

ZÁRÓ KUTATÓI JELENTÉS

OTKA F60643

**"A XIII-AS VÉRALVADÁSI FAKTOR A ÉS B ALEGYSÉGÉNEK
KAPCSOLÓDÁSÁÉRT FELELŐS STRUKTÚRÁLIS ELEMEEK
AZONOSÍTÁSA A B ALEGYSÉGBEN"**

DR. BALOGH ISTVÁN

EGYETEMI ADJUNKTUS

DEBRECENI EGYETEM, ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

KLINIKAI BIODÉJÉMI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET

Bevezetés, előzmények

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) két, potenciálisan aktív A alegységből és két protektív/védő B alegységből felépülő heterotetramer (FXIII-A₂B₂). A zimogén aktivált formája (FXIIIa) transzglutamináz enzim, mely izopeptid keresztkötéseket hoz létre két polipeptid lánc között. Az FXIII fő fiziológiás funkciója a fibrin keresztkötésekkel történő stabilizálása és ellenállóvá tétele [1-3]. A FXIII öröklött hiánya súlyos vérzékenységgel jár [4]. Fiziológiás körülmények között a FXIII aktiválódásának első lépése egy 37 aminosav hosszúságú aktivációs peptid thrombin általi lehasítása az N-terminálisról [1]. Ca²⁺ jelenlétében a B alegységek disszociálnak és az A alegység elnyeri aktív konformációját. A FXIII-A-t kódoló gén a 6-os kromoszómán található [5]. A nagy (~160 kb) gén 15 exont tartalmaz. Ellentétben a FXIII-B génnel az FXIII-A szekretorikus vezető szekvenciát nem tartalmaz, a FXIII-A szekréciója ismeretlen [6]. A FXIII-A szintézisének fő helye a monocyta makrofág rendszer és a megakaryocyták [7, 8]. A FXIII-B gén az egyes kromoszómán foglal helyet, 12 exont tartalmaz [9], [10].

Elektromikroszkopikus képen a FXIII-A₂B₂ heterotetramerként látszik, melyben a két globuláris kompakt A₂ dimert hosszú, vékony és flexibilis B alegységek veszik körbe [11, 12]. A FXIII-A aktivációs peptidből, β-szendvicsből, katalitikus magból és két β-hordóból áll [13-15]. A 83 kDa molekulásúlyú FXIII-A szerkezete (leader szekvencia, illetve szénhidrát módosítás hiánya) sokkal inkább intracelluláris mint szekretált fehérjére utal. A 80 kDa molekulásúlyú FXIII-B a májban szintetizálódik [16]. 8,5% szénhidrátot tartalmaz, ami a FXIII-A-hoz való kötődésben nem játszik fontos szerepet [17]. A FXIII-B egyetlen ismert biológiai funkciója a FXIII-A kötése. A FXIII-B tipikus domén struktúrával rendelkezik, szinte kizárólag Sushi doménekből (CCP vagy SCR) áll. Az ilyen típusú fehérjék majdnem mindig fehérje-fehérje interakcióban játszanak szerepet, mint például a komplement rendszer

különböző komponensei (Factor H, CD55, CD46), vagy a C4BP, ami az antikoaguláns Protein-S-t köti [18]. Valószínű, hogy a FXIII-B homodimert alkot [19].

A FXIII-B - FXIII-A kötődés a vérplazmában rendkívül fontos a FXIII-A stabilitásának fenntartásában [20]. FXIII-B nélkül a plazmakörnyezetben FXIII-A instabil, a kevés öröklött FXIII-B hiányos beteg alacsony FXIII-A szintekkel rendelkezik, továbbá az ilyen betegeknek adott tisztított placenta eredetű FXIII-A rövidebb féleletidejű, mint a FXIII-A hiányos betegeknek adott [21, 22]. A két alegység kötődése a vérplazmában történik, stabil rekombináns rendszerben a két alegység koexpressziója nem eredményezte a FXIII-A szekrécióját [23]. A FXIII aktivációs mechanizmusainak és aktivitásának különböző aspektusai intenzív kutatások tárgya, elsősorban egy potenciálisan mélyvénás thrombosis és myocardialis infarctus ellen védő hatású polimorfizmus miatt (FXIII-A Val34Leu) [24]. Ez a polimorfizmus mindössze 3 aminosav távolságra esik az aktivációs helytől. A polimorfizmus hatása a FXIII-A aktivációjára nem teljesen tisztázott. Az első publikáció a mutációt hordozók esetében magasabb aktivitást írt le [25]. Később kiderült, hogy nem a végső aktivitás, hanem az aktiváció sebessége, amit a polimorfizmus jelenléte befolyásol [26, 27]. A Val34Leu polimorfizmuson túl egyéb mutációk mind a FXIII-A [28], mind a FXIII-B [29] génben leírtak és kapcsolatban állhatnak thromboembóliás megbetegedésekkel.

E pályázatnak célja, FXIII-B cDNS klónozása, rekombináns mutánsok kialakítása és funkcionális vizsgálata volt a két alegység kapcsolódása szempontjából.

