

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**AZ INTRACELLULÁRIS XIII-AS VÉRALVADÁSI FAKTOR A ALEGYSÉG
SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A MONOCITA/MAKROFÁGOK
FAGOCITÓZISÁBAN**

DR. SÁRVÁRY ATTILA

**TÉMAVEZETŐ
PROF. DR. ÁDÁNY RÓZA**

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET**

DEBRECEN, 2004.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	2
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	9
4. EREDMÉNYEK.....	13
5. MEGBESZÉLÉS.....	18
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	20
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	21
8. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE..... EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	30
9. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK.....	33

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A XIII-as faktor és szerepe a véralvadásban

A XIII-as faktor története több mint 70 évvel ezelőttre nyúlik vissza, amikor Barkan és Gaspar megfigyelte, hogy a Ca^{2+} ionok jelenlétében kialakuló fibrin alvadék nem oldódik gyenge lúgban (1). Húsz évvel később Robbins ismételte meg és terjesztette ki ezeket a kísérleteket tisztított fibrinogént alkalmazva és megállapította, hogy a Ca^{2+} önmagában nem elég az alvadék gyenge savban vagy lúgban való oldhatatlanná tételéhez, s egy további szérum faktor jelenlétét feltételezte (2). Laki Kálmán és Lóránd László volt az a két magyar kutató, akik először kimutatták, hogy ez a szérum faktor hőlabilis, nem dializálható és szükséges ahhoz, hogy a fibrin alvadék koncentrált ureában oldhatatlanná váljon. Ezt a fehérjét fibrinstabilizáló faktornak nevezték el (3-5). A fibrinstabilizáló faktort először Loewy és munkatársai állították elő tiszta formában és írták le enzimatisztikus tulajdonságait (6-10). A Véralvadási Faktorok Nemzetközi Bizottsága 1963-ban a fibrinstabilizáló faktort véralvadási faktorként ismerte el és XIII-as véralvadási faktorként sorolta be.

A FXIII heterotetramerként kering a vérben, amelyet két alegység alkot (A_2B_2), a két globuláris A és az azt körülvevő két hosszú, vékony, egyenes B alegységek (11,12). A B alegység akadályozza meg a vérben az A alegység aktiválódását (13,14). A FXIII proteolitikus úton, trombin hatására aktiválódik, a folyamatot elsősorban Ca^{2+} és a fibrin(ogén) szabályozza (15,16). A FXIII aktív formája (FXIIIa) transzglutaminázként $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysyl}$ keresztkötéseket hoz létre a fibrinmonomerek között és ezáltal a véralvadási kaszkád utolsó fázisában kialakuló fibrinhálót stabilizálja (13,17). Ezen kívül a FXIIIa a fibrinolízis fő inhibitorát, az α_2 -antiplazmint kovalensen köti az α -fibrinlánc polimerekhez, ami megvédi a fibrint a gyors fibrinolitikus degradációtól (18,19). A véralvadásban a FXIII további szubsztrátjai a fibrinogén (20), a faktor V (21,22) és a 2-es típusú plazminogén aktivátor inhibitor (23).

A FXIII B alegységét az emberi szervezetben a májsejtek (24), az A alegységet (FXIII-A) nagyrészt a megakariociták/trombociták (25) és a monociták/makrofágok (25), valamint kis mértékben a májsejtek szintetizálják (26). Néhány évvel ezelőtt bizonyították, hogy a kondrociták is képesek a FXIII-A szintézisére (27).

Véralvadás nem csak intravaszkulárisan, hanem extravaszkulárisan is létrejöhet. Patológias folyamatok során pl. gyulladás esetén vagy a tumorok strómájában a megnövekedett permeabilitású érfalon keresztül jut plazma az extravaszkuláris, intersticiális

térbe. A tumor-asszociált makrofágok szöveti faktort expresszálnak, az extrinzik véralvadási út összes faktorát tartalmazzák (28) és a keresztkötött fibrint létrehozó FXIII-A-t is szintetizálják (29). A kialakuló fibrinháló stabilizálásában valószínűleg mind a tumor-asszociált makrofágokban található, mind a fokozott permeabilitású érfalakon kijutó és aktiválódó FXIII szerepet játszik (30-32). Extravaszkulárisan keresztkötött fibrint a reumatoid szinoviális szövetekben is kimutattak (33).

1.2. A XIII-as faktor véralvadási folyamaton kívüli szerepe

Az elmúlt három évtizedben nyilvánvalóvá vált, hogy a FXIII szerepe nem korlátozódik kizárólag a véralvadás területére. Mind klinikai megfigyelések, mind kísérleti eredmények bizonyítják, hogy a FXIII szerepet játszik a sebgyógyulásban (34,35), a terhesség korai szakában a FXIII deficiencia habituális abortuszhoz vezet, mely normál plazma vagy FXIII koncentrátum adásával kivédhető (13,36).

Noha már évtizedekkel ezelőtt kimutatták a FXIII-A-t a trombocitákban (25) és több, mint 15 évvel ezelőtt a monocita/makrofág sejtvonalban (25), a celluláris FXIII-A szerepéről keveset tudunk. Kísérleti és klinikai eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a megakariociták, monociták és makrofágok nem tekinthetők pusztán a plazma FXIII-A szintézis helyének és a FXIII A alegységének intracelluláris funkciói is vannak:

- a.) A FXIII-A jelen van a monocita/makrofág sejtvonalban a csontvelői fejlődésük legkorábbi szakaszától a keringésben levő monocitákon keresztül a szövetekbe és szerózus testüregbe vándorolt, makrofággá differenciálódott sejtekben (36-43).
- b.) A FXIII-A nem rendelkezik szignál szekvenciával és amikor sejtenyészeten újszülött hörcsög vesesejtekben expresszáltatták, nem jelent meg a tápfolyadékban, ami arra utal, hogy a FXIII-A csak a sejtek szétesése vagy membránjuk károsodása esetén juthat ki a sejtekből (44).
- c.) A makrofágokban a FXIII-A jellegzetes citoplazmatikus eloszlást mutat; elsősorban a citoplazmatikus vakuolumok körül és a pszeudopodiumokban figyelhető meg, de a fagocitotikus vakuolumokban nem lehet kimutatni (39). Immunelektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a FXIII-A a mikrofilamentumok mentén található a sejtekben, de sohasem detektálható a szekretoros vezikulumokban (26).

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a FXIII-A valamilyen módon a fagocitózis folyamatával kapcsolatban van. Ezt a feltételezést erősítik meg azok a kísérleti eredmények,

melyek szerint a fontosabb citoskeletális proteinek (miozin, aktin, vinkulin) a FXIII-A szubsztrátjai (45-47).

A celluláris FXIII ettől teljesen eltérő szerepére utal az a megfigyelés, hogy a monocita/makrofág differenciáció korai szakaszában a 2. és 3. napon a FXIII-A nukleáris akkumulációja figyelhető meg a sejtekben (42). Előzőleg már leírták, hogy bizonyos hisztonok között transzglutamináz által katalizált keresztkötések jönnek létre, illetve a sejtmagban található hisztonok is a transzglutaminázok szubsztrátjai lehetnek (48,49). Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy a celluláris FXIII-nak a monocita/makrofágokban szerepe lehet a kromatin átrendeződésében, olyan folyamatokban, mint pl. a programozott sejthalál, sejt differenciáció vagy sejtproliferáció.

A trombociták, a monocita/makrofágokhoz hasonlóan nagy mennyiségű FXIII-A-t tartalmaznak (41). A FXIII-A trombocitákban betöltött szerepét kutatva kimutatták, hogy a celluláris FXIII egy alacsony molekulású hősokk proteinhez (HSP), a HSP27-hez kapcsolódva található meg ezekben a sejtekben. A trombocita aktiváció során a HSP27 foszforilálódik és a citoskeleton képződés helyére transzlokálódik a FXIII-A-val együtt (50,51). Nemrég írták le azt is, hogy az aktivált trombocitákban a FXIII-A keresztkötéseket hoz létre a filamin és a vinkulin monomerek között, amelyek citoskeletális proteinek. Megfigyelték, hogy az aktin polimerizáció gátlásával a FXIII-A transzlokációja a sejtek szubmembrán részére blokkolható (52).

Fontos kérdés, hogy sejten belül a FXIII-A hogyan aktiválódik trombin nélkül. Kimutatták, hogy a FXIII-A nem-proteolitikus úton is aktiválódhat: lokálisan magas só koncentráció esetén (53). Bizonyították, hogy az intracelluláris FXIII-A lassú progresszív aktivációja jön létre fiziológiás ionerősség mellett is Ca^{2+} jelenlétében (53-55).

1.3. A monocita/makrofágok és a fagocitózis

A monocita/makrofágok a mononukleáris fagocita rendszer tagjai, melyet a keringésből kilépve különböző szervekbe vándorolt és ott makrofággá differenciálódott sejtek alkotnak. Jelen vannak a kötőszövetben, a hajszálerek bazálmembránja körül és különösen sok található belőlük a tüdőben (alveoláris makrofágok) és a májban (Kuppfer sejtek), ezen kívül megtalálhatóak a lépben, a nyirokcsomókban, a vesékben, az agyban és a csontokban (56). A differenciálódás során a monociták morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül, melyet citokinek, baktériumok által termelt anyagok és *in vitro* különböző ágensek szabályoznak (56-60). A monocita/makrofágok az immunrendszerben sokrétű szerepet

töltenek be, így részt vesznek a baktériumok, vírusok elleni védekezésben, a tumorsejtek eliminálásában, a hiperszenzitivitási és autoimmun reakciókban (56-59). A fagocitózis folyamatában az Fc γ , a komplement és az ún. lektin-szerű receptorok a legfontosabbak (57-61).

