

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HUMÁN NEUTROPHIL PROTEÁZOK SZEREPE A
VÉRALVADÁS XIII-AS FAKTORÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Dr. Bagoly Zsuzsa

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László
Programvezető: Prof. Dr. Muszbek László

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI KUTATÓ KÖZPONT
DEBRECEN, 2008

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A véralvadás XIII-as faktora (pFXIII) egy tetramer struktúrájú protranszglutamináz, amely két alegységből áll (FXIII-A₂B₂). A potenciálisan aktív A alegység (FXIII-A) ~83 kDa molekulatömegű, aktivált formája egy acil-transzfer reakciót katalizál. A B alegység (FXIII-B) molekulatömege ~80 kDa, carrier/védő szerepet tölt be. Az FXIII-A szintézise elsősorban csontvelői eredetű sejtekben megy végbe, míg a FXIII-B-t hepatocyták termelik. Normál körülmények között a FXIII-A kizárólag komplex formában van jelen a plazmában, míg a FXIII-B a komplexen kívül is megtalálható, kb. 50%-a szabad formában van a keringésben. A celluláris FXIII (cFXIII) a FXIII-A homodimerje (FXIII-A₂). Megtalálható thrombocytákban, monocytákban, csontvelői előalakjaikban és monocyta-eredetű macrophágokban. A FXIII-A öt jól meghatározott doménből áll, ezek az aktivációs peptid (1-37 aminosavak), béta szendvics (38-184 aminosavak), katalitikus mag (185-515 aminosavak), hordó 1 (516-628 aminosavak) és hordó 2 (629-730 aminosavak) domének. A FXIII-B 10, úgynevezett "sushi-domén"-t tartalmazó glikoprotein. A sushi domének mindegyike kb. 60 aminosavból áll és két diszulfid híd köti össze, több mint 20 egyéb fehérjében leírták, szerepük feltehetően a molekula egy másik fehérjéhez történő kötésében van.

A pFXIII a véralvadás utolsó lépcsőjében aktiválódik trombin és Ca²⁺ együttes hatására. Először az R37-G38 peptidkötés hidrolizálásával a trombin lehasítja az N-terminális aktivációs peptidet (AP-FXIII), majd Ca²⁺ jelenlétében a B alegységek disszociálnak és az így kialakult trunkált FXIII-A dimer (FXIII-A₂') enzimatikusan aktív konfigurációt vesz fel (G38-FXIII-A₂*). A konformáció-változás során az aktív hely ciszteinje, mely eredetileg a katalitikus mag belsejében található, felszínre kerül és reakcióba tud lépni acil donor szubsztrátjával. A cFXIII intracelluláris aktivációja egy sokkal lassúbb folyamat, amelyhez nincs szükség proteolitikus hasításra; az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedése elegendő ahhoz, hogy a FXIII-A₂ aktív konfigurációt vegyen fel (FXIII-A₂°). Extracelluláris viszonyok között a cFXIII-t a trombin és Ca²⁺ ugyanúgy aktiválja, mint a pFXIII-t, természetesen, leszámítva a B alegységek disszociációját. Érdekes módon az AP-FXIII lehasítása a dimer egyik A alegységéről elegendő a teljes transzglutamináz aktivitás kialakulásához Ca²⁺ jelenlétében. Polimerizált fibrin jelenléte (fibrin I és II: a fibrinopeptid A ill. fibrinopeptid A és B hasítása után) nagymértékben fokozza a FXIII-A trombin által

történő hasítását és felgyorsítja a FXIII aktivációját. A cFXIII esetén a fibrinnek nincs ilyen aktivációt fokozó hatása, amely arra utal, hogy fibrin jelenlétében a FXIII-B befolyásolhatja az A₂B₂ komplex orientációját és trombinnal való interakcióját.

A trombin pFXIII és cFXIII hasítását egy gyakori polimorfizmus is befolyásolja a FXIII-A alegységben, amely V/L cserével jár a 34-es helyen az aktivációs peptidben. Ez a hely csak három aminosavnyira található a trombin hasítási helyétől, így nem meglepő, hogy a polimorfizmus befolyásolja a FXIII trombin hatására bekövetkező aktivációját. cFXIII-al és pFXIII-al is kimutatták, hogy az L34 variáns esetén a FXIII-A hasítása, az AP-FXIII felszabadulása és a FXIII aktiválása 2,5-szer gyorsabban megy végbe a V34 variánssal összehasonlítva. A polimorfizmus aktivációt gyorsító hatása fibrinogén jelenlététől független, bár a fibrinogén jelenléte természetesen önmagában fokozta a katalitikus hatékonyságot.

A trombin nem az egyetlen szerin proteáz, amely hasítja és aktiválja az FXIII-t Ca²⁺ jelenlétében. Számos egyéb proteáz, úgymint a batroxobin marajoensis, thrombocytin, tripszin és az aktivált X-es faktor (FXa) is hasítja és aktiválja a FXIII-t. Ezeknek a proteázoknak a szubsztrát-specifitása hasonló a trombinéhoz, vagyis arginin és lizin mellett hasítanak. Bár az aktivációhoz vezető FXIII-A hasítási hely egyik enzim esetén sem ismert, ismerve az enzimek szubsztrát-specifitását és a trunkált FXIII-A molekulatömegét, feltételezhetjük, hogy ezen enzimek hatására képződő aktivált FXIII-A forma is a G38-FXIII-A₂*, csakúgy, mint trombin esetén. Valójában a G38-FXIII-A₂* az egyetlen eddig ismert aktív trunkált FXIII-A forma. Az sem ismert, hogy a G38 és az azt követő N terminális aminosavak az FXIII-A*-ban nélkülözhetők-e az enzimatisan aktív FXIII-A kialakulásához.

Az aktivált FXIII (FXIIIa) mechanikailag erősíti a fibrin alvadékot és védi a fibrinolízistől legalább két alapvető mechanizmus révén: 1/ A FXIIIa keresztköti a fibrin láncait, ami ellenállóvá teszi az alvadékot a fibrinolízissel szemben. 2/ Az α₂-plazmin inhibitor (α₂PI) és egyéb plazmaalkotók fibrinhez való kötése megóvjaa a fibrint az erőteljes fibrinolitikus rendszer azonnali hatásától.

A FXIIIa a fibrin γ- és α-láncait köti keresztbe, melynek végeredményeképpen γ-dimerek és α-polimerek képződnek. A γ-dimerek kialakulásakor gyors reciprok intermolekuláris kötés alakul ki az egyik γ-lánc 406-os lizinje és egy másik γ-lánc 398/399-es glutaminja között. Az α-láncok keresztkötése sokkal lassúbb folyamat, több glutamin és lizin reziduum között is kialakulhat, melynek eredményeképpen α-

oligomerek és nagy molekulású α -polimerek jönnek létre. Általánosan elfogadott, hogy az α -láncok keresztkötése biztosítja az alvadék végleges stabilitását, azáltal, hogy erősíti, rigiddé teszi az alvadékot és egyben védi a fibrinolízistől, ugyanakkor a γ -dimerek is hozzájárulhatnak az alvadék rigiditásának fokozásához. A plazminogén gyengébben kötődik a keresztkötött fibrinhez, mint a nem-keresztkötöthez, ami szintén hozzájárulhat a FXIII fibrinolízissel szemben tanúsított védő hatásához. A FXIIIa az alvadékot azzal is védi, hogy a fibrin α -láncának C-terminális doménjében lizin reziduumokat köt keresztbe, melynek révén csökken a plazmin proteolízis hatására felszabaduló plazminogén és tPA kötődési helyek száma és így a plazminogén aktivációjának egyik fontos pozitív visszacsatolása gátolt.

A fibrin α -láncainak túlzott keresztkötése növeli az alvadék fibrinolízissel szembeni ellenállását. Amennyiben a FXIIIa aktivitásnak és így a keresztkötések kialakulásának nem lenne szabályozó mechanizmusa, úgy egy túlzottan keresztkötött fibrin hálózat alakulna ki, ami további fehérjék kiterjedt keresztkötésével a thrombuson belül ahhoz vezetne, hogy a thrombus a későbbiekben akkor sem lehetne eltávolítani, amikor már nincs rá szükség. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy léteznie kell a FXIIIa inaktiválásáért felelős down-regulációs mechanizmusnak a fibrin alvadékban.

Az aktivált alvadási faktorok down-regulációjának két fő mechanizmusa ismert. A proteolitikusan aktív faktorokat inaktiválhatják specifikus szerin proteáz gátlók, szerpinek (mint az antitrombin III, heparin kofaktor II és a szöveti faktor útvonal inhibitor), vagy kevésbé specifikus proteáz gátlók, mint az α_2 -makroglobulin. Mivel a FXIIIa (egyedülálló módon az alvadási faktorok között) transzglutamináz és nem szerin proteáz, így a szerpinek általi inaktiváció nem jön szóba és a FXIIIa-nak nincs ismert plazma inhibitora. Az aktivált alvadási faktorok down-regulációjának másik útvonala az aktivált faktorok proteolitikus enzimek által történő inaktivációja. Az inaktiváló proteolitikus enzim lehet nagyon specifikus, erre példa az aktivált V-ös faktor (FVa) és VIII-as faktor (FVIIIa) inaktiválása aktivált protein C révén. Inaktiváló hatása kevésbé specifikus enzimeknek is lehet. Egyik ilyen szélesebb szubsztrát-specifitású enzim a plazmin, mely degradálja a fibrint, fibrinogént, FVa-t, FVIIIa-t. Bár az összes alvadási faktornak van ismert az inaktivációs útvonala, a FXIII esetében nem ismert a down-regulációért felelős mechanizmus. Mivel minden törekvés ellenére sem sikerült eddig plazma protein FXIIIa inhibitorot találni, a FXIIIa

down-regulációban feltehetően proteolitikus enzimeknek lehet szerepe. A plazmin egy lehetséges jelölt lenne ez utóbbi szerepre, azonban korábban Rider és McDonagh kimutatták, hogy mind a pFXIII, mind a cFXIII és aktivált formáik is ellenállnak a plazmin degradációnak. Emellett ha figyelembe vesszük a fibrinhez kötött α_2 PI által kifejtett erőteljes plazmin gátló hatást, nem valószínű, hogy a farmakológiai trombolízis esetét kivéve a plazminnak jelentős szerepe lehetne a FXIIIa down-regulációjában a fibrin alvadékban.