Anyagok és módszerek

Anyagok

pcDNA 3.1 vektorok, sejttenyésztő médiumok és reagensek, FXIII-A cDNS klón (Invitrogen)

Human máj cDNS könyvtár (Ambion)

Restriktációs enzimek (Fermentas)

DNS tisztító oszlopok, Ni-NTA oszlopok (Qiagen)

Ultrafiltrációs eszközök (Millipore)

Streptavidin és biotinált tormaperoxidáz (Vector Laboratories)

HisTrap HP oszlopok (GE Healthcare)

MaxiSorp ELISA lemez (Nunc)

Antitestek

FXIII-B ellenes antitestek: Anti-V5 monoklonális antitest (Invitrogen), nyúl anti-FXIII-B poliklonális antitest (Calbiochem).

FXIII-A ellenes antitestek: birka anti-FXIII-A (Coachrom), nyúl anti-FXIII-A poliklonális antitest (Abcam), eger anti-FXIII-A monoklonális antitest (Abcam).

FXIII (komplex) ellenes antitestek: birka anti-FXIII (Biodesign).

Másodlagos antitestek: R&D Systems, Vector Laboratories.

Az antitesteket a megfelelő fehérjék ellen mind mikrolemez, mind membrán alapú módszerekben használva teszteltem.

FXIII-B cDNS klónozása

A PCR reakciókban Pfu Ultra enzimet használtam, ezzel a DNS polimeráz által elkövetett hibák minimalizálása céljából.

Az 1986 bp hosszúságú cDNS-t három átfedő szakaszban amplifikáltam. Az 'A' szakaszhoz az F(F13B-Met-EcoRI) és az R(F13B-780) primereket, a 'B' szakaszhoz az F(F13B-780) és az R(F13B-1470), míg a 'C' szakaszhoz az F(F13B-1470) és az R(F13B-Stop-XhoI) primereket használtam. A szekvenciák és a PCR termékek hossza az 1. táblázatban található. A két szélső primer EcoRI és XhoI helyeket tartalmazott. A klónozás során először a három szakaszt külön amplifikáltam (1. ábra). A második PCR lépés szeparáltan zajlott. Az elsőben, melyhez az F(F13B-Met-EcoRI) és az R(F13B-1470) primereket használtam, tisztított 'A' és 'B' szakaszokat használtam templátként. A második reakcióban tisztított 'B' és 'C' szakaszok koamplifikációja történt az F(F13B-780) és R(F13B-Stop-XhoI) primerekkel. Az így kapott 'A+B' és 'B+C' szakaszokat tisztítás után az F(F13B-Met-EcoRI) és R(F13B-Stop-XhoI) primerekkel amplifikáltam. Végül egy 2018 bp szakaszt kaptam, amelyet EcoRI és XhoI enzimekkel emésztettem és pcDNA3.1 vektorba ligáltam. A klónozott cDNS-t DNS szekvenálással ellenőriztem.

Rekombináns FXIII-B mutánsok előállítása

A deléciós mutánsok létrehozásához a fenti módon klónozott FXIII-B cDNS-t használtam. Minden esetben azonos forward primert (F13B-Met-EcoRI) használtam a megfelelő reverse primerrel (1. táblázat). Az amplifikációs reakciók 482 bp, 839 bp, 1205 bp, 1589 bp és 2009 bp PCR termékeket eredményeztek, melyek a következő mutánsokat/fehérjéket kódolták: I-II, I-IV, I-VI, I-VIII Sushi domént tartalmazó és a teljes hosszúságú FXIII-B (2. ábra). Az I-II mutáns tartalmazta az $^1\text{Met}^{152}\text{Thr}$ szakaszt, az I-IV a $^1\text{Met}^{271}\text{Arg}$, szakaszt, az I-VI a $^1\text{Met}^{393}\text{Asn}$ szakaszt, míg az I-VIII a $^1\text{Met}^{521}\text{Lys}$ szakaszt. A teljes hosszúságú FXIII-B cDNS a teljes FXIII-B fehérje szekvenciáját tartalmazta stop kodon nélkül ($^1\text{Met}^{661}\text{Thr}$). A nomenklatúra az éretlen aminosav szekvenciát tartalmazza, azaz a szekretált fehérjék esetében a leader szekvencia hiányozni fog.

Ezt követően az összes rekombináns mutánst és a teljes hosszúságú FXIII-B cDNS-t pcDNA3.1/V5-His plazmidba ligáltam és DNS szekvenálással ellenőriztem. Ennek megfelelően, minden esetben egy 31 tagú peptid szekvencia (LESRGPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH, a detektáláshoz használt V5 epitóp aláhúzva) került a rekombináns fehérjék C-terminálisára.

Transzfekció

A tranziens transzfekcióra COS-7 sejteket használtam. Előkísérletekben két transzfektálási módszert, a liposzóma alapú Effectene (Qiagen) módszert és a DEAE-dextrán módszert használtam. Az optimalizált rendszerben using COS-7 sejteket 70%-os felület fedettségig növesztettem Dulbecco's Modified Eagle Medium-ban (DMEM), mely 10% FCS-t tartalmazott. A rekombináns médiumot 72 óra elteltével gyűjtöttem és -20°C-on tároltam a további felhasználásig.