Az Fc γ receptorok (Fc γ R) szerepet játszanak az immunkomplexek eltávolításában, az antitesttel fedett partikulumok fagocitózisában, az antigén prezentáció fokozásában, a reaktív oxigén intermedierek (ROI) szekréciójában, az antitest-dependens citotoxicitásban (ADCC) és a tumorsejtek eliminációjában (57,62). Ezen kívül gyuladós mediátorok, hidrolitikus enzimek és több citokin termelését is indukálhatják (63-66). Az Fc γ R közül a monocitákon az Fc γ I és Fc γ II és Fc γ III receptor expresszálódik. Az Fc γ RI nagy affinitással köti a humán IgG1-et és IgG3-at, az egér IgG2a-t és IgG3-at, illetve az IgG immunkomplexet és fontos szerepe van az ADCC-ben (62,66). Az Fc γ RII-t a monociták/makrofágok mellet számos más sejt is expresszálja pl. a granulociták, trombociták, nagy granulumú limfociták (LGL), a természetes ölüsejtek (NK) és a B limfociták (57). Az Fc γ RII alacsony affinitással köti az IgG-t és csak IgG immunkomplexszel vagy opsonizált partikulumokkal lép reakcióba. Az expressziója alig változik a sejt differenciáció alatt vagy citokinek hatására (57). A monomer IgG-t alacsony affinitással kötő Fc γ RIII főleg a makrofágokon, granulocitákon és az LGL/NK sejteken található meg. Az Fc γ RII-höz hasonlóan az immunkomplexet és az opsonizált partikulumokat köti meg. Fc γ RIII-nak két típusa van az: az Fc γ RIIIA, melyet makrofágok és LGL/NK sejtek expresszálnak, rendelkezik transzmembrán és citoplazmatikus doménnel is és citotoxikus, illetve fagocitotikus trigger molekulaként működik (67,68); az Fc γ RIIIB a granulocitákon expresszálódik és a ROI-k termelését indukálja, illetve valószínűleg az immunkomplexek eltávolításában is részt vesz (68,69).

A komplement receptorok (CR) az Fc γ receptorokhoz hasonlóan szerepet játszanak a kórokozók felismerésében és fagocitózisában, részt vesznek a sejtek aktiválásában, az immunkomplexek eltávolításában, a gyulladós reakció szabályozásában, a kemotaxisban és az autoimmun folyamatokban (70). A monocitákon/makrofágokon megtalálható komplement receptorok közül a legfontosabbak a komplement receptor 1 (CR1) és 3 (CR3), ezen kívül megtalálható felszínükön a komplement receptor 4, C5a és C1q is (70-72).

A CR1 (CD35) elősegíti a C3b és C4b komplement proteinekkel opsonizált partikulumok vagy immunkomplexek sejthez való kötődését és a CR3-mal együttműködve részt vesz a kötődött partikulumok fagocitózisában is. A lépben és a májban található mononukleáris fagocita sejtek képesek eltávolítani a vörösvértestek CR1 receptorához kötődött C3 és/vagy

C4-el bevont immunkomplexeket a sejtek felszínéről, anélkül, hogy elpusztítanák vagy bekebeleznék őket. A CR1 a komplement kaszkád negatív regulátoraként is működik (72,73).

A CR3 (CD11b/CD18) a β 2 integrinek családjába tartozik. A CR3-nak sokféle ligand a szubsztrátja: köti az iC3b komplement komponenst, néhány véralvadási faktort (fibrinogén, kininogén, faktor X), felismer nem protein ligandokat (β -glükán, lipopoliszacharid, heparin és proteoglikánok) és kötődik az immunglobulin szuperfamilia tagjaihoz (intercelluláris adhéziós molekulák - ICAM-1, ICAM-2) (72,74). A CR3 központi szerepet játszik a kórokozók fagocitózisában egyrészt elősegítve a sejthez való kötődésüket közvetlenül (lipopoliszacharid vagy poliszacharid révén) vagy közvetve (iC3b fragmentekkel opsonizálva), másrészt a fagocitózis folyamatának elindításában (72,74).

A lektin-szerű receptorok közül a monocitákon a β -glükán receptor expresszálódik, a makrofágokon emellett megjelenik a mannóz receptor, míg a specifikusan differenciálódott rezidens makrofágok galaktóz és szialoadhezin receptorokkal is rendelkeznek (75-80). Ezeknek a receptoroknak a pontos funkciója még nem teljesen tisztázott, az azonban bizonyos, hogy a β -glükán és a mannóz receptorok részt vesznek a nem opsonizált partikulumok sejthez való kötődésében és fagocitózisában (75-80).

Az opsonizált vagy a nem opsonizált partikulumok receptorhoz való kötődése egy bonyolult jelátviteli folyamat beindulását eredményezi, amely végül az aktin polimerizációját idézi elő. A folyamatban részt vevő fehérjék leginkább az Fc γ és a komplement receptor-mediált fagocitózisban ismertek. A szignálútvonalakban részt vevő proteinek nem csak a receptorok szerint lehetnek különbözőek, hanem a receptorhoz kötődött ligand szerint is. Ugyanakkor a szignálútvonalakban sok közös fehérje is található. A receptor-mediált fagocitózisban szerepet játszanak az Src családjába tartozó tirozin kinázok, a SYK tirozin kináz, a foszfolipázok, a protein kináz C (PKC) család szerin/treonin kinázai, a foszfoinozitol kinázok, a GTP-ázok, többek között a Rho és az ADP-riboszilációs faktor (ARF) család tagjai és az Arp2/3 komplex. Ezen kívül szerepet játszik a folyamatban a Ca²⁺ is, amely az aktin depolimerizációját indukálja a fagoszóma körül (81-94).

Az ismereteink alapján a partikulumok internalizációjára megalkotott 4 lépcsős modell a következő: 1. Interakció az Fc receptor és a partikulum felszínéhez kötődött immunglobulin között; 2. Más receptorok eloszlásának megváltozása és kötődése a partikulum felszínén lévő ligandokhoz, amely a partikulum befűződéséhez vezet. Ennek hatására a membrán a partikulum körül kiterjed. Ez a folyamat nem igényel aktin polimerizációt; 3. A receptorok által elindított szignalizáció számos citoskeletális protein eloszlásának megváltozásához vezet, többek között az Arp2/3 komplexéhez, amely az aktin polimerizációjában kulcsszerepet

játszik. Az aktin háló kialakulása a plazma membrán partikulum körüli további kiterjedését eredményezi; 4. Ha a partikulum bekerült a sejtbe, a foszfoinozitol 3-kináz aktivitása szükséges a partikulum bekebelezésének befejezéséhez (93).

Az aktin polimerizációjában, átrendeződésében és keresztkötések kialakításában is többféle protein játszik szerepet. Így a már említett Arp 2/3 komplex, amely az aktin polimerizációján kívül keresztkötéseket tud létrehozni az aktin filamentumok között (94), illetve az α -aktinin, amely csomókba köti a filamentumokat és az integrinekhez kapcsolja őket (95,96). Az aktinon kívül a miozin különböző izoformái (97,98) és a vinkulin is involváltak a fagocitózisban (96). A sejt által bekebelezett partikulum aztán endoszómákkal és lizoszómákkal egyesül, amely végső soron annak eliminációjához vezet (99).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az eddigi megfigyelések és eredmények alapján feltételeztük, hogy a FXIII-A a monocita/makrofágokban intracellulárisan aktiválódhat és mint transzglutamináz szerepet játszhat a sejtek citoszkeletonjának átrendeződésével jellemezhető folyamatokban. A fagocitózis folyamatában a citoszkeleton átrendeződése az egyik legmarkánsabb jelenség. Ezért munkánk során célul tűztük ki olyan kísérletek végzését, melyek hozzájárulhatnak a FXIII-A fagocitózisban játszott szerepének tisztázásához a monocita/makrofágokban.

A monocita/makrofág differenciáció során vizsgáltuk, hogy:

- ◆ hogyan változik a FXIII-A mRNS expressziója és a fehérje termék produkciója?
- ◆ hogyan változik az Fc γ és komplement receptor által mediált fagocitózis mértéke?
- ◆ megfigyelhető-e valamilyen összefüggés a monocita/makrofágok fagocitózis mértékének változása és a FXIII-A expressziójának változása között?
- ◆ a FXIII-A által katalizált reakció gátlásával *in vitro* gátolható-e a monociták/makrofágok fagocitózisa?