Az utóbbi években több kutatócsoport érdeklődésének középpontjába került a polymorphonucleáris (PMN) granulocyták szerepének vizsgálata a thrombus képződés, remodeling és fibrinolízis patofiziológiájában. A thrombusban lévő fibrin erős adhezív szubsztrát a PMN sejtek kötődéséhez. Számos egyéb, a thrombusba inkorporálódó plazmafehérjéről leírták, hogy a PMN sejtek kitapadását elősegítheti, úgymint a fibronectin, trombospondin, vitronectin és plazminogén. A folyamat alapjait, amely a PMN sejtek thrombusba való beépülését szabályozza, nemrégiben mutatták ki. Statikus és áramlási viszonyok között is leírták, hogy stimulált ill. nem-stimulált PMN sejtek is kötődnek a felszínhez kikötött fibrinogénhez és fibrinhez. A fibrinogénben kialakuló konformációs változások, melyek a fibrinné való átalakuláskor vagy immobilizáció során jönnek létre, hozzájárulhatnak a nem-stimulált sejtek kitapadásához és a fibrin alvadékba történő beépülésükhöz. A kötésben az integrinek családjába tartozó sejtfelszíni receptorok vesznek részt, úgymint az $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CD11b/CD18), $\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18) és az $\alpha_5\beta_1$. Bár stimulált PMN sejtek szolubilis fibrinogént is képesek kötni, a nyugvó sejtek felszínén lévő integrinek nem kötődnek szolubilis fehérjékhez és a kötés előfeltétele az integrinek magas affinitású állapotba való kerülése. Az in vitro tanulmányokon kívül számos in vivo kísérleti thrombus modell is bizonyítékkal szolgált arra, hogy a PMN sejtek akkumulálódnak a thrombusban, ill. hogy a leukocyták közül a PMN sejtek elsőként halmozódnak fel az alvadékban. A thrombusba bekerülő PMN sejteket gazdag proteáz forrást jelentenek. In vivo kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a PMN sejtek, miközben beépülnek a fibrin hálóba, részlegesen degranulálódnak. Számos közlés született arról, hogy a PMN sejtek granulumaiban lévő proteázok, például a human neutrophil elasztáz (HNE), a katepszin G vagy matrix metalloproteázok (MMP) miután felszabadulnak sejtekből, interakcióba lépnek a hemosztázis és fibrinolitikus rendszer egyes alkotóelemeivel és részt vehetnek a

fibrinolízisben. A PMN sejtek a fibrinolízishez egyéb útvonalon, urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) dependens módon is hozzájárulhatnak.

A HNE és a katepszin G a kimotripszinek családjába tartozó szerin proteázok, mindkettő a PMN sejtek primer granulumaiban raktározódik. A HNE az egyik legfőbb PMN proteáz, széles szubsztrát-specifitással elsősorban rövid oldalláncú alifás aminosavak mellett hasít, előszeretettel valin mellett. A fibrin hasítása mellett, több alvadási faktorról és fibrinolitikus fehérjével való interakcióját is leírták. Az alvadási faktorok közül inaktíválja a VII-es (FVII), VIII-as (FVIII), IX-es (FIX), X-es (FX), XII-es (FXII) alvadási faktorokat, továbbá inaktíválja az antitrombin III-t, a szöveti faktor útvonal inhibitorát, a protein C-t és protein S-t. A HNE aktiválja az V-ös faktort (FV), amelyet azután inaktívál is. A HNE a trombin-aktivált FVa-t is inaktíválja. A HNE a plazminogén hasításával mini-plazminogént képez, amit hatékonyabban aktiválnak plazminogén aktivátorok. A HNE katalitikus aktivitását a keringésben elsősorban az α_1 -antitripszin (α_1 AT), másodsorban az α_2 -makroglobulin szabályozza. Amikor a HNE aktivitás down-regulációja csökken vagy megszűnik, mint például α_1 AT deficiencia esetén, súlyos tüdőbetegséggel járó kórkép alakul ki. A csökkent anti-proteáz védelem a légutak epithelialis felszínén pulmonális emfizéma kialakulásához vezet. Ezzel szemben emelkedett α_1 AT szint és egyben gátolt HNE funkció negatívan befolyásolta a pulmonális tromboembóliában szenvedő betegek fibrinolízis potenciálját.

A katepszin G, hasonlóan a HNE-hez, számos, a hemosztázisban szerepet játszó fehérje hasításában részt vesz, ide tartozik a fibrinogén, FV, FVII, FVIII, FX, protein C and protein S. Az aktivált FVII, protein C és protein S hasítása a fehérje inaktívációját okozza, míg a FV, FX és FVIII esetén az alvadási faktorok aktivációját is leírták. A α_1 AT nem csak a HNE-t, hanem a katepszin G-t is inaktíválja.

Az MMP-k a cink dependens endopeptidázok családjába tartozó enzimek, szerteágazó proteolitikus folyamatokban vesznek részt. Az MMP család tagjai 5 osztályba sorolhatók szerkezetük és szubsztrát-specifitásuk alapján. Ezek a kollagenázok, zselatinázok, sztromelizinek, membrán típusú MMP-k és egyebek. A zselatinázok közül a PMN sejtekben az MMP-9 található meg, melynek arteriális remodelingben játszott szerepét MMP-9 deficiens egerek segítségével mutatták ki. A PMN sejtekből felszabaduló MMP-9 szerepét az aorta fali degenerációjában és aneurizma-képződésben is leírták.

A PMN proteázok hatását a FXIII-ra fibrin alvadékban korábban nem vizsgálták. Néhány korai tanulmány kimutatta, hogy a HNE és a katepszin G proteolitikusan degradálja, de nem aktiválja a FXIII-at. Egy másik tanulmány, kvalitatív aktivitás-festés technikát használva felvetette, hogy nem-fiziológiás körülmények között, vagyis EDTA jelenlétében a pFXIII átmenetileg aktiválódhat. A hasítási helyek azonosítását egyik esetben sem kísérelték meg. Nem ismert, hogy a PMN sejtekből felszabaduló proteázok a fibrin alvadékban is hasítják-e a FXIII-at, és ha igen, az hatással van-e a FXIII aktivitásra. Kérdéses továbbá, hogy a PMN proteázok tudnak-e bármilyen hatást gyakorolni a FXIII-ra a sokkal összetettebb plazma alvadékban, ahol az α_1 AT erőteljes gátló hatása érvényre jut. Szintén nem ismert, hogy a PMN proteázok jelenléte befolyásolja-e a keresztkötések kialakulásának mértékét a fibrin alvadékban, és ezáltal hogyan változik az alvadék végleges struktúrája és érése.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűztük ki a PMN proteázok FXIII aktivitás szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatát.

1. Tanulmányoztuk, hogy a HNE által kifejtett proteolitikus hasítás milyen hatást gyakorol a pFXIII-ra és a cFXIII-ra.
2. Mivel a HNE szubsztrát-specifitása alapján eltér a trombinétól, vizsgáltuk, hogy a HNE hasítása a FXIII-ban eredményezhet-e új, aktív trunkált FXIII formát, ami különbözne az eddig ismert G38-FXIII-A*-tól, ezáltal lényeges új információkat szolgáltatva a FXIIIa transzglutamináz aktivitásának strukturális feltételeiről.
3. Megvizsgáltuk a PMN proteázok tisztított FXIIIa-ra kifejtett hatását: vizsgáltuk, hogy létrejön-e a FXIII proteolitikus degradációja és vizsgáltuk ennek összefüggését a FXIII aktivitással.
4. Vizsgáltuk a PMN proteázok felszabadulásának és proteolitikus aktivitásának mértékét fibrin alvadékban.

5. Vizsgáltuk a PMN proteázok FXIIIa-ra gyakorolt hatását a fibrin alvadékban. Meghatároztuk az egyes PMN proteázok relatív jelentőségét a FXIIIa-val való interakcióban.
6. Teszteltük a PMN proteázok FXIIIa-ra gyakorolt hatását fibrin alvadékban α_1 AT jelenlétében/hiányában és plazma alvadékban.
7. Megvizsgáltuk, hogy a PMN proteázok befolyásolják-e a keresztkötések kialakulásának mértékét a fibrin alvadékban fiziológias körülmények között és vizsgáltuk ennek közvetett jelentőségét az alvadék érése szempontjából.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

FXIII preparálás

A kísérletekhez felhasznált nagy tisztaságú pFXIII-t egészséges önkéntesek plazmakeverékéből preparáltuk. A cFXIII-t human placentából tisztítottuk. Egyes kísérletekhez pFXIII-t a FXIII-A V34L polimorfizmusára nézve vad típusú egyének (V34) illetve L34 homozigóta egyének (L34) plazmájából is preparáltunk. A FXIII-A V34L genotípus vizsgálatot a laboratóriumunkban kifejlesztett valós idejű polimeráz láncreakción alapuló módszer segítségével határoztuk meg.