A rekombináns FXIII-B fehérjék részleges tisztítása

Az előkísérletekben Ni-NTA centrifugációs mikrooszlopokat használtam, mind denaturáló, mind natív tisztítási protokollal. Az optimalizált kísérletekben HisTrap HP oszlopokat használtam nem denaturáló tisztítási protokollal. A 0,22 µm-es szűrőn átszűrt rekombináns médiumot (200-400 mL) oszlop kötő pufferbe dializáltam (20 mM Na₃PO₄, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) 4°C-on. Ezt követően az oszlopon egy éjszakán át recirkuláltattam. A rekombinánsokat az oszlopról, annak összesen 20 oszloptérfogattal történő mosása után eluáltam magas imidazol koncentrációval. A részlegesen tisztított fehérjéket további felhasználásig vagy 4°C-on, vagy -20°C-on tároltam.

Immunoblotting

Az oszlopról eluált frakciókat 10% SDS-PAGE-en futtattam, mind redukáló, mind nem redukáló körülmények között. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltam és blokkolás után a megfelelő antitesttel inkubáltam. A biotínált második antitestet inkubációt követően ABC tormaperoxidáz kittel történt a jel amplifikáció. Az alkalmazott szubsztrát diaminobenzidin (DAB) volt.

A rFXIII-A esetében mind az elektroforetikus elválasztás, mind a detektálás hasonlóan történt.

FXIII-A cDNS klónozás és mutagenezis

Mivel a FXIII-A esetében a cDNS hozzáférhető volt, így itt nem volt szükség klónozásra, rögtön lehetőség volt a restrikciós helyek beépítésére és a cDNS prokarióta expressziós vektorba inzertálására. Az első felhasznált vektor a pET-16b vektor volt, ahol a használt enzimek az XhoI és a Bpu1102I voltak. a következő oligonikleotid primerekkel: F13ApET16bF (5'-CTG ACT CGA GTC AGA AAC TTC CAG GAC CGC C-3') és F13ApET16bR (5'-CTA AGC TCA GCC ATG GAA GGT CGT CTT TGA AT-3'). A vektorba inzertálás sikeres volt. A FXIII-A cDNS tartalmaz egy Shine-Dalgarno szekvenciát. Ezt helyspecifikus mutagenezissel úgy sikerült kiiktatni, hogy eközben az aminosavak nem változtak. TB1 törzset használva, többféle indukciós és inkubációs körülményeket kipróbálva, rFXIII nem termelődött sem oldható, sem zárványtest formában.

pMal rendszer használata rFXIII-A termeltetésére

A következő próbálkozás a FXIII-A cDNS N-terminális maltóz-kötő fehérje fúziós vektorba klónozása volt. A rendszer nagyon jó hatásfokkal működik, a rekombináns fehérjék oldatban tartását illetően. Mind a citoplazmatikus pMal-C, mind a periplazmatikus pMal-P rendszerbe beinzertáltam a FXIII-A cDNS-t, XbaI és HindIII helyek beépítésével. Az alkalmazott primerek a következők voltak: F13ApMalF (5'-AGA ATC TAG ATC AGA AAC TTC CAG

GAC CGC CTT T-3') és F13ApMalR (5'-AAG AAA GCT TTC ACA GGG AAG GTC GTC TTT GAA T-3'). Hasonlóan a pET rendszerhez, a pMal rendszerekben is, TB1 törzset használva, számos indukciós és inkubációs körülményeket tesztelve, rFXIII nem termelődött sem oldható, sem zárványtest formában. Ezt követően döntöttem úgy, hogy a FXIII-A rekombináns termelését is emlős sejtvonalon kísérelem meg.

rFXIII-A termeltetése emlős sejtvonalban

A fenti, bakteriális rendszerekben való eredménytelen fehérje termeltetés után a FXIII-A cDNS-t a FXIII-B-hez hasonlóan pcDNA3.1 vektorba klónoztam. Ebben az esetben olyan vektort választottam, amelynél a hisztidin toldalék az N-terminálison van, hiszen a FXIII-A-nak nincs szekretorikus szekvenciája, nem is várható, hogy a megjelenjen a fehérje a rekombináns médiumban (nem is jelent meg). XhoI és Asp718 enzimek használtam a következő primerek által amplifikált cDNS ligálásához: F13AAsppcDNAF (5'-AAG GTA CCT ATG TCA GAA ACT TCC AGG ACC-3') és F13AXhopcDNAR (5'- GAC TCG AGC TCA CAT GGA AGG TCG TCT TTG-3'). A klónozás után a rFXIII-A termeltetése a rFXIII-B-vel azonos módon zajlott, azzal a különbséggel, hogy ez esetben a sejt lizátumot szűrve, dializálva vittem fel a Ni-oszlopra. Az eluált frakciókban a FXIII-A a megfelelő molekula súly tartományban immunoblottinggal többféle antitesttel kimutatható volt. Mivel a rFXIII-A-t nem lehet fagyasztva tárolni, ez esetben a tárolás (max. egy hétig) 4°C-on történt.

Az alegységek kapcsolódásának vizsgálata

A rFXIII-A és rFXIII-B, valamint ennek mutánsainak kapcsolódását mikrolemezen vizsgáltam. Először a különböző fehérjéket a lemezen immobilizálva (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6, éjszakán át 4°C), kipróbáltam a különböző antitestek felismerő képességét. Bizonyos esetekben kiderült, hogy az antitest nem kellően specifikus vagy érzékeny (Abcam).