Faktor XIII deficiens betegekből izolált monocita preparátumokon vizsgáltuk, hogy:

- ◆ ki lehet-e mutatni FXIII deficiens betegek monocitáin a fagocitózis csökkenését?
- ◆ a FXIII-A a partikulumok kötődésében vagy internalizációjában játszik-e szerepet?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Monociták szeparálása és tenyésztése

A monocitákat egészséges donoroktól származó trombocitamentes buffy coatból izoláltuk elutriációs centrifugálással (100). A sejteket 10%-os humán AB savóval komplettált RPMI 1640 médiumban 4 napig tenyésztettük (42). A monocita preparátum tisztaságát monocita CD14 markerrel, áramlási citometriával határoztuk meg, és az 85-90%-osnak, a sejtek életképességét tripánkék teszttel ellenőrizve azt minden stádiumban >95%-nak találtuk. A sejt kultúrákból minden vizsgálathoz naponta különítettünk el sejteket.

3.2. XIII-as faktor deficiens betegek

A vizsgálatban tizenhárom FXIII-A deficiens beteg vett részt. Hárman (nők) Lengyelországból, egy férfi Németországból és kilencen (5 férfi, 4 nő) Izraelből (101). Az első diagnosztikus vizsgálat alkalmával az összes beteg pozitív urea szolubilitási tesztet mutatott és a plazma XIII-as faktor aktivitás minden beteg esetében 1% alatt volt. Valamennyi beteg regisztrálva van a Working Party on FXIII of the European Thrombosis Research Organization által létrehozott a kongenitális FXIII deficienciával rendelkező betegek nyilvántartására és követésére létrehozott adatbázisban (102). A német és az izraeli betegek esetében azonosították a FXIII-A gén deficienciát okozó mutációit (103,104).

3.3. Monociták szeparálása a FXIII deficiens betegekből és a kontrollokból

A FXIII-A deficiens betegek és egészséges kontroll egyének (n=21) heparinnal alvadásgátolt véréből a mononukleáris sejteket Ficoll gradiens centrifugálással szeparáltuk. A mononukleáris sejszuspenzióból a monocitákat üveglemezre való kitapasztással választottuk el. A letapadt sejtek 80%-a monocita volt, amelyet Wright festés utáni morfológiai vizsgálattal, illetve nem specifikus észteráz reakcióval és neutrál red fagocitózissal igazoltunk. Mind a betegek, mind a kontrollok beleegyezésüket adták a vizsgálatok elvégzéséhez (105).

3.4. IgG-vel szenitizált vörösvértestek kötődésének és fagocitózisának vizsgálata

Az ún. vörösvértesthez kötött antitest (EA) Fc γ receptoron való kötődésének és fagocitózisának vizsgálatát nyúlszérumból izolált IgG-vel szenitizált birka vvt-vel végeztük (106). A nyúlszérumból izolált IgG-ből sorozathígítást készítettünk és 2,5%-os birka vvt-vel inkubáltuk, hogy meghatározzuk az IgG antitest szubagglutinációs titerét. A továbbiakban az IgG szubagglutinációs mennyiségével szenitizált birka vvt-vel dolgoztunk. A betegekből és kontrollokból szeparált mononukleáris sejteket (10^5) üveglemezre tapasztottuk ki és 30 percig 37°C-on 2,5%-os EA-val inkubáltuk. Az EA kötődésének és fagocitózisának kiértékelését Diaplan mikroszkóppal (Leitz, Germany) preparátumonként 300 sejten végeztük. Meghatároztuk az ún. uptake indexet (UI), amely a sejt felszínéhez kötődött és a sejt által fagocitált partikulumok egy sejtre vonatkoztatott átlagos számát jelenti. A sejtek felszínéhez kötődött szenitizált vvt-k hipotóniás lízise után a sejtek által fagocitált partikulumok átlagos számát a fagocitózis index-el fejeztük ki (PI). Az uptake index és a fagocitózis index különbsége adja a kötődési (binding) indexet (BI): $BI=UI-PI$.

3.5. Az élesztő partikulumok kötődésének és fagocitózisának vizsgálata

Az előzőleg megfőzött és Hanks' Balanced Salt Solution-ban (HBSS) szuszpendált élesztő gombákat (*Saccharomyces cerevisiae*) IgG és fibronectin mentes humán AB szérummal kezeltük, hogy felületüket C3b komplementkomponenssel vonjuk be (107). A betegekből és a kontrollokból szeparált mononukleáris sejteket (10^5) üveglemezre tapasztottuk ki és 60 percig 37°C-on komplementtel bevont és bevonatlan, fluorescein izotiocianáttal (FITC) konjugált élesztőpartikulumokkal inkubáltuk. A partikulumok kötődését és fagocitózisát fluoreszcencia kioltásos módszerrel határoztuk meg. A sejtek uptake indexét Axioplan fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Germany) preparátumonként 300 sejten határoztuk meg. Tripánkék festés után (0,2%-os), - amely teljesen kioltja a sejtek felszínéhez kötődött élesztőpartikulumok fluoreszcenciáját - számoltuk ki a fagocitózis indexet. A kötődési indexet az uptake index és a fagocitózis index különbségeként határoztuk meg.

3.6. A fagocitózis gátlása

A monocyta/makrofágok Fc γ és komplement receptoron keresztül történő fagocitózisát monodanzilkadaverin (MDC) inkubációt követően is megvizsgáltuk. Az MDC a

transzglutaminázok által katalizált keresztkötések kialakulását gátló vegyület (108). A monocita/makrofág sejttenyészetből származó sejteket 20 percig, 37°C-on 100 µmol/l végkoncentrációban MDC-t tartalmazó tápfolyadékban inkubáltuk, majd a fagocitózist a 3.4. és a 3.5. pontban ismertetett módon vizsgáltuk. Kontrollként az MDC-vel nem kezelt sejtkultúrák szolgáltak.

3.7. A FXIII-A immunfluoreszcens jelölése és a sejtpreparátumok image analízise

A monocita/makrofág sejttenyészetből naponta elkülönített szuszpenzió aliquotokból Cytospin 3 citocentrifugával (Shandon, Pittsburg, UK) citospin preparátumokat készítettünk. A preparátumokat 4%-os paraformaldehiddel (pH 7,4) 30 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. A FXIII-A-t indirekt immunfluoreszcens reakcióval poliklonális nyúl anti-FXIII-A, biotinnal jelölt anti-nyúl IgG és FITC-streptavidin felhasználásával detektáltuk (41,43). A FXIII-A relatív mennyiségét Axioplan típusú fluoreszcens mikroszkóphoz (Zeiss, Oberkochen, Germany) kapcsolt Charged-Coupled Device (CCD) kamera (IMAC-CCD, Sony, Japan) és képanalizáló szoftver (ISIS, Metasystems, Germany) segítségével sejtszinten mértük az általunk kidolgozott és publikált módszerrel (109). Minden preparátumban 200 sejt fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg.

3.8. A FXIII-A mRNS expresszió változása a tenyésztés során

A FXIII-A mRNS meghatározására kvantitatív reverz-transzkriptáz polimeráz lánreakciót használtunk (QRT-PCR). A sejtekből (6×10^6) naponta a tenyésztés során a High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA) segítségével totál RNS-t izoláltunk. Az RNS mennyiségét GeneQuantII (Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) RNS/DNS spektrofotométerrel határoztuk meg. Kétlépéses kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR reakciót alkalmaztunk. Az első lépésben minden mintából azonos mennyiségű RNS-t (600 µl) írtunk át cDNS-re a gyár által megadott protokollt használva. Röviden, a reverz transzkriptáz mix 1X TaqMan RT Buffer-t, 5,5 mM magnézium kloridot, 500 µM dNTPs mixet, 2,5 µM random hexamert, 0,4 U/µl Rnase inhibitor és 1,25 U/µl MultiScribe reverz transzkriptázt tartalmazott 20 µl térfogatban. Az átíráshoz használt hőmérsékleti paraméterek a következők voltak: 10 perc 25°C-on, 30 perc 48°C-on és 5 perc 95°C-on. A cDNS-t az Applied Biosystems (Foster City, USA) által kifejlesztett FXIII-A specifikus primerekkel és probe-bal,

PCR Master Mix-ben ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) készüléken amplifikáltuk a megadott protokoll alapján. A következő hőmérsékleti ciklusokat alkalmaztuk: 10 perc 95°C-on, majd 40 ciklus (15 mp 95°C-on és 1 perc 60°C-on). Valamennyi stádiumból 3 párhuzamos minta fluoreszcencia intenzitás változását mértük. A 18S rRNS (belső kontroll) amplifikálásához szintén az Applied Biosystems (Foster City, USA) által kifejlesztett 18S rRNS specifikus primereket és probe-ot használtuk a gyár által megadott protokoll szerint.

3.9. SDS-PAGE elektroforézis és Western blot analízis

A monocita/makrofág tenyészetből e célra naponta 5×10^6 sejtet vettünk ki, majd desztillált vizes feltárás után a citoszolban levő fehérje koncentrációját a Lowry által leírt módszerrel határoztuk meg (110). Denaturált rekombináns FXIII-A-t (1 μ g), minden mintából azonos mennyiségű fehérjét (50 μ g), nagy molekulásúlyú, illetve biotinált molekulásúlystandardot vittünk fel 7,5%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS) poliakrilamid géltre, majd elvégeztük az elektroforézist (Hoefler SE 600, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) (111). A fehérjéket a gélen Coomassie blue festéssel tettük láthatóvá. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át (Hoefler TE 50X, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA). A nitrocellulóz membránt (0,2 μ m pórusátmérőjű) 3%-os gelatinos blokkolás után FXIII-A ellenes antitesttel inkubáltuk, majd biotinált nyúl IgG, avidin-biotinylated peroxidase komplex felhasználásával jelöltük és diaminobenzidin tetrahidrokloriddal (ABC/DAB) tettük láthatóvá.