PMN leukocyták szeparálása és stimulált PMN felülúszók előállítása

A PMN sejtek szeparálásához egészséges véradóktól vettünk vért, akik a vérvételt megelőzően két hétig nem fogyasztottak gyógyszert. A kísérletekhez szükséges vérvételeket a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük. A vért 1:9 arányban antikoaguláltuk 3,8%-os trinátrium citráttal. A trombocytá-dús plazma nyeréséhez (PRP) 120 g-n centrifugáltuk a vért 25 percig. A PMN sejteket a PRP eltávolítása után fennmaradó részből szeparáltuk dextran szedimentációval és Ficoll-Paque-al végzett gradiens centrifugálással, melyet a vörösvértestek lizálása követett. Annak érdekében, hogy a PMN sejtekhez tapadó thrombocytákat teljes mértékben eltávolítsuk, a PMN sejteket háromszor mostuk HEPES Tyrode pufferben (140 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 2,5 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 5,6 mM dextróz, 10 mM HEPES, pH 7,4) amelyhez 5 mM EDTA-t adtunk, majd végül a sejteket 0,1 mM MgCl₂-ot tartalmazó

HEPES Tyrode pufferben vettük fel. A sejtuszpenziók átlagos PMN granulocytaszáma 95% felett volt. Az aktivált sejtek felülúszóinak előállításához 5×10^6 /ml vagy 20×10^6 /ml PMN szuszpenziót inkubáltunk $2 \mu\text{M}$ fMLP-vel (N-formyl-Met-Leu-Phe) és 2 mM CaCl_2 -al két percig 37°C -on. A sejteket ezek után lecentrifugáltuk, és a továbbiakban a felülúszójukat használtuk. Thrombocytamentes plazma előállításához a PRP-t 1300 g -n 15 percig centrifugáltuk szobahőn. Annak érdekében, hogy a thrombocytákat teljes mértékben eltávolítsuk, a centrifugálást kétszer ismételtük és a második felülúszót hagytuk $0,2 \mu\text{m}$ pórusátmérőjű szűrőn a súlyánál fogva átszűrődni.

SDS PAGE and Western blotting

A denaturált plazma/szérum, fibrin vagy FXIII mintákat SDS PAGE-el vizsgáltuk. A fibrin keresztkötések mértékének ill. a fibrin degradáció mértékének tanulmányozása 10%-os SDS gélben történt, Coomassie brillant kék festéssel. Amikor a tisztított FXIII proteolitikus degradációját vizsgáltuk aktivált PMN sejtek felülúszójának hatására, az SDS PAGE után ezüst festést végeztünk. A minták egy részét Western blotting-al is vizsgáltuk. Elsődleges antitestként nyúl poliklonális FXIII-A-ellenes vagy FXIII-B-ellenes antitestet, az immunreakció előhívásához pedig biotinált nyúl-ellenes kecske antitestet és avidin-biotinált peroxidáz komplexet használtunk. A jelet erősített kemilumineszcencia (ECLplus+) reagenssel hívtuk elő a gyártó utasítása szerint. Azoknál a kísérleteknél, ahol az eredményeket kvantitatív módon értékeltük, GS-800 kalibrált denzitométert (Bio-Rad, Hercules, CA) használtunk az értékeléshez.

HNE, katepszin G and MMP-9 aktívás mérése

A HNE és katepszin G aktivitásokat az fMLP-vel aktivált PMN sejtek felülúszójából $0,66 \text{ mM}$ HNE vagy katepszin G szubsztrát jelenlétében mértük 405 nm -en a gyártó utasítása szerint. Az MMP-9 aktivitás méréshez fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) peptid szubsztrátot (MMP III szubsztrát) használtunk. A PMN sejtekből a fibrin alvadékban felszabaduló proteolitikus enzimek detektálásához $2,1 \text{ mg/ml}$ fibrinogént, $13 \mu\text{g/ml}$ pFXIII-t és 20×10^6 /ml PMN sejtet tartalmazó inkubációs elegyet az alábbiak közül valamelyik szubsztráttal egészítettük ki: $0,66 \text{ mM}$ HNE szubsztrát, $0,66 \text{ mM}$ katepszin G szubsztrát ill. $5 \mu\text{M}$ MMP szubsztrát III. A fibrinogént $1,2 \text{ U/ml}$ trombin és 2 mM CaCl_2 segítségével megalvasztottuk. Az alvadékokat 30 percig 37°C -on inkubáltuk, majd centrifugáltuk és az alvadék

felülúszójában a kromogén HNE vagy katepszin G szubsztrátból felszabaduló p-nitroanilid mennyiséget 405 nm-en detektáltuk. Az MMP-9 aktivitást az alvadék felülúszóban mért fluoreszcencia intenzitás meghatározásával végeztük. Annak érdekében, hogy a specifikus proteáz inhibitorok hatását teszteljük az aktivált PMN sejtek felülúszójában vagy az alvadékon belül, a HNE, katepszin G és MMP-9 szubsztrátokkal végzett fenti kísérleteket az adott proteáz inhibitor jelenlétében is megismételtük (10 μ M HNE inhibitor IV, 10 μ M katepszin G inhibitor I vagy 0,1 μ M MMP-9 inhibitor I). Az inhibitorokat több, mint egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban alkalmaztuk az adott humán PMN enzimre vonatkozó IC 50-hez (ONO 5046: 44 nM, katepszin G inhibitor I: 53 nM, MMP-9 inhibitor I: 5 nM) képest és gátlás nem volt fokozható a koncentráció emelésével.

A transzglutamináz aktivitás mérése

A FXIII aktivitást spektrofotometriás módszerrel mértük, REA-chrom FXIII kit használatával (Reanal-ker, Budapest). A kísérletekben, ahol a FXIII HNE-által mediált aktivációját vizsgáltuk, a reagens keverékből kihagytuk a trombint és a GPRP-t. Az eredményeket U/l-ben és a trombin aktiválással elért maximális transzglutamináz aktivitás százalékában adtuk meg. Ez utóbbihoz a FXIII aktivációját 10 U/ml trombin hozzáadásával értük el és 5 perc után, a trombint 15 U/ml hirudinnal gátoltuk. Annak érdekében, hogy a nem aktivált zimogén FXIII un. "innate" aktivitását kompenzáljuk, párhuzamos, nem-aktivált minták aktivitását is lemértük, és az alap aktivitást levontuk az eredményekből. Ahogy arra irodalmi adatok is utalnak, a nem aktivált FXIII transzglutamináz aktivitása alacsony molekulásúlyú szubsztrátokkal mérve minimális, a mi esetünkben a maximális FXIII aktivitás 2-3%-ának felelt meg.

A HNE FXIII-ra kifejtett hatása

25 μ g/ml pFXIII-t vagy cFXIII-t inkubáltunk különböző koncentrációjú HNE-vel 50 mM HEPES, 100 mM NaCl pufferben (pH 7,4), 2,5 mM CaCl₂ jelenlétében 37 °C-on 20 percig. Egyes kísérletekben 2,5 mg/ml fibrinogént és/vagy 1,5 mg/ml α_1 AT-t is adtunk az inkubációs elegyekhez, ebben az esetben 5 μ g/ml HNE hatását teszteltük. Kinetikus kísérletekben különböző koncentrációjú pFXIII-t és cFXIII-t használtunk 400 μ g/ml-ig és 2,5 μ g/ml HNE hatását vizsgáltuk. 20 perc után 10 μ M ONO 5046-t

adtunk az inkubációs elegyekhez és a mintáknak lemértük a FXIII aktivitását és Western blotting analízist végeztünk.

A HNE-aktivált FXIII minták fibrin-keresztalkötő képességének vizsgálata batroxobin moojeni használatával

A fibrin keresztalkötések mértékét 2,5 mg/ml FXIII-hiányos fibrinogén oldatban vizsgáltuk (50 mM HEPES, 100 mM NaCl pufferben, pH 7,4), amit 25 µg/ml nem-aktivált, HNE-aktivált vagy trombin-aktivált FXIII-al egészítettünk ki. Kontrollként olyan FXIII-hiányos fibrinogén oldatból készített fibrin használtunk, melyhez nem adtunk FXIII-t. A HNE-aktivált FXIII-t 100 µg/ml pFXIII-ból 10 µg/ml HNE hozzáadásával állítottuk elő 2,5 mM CaCl₂-ot tartalmazó 50 mM HEPES, 100 mM NaCl pufferben (pH 7,4) 37°C-on. 20 perc elteltével a reakciót 10 µM ONO 5046-al állítottuk le. A trombin-aktivált FXIII esetén 10 U/ml trombint használtunk HNE helyett és 5 perc után 15 U/ml hirudinnal állítottuk le a reakciót. A fibrinogén oldatokat 1,2 U/ml trombinnal vagy ennek megfelelő aktivitású batroxobin moojeni-vel (6,7 BU/ml) alvasztottuk meg. Az alvadékokat 30 percig 37 °C-on aktiváltuk és a reakciókat 7 térfogat 8 M ureát tartalmazó SDS PAGE mintapufferrel állítottuk le. A mintákat SDS PAGE-el vizsgáltuk redukáló körülmények között. A batroxobin moojeni FXIII-A-ra kifejtett direkt proteolitikus hatását, a nem-aktivált FXIII-al kiegészített, batroxobin moojeni-vel megalvasztott fibrinogén mintákon Western blottinggal (FXIII-A-ellenes immunreakcióval) zártuk ki.