Mivel a két alegység kötődése erősen konformáció érzékeny lehet, kétféle megközelítést alkalmaztam. Az elsőben rFXIII-A került a mikrolemezre, és rFXIII-B valamint mutánsait inkubáltam blokkolást követően. A jel generálása FXIII-B ellenes antitesttel, második antitesttel, ABC rendszer általi jel amplifikációval és OPD szubsztráttal történt. A második beállítás ennek pontosan fordítottja, azaz ez esetben a rFXIII-B és mutánsai voltak immobilizálva és rFXIII-A ellenes antitestet használtam a detektáláshoz.

Eredmények

A faktor XIII-B cDNS klónozása

Mivel a FXIII-B cDNS kereskedelmi forgalomban nem volt kapható, meg kellett klónozni. A fent ismertetett átfedő PCR technikával ez sikeresen megtörtént. A klónozott cDNS-ben nem találtam klónozási artefaktumot, a szekvencia megfelelt az NM_001994-nek.

A deléciós mutánsok kialakítása

A stratégia az volt, hogy olyan cDNS szakaszokat kell előállítani, melyek

- (i) 2, 4, 6, 8 Sushi-domént kódolnak, ezeket
- (ii) olyan emlős expressziós vektorba ligálni, amely a tisztítást elősegítő fúziós toldalékot (His-tag) tartalmaz,
- (iii) valamint a His-tag a rekombinánsok C-terminálisán legyen, hogy ne zavarhassa a fehérjék médiumba történő szekréciónak.

A templátként szolgáló FXIII-B cDNS-ről a deléciós mutánsok könnyen kialakíthatók voltak (2. ábra). Szekvencia eltérés nem volt, minden szekvencia a tervezettnél megfelelő volt.

A transzfecció optimalizálása

A tranziens expresszióra COS-7 sejteket (majom vese sejtvonal) használtam. Az előkísérletek során bizonyítást nyert, hogy a DEAE-dextrán módszer jobb eredményt ad, mint az Effectene (magasabb hozam). Ezért ezt használtam a nagyobb mennyiségű rekombináns fehérje előállítására.

A rekombinánsok részleges tisztítása és detektálása

A rekombinánsokat a nikkell affinitás kromatográfia után eluált frakciónként immunoblottinggal vizsgáltam. Mivel minden rekombináns tartalmazta a V5 epitópot

szekvenciát a C-terminálison, a membránon egér monoklonális anti-V5 antitesttel lehetett detektálni a fehérjét. A fúziós szekvenciát kimutató anti-V5 mellett specifikus, nyúl poliklonális anti-FXIII-B ellenes antitestet is használtam, mellyel nagyon hasonló eredményt kaptam. A csúcsfrakciók redukáló és nem redukáló körülmények közötti elválasztását mutatja a 3. ábra (3.A redukáló, 3.B nem redukáló). A két típusú futtatás közötti mobilitás különbség (molekulasúly) arra utal, hogy a rekombinánsokban kialakulnak a diszulfid hidak. Ezen felül, a számolt molekulásúly (76,6 kDa a teljes hosszúságú rFXIII-B esetében, 60,5 kDa, 46,0 kDa, 32,3 kDa és 18,6 kDa a deléciós mutánsok esetében) jól korrelált a megfigyelttel. A legkisebb deléciós mutánst (I-II (FXIII-B ¹Met-¹⁵²Thr)) igen alacsony transzfekciós hatékonysága vagy expressziós szintje miatt külön kellett futtatni a többtől (3.C ábra).

A rekombináns fehérjék stabilitása

A részlegesen tisztított expresszált fehérjék stabilitását 4°C-on történő 1, 3 és 6 hónapig való, proteáz inhibítortól mentes tárolással teszteltem. Az ezt követő immunoblotting semmilyen degradációs terméket nem mutatott. Emellett a kapott jel intenzitása sem csökkent, még 6 hónapos tárolás után sem. ezen eredmények arra utalnak, hogy a COS-7 sejtekben termelt rekombináns FXIII-B és deléciós mutánsai igen stabilak, legalábbis immundetektálás tekintetében. A rFXIII-A esetében viszont ez nem mondható el, mert fagyasztani nem lehet és 4°C-on is csak rövid ideig tárolható degradáció mentesen.

rFXIII-A expressziós próbálkozások

Az E.coli rendszerekben, hosszas próbálkozások után, rFXIII-A termeltetése nem sikerült. Ennek okára nem jöttem rá, hiszen a potenciális zavaró tényezőket (Shine-Dalgarno szekvencia) kiiktattam, és többféle vektorrendszert is használtam. Az emlős rendszerben viszont, amelyek alacsony kinyeréssel ugyan, de sikerült rFXIII-A-t termeltetni, melyet részlegesen tisztított formában a kötődési előkísérletekben felhasználhattam.

A két alegység kötődésének vizsgálata

A mikrolemmezre rögzített rFXIII-A-hoz hozzáadva a rFXIII-B-t és deléciós mutánsait, minden esetben kaptam a kötődésre utaló, FXIII-B-t jelző szignált. A kapott jel a lekötött rFXIII-A mennyiségének függvénye volt.