3.10. Statisztikai analízis

Az egészséges kontrollok és a FXIII deficiens betegek monocitáin végzett mérések eredményeit a Student féle t-tesztel hasonlítottuk össze. A különbséget akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $P < 0,05$. A kvantitatív RT-PCR eredményeit statisztikailag az ún. komparatív threshold cycle (Ct) módszerrel értékeltük ki. A minták RNS tartalmának normalizálásához a 18S rRNS-t használtuk, mint belső kontrollt és a FXIII-A első nap mért mRNS expresszióját tekintettük az eredmények összevetésekor viszonyítási alapnak. Átlag és a $2^{-\Delta\Delta Ct \pm SD}$ értékeket határoztuk meg (112).

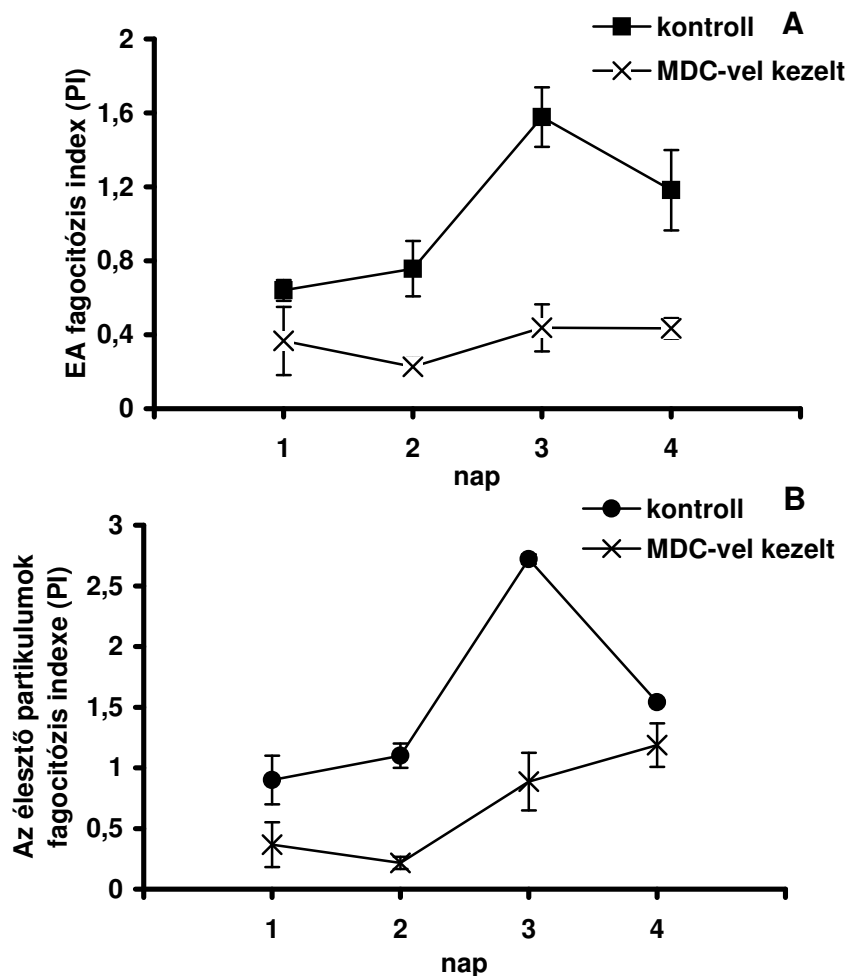
4. EREDMÉNYEK

4.1. A monocita/makrofágok fagocitózisának változása a tenyésztés során

A buffy coatból elutriációs centrifugálással nyert monocitákat 4 napig tenyésztettük és minden nap meghatároztuk a sejtek Fc γ és CR mediált fagocitózisát a FXIII-A által katalizált keresztkötések kialakulását gátló MDC jelenlétében és anélkül (1. ábra). A sejtek fagocitózis aktivitása fokozatosan növekedve a 3. napon érte el a maximumát mind az Fc γ (PI=1,58) (1A ábra), mind pedig a CR mediált fagocitózis esetében (1B ábra). MDC jelenlétében mindkét úton történő fagocitózis nagymértékben gátlódott: az Fc γ receptor által mediált 55-70%-kal, a CR által közvetített 20-70%-kal.

1. ábra

A monocita/makrofágok Fc γ és komplement receptor mediált fagocitózisának változása a tenyésztés során monodanzilkadaverinrel kezelt és kontroll sejteken

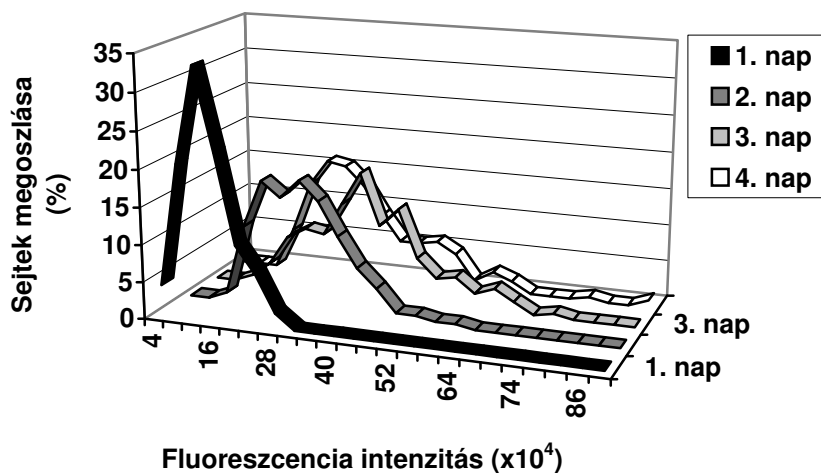


4.2. A FXIII-A fehérje expressziójának sejtszinten történő változása a tenyésztés során

A FXIII-A expressziójának sejtszinten történő követéséhez az immunfluoreszcensen jelölt preparátumok mikroszkópos és számítógépes képanalízisét végeztük el (2. ábra). A tenyésztés első napján a kis fluoreszcencia intenzitású sejtek domináltak, majd a 2. napon jelentős eltolódás következett be a nagyobb intenzitású sejttartomány felé, s a 3. napon a nagyobb fluoreszcencia intenzitást mutató sejtek aránya tovább fokozódott. A negyedik napon mért fluoreszcencia intenzitás megoszlása hasonló volt a harmadik napon észlelthez.

2. ábra

A FXIII-A expressziója a monocita/makrofágokban a tenyésztés során



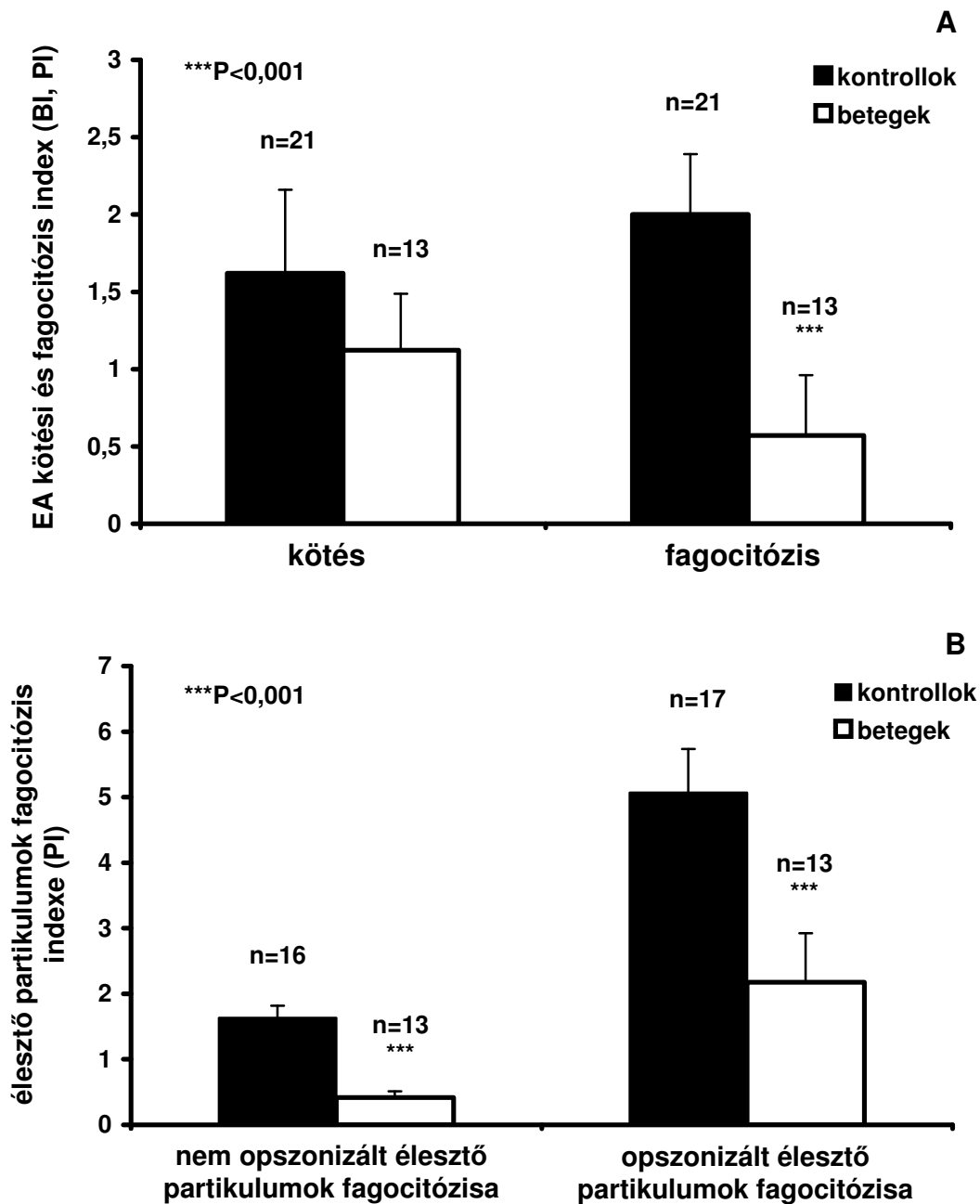
4.3. A FXIII deficiens betegekből izolált monociták fagocita funkcióinak vizsgálata

