

A jelen pályázat keretében végzett kutatások szervesen kapcsolódnak korábbi, az intracelluláris FXIII-A a nem immunológiai és immunológiai receptor mediált fagocitózisban betöltött lehetséges szerepének tisztázása érdekében a 35198 sz. „Az intracelluláris XIII-as faktor lokalizációja és lehetséges funkciói” c. 2001-2004 között futó OTKA pályázat keretében végzett vizsgálatainkhoz. A pályázat egyik alprogramjaként végzett vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a FXIII-A expresszió és az Fc γ R mediált szenzitizált erythrocyta (EA) kötés/fagocitózis, valamint a komplementtel bevont élesztő partikulumok komplement receptor mediált (CR) kötés/fagocitózis a monocyták/makrofág differenciáció során szoros összefüggést mutat. Az EA és a komplementtel bevont élesztő partikulumok fagocitózisa párhuzamosan emelkedett a FXIII-A expresszióval és a makrofág differenciáció 3. napján érte el maximumát. Mind az Fc γ R, mind a CR mediált fagocitózis nagymértékben gátolt volt a transzglutamináz mediált keresztkötések kialakulását gátló szer, a monodansylcadaverine jelenlétében. Ezen eredményeink alapján megerősítve láttuk azt a feltételezésünket, hogy a FXIII-A szerepet játszik a monocyták/makrofágok immunológiai és a nem-immunológiai receptor mediált fagocitózisában. A FXIII-A intracelluláris eloszlása és szubsztrát-profilja alapján feltételeztük, hogy fontos szerepet játszhat bizonyos citoskeleton átrendeződéssel jellemezhető aktivációs folyamatokban. Ezért jelen pályázat keretében végzett kutatásaink arra irányultak, hogy a monocyták/makrofágok különböző funkcionális állapotaiban a FXIII A gén expressziójának mértékét tisztázzuk, ill., hogy adatokat szerezzünk arra vonatkozóan, hogy a gén up- és down-regulációja milyen körülmények között következik be. Humán buffy coat-ból izolált monocyták/makrofágok kultúráit különböző sejtaktiváló ágensekkel kezeltük: a klasszikus aktivációs út vizsgálatához *Mycobacterium bovis* (BCG) kezelést, míg az alternatív aktivációs út elemzéséhez interleukin 4 kezelést alkalmaztunk. A FXIII-A gén kifejeződésének mértékét a tenyésztési idő függvényében Q-RT-PCR módszerrel határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy az alternatív aktivációs úton a gén expressziója a kontrollhoz képest nagyságrendileg fokozódott, míg a klasszikus útvonalon történt aktivációt követően a gén expresszió gátolttá vált. Sejtszintű fluoreszcens image analízis segítségével igazoltuk, hogy az mRNS szintű változásokat a fehérje produkció szintjén is hasonló változások kísérik.

Fenti vizsgálati eredmények alapján megalapozott annak feltételezése, hogy a FXIIIa immunhisztokémiai kimutatása a patodiagnosztikában is marker reakcióként érvényesíthető az alternatív úton aktivált makrofágok kimutatására, illetve annak eldöntésére, hogy egy adott szövettani elváltozás makrofág populációját milyen lokális hatások érték. A bőr granulomás elváltozásainak etiológiai háttere tisztázatlan; ismeretlen, hogy a folyamat alapvetően fertőzőes eredetű, vagy nem-fertőzőes expozíciókra adott lokális proliferációnak tekinthető. A DEOEC Bőrgyógyászati Klinikájával együttműködve különböző granulomás szövetek immunhisztokémiai vizsgálatát kezdtük el, kettős immunfluoreszcens reakciót használva, annak eldöntésére, hogy az elváltozás makrofág populációja alternatív vagy klasszikus úton aktivált-e. Az elvégzett vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a bőr granulomás elváltozásainak hátterében különböző, a makrofág aktiváció jellegét is befolyásoló etiológiai tényezők állnak, s az alternatív makrofág aktiváció marker reakcióinak alkalmazásával a granulómák egy alcsoportja (mely további karakterizálást igényel) jól leválasztható.

Az IL4 által indukált, - többek között - az FXIII-A gén overexpressziójához vezető alternatív aktiváció hatásmechanizmusának/útvonalának feltárásához és a FXIII-A génexpresszióban betöltött lehetséges szerepének tisztázása érdekében RNS microarray vizsgálatokat végeztünk normál és FXIII A deficiens egyénekből (n=4, mindkét esetben) izolált, majd IL4 jelenlétében és hiányában differenciálódó monocytá/makrofágokból izolált RNS mintákon. A microarray vizsgálatok a monocytá/makrofág differenciáció kezdeti szakaszában tartósan (48 órán át) IL4-stimulált sejteken kerültek elvégzésre Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays felhasználásával, majd a génexpressziós változások validitásának ellenőrzése TaqMan real-time quantitative PCR low density array-vel történt. A génexpressziós mintázat elemzése során annak tisztázására törekedtünk, hogy

- melyek azok a gének ill. géncsoportok, melyek fel- ill. leszabályozódása a FXIII A jelenlétéhez kötött

- ill. a FXIII A jelenléte, mely gének ill. géncsoportok expressziójának mértékét befolyásolja a makrofágok alternatív differenciációja során.

A target gének funkcionális klaszter-analízise Cytoscape/BiNGO és Ingenuity Pathways Analysis programokkal történt, s igazoltuk, hogy a FXIII A egyes immunfunkciókban, a sebgyógyulásban és bizonyos gyulladásozó folyamatok

szabályozásában involvált gének expressziójának regulációjában lényeges szerepet játszik.

A FXIII-A, mint transzglutamináz enzim extra és intracelluláris működését a génpolimorfizmusai jelentősen módosíthatják. Előtanulmányként, a szív-érrendszeri betegségek és a FXIII-A feltételezett kapcsolatából kiindulva, elvégeztük a XIII-as faktor Val34Leu polimorfizmusa és a koszorúér-betegség kapcsolatát vizsgáló 16 eredeti kutatás meta-analízisét. Az eredeti kutatásokban 5346 koszorúér beteg és 7053 kontroll személy vett részt. Az elemzésbe bevontuk az összes olyan eredeti kutatást, amely módszertanilag megfelelő volt és amelyben a koszorúér-betegség meglétét az anamnézisben szereplő szívinfarktus alapján, illetve angiográfiával igazolt szignifikáns stenosis alapján határozták meg. Az eredeti kutatási eredmények heterogenitása miatt az összevont kockázati mutató becslésére a véletlenszerű hatás meta-analízisek módszerei közül a Bayes-féle empirikus becslést alkalmaztuk. Az eredmények alapján a XIII faktor Val34Leu mutációja enyhe protektív hatással bír a koronária betegség kialakulására: az esélyhányados 0,82; 95%-os megbízhatósági tartomány 0,73-0,94 a heterozygoták, illetve 0,89, 95%-os megbízhatósági tartomány 0,69-1,13 a homozygota Val34Val csoportban. A genetikai tényező hatását azonban jelentős mértékben módosítják környezeti tényezők, különösen a szérum fibrinogén szintje. Az eredmények értelmezésekor azt is figyelembe kell venni, hogy a kis mintaelem számú csoportokon elvégzett negatív eredményű vizsgálatok hiánya az irodalomban felveti a publikációs torzítás lehetőségét.