Fordított esetben is hasonló eredményt kaptam, azaz a lerögzített rFXIII-B és deléciós mutánsai a rFXIII-A-t kötik. Ugyan ez a megfigyelés még további kísérletek általi megerősítést is igényel, de ezek az első eredmények arra utalnak, hogy a FXIII-B N-terminálisa vesz részt a FXIII-A kötésben.

Megbeszélés

Az e pályázat keretei között végzett munka az első olyan, amelyben rekombináns FXIII-B termelése folyik COS-7 sejtekben. Korábban eredményesen termeltek FXIII-B-t BHK sejtekben [30, 31] [23] és baculovírus rendszerben [19]. A nagyszámú diszulfid híd miatt a FXIII-B esetében bakteriális expresszió nem reális.

A FXIII-B gén az 1-es kromoszóma jól karakterizált részén (1q32) foglal helyet. Ez a régió a komplement aktiváció szabályzó gén klaszter (regulator of complement activation (RCA) gene cluster). Nagyon sok olyan fehérjét kódoló gén van itt, amely a komplement rendszerhez köthető. E fehérjék nagysága ugyan különböző, de aminosav szekvenciájuk és másodlagos szerkezetük nagyfokú homológiát mutat. Igazából nagyon kevés olyan gén van itt, amely fehérjetermékének *nincs* szerepe a komplement rendszerben, ezek egyike a FXIII-B, amelynek esetleges szerepe legalábbis nem ismert. (Zárójelben megjegyzendő, hogy a FXIII-B legközelebbi evolúciós rokona a komplement faktor H, amely éppen emiatt keltette fel az érdeklődésemet, és amelynek egy polimorfizmusának molekuláris epidemiológiáját más forrásból, de ez idő alatt vizsgáltuk időskori macula degenerációban szenvedő betegekben, lásd közleményjegyzék). Az RCA klaszterben kódolt fehérjék fő strukturális eleme a Sushi domén, amely homológ minden tagban. Vizsgálataim során léterhoztam a deléciós mutánsokat. Az alkalmazott technika sikeressége és a rekombináns deléciós mutánsok stabilitás vizsgálata arra utal, hogy a későbbiekben lehetőség lesz a szubsztitúciós mutánsok előállítására és a kimérák vizsgálatára is.

A FXIII-B-ben, annak második Sushi doménjében is ismert egy érdekes polimorfizmus [29]. A H95R esetében azonban nem sikerült egyértelmű kapcsolatot találni thromboembóliás megbetegedéssel [32-34], viszont az arginin allél hordozása a két alegység megnövekedett disszociációját eredményezte [29]. Valójában ez volt az első molekuláris szintű megfigyelés arról, hogy a FXIII-B mely része lehet érintett a két alegység kapcsolódásában, vagy annak szabályozásában. Souri és munkatársai [19], baculovírus

rendszerben expresszált rFXIII-B mutánsokkal kimutatták, hogy az első Sushi domén nagyon fontos a kötődésben. Nem zárták ki más domének szerepét. A saját, előkísérleti szakaszban járó eredményeim is hasonlóak, tehát úgy tűnik, hogy a FXIII-B N-terminálisa kritikus a FXIII A₂B₂ heterotetramer kialakulásában.

A fibrin háló ellenálló képessége és stabilitása az alvadék lízis terápiájának központi kérdése. Ebből az következik, hogy ha valamilyen módon tudnánk szabályozni a plazma FXIII-A aktivitását, például monoklonális antitestekkel vagy blokkoló peptidekkel, azaz a komplexből, a védett környezetből kikényszeríthetnénk a FXIII-A-t az őt tönkretévő plazma környezetbe, akkor a thrombosis kezelésben/preveniójában nagyot léphetnénk előre. E pályázat keretei között sikerült létrehozni olyan FXIII-B mutánsokat, amelyekkel az interakció az eddigieknél könnyebben vizsgálható. Ennek vizsgálatát el is kezdtem.