A FXIII-A deficiens betegek monocitáinak EA kötését és fagocitózist, másrészt a nem opsonizált és opsonizált élesztő partikulumok fagocitózist Prof. Dr. Ádány Róza, Prof. Dr. Muszbek László és Prof. Dr. Kávai Mária a kollaborációs partnereinkkel, Prof. Dr. Uri Seligsohn, Prof. Dr. Rudolf Egbring és Prof. Dr. Stanislaw Lopaciuk közreműködésével végezte. A betegek monocitáinak EA kötése alacsonyabb volt, mint a kontrolloké, a változás azonban nem volt szignifikáns, a betegekből izolált monociták Fc γ receptoron történő fagocitózisa viszont szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollok átlagához képest (3A ábra).

Ugyancsak szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a FXIII-A deficiens betegek lektin-szerű és komplement receptoron keresztül történő fagocitózisa is (3B ábra).

3. ábra

FXIII-A deficiens betegek és kontrollok monocitáinak EA és élesztő partikulum kötése és fagocitózisa

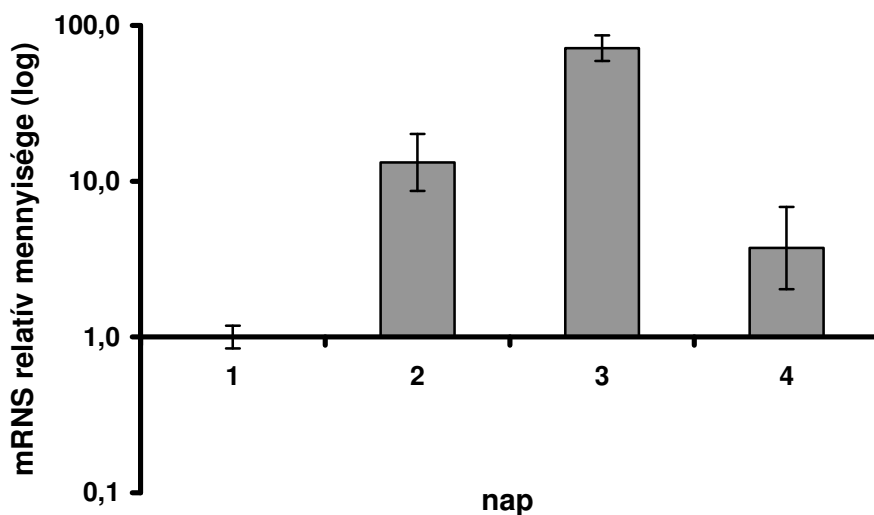


4.4. A FXIII-A mRNS expressziója a monocita/makrofág differenciáció során

A FXIII-A mRNS mennyiségi változásának vizsgálatára kvantitatív RT-PCR reakciót alkalmaztunk. A FXIII-A mRNS expressziója gyorsan növekedett a sejtekben a tenyésztés során és a legmagasabb szintet a 3. napon érte el (4. ábra). A FXIII-A mRNS expressziójának mértéke a 3. napon több, mint 70-szeres volt az első napi értékhez képest.

4. ábra

A FXIII-A mRNS expressziójának változása a monocita/makrofág differenciáció során

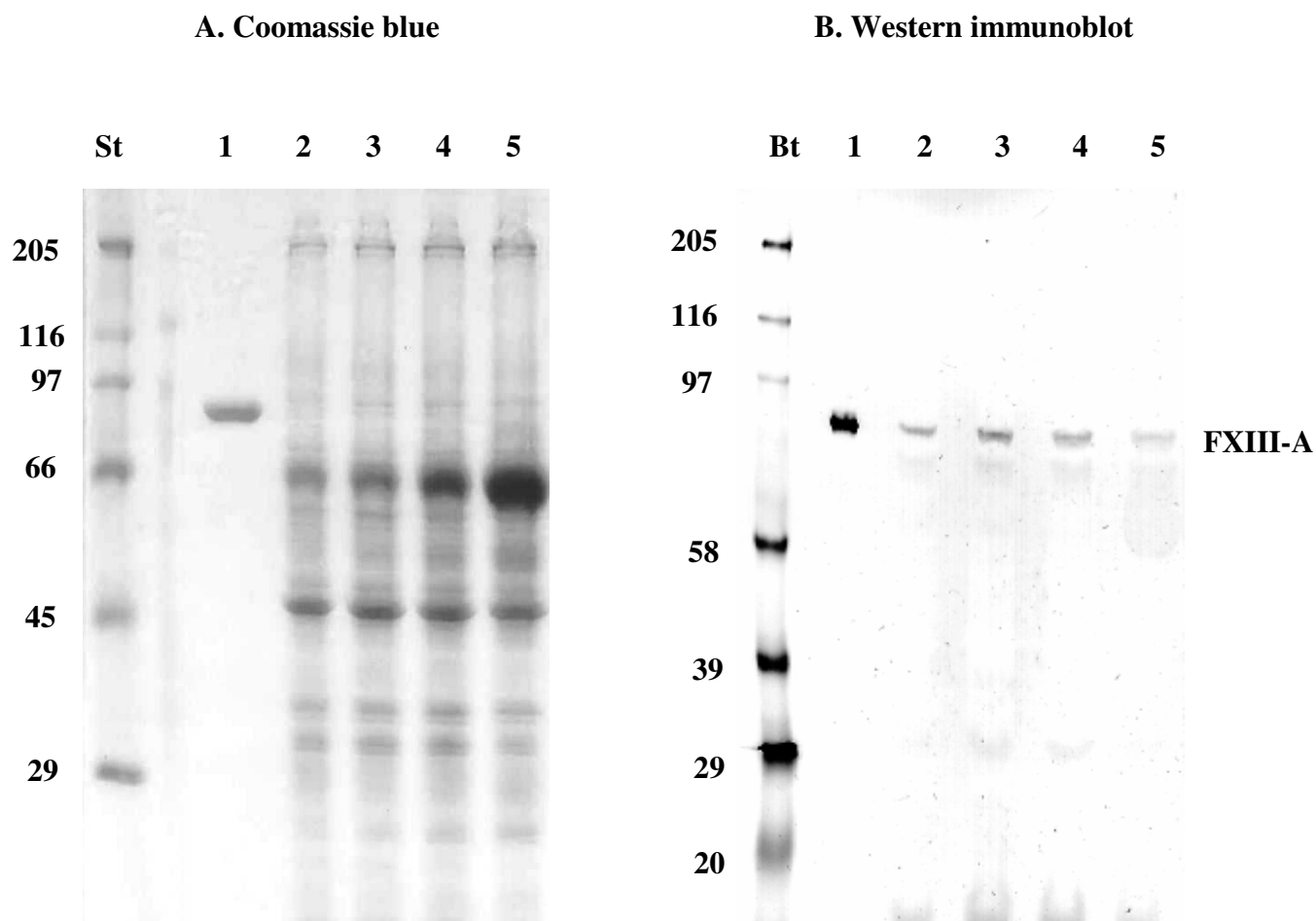


4.5. A monocita/makrofágok Western immunoblot analízise

A protein szintézis képanalízissel tapasztalt változásának megerősítésére az elektroforézissel szeparált fehérjék Western immunoblot analízisét végeztük el (5. ábra). A FXIII-A fehérje szintézise a 3. napig folyamatosan emelkedett, majd a 4. napon nagymértékben csökkent.

5. ábra

A monocita/makrofágokból izolált fehérjék Western immunoblot analízise



A: Coomassie blue-val festett proteinek elektroforetikus képe. 1: rekombináns humán FXIII-A; 2-5: 1-4 napig a tenyésztett monocita/makrofágokból izolált fehérjék. B: A monocita/makrofág tenyészetből származó fehérjék Western immunoblot képe. 1: rekombináns humán FXIII-A; 2-5: a tenyésztett monocita/makrofágokból izolált, specifikus antitesttel jelölt FXIII-A 1-4 napig. St: molekulásúly standard; Bt: biotinált molekulásúly standard.