A HNE hasítási helyek azonosítása a FXIII-A-ban MALDI TOF tömegspektrométerrel és N-terminális szekvenálással

100 µg/ml pFXIII-t vagy cFXIII-t inkubáltunk 10 µg/ml HNE-vel 2,5 mM CaCl₂ jelenlétében 37 °C-on, majd különböző időintervallumokban a reakciót ONO 5046-al állítottuk le. A mintákat forraltuk, centrifugáltuk és a felülúszókat filtráltuk. A szűrletben maradó peptideket tisztítottuk és sómentesítettük ZipTip™ C18 mátrixot tartalmazó pipettahegygel (Millipore, Billerica, MA). A kötődött peptideket 1:4 hígítású telített α-ciano-4-hidroxifahéjsav (50% acetonitril, 0,1% trifluoecetsav-ban) elegyével eluáltuk, és rozsdamentes MALDI lemezen levegőn száradni hagytuk. A MALDI TOF tömegspektrometriás mérést Voyager DE STR készüléken (Applied Biosystems, Foster City, CA) végeztük pozitív lineáris és reflektrom módban.

Az N-terminális szekvenáláshoz 100 µg/ml cFXIII-t 10 µg/ml HNE-vel és 2,5 mM CaCl₂-dal 10 percig inkubáltuk. A mintákat 7,5%-os gélen futtattuk SDS PAGE-el és a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk. A membránokat Coomassie brillant késsel festettük, a HNE-hasított FXIII-A-nak megfelelő sávot kivágtuk és a trunkált fehérjét az Applied Biosystems fehérjeszekvenálójával (Procise 494 model) vizsgáltuk Edman degradációs program segítségével.

Az elsődleges HNE hasítási hely és környezete a cFXIII molekulamodelljében

A cFXIII geometriához a protein krisztallográfias adatbázisból fértünk hozzá (www.rcsb.org, hozzáférési kód: 1F13). A hasítási hely körüli néhány hiányzó reziduumot és az N- és C-terminális részeket SYBYL modeling csomag segítségével egészítettük ki (SYBYL 7.0, Tripos Inc., St. Louis, MO).

Az aktivált PMN felülúszók hatása a FXIIIa-ra

100 µg/ml pFXIII-t 40 U/ml trombin és 10 mM CaCl₂ jelenlétében aktiváltunk 5 percig 37°C-on 500 µl végtérfogatban. Ezután 2 ml, 5x10⁶/ml fMLP-vel aktivált PMN sejtszuspenzió felülúszóját adtuk az inkubációs elegyhez és 37°C-on inkubáltuk. Különböző időközökben a mintákból FXIII aktivitásmérést és SDS PAGE analízist végeztünk.

A PMN sejtekből felszabadult proteázok hatása a trombin-aktivált FXIII-ra fibrin alvadékokban

13 µg/ml pFXIII tartalmú, 2,1 mg/ml végkoncentrációjú fibrinogént HEPES Tyrode pufferben kiegészítettünk 5x10⁶/ml vagy 20x10⁶/ml PMN sejtszuspenzióval. A fibrinogént 1,2 U/ml trombinnal és 2 mM CaCl₂-al alvasztottuk meg. Az alvadékokat 37 °C-on inkubáltuk különböző ideig, majd mintapufferben vettük fel és Western blottinggal vizsgáltuk mindkét FXIII alegységet. A fenti kísérleteket proteáz inhibitorok jelenlétében is megismételtük. A HNE, katepszin G és MMP-9 enzimaktivitások blokkolására 10 µM ONO 5046-t, 10 µM katepszin G inhibitor I-t vagy 0,1 µM MMP-9 inhibitor I-t használtunk. A gátlási kísérleteket 1,5 g/l α₁AT-nel is elvégeztük.

A FXIII aktivációja a plazmában és a fibrin visszanyerése

100 µl thrombocyta-mentes plazmát inkubáltunk 20 µl thrombin-CaCl₂ eleggyel (végkoncentrációk: 0,1-0,3 U/ml trombin és 18 mM CaCl₂). A mintákat különböző ideig inkubáltuk 37 °C-on, majd a reakciót egyenlő térfogatú inhibitor koktél hozzáadásával állítottuk le. A mintákat centrifugáltuk, a felülúszókat eltávolítottuk és 9 térfogat SDS PAGE mintapufferben oldottuk fel. Amennyiben képződött fibrin alvadék, azt extenzíven mostuk fiziológiás sóoldattal majd mintapufferben vettük fel. A mintákat SDS PAGE-el és FXIII-A Western blottinggal vizsgáltuk. Hasonló kísérleteket végeztünk PMN sejtekkel kiegészített plazmákból. Ebben az esetben thrombocyta-mentes plazmát inkubáltunk PMN sejtekkel (5x10⁶/ml vagy 20x10⁶/ml) vagy azok nélkül 37 °C-on és 1,2 U/ml trombint és 18 mM CaCl₂-ot használtunk a minták megalvasztásához. Különböző ideig inkubáltuk a mintákat, majd proteáz inhibitor koktéllal állítottuk le a reakciót és a fibrint többszöri mosás után vettük fel mintapufferben.

EREDMÉNYEK

A HNE hatására a FXIII aktiválódik

Ezekben a kísérletekben tisztított HNE tisztított pFXIII-ra és cFXIII-ra kifejtett hatását vizsgáltuk. A HNE a pFXIII-t és a cFXIII-t koncentráció-függő módon aktiválta, a K_m érték 2,73 µM volt pFXIII és 3,10 µM cFXIII esetén. A maximális transzglutamináz aktivitás, melyet 5 µg/ml HNE segítségével értünk el, valamivel több mint 50%-a volt a trombinnal elért maximális transzglutamináz aktivitásnak. Magasabb HNE koncentrációk esetén a transzglutamináz aktivitás csökkenést mutatott, vagyis a FXIII további proteolízise a HNE által a FXIIIa inaktivációjához vezetett.

25 µg/ml pFXIII és cFXIII 5 µg/ml HNE hatására bekövetkező aktivációjának az időfüggését Western blottinggal és aktivitás mérésekkel követtük. HNE hiányában csak nem aktivált FXIII-A volt jelen 3 óra inkubációt követően is. Jelentős mennyiségű trunkált FXIII-A volt megfigyelhető HNE jelenlétében már 5 perces inkubációt követően. Ugyanebben az időpontban szignifikáns transzglutamináz aktivitás volt mérhető, amely azt mutatja, hogy a HNE proteolitikus hasításának és

Ca²⁺-nak az együttes hatására a FXIII molekulák egy része aktiválódott, vagyis átalakult FXIII-A*-á. A HNE-trunkált FXIII-A molekulatömege (~78 kD) nagyjából megegyezett a trombin-aktivált FXIII-A molekulatömegével. A FXIII-A* mennyisége 10 és 20 perc között volt a legtöbb, 52,5%-a és 67,4%-a a trombin aktivált pFXIII ill. cFXIII aktivitásnak. A FXIII-A hasítása és a transzglutamináz aktivitás megjelenése nem volt teljesen párhuzamos. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy egy hasított és egy nem-hasított FXIII-A-t tartalmazó dimernek is teljes a transzglutamináz aktivitása. Miután elérte a maximumot, az aktivitás lecsökkent és 3 óra után már nem volt mérhető. A cFXIII esetén (a B alegység hiányában) az aktiváció kissé gyorsabbnak tűnt, mint a pFXIII esetén, de a különbség nem volt szignifikáns.

Érdekes volt megfigyelni, hogy vajon a HNE FXIII-t aktiváló hatása tud-e érvényesülni összetettebb környezetben is, például fibrinogén vagy α_1 AT jelenlétében. A pFXIII HNE-által elért maximális aktivációja fiziológiás koncentrációjú fibrinogén jelenlétében illetve hiányában $62,5 \pm 5,5$ U/l és $67,3 \pm 4,6$ U/l (n=4 mindkét esetben) transzglutamináz aktivitást eredményezett. Az α_1 AT plazma koncentrációjának jelenléte teljesen legátolta a HNE-indukált FXIII aktivációt.

A HNE-aktivált pFXIII keresztköti a fibrint

A következő kérdés az volt, hogy a HNE-aktivált FXIII képes e fibrint keresztkötni, vagyis, hogy be tudja e tölteni FXIIIa fő fiziológiás funkcióját. Ezekben a kísérletekben nem használhattunk trombint a fibrinogén fibrinné alakításához, hiszen annak jelenléte FXIII aktivációhoz vezetne. A batroxobin moojeni egy trombin-szerű proteolitikus enzim, ami csak a fibrinopeptid A-t hasítja le a fibrinogénből (a fibrinopeptid B-t nem) és az így kialakuló fibrin monomer azután spontán polimerizálódik. Irodalmi adatok szerint a batroxobin moojeni nem hasítja és így nem aktiválja a FXIII-t. A fibrinogén mintákat, melyeket vagy nem-aktivált FXIII-al, trombin-aktivált FXIII-al (FXIIIa[t]) vagy HNE-aktivált FXIII-al (FXIIIa[e]) egészítettünk ki, az "Anyagok és módszerek" részben leírtak szerint készítettük el. Azokban a fibrin mintákban, ahol a FXIII-hiányos fibrinogént nem egészítettük ki FXIII-al sem a trombin, sem batroxobin moojeni hatására nem jött létre keresztkötés. Amikor nem-aktivált FXIII-t adtunk az inkubációs elegyekhez és batroxobin moojeni-vel alvasztottuk meg a fibrinogént, csak egy kevés γ -lánc dimer volt megfigyelhető, amely elviekben a zimogén FXIII aktivitásának vagy esetleg a batroxobin moojeni

készítmény egyéb kígyóméreg proteázokkal történő szennyeződésének tudható be. Mivel Western blottinggal nem volt kimutatható proteolízis, a megfigyelt γ -dimerizáció a zimogén FXIII kis mértékű keresztköti aktivitásának a következménye. A FXIIIa[e] jelenlétében a γ -láncok gyakorlatilag teljesen dimerizálódtak, és az α -láncok is nagy molekulásúlyú oligomerekké/polimerekké alakultak át. A FXIIIa[e] hatása a fibrin keresztkötiésekre a FXIIIa[t] hatásával összevethető volt, azzal a különbséggel, hogy az utóbbi esetben az α -láncok nagy molekulatömegű α -polimerekbe történő keresztkötiése nagyobb mértékű volt.