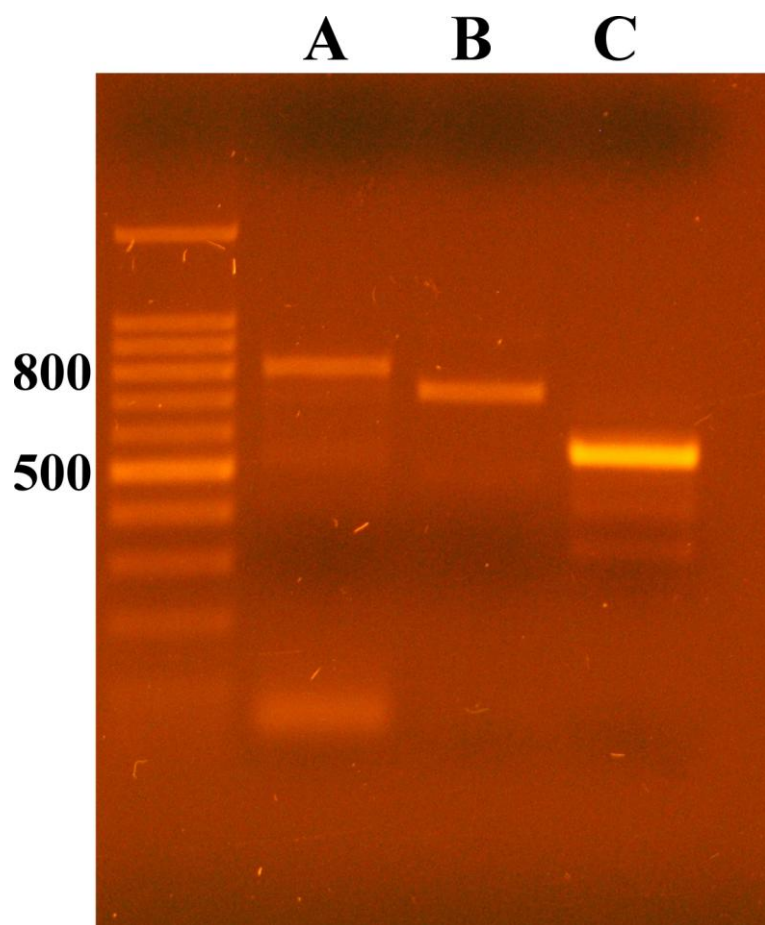
- [1] L. Muszbek, V.C. Yee, Z. Hevessy, Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 94 (1999) 271-305.
- [2] L. Lorand, M.S. Losowsky, K.J. Miloszewski, Human factor XIII: fibrin-stabilizing factor. *Prog Hemost Thromb* 5 (1980) 245-290.
- [3] J.E. Folk, Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed epsilon-(gamma-glutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 54 (1983) 1-56.
- [4] R. Anwar, K.J. Miloszewski, Factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 107 (1999) 468-484.
- [5] P.G. Board, G.C. Webb, J. McKee, A. Ichinose, Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24----p25. *Cytogenet Cell Genet* 48 (1988) 25-27.
- [6] A. Ichinose, E.W. Davie, Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 5829-5833.
- [7] R. Adany, Intracellular factor XIII: cellular distribution of factor XIII subunit a in humans. *Semin Thromb Hemost* 22 (1996) 399-408.
- [8] L. Muszbek, R. Adany, G. Szegedi, J. Polgar, M. Kawai, Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res* 37 (1985) 401-410.
- [9] G.C. Webb, M. Coggan, A. Ichinose, P.G. Board, Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. *Hum Genet* 81 (1989) 157-160.
- [10] R.E. Bottenus, A. Ichinose, E.W. Davie, Nucleotide sequence of the gene for the b subunit of human factor XIII. *Biochemistry* 29 (1990) 11195-11209.
- [11] P.D. Bishop, D.C. Teller, R.A. Smith, G.W. Lasser, T. Gilbert, R.L. Seale, Expression, purification, and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 29 (1990) 1861-1869.
- [12] N.A. Carrell, H.P. Erickson, J. McDonagh, Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *J Biol Chem* 264 (1989) 551-556.
- [13] R. Hilgenfeld, A. Liesum, R. Storm, H.J. Metzner, H.E. Karges, Crystallization of blood coagulation factor XIII by an automated procedure. *FEBS Lett* 265 (1990) 110-112.
- [14] P.D. Bishop, G.W. Lasser, I. Le Trong, R.E. Stenkamp, D.C. Teller, Human recombinant factor XIII from *Saccharomyces cerevisiae*. Crystallization and preliminary x-ray data. *J Biol Chem* 265 (1990) 13888-13889.
- [15] V.C. Yee, L.C. Pedersen, I. Le Trong, P.D. Bishop, R.E. Stenkamp, D.C. Teller, Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 7296-7300.
- [16] J.A. Nagy, P. Henriksson, J. McDonagh, Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* 68 (1986) 1272-1279.
- [17] J.T. Radek, J.M. Jeong, J. Wilson, L. Lorand, Association of the A subunits of recombinant placental factor XIII with the native carrier B subunits from human plasma. *Biochemistry* 32 (1993) 3527-3534.
- [18] M.D. Kirkitadze, P.N. Barlow, Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation. *Immunol Rev* 180 (2001) 146-161.
- [19] M. Souri, H. Kaetsu, A. Ichinose, Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry* 47 (2008) 8656-8664.
- [20] M. Souri, S. Koseki-Kuno, N. Takeda, J.L. Degen, A. Ichinose, Administration of factor XIII B subunit increased plasma factor XIII A subunit levels in factor XIII B subunit knock-out mice. *Int J Hematol* 87 (2008) 60-68.