5. MEGBESZÉLÉS

A keringésben lévő monociták a mononukleáris fagocita rendszer átmeneti populációját képezik, melyek a csontvelői prekurzor sejtekből differenciálódnak. A keringésből a szövetekbe és a különböző testüregekbe jutva makrofágokká differenciálódnak (70). A monociták *in vitro* történő makrofággá érése sejtkultúrákban jól modellezi az *in vivo* lejátszódó folyamatot és információkkal szolgál a differenciáció alatt bekövetkező strukturális és funkcionális változásokról. A FXIII-ról kimutatták, hogy több sejtípus is képes szintetizálni, többek között a monociták/makrofágok is. Bár a véralvadásban nélkülözhetetlen szerepet játszó FXIII a trombin, illetve a Ca^{2+} ionok hatására aktiválódik, a FXIII nem proteolitikus aktivációját is leírták (53-55). A FXIII-nak a citoskeletális átrendeződésben szerepet játszó fehérjék - az aktin, miozin, vinkulin – szubsztrátjai (45-47). Egy nem fagocitáló és immunhisztokémiai detektálás során FXIII-A negatív mielomonocitás (DD) sejtvonalról kimutatták, hogy forbol-észter aktivációval helyreállítható a fagocitáló képessége, és ezzel párhuzamosan a FXIII-A szintézise is észlelhetővé vált (107). Ezekből a kísérleti eredményekből feltételezhető, hogy az intracelluláris FXIII olyan folyamatokban játszhat szerepet a sejtben, amelyek a citoskeletális átrendeződéshez kapcsolódnak, így többek között a fagocitózisban. Eddig sem a FXIII-A szintézisének változását nem vizsgálták a monocita/makrofág differenciáció során, sem a sejtek FXIII-A tartalma és fagocitózisa közötti kapcsolatot.

Eredményeink szerint a FXIII-A szintézise fokozódik sejt szinten a monocita/makrofág differenciáció során. A FXIII-A-hoz kapcsolható fluoreszcencia intenzitás 10-szer nagyobb volt a 3. napos sejtek domináns szubpopulációjában, mint a tenyésztés első napján észlelt, az egész sejtpopulációt jellemző mérték. A kvantitatív RT-PCR eredménye szerint a 3. napon a FXIII gén expressziója több, mint 70 szerese volt az első nap mért értéknek. Ez az eredmény összhangban áll a Western immunoblot analízis eredményével, ami a FXIII-A protein párhuzamos változását jelezte. A FXIII-A szintézisével párhuzamosan változott a sejtek Fc γ és komplement receptor mediált fagocitózisa. A fagocitózis és a FXIII-A szintézis párhuzamos változása felveti annak a lehetőségét, hogy a két folyamat kapcsolatban van egymással és ezt a feltételezést a következő kísérletekkel támasztottuk alá:

1. Az MDC, amely a FXIII-A által katalizált keresztkötések kialakulását gátolja, nagymértékben csökkentette a monocita/makrofágok fagocitózisát.
2. A FXIII deficiens betegek monocitáinak - akiknek monocitáiból hiányzik a FXIII-A és nincs detektálható transzglutamináz aktivitásuk - Fc γ receptor, komplement receptor és

lektin-szerű receptor mediált fagocitózisa szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollokéhoz képest.

Az Fc γ és a komplement receptor mediált fagocitózis nemcsak a partikulumok kötődéséért felelős receptorok típusában, de a jelátviteli útvonal bizonyos lépéseiben is különböznek egymástól (71-73; 81-93). Az a tény, hogy mind az Fc γ , mind a komplement receptor mediált fagocitózis majdnem teljesen párhuzamosan változott a FXIII-A expressziójával és mindkettő nagymértékben csökkent a FXIII deficiens betegek monocitáiban, illetve MDC jelenlétében a normál monocitákban/makrofágokban azt a feltételezést engedi meg, hogy a FXIII-A a fagocitózis folyamatának egy közös pontján fejt ki hatását. Ezzel ellentétben a transzglutamináz aktivitás gátlása nem csökkentette az EA és a komplementtel opsonizált partikulumok kötését és nem volt szignifikáns különbség a kontrollok és a FXIII deficiens betegek monocitáinak EA kötése között. Ez azt mutatja, hogy a csökkent Fc γ receptor mediált fagocitózis valószínűleg nem a betegek monocitáinak csökkent kötési kapacitásának, hanem a megkötött partikulumok csökkent internalizációjának tulajdonítható. A ligandok monocita/makrofágok felszínéhez való kötődését követően receptor-klaszterképződés jön létre, ami többszörös kötődést tesz lehetővé a felszínhez. Ez a jelenség a citoszkeleton átrendeződésén alapul, mely lehetővé teszi a komplement és az Fc γ receptorok cappingjét vagy akár közös cappingjét és következményes endocitózist (71,72; 81). Az Fc γ receptor mediált fagocitózis jelátviteli útvonala magába foglalja az Src és Syk kinázok aktiválását, ami a tirozin csoportok foszforilációját eredményezi; ugyancsak részt vesz a folyamatban a foszforilált foszfinozitol és a Ras/Raf-1/MAP kináz útvonal is (72,81-91), ami közvetlenül vagy közvetve az aktin polimerizációjához vezet (90,93-97). A citoszkeleton átrendeződés a komplement receptor mediált fagocitózisnak is esszenciális része (71-73; 93).

Biokémiai kísérletek bizonyították, hogy a citoszkeletonális proteinek – a miozin, az aktin és a vinkulin – szubsztrátjai lehetnek a FXIII-A-nak (45-47) és egy előző immunelektronmikroszkópos tanulmányban kimutatták, hogy a FXIII-A szoros asszociációt mutat a mikrofilamentumokkal a sejtekben (26).

Eredményeink azt mutatják, hogy a FXIII-A szerepet játszhat a monocita/makrofágok receptor mediált fagocitózisában. További vizsgálatok szükségesek azonban annak tisztázására, hogy a FXIII-A pontosan milyen szinten, hol játszik szerepet a citoszkeleton átrendeződésében vagy a fagocitózis folyamatának más lépésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a monocita/makrofág sejtekben szintetizálódó transzglutamináz, a faktor XIII-A lehetséges intracelluláris funkcióját kívántuk vizsgálni. Irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a FXIII-A-nak a monocita/makrofágokban szerepe lehet olyan intracelluláris folyamatokban, mint a citoszkeleton átrendeződése, mely a legkarakterisztikusabban a fagocitózisban nyilvánul meg. A vizsgálatainkat egyrészt egészséges donorokból izolált monociták sejtenyészetén, másrészt faktor XIII deficiens betegek monocitáin végeztük.

1. Megállapítottuk, hogy mind az Fc γ , mind a komplement receptor mediált fagocitózis növekedett a monociták makrofággá differenciálódását lehetővé tevő tenyésztés során és a 3. napon érte el a csúcspontját. A sejtek fagocitózisa jelentős mértékben gátolható monodanzilkadaverinnel, amely a transzglutaminázok által katalizált keresztkötések gátlószere.
2. A FXIII-A deficiens betegek monocitáinak Fc γ , komplement és lektin-szerű receptorokon keresztüli fagocitózisa szignifikáns csökkenést mutatott az egészséges kontrollok átlagértékeihez képest.
3. A tenyésztett monociták/makrofágok fagocitózisa a FXIII-A mRNS expressziójával és protein szintézisével párhuzamos változást mutatott.
4. Eredményeink szerint a FXIII-A szerepet játszhat a monociták/makrofágok Fc γ és komplement receptor mediált fagocitózisában.

Eredményeink hozzájárulnak a FXIII-A intracelluláris szerepének jobb megértéséhez, azonban további vizsgálatok szükségesek annak tisztázásához, hogy a FXIII-A pontosan milyen szinten, hol játszik szerepet a citoszkeleton átrendeződésében vagy a fagocitózis folyamatának más lépéseiben.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Barkan G, Gaspar A. Zur Frage der Reversibilität der Fibringerinnung II. *Biochem Z* 1923; 139: 291-301.
2. Robins KC. A study on the conversion of fibrinogen to fibrin. *Am J Physiol* 1944; 142: 581-8.
3. Laki K, Lóránd L. On the solubility of fibrin clots. *Science* 1948; 108: 280.
4. Lóránd L. A study on the solubility of fibrin clots in urea. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1948; 1: 192-6.
5. Lóránd L. Fibrin clots. Some properties of the "serum factor". *Nature (London)* 1950; 166: 694-6.
6. Loewy AG, Veneziale C, Forman M. Purification of the factor involved in formation of urea-insoluble fibrin. *Biochim Biophys Acta* 1957; 26: 670-1.
7. Loewy AG, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger HL Jr. Fibrinase. I. Purification of substrate and enzyme. *J Biol Chem* 1961; 236: 2625-33.
8. Loewy AG, Dahlberg A, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger HL Jr. Fibrinase. II. Some physical properties. *J Biol Chem* 1961; 236: 2634-43.
9. Loewy AG, Dunathan K, Gallant JA, et al. Fibrinase. III. Some enzymatic properties. *J Biol Chem* 1961; 236: 2644-47.
10. Loewy AG, Gallant JA, Dunathan K. Fibrinase. IV. Effect on fibrin solubility. *J Biol Chem* 1961; 236: 2648-55.
11. Bishop PD, Teller DC, Smith RA, Lasser GW, Gilbert T, Seale RL. Expression, purification and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 1990; 29: 1861-9.
12. Carell NA, Erickson HP, McDonagh J. Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *J Biol Chem* 1989; 264: 551-6.
13. Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJM. Human factor XIII: fibrin stabilizing factor, *Prog Hemost Thromb* 1980; 5: 245-290.
14. Miloszewski KJM, Losowsky MS. The half life of factor XIII *in vivo*. *Br J Haematol* 1978; 38: 267-71.
15. Muszbek L, Laki K. Interaction of thrombin with proteins other than fibrinogen (thrombin susceptible bonds). Activation of factor XIII. In: Machovich R, ed. *The thrombin*. Pp. 83-102. Boca Raton, FL: CRC Press, 1984.