A HNE hasítási helyei a FXIII-A-ban

Bár a HNE-hasított FXIII-A molekulatömege durván megfelelt a trombin-aktivált FXIII-A molekulatömegének a Western bloton, a HNE hasítási helye gyaníthatóan nem volt azonos a trombin hasítási helyével, hiszen a HNE szubsztrát-specifitása eltér a trombinétól. Annak érdekében, hogy meghatározzuk az elsődleges (és lehetőség szerint másodlagos) HNE hasítási helyeket a FXIII szerkezetében, két kísérletsorozatot végeztünk el. A cFXIII-ból kihalított peptideket MALDI TOF-al, a HNE-trunkált FXIII-A-t pedig N-terminális szekvenálással vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy az elsődleges hasítási termék a FXIII-A N-terminális részének első 39 aminosavát magába foglaló peptid. Az 1-39 peptid MALDI TOF-al dupla csúcsként mutatkozott, 14 D tömegkülönbséggel, ami a cFXIII preparátumban jelen lévő V/L 34 variánsok tömegkülönbségéből adódik. A kezdetben felszabaduló 1-39 peptidet a HNE tovább hasította a T6-A7 helyen, majd a V34-V35 helyen. A tény, hogy a 7-34 peptid csak egy csúcs formájában volt megfigyelhető és hogy az L34 variáns relatív aránya a 7-39 peptidben nőtt az idő előrehaladtával, arra utal, hogy a HNE a L34 peptid variánst nem hasítja az L34-V35 helyen. Bár a V34 variánsban az egyik szekunder hasítási hely a V34-V35 peptidkötés volt, az intakt fehérjében a hasítás nem jött létre és csak a már lehasított peptidre korlátozódott. A kísérleteket pFXIII-al is elvégeztük, és a FXIII-A hasítási sémája megegyezett a cFXIII-nál megfigyeltével.

Azt, hogy a HNE-aktivált FXIII-ban a V39-N40 az elsődleges hasítási hely, N-terminális szekvenálással is megerősítettük. A blotról kivágott trunkált FXIII-A esetén aszparagin volt az egyetlen N-terminális aminosav és az azt követő aminosav szekvencia megegyezett a várt szekvenciával. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a

HNE által V39-N40-nél trunkált FXIII-A₂ az az aktív FXIII-A forma, amelyik Ca²⁺ jelenlétében aktív transzglutaminázzá alakul (N40-FXIII-A₂*). Az N40-FXIII-A₂* egy új, aktív FXIII forma, amely két aminosavval rövidebb, mint az ismert trombinhasított G38-FXIII-A₂* transzglutamináz.

A FXIII-A V34L polimorfizmusának hatása a HNE-indukált FXIII aktivációra

A fentiek alapján kiderül, hogy a FXIII-A egyik legfőbb polimorfizmusának helye, a V34, nem a HNE elsődleges hasítási helye a FXIII-A-ban. Mivel a V34L polimorfizmus szignifikánsan fokozza a trombin FXIII-A hasításának mértékét, és csak öt aminosavnyi távolságra található az elsődleges HNE hasítási helytől, érdekes volt megvizsgálni, hogy a polimorfizmus van-e hatással a HNE-indukált FXIII aktivációjára. Western blotting kísérletek és FXIII aktivitás mérések is azt mutatták, hogy a FXIII-A V34L polimorfizmus sem a hasítás mértékét, sem a pFXIII aktivációját nem befolyásolja.

A cFXIII három dimenziós szerkezete az elsődleges HNE hasítási hely körül

A V39 reziduumon kívül, ami a HNE elsődleges hasítási helye a FXIII-A-ban, négy másik valin is található a hasítási hely környezetében. A kérdést, hogy a HNE elsődlegesen miért a V39 mellett és nem a V34, V35, V47 vagy V50 mellett hasít, molekula modellezés segítségével próbáltuk megválaszolni. A V39 hely egy hajlékony hurok közepén található, a HNE aktív centruma számára könnyen elérhető helyen, és a környező reziduumok könnyen felvehetik az enzim-szubsztrát interakcióhoz szükséges konformációt. Ezzel ellentétben a V47 és V50 reziduumok egy β -redőben találhatók a β -szendvics domén kezdeti szakaszán, és oldalláncaik a domén belseje felé mutatnak, ami elérhetetlenné teszi őket a HNE számára. A V34 és V35 reziduumok a Q32-L45 hurok N-terminális végéhez közel találhatók, és részlegesen fedettek a FXIII-A dimer magja és az első β -hordó doménje által. A V39 aminosavhoz képest mindkét reziduum egy kevésbé flexibilis régióban található és a HNE aktív centrumával való interakciójuk korlátozott.

A FXIIIa proteolitikus degradációja aktivált PMN sejtek felülűszójának hatására

Korábbi kísérletekben kimutattuk, hogy a HNE az idő előrehaladtával proteolitikusan degradálja és inaktiválja a FXIIIa-t. A HNE-n kívül a PMN sejtekből egyéb proteolitikus enzimek is felszabadulnak a sejtek aktivációja során. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a PMN proteázoknak lehet-e szerepük a FXIIIa down-regulációjában a fibrin alvadékban. Első lépésként fMLP-el aktivált PMN sejtekből felszabaduló proteázok trombin-aktivált FXIIIa-ra kifejtett hatását vizsgáltuk. A PMN proteázok a FXIII trombin aktivált formáját (FXIII-A*) proteolitikusan degradálták. A degradáció az idő függvényében zajlott, melynek mértékét SDS PAGE-el és kvantitatív denzitometriával követtük. Kimutattuk, hogy a FXIII-A* sáv csökkenése parallel zajlott a FXIII aktivitás csökkenésével, vagyis a FXIII-A* degradációs termékeinek nincs transzglutamináz aktivitása. A PMN proteázok a FXIII-B-t is degradálták, az eredeti FXIII-B-nek 73,6%-át és 50,3%-át tudtuk detektálni 30 perc ill. 3 óra inkubáció után.

A PMN sejtekből a fibrin alvadékban proteázok szabadulnak fel

A következő lépésben azt szeretnénk volna kimutatni, hogy a fibrin alvadékba inkorporálódó PMN sejtek aktiválódnak és proteolitikus enzimeket szabadítanak fel. Ennek bizonyítására két kísérletsorozatot végeztünk. Először SDS PAGE-el kimutattuk, hogy a PMN sejtek jelenlétében a plazminogén mentes fibrin alvadék lizálódik. PMN sejtek hiányában nem következett be fibrinolízis, vagyis a fibrin proteolitikus degradációja a PMN sejtekből felszabaduló proteázok hatásának tulajdonítható. A második kísérletsorozatban HNE, katepszin G és MMP-9 aktivitásokat mértünk az "Anyagok és módszerek"-ben leírtak szerint fibrin alvadékban. PMN sejtek jelenlétében számottevő HNE, katepszin G és MMP-9 aktivitásokat tapasztaltunk. A specifikus inhibitorok, ONO 5046 és MMP-9 I inhibitor, szinte teljesen legátolták a HNE és MMP-9 aktivitásokat. Ezzel szemben az alvadékban a katepszin G inhibitor I csak részlegesen gátolta a katepszin G aktivitást, annak ellenére, hogy az fMLP-vel aktivált PMN sejtek felülűszójában teljesen legátolta az enzimet. A részleges gátlás hátterében az állhat, hogy az alvadékban a felszínhez kikötődött enzim kevésbé elérhető a gátló molekulák számára.

Az FXIII alegységek PMN sejtek hatására bekövetkező proteolitikus degradációja fibrin alvadékban

Annak érdekében, hogy leteszteljük a PMN sejtekből felszabaduló proteázok trombin aktivált FXIII-ra kifejtett hatását fibrin alvadékokban, pFXIII-t tartalmazó fibrinogén oldatokat egészítettünk ki PMN sejtszuszpenzióval, majd trombinnal és CaCl_2 -al megalvasztottuk. Az alvadékokat Western blottinggal vizsgáltuk. Kezdetben csak zimogén FXIII-A volt az alvadékban, ami fokozatosan aktiválódott az inkubáció folyamán és 30 perc után már szinte csak a hasított aktív formában volt jelen. Ha PMN sejteket is adtunk az inkubációs elegyekhez, idő- és sejtszám-függő FXIII-A proteolízis ment végbe. 5×10^6 /ml PMN sejt jelenlétében, a FXIII-A/A* fokozatos proteolízise volt megfigyelhető és három óra elteltével a FXIII-A*-t már csak egy halvány sáv jelezte az immunobloton. 20×10^6 /ml PMN sejt hatására az aktivált FXIII-A degradációja már 15 perc után is jelentős volt, és 3 óra elteltével a degradáció teljessé vált. Érdekes módon az immunobloton intermedier hasítási termék nem volt megfigyelhető és 3 óra elteltével is csak kis mennyiségű alacsony molekulatömegű hasítási termék volt kimutatható. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a PMN sejtekből felszabaduló, különböző szubsztrát-specifitású proteolitikus enzimek együttesen gyorsan degradálják a FXIII-A*-t alacsony molekulatömegű peptidekké. A PMN sejtek hatékonyan degradálták a fibrinről és FXIII-A'-ról a FXIII aktiváció során disszociálódó FXIII-B-t is.