- [21] A. Ichinose, Physiopathology and regulation of factor XIII. *Thromb Haemost* 86 (2001) 57-65.
- [22] M. Saito, H. Asakura, T. Yoshida, K. Ito, K. Okafuji, T. Matsuda, A familial factor XIII subunit B deficiency. *Br J Haematol* 74 (1990) 290-294.
- [23] H. Kaetsu, T. Hashiguchi, D. Foster, A. Ichinose, Expression and release of the a and b subunits for human coagulation factor XIII in baby hamster kidney (BHK) cells. *J Biochem* 119 (1996) 961-969.
- [24] H. Mikkola, M. Syrjala, V. Rasi, E. Vahtera, E. Hamalainen, L. Peltonen, A. Palotie, Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 84 (1994) 517-525.
- [25] H.P. Kohler, R.A. Ariens, P. Whitaker, P.J. Grant, A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb Haemost* 80 (1998) 704.
- [26] I. Balogh, G. Szoke, L. Karpati, U. Wartiovaara, E. Katona, I. Komaromi, G. Haramura, G. Pfliegler, H. Mikkola, L. Muszbek, Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 96 (2000) 2479-2486.
- [27] U. Wartiovaara, H. Mikkola, G. Szoke, G. Haramura, L. Karpati, I. Balogh, R. Lassila, L. Muszbek, A. Palotie, Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIII-A. *Thromb Haemost* 84 (2000) 595-600.
- [28] D.M. Pruissen, A.J. Slooter, F.R. Rosendaal, Y. van der Graaf, A. Algra, Coagulation factor XIII gene variation, oral contraceptives, and risk of ischemic stroke. *Blood* 111 (2008) 1282-1286.
- [29] N. Komanasin, A.J. Catto, T.S. Futers, A. van Hylckama Vlieg, F.R. Rosendaal, R.A. Ariens, A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 3 (2005) 2487-2496.
- [30] T. Hashiguchi, A. Ichinose, Molecular and cellular basis of deficiency of the b subunit for factor XIII secondary to a Cys430-Phe mutation in the seventh Sushi domain. *J Clin Invest* 95 (1995) 1002-1008.
- [31] S. Koseki, M. Souri, S. Koga, M. Yamakawa, T. Shichishima, Y. Maruyama, F. Yanai, A. Ichinose, Truncated mutant B subunit for factor XIII causes its deficiency due to impaired intracellular transportation. *Blood* 97 (2001) 2667-2672.
- [32] C.J. Doggen, A.P. Reiner, H.L. Vos, F.R. Rosendaal, Two factor XIII gene polymorphisms associated with a structural and functional defect and the risk of myocardial infarction in men. *J Thromb Haemost* 1 (2003) 2056-2058.
- [33] A.P. Reiner, S.R. Heckbert, H.L. Vos, R.A. Ariens, R.N. Lemaitre, N.L. Smith, T. Lumley, T.D. Rea, L.A. Hindorff, G.D. Schellenbaum, F.R. Rosendaal, D.S. Siscovick, B.M. Psaty, Genetic variants of coagulation factor XIII, postmenopausal estrogen therapy, and risk of nonfatal myocardial infarction. *Blood* 102 (2003) 25-30.
- [34] D. Gemmati, F. Federici, G. Campo, S. Tognazzo, M.L. Serino, M. De Mattei, M. Valgimigli, P. Malagutti, G. Guardigli, P. Ferraresi, F. Bernardi, R. Ferrari, G.L. Scapoli, L. Catozzi, Factor XIII A-V34L and factor XIII B-H95R gene variants: effects on survival in myocardial infarction patients. *Mol Med* 13 (2007) 112-120.

Primer név	Szekvencia	PCR termék hossz (bp)
F(F13B-Met-EcoRI)	5'-CAC CGA ATT CTG AAG <u>ATG</u> AGG TTG AAA AAC-3'	806
R(F13B-780)	5'-GAT TCT GGG TAC CAA CCA AAG-3'	
F(F13B-780)	5'-CTT TGG TTG GTA CCC AGA ATC-3'	718
R(F13B-1470)	5'-GGT TAA TGG AGA TAA GTC AT-3'	
F(F13B-1470)	5'-ATG ACT TAT CTC CAT TAA CC-3'	535
R(F13B-Stop-XhoI)	5'-GCC ATC TCG AGT CAT <u>TTC TAT</u> GTT CTT AAG-3'	
R(I-II-His)	5'-GCC ATC TCG AGC GTT TCA TGT TCT TTC CTA C-3'	482
R(I-IV-His)	5'-GCC ATC TCG AGT CTT CTT CCT TCG CAT ACA GG-3'	839
R(I-VI-His)	5'-GCC ATC TCG AGA TTA TTT TCA ACA CAC TCA GG-3'	1205
R(I-VIII-His)	5'-GCC ATC TCG AGT TTA GAT TCT TTT CTA GTA CA-3'	1589
R(I-X-His)	5'-GCC ATC TCG AGT GTT CTT AAG GGT TCT TG-3'	2009

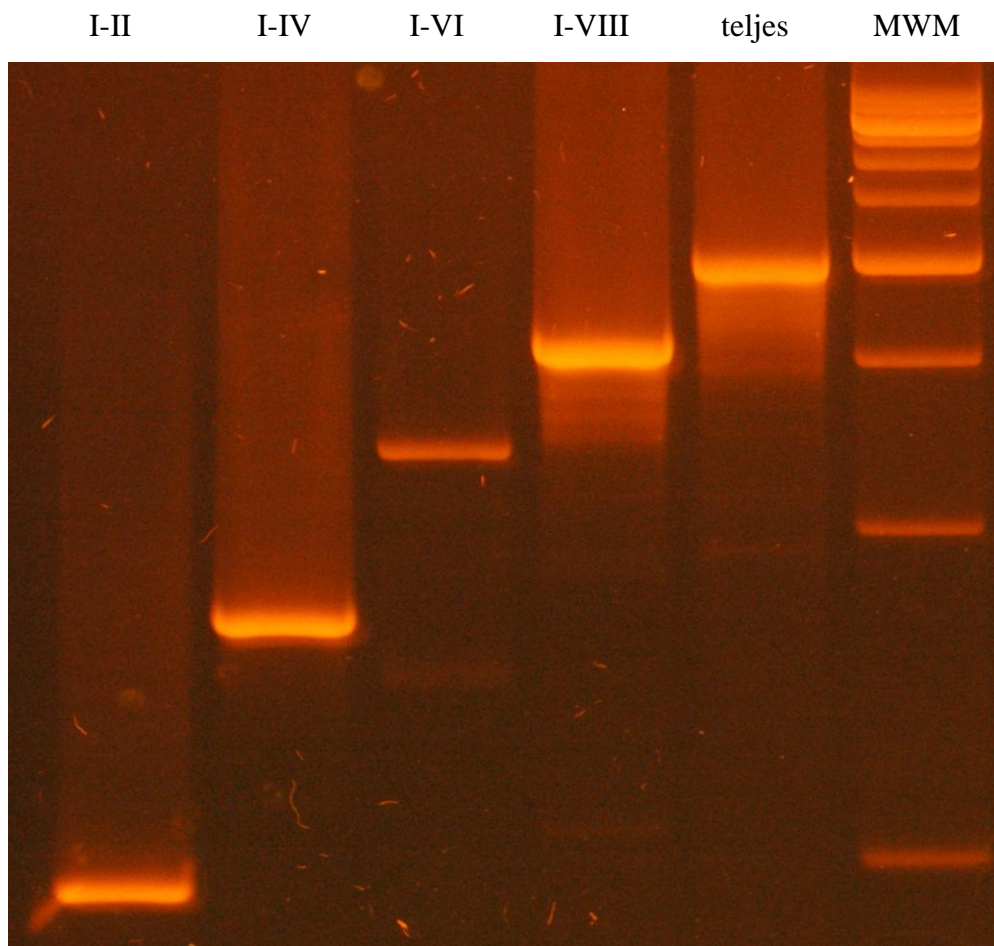
1. táblázat.

A FXIII-B cDNA klónozásához és a deléciós mutánsok kialakításához használt PCR primerek szekvenciája és az általuk generált PCR termékek hossza.



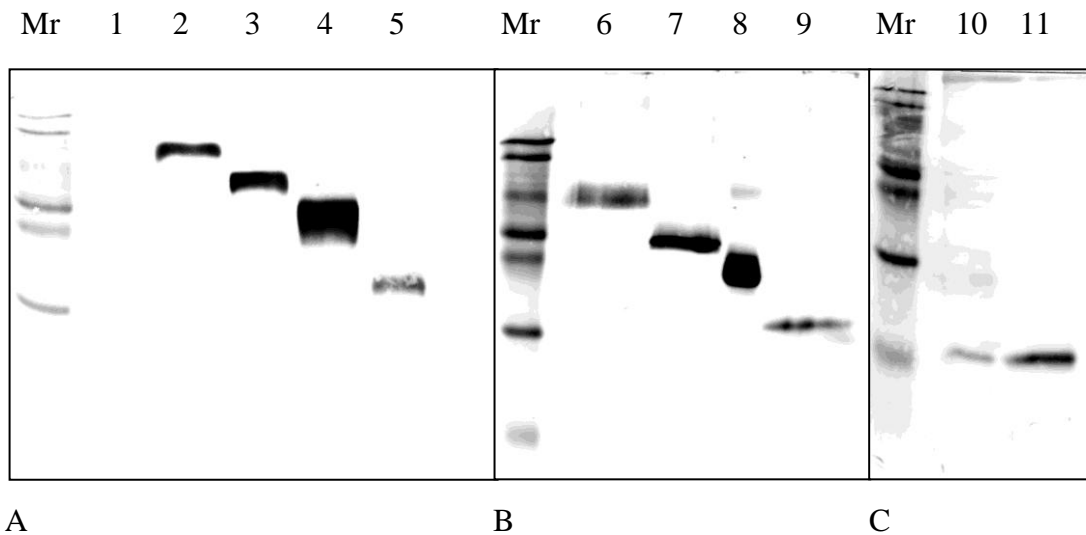
1. ábra.

A FXIII-B cDNS három átfedő szakasza.



2. ábra.

Deléciós mutánsok kialakítása a teljes hosszúságú FXIII-B cDNS felhasználásával. MWM: 500 bp létra.



3. ábra. Immunoblottinggal detektált rekombináns FXIII-B és deléziós mutánsai.

Mr: molekulatömeg marker (felülről: 132 kDa, 95 kDa, 68 kDa (halványabb), 55 kDa, 45 kDa, 31 kDa). (A) redukált, (B) nem redukált körülmények között futtatott SDS-PAGE, (C) az I-II mutáns redukált (10) és nem redukált (11) körülmények között. 1: -, 2 és 6: teljes hosszúságú rFXIII-B, 3 és 7: I-VIII deléziós mutáns, 4 és 8: I-VI deléziós mutáns, 5 és 9: I-IV deléziós mutáns.