16. Lóránd L. Activation of blood coagulation factor XIII. *Ann NY Acad Sci* 1986; 485: 144-58.
17. Folk JA, Finlayson JS. The epsilon(γ -glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem* 1977; 31: 1-133.
18. Sakata Y, Aoki N. Cross-linking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest* 1980; 65: 290-7.
19. Tamaki T, Aoki N. Cross-linking of α_2 -plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Biochim Biophys Acta* 1981; 661: 280-6.
20. Kanaide D, Shainoff JR. Cross-linking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stabilizing factor (factor XIIIa). *J Lab Clin Med* 1975; 85: 574-97.
21. Francis RT, McDonagh J, Mann KG. Factor V is a substrate for the transamidase factor XIIIa. *J Biol Chem* 1986; 261: 9787-92.
22. Huh MM, Schick B, Schick PK, Colman RW. Covalent cross-linking of human coagulation factor V by activated factor XIII from guinea pig megakaryocytes and human plasma. *Blood* 1988; 71: 1693-702.
23. Jensen PH, Lóránd L, Ebbesen P, Gliemann J.. Type-2 plasminogen-activator inhibitor is a substrate for trophoblast transglutaminase and factor XIIIa. *Eur J Biochem* 1993; 214: 141-6.
24. Nagy JA, Henriksson P, McDonagh J. Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* 1986; 68: 1272-1279.
25. Ádány R. Intracellular factor XIII: cellular distribution of factor XIII subunit a in humans. *Semin Thromb Haemost* 1996; 22: 399-408.
26. Ádány R, Antal M, Three different cell type can synthesize factor XIII subunit A in the human liver. *Thromb Haemost* 1996; 76: 74-79.
27. Rosenthal AK, Masuda I, Gohr CM, Derfus BA, Le M. The transglutaminase, Factor XIIIa, is present in articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartilage* 2001; 9: 578-581.
28. Ádány R, Kappelmayer J, Berényi E, Szegedi A, Fabian E, Muszbek L. Factors of the extrinsic pathway of blood coagulation in tumor associated macrophages. *Thromb Haemost* 1989; 62: 850-55.
29. Ádány R, Nemes Z, Muszbek L. Characterization of factor XIII containing macrophages in lymph nodes with Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1987; 55: 421-426.
30. Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM. Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metast Rev* 1983; 2: 41-73.

31. Ádány R, Szegedi A, Ablin RJ, Muszbek L. Fibrinolysis resistant fibrin deposits in lymph nodes with Hodgkin's disease. *Thromb Haemost* 1988; 60: 293-7.
32. Bárdos H, Molnár P, Csécssei Gy, Ádány R. Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours. *Blood Coag and Fibrin* 1996 7: 536-48.
33. Zacharski LR, Brown FE, Memoli VA, Kisiel W, Kudryk BJ, Rousseau SM, Hunt JA, Dunwiddie C, Nutt EM. Pathways of coagulation activation *in situ* in rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63: 155-62.
34. Gierhake FW, Volkman W, Becker W, Schwarz H, Schwich HG. Factor XIII concentration and wound healing. *German Med Month* 1970; 15: 721-725.
35. Beck E, Duckert F, Ernst M. The influence of fibrin stabilizing factor on the growth of fibroblast *in vitro* and wound healing. *Thromb Diath Haemorrh* 1961; 6: 485-91.
36. Loránd L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci* 2001; 936: 291-311.
37. Muszbek L, Ádány R, Szegedi G, Polgár J, Kávai M. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res* 1985; 37: 401-410.
38. Henriksson P, Becker S, Lynch G, McDonagh J. Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest* 1985; 76: 528-534.
39. Ádány R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbek L. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol* 1985; 38: 171-173.
40. Ádány R, Kappelmayer J, Muszbek L. Expression of factor XIII subunit a in different types of human monocytes and macrophages. *Adv Biosci* 1987; 66: 323-333.
41. Ádány R, Kiss A, Muszbek L. Factor XIII: a marker of mono- and megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol* 1987; 67: 167-172.
42. Ádány R, Bárdos H, Antal M, Módis L, Sárváry A, Szűcs S, Balogh I. Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost* 2001; 85: 845-51.
43. Ádány R, Glukhova AM, Kabakov AY, Muszbek L. Characterization of human connective tissue cells containing factor XIII subunit a. *J Clin Pathol* 1988; 41: 49-56.
44. Kaetsu H, Hashiguchi T, Foster D, Ichinose A. Expression and release of the a and b subunits for human coagulation factor XIII in baby hamster kidney (BHK) cells. *J Biochem Tokyo* 1996; 119: 961-969.
45. Cohen I, Young-Bandala L, Blankenberg TA, Siefiring GE Jr, Bruner-Lorand J. Fibrinolytic-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1979; 192: 100-111.

46. Cohen I, Blankenberg TA, Borden D, Kahn DR, Veis A. Factor XIIIa-catalyzed cross-linking of platelet and muscle actin. Regulation by nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1980; 628: 365-375.
47. Asijee GM, Muszbek L, Kappelmayer J, Polgár J, Horváth A, Sturk A. Platelet vinculin: a substrate of activated factor XIII. *Biochim Biophys Acta* 1988; 954:303-308.
48. Ballestar E, Abad C, Franco L. Core histones are glutaminyl substrates for tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 1996; 271: 18817-24.
49. Shimizu T, Hozumi K, Horiike S, Nunomura K, Ikegami S, Takao T, Shimonishi Y. A covalently crosslinked histone. *Nature* 1996; 380: 32.
50. Zhu Y, O'Neill S, Saklatvala J, Tassi L, Mendelsohn ME. Phosphorylated HSP27 associates with the activation dependent cytoskeleton in human platelets. *Blood* 1994a; 84: 3715-23.
51. Zhu Y, Tassi L, Lane W, Mendelsohn ME. Specific binding of the transglutaminase, platelet factor XIII, to HSP27. *J Biol Chem* 1994b; 269: 22379-84.
52. Serrano K, Devine DV. Intracellular factor XIII crosslinks platelet cytoskeletal elements upon platelet activation. *Thromb Haemost* 2002; 88:315-20.
53. Polgár J, Hidasi V, Muszbek L. Non-proteolytic activation of cellular transglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J* 1990; 267: 557-560.
54. Muszbek L, Haramura G, Polgár J. Transformation of cellular factor XIII into an active zymogen transglutaminase in thrombin-stimulated platelets. *Thromb Haemost* 1995; 73: 702-5.
55. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Protransglutaminase (factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1221-28.
56. Roitt MI. *Essential immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991.
57. Wallace PK, Howell AL, Fanger MW. Role of Fc γ receptors in cancer and infectious disease. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 816-826.
58. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 1991; 12: 322-326.
59. Anderson CL, Guyre PM, Whitin JC, Ryan DH, Looney RJ, Fanger MW. Monoclonal antibodies to Fc receptors for IgG on human mononuclear phagocytes. Antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell line. *J Biol Chem* 1986; 261: 12856-12864.

60. Andreesen R, Brugger W, Scheibebogen C, Kreutz M, Leser H, Rehm A, Löhr GW. Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 1990; 47: 490-497.
61. Czop JK, Austen FK. A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J Immunol* 1985; 134: 2588-2593.
62. Fanger MW, Shen L, Graziano RF, Guyre PM. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today* 1989; 10: 92-9.
63. Rouzer CA, Scott WA, Hamill AL, Cohn ZA. Dynamics of leukotriene C production by macrophages. *J Exp Med* 1980; 152: 1236.
64. Cardella CJ, Davies P, Allison AC. Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages. *Nature* 1974; 247: 46.
65. Debets JMH, van de Winkel JGJ, Ceuppens JL, Dieteren IEM, Buurman WA. Cross-linking of both Fc γ RI and Fc γ RII induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high affinity Fc-Fc γ R interactions. *J Immunol* 1990; 145: 3026.
66. van de Winkel JGJ, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol* 1991; 49:511-24.
67. Fleit HB, Wright SK, Unkeless JC. Human neutrophil Fc γ receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3275-9.
68. Huizinga TW, van der Schoot CE, Jost C, Klaasen R, Kleijer M, Kr von dem Borne AEG, Ross D, Tetteroo PAT. The PI-linked receptor for FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 1988; 333: 667-9.
69. Clarkson SB, Kimberly RP, Valinsky JE, Witmer MD, Bussel JB, Nachman RL, Unkeless JC. Blockade of clearance of immun complexes by an anti-Fc γ receptor monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986; 164: 474-89.
70. Johnston RB Jr, Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988; 318: 747-752.
71. Tausk F, Gigli I, The human C3b receptor: function and role in human diseases. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 141S-145S.
72. Speth C, Kacani L, Dierich MP. Complement receptors in HIV infection. *Immunol Rev* 1997; 159: 49-67.
73. Aheran JM, Fearon DT. Structure and function of the complement receptors CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol* 1989; 75: 329-335.
74. Law SKA. C3 receptors on macrophages. *J Cell Sci Suppl* 1988; 9: 67-97.

