Fischer W, Seitz R, Müller T, Egbring R, Lange H, Havemann K. 1991. Hemodialysis and blood coagulation: the effect of hemodialysis on coagulation factor XIII and thrombin-antithrombin III complex. *Nephron* 58:106-8.

10 Tárgyszavak

- FXIII-as faktor
- FXIII-B alegység
- deglikoziláció
- N-glikán
- FXIII hiány
- autoimmun betegség
- vérzéses rendellenesség
- véralvadás
- végstádiumú vesebetegség
- fibrinogén
- hemodiafiltráció
- hemodialízis

11 Keywords

- factor XIII
- FXIII-B subunit
- deglycosylation
- N-glycan
- factor XIII deficiency
- autoimmune disease
- hemorrhagic disorder
- blood coagulation
- end-stage renal disease
- fibrinogen
- hemodiafiltration
- hemodialysis

12 Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Muszbek László akadémikusnak a kutatáshoz szükséges feltételek megteremtéséért, a munkám irányításáért, az értekezés megírásában és a felmerülő problémákban nyújtott maximális támogatásáért, de elsősorban az irányomba mutató kedvességéért és végtelen türelméért.

Köszönöm Dr. Bereczky Zsuzsannának, a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék igazgatójának, hogy biztosított támogatásáról.

Külön köszönöm Haramura Gizellának azt a rengeteg segítséget és támogatást, amit PhD tanulmányaim alatt kaptam tőle szakmailag és emberileg egyaránt.

Köszönöm Dr. Katona Évának és munkacsoportjának az antitestek izolálásában és az antigén mérésekben nyújtott segítségért, melyek elengedhetetlenek voltak a munkához.

Köszönettel tartozom Guttman András professzor úrnak és munkatársainak, valamint a Belgyógyászati és Laboratóriumi Medicina Intézetnek és a Dijoni Hemofília Centrum dolgozóinak a rendelkezésünkre bocsátott beteg plazmákért és mérési eredményekért.

Köszönöm a Klinikai Laboratóriumi Kutatószék Tanszék minden egyes munkatársának a munkámban nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és támogattak céljaim elérésében.

13 Függelék

A függelék hivatalos publikációs listát és az értekezés témájában megjelent közlemények különlenyomatát tartalmazza.



Nyilvántartási szám: DEENK/181/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hurják Boglárka
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bovet, J., **Hurják, B.**, Maistre, E. D., Katona, É., Péntes-Daku, K., Muszbek, L.: Autoimmune Factor XIII Deficiency With Unusual Laboratory and Clinical Phenotype.
J. Thromb. Haemost. 18 (6), 1330-1334, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14811>
IF: 5.824
2. **Hurják, B.**, Kovács, Z., Dönczö, B., Katona, É., Haramura, G., Erdélyi, F., Shemirani, A. H., Sadeghi, F., Muszbek, L., Guttman, A.: N-glycosylation of blood coagulation factor XIII subunit B and its functional consequence.
J. Thromb. Haemost. 18 (6), 1302-1309, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14792>
IF: 5.824
3. Péntes-Daku, K., **Hurják, B.**, Katona, É., Becs, G., Balla, J., Muszbek, L.: Terminal Phase Components of the Clotting Cascade in Patients with End-Stage Renal Disease Undergoing Hemodiafiltration or Hemodialysis Treatment.
Int. J. Mol. Sci. 21, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21228426>
IF: 5.924

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,572

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
17,572**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudomány-metriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.05.30.