Az egyes PMN proteázok relatív jelentősége a FXIII-A proteolitikus degradációjában

A tesztelt proteáz inhibitorok közül ONO 5046 jelenlétében tapasztaltuk a legerősebb védő hatást a FXIII-A és FXIII-B proteolitikus degradációjával szemben. Csak ez az inhibitor tudta kivédeni a FXIII alegységek teljes degradációját 3 óra alatt. A védő hatás ellenére a FXIII alegységek szignifikáns része degradálódott. Kismértékű védelem volt megfigyelhető 30 perc után katepszin G inhibitor jelenlétében. Az intakt FXIII-A* sáv eltűnését nem befolyásolta az MMP-9 inhibitor jelenléte, ugyanakkor ez esetben (és kisebb mértékben katepszin G inhibitor jelenlétében is) 63 kD és 61 kD tömegű intermedier hasítási termékek halmozódtak fel. A hasítási termékek inhibitor hiányában vagy HNE inhibitor jelenlétében nem jelentek meg. Eredményeink arra utalnak, hogy a HNE szerepet játszik az aktivált FXIII elsődleges proteolitikus

hasításában, az MMP-9-nek és a katepszin G-nek pedig feltehetően a köztitermékek lebontásában van szerepe.

A FXIII aktivációja plazmában és asszociációja fibrinnel

Annak érdekében, hogy a PMN sejtek FXIIIa-ra kifejtett hatását plazma alvadékokban is megvizsgáljuk, először bizonyítanunk kellett, hogy az aktiváció után a FXIIIa fibrinhez kötve marad. Ennek a kérdésnek a tisztázása azért volt fontos, mert a FXIII degradáció mértékének megítélése teljes plazmából csak úgy kivitelezhető, ha az alvadékokat extenzíven mossuk a fibrinhez nem kötődött, az SDS PAGE és Western blot meghatározásokkal interferáló plazma fehérjék és különösen albumin eltávolítása végett. A trombin hatására bekövetkező FXIII aktivációt és a fibrin kialakulását alacsony trombin koncentráció mellett vizsgáltuk. Ahogy azt korábban kimutatták, az α -láncok polimerizációja a fibrinopeptid A $A\alpha$ -láncból történő kihalása után rögtön megtörtént, míg ebben a stádiumban a $B\beta$ -láncok nagy része még nem hasadt le. A FXIII azonnal az újonnan képződött fibrin polimerhez kötődött, még a nem-trunkált formájában. A FXIII hasítása és aktivációja az újonnan képződött fibrin felszínén ment végbe egy rövid lag fázis után. Kiemelendő, hogy a FXIII-A hasítása egyik vizsgált plazma mintában sem ment végbe a szolubilis fázisban (n=23) és a trunkált FXIII sohasem jelent meg a szérumban. Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a FXIII fiziológias aktivációja kizárólagosan a fibrin felszínén megy végbe és a továbbiakban nem válik le a fibrinről.

A FXIII proteolitikus degradációja plazma alvadékban

Kérdéses volt, hogy a PMN proteázok által kifejtett FXIIIa down-regulációs mechanizmus, mely tisztított fibrinogén esetén hatékonyan működött, vajon plazma körülmények között is ki tudja e fejteni a hatását. Annak ellenére, hogy a plazmában számottevő mennyiségű természetes proteáz inhibitor volt jelen, jól detektálható FXIII-A* degradáció jött létre 5×10^6 /ml PMN sejt jelenlétében. Erőteljesebb proteolízis volt megfigyelhető 20×10^6 /ml PMN sejt esetében, bár a degradáció mértéke összességében kisebb volt, mint a tisztított fibrinogénből készített alvadékok esetén.

Az α_1 AT hatása a FXIII alegységek PMN proteázok hatására bekövetkező degradációjára

Mivel az α_1 AT az elsődleges szerin proteáz inhibitor a plazmában, mely a PMN proteázok (HNE és kisebb mértékben katepszin G és proteináz 3) gátlásáért felelős, érdekes volt megfigyelni, hogy a FXIII alegységek proteolízisét hogyan befolyásolja az α_1 AT jelenléte fibrin alvadékokban. A kérdés tisztázásához a degradációs kísérleteket megismételtük olyan fibrin alvadékokban, amelyeket FXIII-tartalmú fibrinogénből állítottunk elő, és PMN sejtekkel és α_1 AT-el egészítettünk ki. Az α_1 AT fiziológiás koncentrációban gátolta ugyan a FXIII alegységek PMN sejtek hatására bekövetkező proteolitikus degradációját, de a gátlás csak részleges volt. A FXIII-A esetén még α_1 AT jelenlétében is szignifikáns proteolízis következett be 30 perc után és csak egy kevés nem-degradálódott FXIII-A maradt a fibrin alvadékban 3 óra elteltével. Az α_1 AT védő hatása a FXIII-B degradációjával szemben hatásosabbnak bizonyult, mint a FXIII-A esetén.

A PMN proteázok hatása a fibrin keresztkötések kialakulásának mértékére

Annak kimutatására, hogy a PMN sejtek hatására lezajló FXIIIa down-reguláció hogyan befolyásolja az alvadékban képződő keresztkötések mértékét, megvizsgáltuk a fibrin keresztkötés és a FXIII-A proteolízisének időfüggését fiziológiás PMN sejtszám (5×10^6 /ml PMN) és fiziológiás koncentrációjú α_1 AT jelenlétében. A fibrin γ -láncok teljes keresztkötéséhez csak néhány percre van szükség, így nem meglepő, hogy fél óra elteltével a γ -láncok mindegyike dimerizálódott. Az 5×10^6 /ml PMN-el történő inkubáció három óra után is csak kismértékben degradálta a γ -dimereket. Az α -láncok keresztkötése jóval lassabb folyamat, melynek során nagy molekulásúlyú keresztkötött polimerek jelentek meg a szeparáló gél felső részén és a koncentráció gél tetején, viszont 3 óra kevés volt ahhoz, hogy α -láncok teljes mértékben keresztkötött állapotba kerüljenek. A PMN proteázok elsősorban az α -láncokat emésztették, amivel szemben az α_1 AT jelentős, de csak részleges védő hatást nyújtott. Ez lehetővé tette, hogy nagy molekulásúlyú keresztkötött polimerek képződjenek. A fibrin keresztkötése és emésztése ebben az esetben egyszerre zajlik, de az α_1 AT jelenlétében a keresztkötött fehérjék teljes mennyisége nem csökkent 3 óra elteltével sem, és a keresztkötött α -polimerek mennyisége nőtt, igaz kisebb arányban, mint a PMN sejtek hiánya esetén. α_1 AT jelenlétében a PMN proteázok által kifejtett FXIII-A degradáció

mértéke lelassult, különösen a kezdeti szakaszban. Egy ill. három óra elteltével azonban már csak 52% ill. 21% FXIII maradt fenn. A FXIII-A proteolitikus degradációjának és a keresztkötött fibrin mennyiségi alakulásának az összehasonlítása azt mutatja, hogy α_1 AT jelenlétében a fibrin alvadékban a PMN sejtek hamarabb degradálják a FXIII-t, mint a keresztkötött fibrint. Ebben az időszakban az újonnan képződött keresztkötött termékek aránya egyensúlyba került a proteolízisük mértékével és a nagy molekulású keresztkötött termékek mennyisége tovább növekedett.

MEGBESZÉLÉS

A proteolízis központi szerepet játszik a véralvadás szabályozásában, számos faktor és kofaktor aktivációja és inaktivációja proteolitikus hasítások eredményeképpen valósul meg a hemosztázisban. A PMN proteázok FXIII-ra kifejtett hatásáról csak néhány közlés ismert. Egy korai tanulmányban leírták egy FXIII preparátum inaktivációját tisztított HNE-vel és részleges inaktivációját katepszin G-vel és kimutatták a proteolitikus degradációjukat is. Henriksson és munkatársai korai munkájukban felvetik, hogy nem-fiziológias körülmények között, vagyis EDTA jelenlétében a HNE átmenetileg aktiválhatja a FXIII-t. Eredményeink kétséget kizáróan bizonyítják, hogy Ca^{2+} jelenlétében a pFXIII és a cFXIII is aktiválódik HNE hatására. Kimutattuk, hogy a peptidkötés, melynek hasítása az aktivációért felelős, a trombin hasítási helyétől eltér.

Az AP-FXIII lehasítása az A alegységről nélkülözhetetlen lépése a pFXIII aktivációnak, amely lehetővé teszi a Ca^{2+} hatására bekövetkező FXIII-B disszociációját a tetramerről és a fennmaradó FXIII- A_2' aktív enzimmé (FXIII- A_2^*) való átalakulását. A cFXIII esetén a FXIII-A hasítása trombinnal nagymértékben felgyorsítja a Ca^{2+} hatására bekövetkező aktivációt. Mindezidáig a G38-FXIII- A_2^* volt az egyetlen ismert, aktív trunkált FXIII forma. Aktivált FXIII-A formák expresszálása transzfektált sejtekben több laboratóriumban, a miénket is beleértve, sikertelennek bizonyult. Itt egy eltérő módszerrel próbálkoztunk, és a HNE proteolitikus hasítása révén hoztunk létre aktív trunkált FXIII-A-t. Kimutattuk, hogy a HNE elsődleges hasítása helye a V39-N40, és a hasítás eredményeképpen létrejövő FXIIIa egy új aktív, trunkált FXIII forma, az N40-FXIII- A_2^* . A HNE szubsztrát-

specifitása a trombinétól teljesen eltér, a hasításhoz a HNE P1 aminosavként valint preferál. A V39 mellett további négy valin reziduum is található az elsődleges HNE hasítási hely közelében a FXIII-A-ban (V34, V35, V47, V50). Molekulamodellezéssel sikerült feltárni, hogy ezek a valin reziduumok kedvezőtlenebb pozícióban helyezkednek el, ezért interakciójuk a HNE-vel korlátozott.

Az N40-FXIII-A₂* transzglutamináz aktivitása azt jelzi, hogy a G38 és a V39 aminosavak nem nélkülözhetetlenek az enzimatikusan aktív FXIII konfiguráció eléréséhez. Mivel a HNE hatása kevésbé specifikus, mint a trombiné és az aktiváció mellett párhuzamosan degradáció is létrejön, a HNE-aktivált FXIII-A₂* specifikus aktivitását nem lehet megállapítani. A spektrofotometriás módszerrel mért maximális aktivitás értékek a maximális trombin-idukálta aktivitás 50%-a felett voltak mind pFXIII mind cFXIII esetén, ami arra utal, hogy a FXIIIa[e] aktivitása nagyságrendben megközelíti a FXIIIa[t] aktivitását. A FXIIIa[e] a fibrin láncait is hatékonyan kereszt kötötte, vagyis képes betölteni a FXIIIa fő fiziológiai funkcióját.

Mivel a FXIII-A V34L polimorfizmus szignifikánsan befolyásolja a pFXIII és cFXIII trombin hatására bekövetkező aktivációját, kíváncsiak voltunk, hogy a polimorfizmus befolyásolja-e a FXIII HNE-indukált aktivációját. Bár a V34L polimorfizmus csak öt aminosavnnyira helyezkedik el a primer HNE hasítási helytől, a polimorfizmus nem volt hatással a HNE szubsztrát kötésére vagy a proteolízis mértékére. Kimutattuk, hogy ha az N-terminális peptidet a HNE hasítja, elérhetővé válik a V34 hely is mint másodlagos hasítási hely, de az L34 hely mellett ekkor sem történik hasítás. Természetesen ez a tény nem befolyásolta a FXIII aktivációjának az ütemét vagy annak mértékét. Érdekes azonban, hogy a V35 hely mellett egyáltalán nem történt hasítás. Ez az eredmény arra utal, hogy a V35 körül elhelyezkedő aminosavak nem felelnek meg a HNE szubsztrát-specifitásának.

Bár a HNE-vel végzett kísérleteink elsődleges célja egy új, aktív trunkált FXIII-A forma keresése volt, illetve hogy új információkat nyerjünk a transzglutamináz aktivitás szerkezeti feltételeiről a FXIIIa-ban, mégis felmerül a kérdés, hogy vajon az eredményeknek van-e fiziopatológiai jelentősége. A legtöbb kísérletben használt FXIII és HNE koncentráció fiziológiai volt. A PMN sejtekben 0,44-2,5 pg mennyiségű HNE van sejtenként, vagyis 5×10^6 /ml PMN sejtben (a vérben lévő fiziológiai mennyiség) átlagosan 5 µg/ml HNE van, melynek nagy része az aktiváció során felszabadulhat. A FXIII referencia intervalluma a plazmában 14-28

$\mu\text{g/ml}$. A kísérletekben használt $25 \mu\text{g/ml}$ FXIII és $5 \mu\text{g/ml}$ HNE koncentrációknak tehát lehet relevanciája fiziopatológias körülmények között. A lehetőség ellenére nem valószínű, hogy a HNE szignifikánsan hozzájárulna a FXIII aktivációjához az alvadékon belül. Az alvadás során gyorsan keletkező trombin elegendő mennyiségű ahhoz, hogy a pFXIII-t aktiválja a HNE közreműködése nélkül is. A HNE felszabadulása egy későbbi esemény, ami csak a fibrin kialakulása után jön létre. Az extravaszkuláris térben azonban másabb lehet a helyzet, különösen $\alpha_1\text{AT}$ hiányos betegekben. A bronchoalveoláris köpenyfolyadék cFXIII-t tartalmaz, amit elviekben a HNE aktiválhat és az így kialakult FXIIIa keresztköthet szubsztrát adhezív proteineket a bronchoalveoláris kompartmentben, ami esetleg hozzájárulhat az $\alpha_1\text{AT}$ hiányban bekövetkező bronchoalveoláris elváltozások patomechanizmusához. Természetesen ezt a hipotézist kísérletesen is igazolni kell.

Bár a FXIII HNE-indukált aktivációja nem valószínű, hogy létrejönne az alvadás során, a down-regulációs mechanizmusnak, melyben az FXIIIa-t a HNE a többi PMN proteázzal együtt inaktiválja, lehet fontos fiziológias negatív feed-back szerepe. Ezt a hipotézist alátámasztották azok a kísérletek, melyekben kimutattuk, hogy az aktivált PMN sejtek felülúszójában lévő proteázok a FXIII-A*-t degradálták és ez a transzglutamináz aktivitás parallel csökkenésével járt együtt.

Korábban kimutatták, hogy nem-stimulált PMN sejtek inkorporálódnak plazma alvadékba vagy a thrombusba és proteolitikus enzimeket szabadítanak fel, melyek a hemosztázisban és a fibrinolízisben részt vevő számos fehérjével kölcsönhatásba lépnek. Azt, hogy a PMN sejtekből a fibrin alvadékban proteázok szabadulnak fel, a mi kísérleteink is igazolták és a proteázok fibrinolitikus hatását is bizonyítottuk plazminogén mentes fibrinogénnel. A PMN sejtekből felszabadult proteázok kötődnek a sejtmembránhoz és fibrinhez, így csak részben lehet az enzimeket visszanyerni az alvadék felülúszójából. Annak érdekében, hogy megbecsüljük a kikötődött és szabad proteázok teljes aktivitását, és hogy megítéljük, hogy specifikus inhibitoraik gátolják-e őket az alvadékban, egy újfajta megközelítést dolgoztunk ki. Az enzimekre specifikus szubsztrátokat hozzáadtuk a fibrin alvadékokhoz és a meghatározott idő alatt végbement hasítás eredményeképpen létrejövő abszorbanciaváltozást vagy fluoreszcencia intenzitásváltozást mértük. Ezzel a módszerrel kimutattuk, hogy a fibrin alvadékban a PMN sejtekből HNE, katepszin

G és MMP-9 szabadul fel és a HNE és MMP-9 aktivitást gyakorlatilag teljesen, a katepszin G aktivitást pedig részlegesen gátolta a specifikus inhibitor.

A PMN sejtek a fibrin alvadékban hatékonyan degradálták a FXIII-A-t és a FXIII-B-t. Mivel a szabad FXIII-B szerepe ismeretlen, az utóbbi eredmény jelentőségét nem lehet megítélni. Az egyes PMN proteázok FXIIIa degradációjában betöltött relatív szerepének vizsgálatát specifikus inhibitoraik segítségével, indirekt úton határoztuk meg. A tesztelt inhibitorok közül a HNE inhibitor fejtett ki legjelentősebb, de még így is csak részleges védő hatást. A katepszin G jelentőségének megítélése nehéz, mivel csak részlegesen lehetett gátolni a fibrin alvadékban. Az MMP-9 inhibitor nem befolyásolta az intakt FXIII-A* proteolitikus degradációját, de az inhibitor jelenlétében intermedier proteolitikus termékek halmozódtak fel. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HNE a FXIII-A* elsődleges hasításában játszik szerepet, míg az MMP-9 és kisebb mértékben a katepszin G az elsődleges hasítási termékek további degradálásában vesznek részt.

Az α_1 AT jelenlétének ellenére a FXIIIa PMN proteázok által kifejtett down-regulációja plazma alvadékban is végbement. Az eredmény megerősítéséhez α_1 AT-el kiegészített, tisztított fibrinogénből készített fibrin alvadékkal is végeztünk kísérleteket. A proteáz inhibitor ebben az esetben is csak csökkentette a FXIIIa proteolitikus degradációjának a sebességét. Fontos hangsúlyozni, hogy mikor fibrin vagy fibrinogén nem volt jelen, az α_1 AT teljesen megakadályozta a tisztított HNE vagy az aktivált PMN sejtek felülúszójának proteolitikus hatását. Ez összhangban van korábbi közlésekkel, ahol leírták, hogy az α_1 AT meggátolta a PMN proteázok thrombocytákra kifejtett hatását amikor PMN felülúszót vagy tisztított katepszin G-t használtak, de kevésbé volt hatásos, amikor intakt PMN sejtek is jelen voltak az inkubációs elegyekben. Az α_1 AT limitált hatékonyságát a PMN sejtekből felszabaduló proteázokkal szemben több tényező is magyarázhatja: a) a sejt-felszínhez kötődött proteázok elérhetetlenek az α_1 AT számára, b) az α_1 AT-t a PMN sejtekből felszabaduló myeloperoxidáz oxidatív módon inaktíválhatja, c) az α_1 AT-t az MMP-9 proteolitikusan inaktíválhatja. További magyarázatot szolgáltat, hogy a fibrin jelenléte is csökkenti az α_1 AT hatékonyságát HNE-vel szemben, vagyis a fibrinhez kötött HNE hatékony marad még az inhibitor jelenlétében is. A kísérletsorozatok eredménye azt igazolja, hogy a thrombusban a PMN proteázoknak lényeges szerepe lehet a FXIIIa down-regulációjában. A kísérletekben használt PMN koncentrációk

nagy valószínűséggel a fiziológias körülményeket reprezentálják, az $5 \times 10^6/\text{ml}$ és $20 \times 10^6/\text{ml}$ PMN sejtszám normál vagy közepesen emelkedett PMN sejtszámnak felelnek meg, még akkor is, ha a PMN sejtek csak passzívan kerülnének a thrombusba. Több kiváló tanulmány azonban kimutatta, hogy a PMN sejtek aktívan is akkumulálódnak a thrombusban fibrinhez való kötődés és P-szelektin-függő thrombocytákhoz való kötődés révén. Ezek alapján a PMN sejtek denzitása a thrombusban a kísérleteinkben használt koncentrációnál valamivel nagyobb is lehet.

A PMN proteázok hatása az alvadékban egy komplex folyamat, amely hatást gyakorol a keresztkötő enzimre, a FXIIIa-ra, és annak keresztkötött szubsztrátjára is. A FXIIIa PMN proteázok által bekövetkezett degradációjának időfüggése azt mutatja, hogy a PMN proteázok nem befolyásolják a kezdeti keresztkötések kialakulását. A γ -láncok dimerizációja és az $\alpha_2\text{PI}$ fibrin α -láncához történő kötése percekben belül végbemegy. A FXIIIa degradációja a PMN sejtekből felszabaduló proteázok hatására egy lassabb folyamat, melyet tovább lassít az $\alpha_1\text{AT}$ jelenléte, így az nem befolyásolja a kezdeti keresztkötések kialakulását. A FXIIIa inaktivációja azonban megakadályozza a fibrin α -lánc extenzív keresztkötésének sokkal lassabb folyamatát. Ez a down-regulációs mechanizmus tehát megengedi a fibrin és $\alpha_2\text{PI}$ -fibrin keresztkötések kialakulását, amely stabilizálja az alvadéket és védi az azonnali fibrinolízissel szemben, de gátat szab a túlzott keresztkötések kialakulásának, amely lebonthatatlan alvadéket eredményezne.

Összefoglalva, a PMN proteázok FXIII aktivációban/inaktivációban betöltött komplex szabályozó szerepét írtuk le, mely új információkat szolgáltatott a FXIII biokémiai funkciójáról és a fibrin keresztkötés down-regulációjáról az alvadékon belül. A HNE-vel végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy az inaktív FXIII hasításának eredményeképpen egy új, aktív trunkált FXIII forma jön létre (N40-FXIII-A*), ami két aminosavval rövidebb a trombin-hasított FXIII-A*-nál, mégis szignifikáns transzglutamináz aktivitással bír. Kísérleteinkben a FXIIIa down-regulációjának egyetlen, korábban ismeretlen mechanizmusát mutattuk ki. A PMN sejtekből felszabaduló proteázok effektíven degradálták a FXIIIa-t fibrin és plazma alvadékokban is. Az általunk leírt down-regulációs mechanizmusnak fontos fiziológias szerepe lehet: meggátolhatja a túlzottan keresztkötött plazma alvadékok kialakulását, ezáltal lehetővé téve a fibrin eliminációját, amikor arra már nincs szükség.

ÖSSZEFOGLALÁS

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy tetramer struktúrájú zymogen (A_2B_2). A FXIII aktivációja során első lépésként a trombin hidrolizálja az R37-G38 peptidkötést az A alegységben (FXIII-A), mely lehetővé teszi az aktív transzglutamináz kialakulását. Az így létrejött G38-FXIII-A* az egyetlen eddig ismert aktív FXIII-A forma. Az aktivált FXIII (FXIIIa) fő funkciója a fibrin láncok keresztkötése és az α_2 plazmin inhibitor fibrin láncokhoz való kötése, mely stabilizálja a fibrint és védi a fibrinolízissel szemben. Bár az összes aktivált alvadási faktornak van ismert inaktivációs szabályozó mechanizmusa, a FXIII esetében erről eddig nem született közlés. Mivel a trombusban proteolitikus enzimekben gazdag polymorphonucleáris (PMN) granulocyták halmozódnak fel, megvizsgáltuk, hogy a PMN sejtekből felszabaduló proteázoknak van-e szerepük a FXIII aktivitás szabályozásában.

Tisztított humán neutrophil elasztáz (HNE) az inaktív FXIII-at részlegesen hasította, a FXIII gyors aktivációját majd lassabb inaktivációját eredményezve. A HNE-aktivált FXIII a fibrin γ - és α -láncait keresztkötötte a batroxobin moojenivel megalvasztott fibrin alvadékban. MALDI TOF analízis és N-terminális szekvenálás segítségével azonosítottuk az elsődleges hasítási helyet (V39-N40) és egy új, aktív FXIII formát írtunk le (N40-FXIII-A*).

Stimulált PMN sejtek felülúszójának hatására a FXIIIa proteolitikusan degradálódott, a transzglutamináz aktivitás parallel csökkenésével. Kimutattuk, hogy a fibrin alvadékban HNE, katepszin G és mátrix metalloproteáz 9 (MMP-9) szabadul fel a PMN sejtekből, melyek a fibrint bontották és degradálták mindkét FXIII alegységet. Kimutattuk, hogy a FXIIIa down-regulációjában a HNE részt vesz, míg az MMP-9 és a katepszin G elsődleges szerepe a hasítási termékek további lebontása. A FXIII PMN proteázok által bekövetkező degradációja teljes plazmából illetve α_1 -antitripsinnel kiegészített fibrinogénből készült alvadékok esetén is jelentős volt. Az α_1 -antitripsint is tartalmazó fibrin alvadékban a FXIIIa degradációja szignifikánsan gyorsabban ment végbe, mint a keresztkötött fibrin degradációja.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a PMN sejtekből felszabaduló proteázok szerepet játszhatnak a FXIIIa inaktiválásában a fibrin alvadékban. A FXIII PMN proteázok által bekövetkező degradációja a FXIII down-regulációjának egyetlen eddig ismert, új mechanizmusa, mely meggátolhatja a túlzottan keresztkötött, nehezen eliminálható fibrin alvadék kialakulását.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost* 2007; 98:359-67.

Impakt faktor (2006): 2.803

Bagoly Z, Fazakas F, Komáromi I, Haramura G, Tóth E, Muszbek L. Cleavage of factor XIII by human neutrophil elastase results in a novel active truncated form of factor XIII A subunit. *Thromb Haemost* 2008; 99:xx (in press)

Impakt faktor (2006): 2.803

Muszbek L, **Bagoly Z**, Bereczky Z, Katona E. The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008 (accepted)

Impakt faktor 2008-ban jelenik meg

Shemirani AH, Haramura G, **Bagoly Z**, Muszbek L. The combined effect of fibrin formation and Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764:1420-3.

Impakt faktor: 3.311

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 8.917

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Piccardoni P, Manarini S, Federico L, **Bagoly Z**, Pecce R, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Cerletti C, Evangelista V. SRC-dependent outside-in signalling is a key step in the process of autoregulation of beta2 integrins in polymorphonuclear cells. *Biochem J* 2004; 380:57-65.

Impakt faktor: 4.278

Muszbek L, **Bagoly Z**. Fibrin formation disorders and pregnancy loss. Thromb Res 2007;117: S69-70.

Impakt faktor (2006): 2.058

Lahav J, Karniel E, **Bagoly Z**, Dardik R, Inbal A. A novel function of coagulation factor XIII: protein disulphide isomerase. Thromb Haemost (under review)

Az értekezéshez nem szorosan kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 6.336

ELSŐ SZERZŐS ELŐADÁSOK NEMZETKÖZI KONGRESSZUSOKON

Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of factor XIII within the fibrin clot.

ISTH SSC FXIII Standardization Working Party German Thrombosis and Haemostasis Society FXIII Symposium

Basel, Svájc, 2006 február 13-16.

Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot.

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007, Chicago, USA, 2007 április 17-21.

Bagoly Z, Fazakas F, Haramura G, Tóth E, Muszbek L. Transient activation of blood coagulation factor XIII by polymorphonuclear granulocyte elastase.

XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Genf, Svájc, 2007 július 6-12.

Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within the fibrin clot.

XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Genf, Svájc, 2007 július 6-12.

ELSŐ SZERZŐS ELŐADÁSOK HAZAI KONGRESSZUSOKON

Bagoly Z, Piccardoni P, Evangelista V: Tirozin foszforiláció szerepe a leukocytathrombocytá interakcióban.

A Magyar Thrombosis és Hemostasis Társaság Debreceni Szimpóziuma és a Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság Haemostasis Munkacsoport Fóruma, MTHT-MLDT, Debrecen, 2002 október 10-12.

Bagoly Z, Piccardoni P, Evangelista V. Tirozin-kináz függő szignálátvitel szerepe a humán leukocytá adhézióban.

A Magyar Thrombosis és Hemostasis Társaság VIII. Kongresszusa, Alsópáhok, 2003 szeptember 11-13.

Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Granulocytá-proteázok a XIII-as faktor és a fibrinolysis szabályozásában.

A Magyar Thrombosis és Hemostasis Társaság VIII. Kongresszusa, Alsópáhok, 2005 október 6-8.

Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. A XIII-as faktor down-regulációja fibrin alvadékban.

A Magyar Thrombosis és Hemostasis Társaság IX. Kongresszusa, Alsópáhok, 2007 szeptember 27-29.

Bagoly Z, Fazakas F, Haramura G, Tóth E, Komáromi I, Muszbek L. A XIII-as faktor átmeneti aktivációja granulocytá elasztáz hatására.

A Magyar Thrombosis és Hemostasis Társaság IX. Kongresszusa, Alsópáhok, 2007 szeptember 27-29.