75. Ezekowitz RAB, Stahl PD. The structure and function of vertebrate mannose lectin-like proteins. *J Cell Sci Suppl* 1988; 9: 121-133.
76. Czop JK, Austen KF. A β -glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J Immunol* 1985; 134:2588-93.
77. Czop JK, Kay J. Isolation and characterization of β -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 1511-1520.
78. Giaimis J, Lombard Y, Fonteneau P, Muller CD, Levy R, Makaya-Kumba M, Lazdins J, Poindron P. Both mannose and β -glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 565-70.
79. Stahl PD. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 49-52.
80. Linehan SA, Martinez-Pomares L, Gordon S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect* 2000; 2: 279-88.
81. Strzelecka A, Kwiatkowska K, Sobota A. Tyrosine phosphorylation and Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Letters* 1997; 400: 11-14.
82. Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, Bolen JB, Ledbetter JA. Cross-linking of Fc γ receptor I (Fc γ RI) and receptor II (Fc γ RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1993; 268: 24442-24448.
83. Greenberg S, Chang P, Silverstein SC. Tyrosine phosphorylation of the γ subunit of Fc γ receptors, p72syk, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269: 3897-3902.
84. Indik ZK, Park JG, Pan XQ, Schreiber AD. Induction of phagocytosis by a protein tyrosine kinase. *Blood* 1995; 85: 1175-1180.
85. Zhou MJ, Lublin DM, Link DC, Brown EJ. Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon Fc γ RII and Fc γ RIII ligation in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 13553-13560.
86. Park RK, Liu Y, Durden DL. A role for Shc, Grb2, and Raf-1 in Fc γ RI signal relay. *J Biol Chem* 1996; 271: 13342-13348.

87. Zheleznyak A, Brown EJ. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. *J Biol Chem* 1992; 267: 12042-12048.
88. Kanakaraj P, Duckworth B, Azzoni L, Kamoun M, Cantley LC, Perussia B, Phosphatidylinositol 3-kinase activation induced upon Fc γ R1IIIA-ligand interaction. *J Exp Med* 1994; 179: 551-558.
89. Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, Seya T, Okada T, Hazeki O, Ui M. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc γ receptor signaling. *J Biol Chem* 1994; 269: 22732-22737.
90. Darby C, Geahlen RL, Schreiber AD. Stimulation of macrophage Fc gamma R1IIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. *J Immunol* 1994; 152: 5429-5437.
91. Garcia-Garcia E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 1092-1108.
92. Bengtsson T, Jaconi ME, Gustafson M, Magnusson KE, Theler JM, Lew DP, Stendhal O. Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *Eur J Cell Biol* 1993; 62: 49-58.
93. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Science* 2001; 114: 1061-77.
94. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp 2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6181-86.
95. Otto JJ. Actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 105-9.
96. Allen LA, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 1996; 184: 627-37.
97. Stendahl OI, Hartwig JH, Brotschi EA, Stossel TP. Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J Cell Biol* 1980; 84: 215-24.
98. Swanson JA, Johnson MT, Beningo K, Post P, Mooseker M, Araki N. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci* 1999; 112: 307-16.
99. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 136-45.

100. Chiu KM, McPherson LH, Harris JE, Braun DP. The separation of cytotoxic human peripheral blood monocytes into high and low phagocytic subsets by centrifugal elutriation. *J Leukoc Biol* 1984; 36: 729-737.
101. Berliner S, Lusky A, Zivelin A, Modan M, Seligsohn U. Hereditary factor XIII deficiency: report of four families and definition of the carrier state. *Br J Haematol* 1984; 56: 495-505.
102. Seitz R, Duckert F, Lopaciuk S, Muszbek L, Rodeghiero F, Seligsohn U. ETRO Working Party on Factor XIII questionnaire on congenital factor XIII deficiency in Europe: status and perspectives. Study group. *Semin Thromb Haemost* 1996; 22: 415-418.
103. Mikkola H, Yee VC, Syrjala M, Seitz R, Egbring R, Petrini P, Ljung R, Ingerslev J, Teller DC, Peltonen L, Palotie A. Four novel mutations in deficiency of coagulation factor XIII: consequences to expression and structure of the A-subunit. *Blood* 1996; 87: 141-51.
104. Inbal A, Yee VC, Kornbrot N, Zivelin A, Brenner B, Seligsohn U. Factor XIII deficiency due to a Leu660Pro mutation in the factor XIII subunit-a gene in three unrelated Palestinian Arab families. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1062-1067.
105. Muszbek L, Ádány R, Kávai M, Boda Z, Lopaciuk S. Monocytes of patients congenitally deficient in plasma factor XIII lack factor XIII subunit a antigen and transglutaminase activity. *Thromb Haemost* 1988; 59: 231-235.
106. Kávai M, Gyimesi E, Szücs G, Szegedi Gy. Binding and endocytosis of erythrocytes sensitized with rabbit IgG via Fc gamma receptors of human monocytes. *Immunology* 1991; 74: 657-660.
107. Kávai M, Ádány R, Pásti G, Surányi P, Szücs G, Muszbek L, Boján F, Szegedi Gy. Marker profile, enzyme activity, and function of a human myelomonocytic leukemia cell line. *Cell Immunol* 1992; 139: 531-540.
108. Seiving B, Ohlsson K, Linder C, Steberg P. Transglutaminase differentiation during maturation of human blood monocytes to macrophages. *Eur J Haematol* 1991; 46: 263-271.
109. Szücs S, Vámosi Gy, Póka R, Sárváry A, Bárdos H, Balázs M, Kappelmayer J, Tóth L, Szöllősi J, Ádány R. Single-cell measurement of superoxide anion and hydrogen peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy. *Cytometry* 1998; 33: 19-31.
110. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin

phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265- 275.

111. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

112. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 2001; 25: 402-408.

8. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Sárváry A, Szűcs S, Balogh I, Becsky Á, Bárdos H, Kávai M, Ádány R, Seligsohn U, Egbring R, Lopaciuk S, Muszbek L: Possible role of factor XIII subunit A in Fc γ and complement receptor mediated phagocytosis. *Cell Immunol*, 228: 81-90 (2004).

IF: 1,829

Szűcs S, Vámosi Gy, Póka R, Sárváry A, Bárdos H, Balázs M, Kappelmayer J, Tóth L, Szöllősi J, Ádány R: Single-cell measurement of superoxide anion and hydrogen peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy. *Cytometry*, 33: 19-31 (1998).

IF: 2,317

Ádány R, Bárdos H, Antal M, Módis L, Sárváry A, Szűcs S, Balogh I: Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost*, 85: 845-51 (2001).

IF: 4,910

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Tóth L, Pásti G, Sárváry A, Balázs M, Ádány R: Effect of tumor conditioned medium on intercellular communication and proliferation of Balb/c 3T3 cells. *Cancer Letts*, 151: 57-61 (2000).

IF: 1,517

Szűcs S, Tóth L, Legoza J, Sárváry A, Ádány R: Simultaneous determinations of styrene, toluene, and xylene metabolites in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Arch Toxicol*, 76: 560-569 (2002).

IF: 1,852

Szűcs S, Sárváry A, McKee M, Ádány R: Could the high level of cirrhosis in Central and Eastern Europe be partly due to the quality of alcohol consumed? An exploratory investigation. *Addiction*, in press.

IF: 3,241

Szűcs S, **Sárváry A**, Cain T, Ádány R: Method validation for the simultaneous determination of faecal sterols in surface waters by gas chromatography/mass spectrometry (közlésre elküldve)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki Dr. Ádány Róza professzor asszonynak, aki hasznos szakmai tanácsaival irányította és segítette munkámat és a FXIII deficiens betegek fagocitafunkciós tesztjeinek kivitelezésében részt vett. Szeretném külön megköszönni Dr. Kávai Mária professzor asszonynak a fagocitózis tesztek elvégzésében és kiértékelésében nyújtott segítségét. Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Muszbek Lászlónak, Prof. Dr. Uri Seligsohnnak, Prof. Dr. Rudolf Egbringnek és Prof. Dr. Stanislaw Lopaciuknak a FXIII deficiens betegek felkutatásáért és a fagocitafunkciós tesztek elvégzésének lehetővé tételéért. Köszönetet mondok Dr. Szűcs Sándornak és Dr. Bárdos Helgának, hogy tanácsaikkal és munkájukkal segítettek a kísérletek elvégzésében.

9. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK