

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A XIII-as véralvadási faktor alegységek egymással, és glutamin tartalmú szubsztrátokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása

Pénzes-Daku Krisztina

**Témavezető: Dr. Muszbek László,
akadémikus, professzor emeritus**



**Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola
Debrecen, 2014**

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás	4
2. Summary	6
3. Rövidítések jegyzéke	8
4. Bevezetés	10
4.1. A XIII-as faktor szerkezete	10
4.2. A XIII-as faktor aktiválódása, működése	12
4.3. A XIII-as faktor szubsztrátjai	14
4.4. A XIII-as faktor aktivitás meghatározásának lehetőségei	16
5. Célkitűzés	19
6. Anyagok és módszerek	20
6.1. <u>Az FXIII alegységek kölcsönhatásának vizsgálatánál alkalmazott anyagok és módszerek</u>	20
6.1.1 Anyagok	20
6.1.2 FXIII preparátumok és FXIII antigén meghatározások	20
6.1.3 Felszíni plazmon rezonancia vizsgálatok	21
6.1.4 ELISA-típusú kötődési vizsgálatok	21
6.1.4.1 A testfolyadékokban keringő szabad FXIII-A ₂ mennyiségének kiszámítása	22
6.1.4.2 A testfolyadékokban keringő szabad FXIII-A ₂ mennyiségének mérése	22
6.1.5 Az FXIII-A ₂ B ₂ komplex plazmából való eltávolítása után maradt szabad FXIII-A ₂ funkcionális aktivitásának vizsgálata	22
6.2 <u>Az FXIII és szubsztrátjai kölcsönhatásának vizsgálatánál alkalmazott anyagok és módszerek</u>	23
6.2.1 Fehérjék és reagensek	23
6.2.2 Kinetikus FXIIIa tesztek	23
6.2.3 NMR vizsgálatok	24
7. Eredmények	27
7.1 <u>Az FXIII alegységek kölcsönhatásának vizsgálata</u>	27
7.1.1 Az FXIII alegységek kölcsönhatását jellemző egyensúlyi disszociációs állandó (K _d) és egyéb kinetikai paraméterek meghatározása	27
7.1.2 Szabad FXIII-A ₂ a plazmában és egyéb testfolyadékokban	29

7.1.3	A plazmában lévő szabad FXIII-A ₂ működőképes	31
7.2	<u>Az aktivált FXIII és szubsztrátjai kölcsönhatásának vizsgálata</u>	33
7.2.1	Az N1- α_2 PI(1-12) N-terminális szakaszán létrehozott szintetikus mutációk hatása a kinetikai konstansokra	34
7.2.2	Gln2 közeli aminosav oldalláncok FXIIIa-val való kölcsönhatásának bizonyítása proton NMR technikával	35
7.2.3	Az N1- α_2 PI(1-12) C-terminális szakaszán létrehozott szintetikus mutációk hatása a kinetikai konstansokra	37
7.2.4	Az FXIIIa és az N1- α_2 PI(1-12) kölcsönhatásának vizsgálata STD NMR technikával	38
8.	Megbeszélés	40
9.	Új megállapítások	44
10.	Irodalomjegyzék	45
11.	Tárgyszavak	52
12.	Keywords	52
13.	Köszönetnyilvánítás	53
14.	Függelék	54

1. Összefoglalás

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy heterotetramer, mely két katalitikus A alegységből (FXIII-A₂) és két védő/gátló B alegységből áll (FXIII-B₂). Az FXIII-B tíz, ún. sushi doménből felépülő mozaik fehérje, mely szignifikánsan meghosszabbítja a katalitikus alegység féléletidejét a keringésben, és meggátolja lassú, progresszív aktivációját a plazmában. Figyelembe véve az FXIII alegységek közötti komplex kialakulásának fontosságát meglepő, hogy a kölcsönhatás biokémiája felületesen tanulmányozott és az FXIII alegységeinek egymáshoz való kötődéséről igen keveset tudunk. Ez idáig mindössze két munkacsoport foglalkozott az A és B alegységek közötti kölcsönhatás vizsgálatával, ám az általuk közölt egyensúlyi disszociációs állandó (K_d) értékeivel végzett számítások ellentmondanak a kísérletes adatoknak.

Az aktivált FXIII (FXIIIa) a trunkált A-alegység Ca^{2+} által aktivált dimer formája (FXIII-A₂*), egy transzglutamináz, mely keresztköti az elsődleges aminokat peptid kötésben lévő glutamin reziduumokkal. Mivel az FXIII-A₂* természetes glutamin donor peptid szubsztrátjainak nem azonosítható egy konszenzus szekvenciája a reaktív glutamin körül, fontosnak tartottuk tanulmányozni egy fiziológiás szempontból fontos szubsztrát és az FXIII-A₂* közötti kölcsönhatást. Az α_2 plazmin inhibitor (α_2 PI; más néven α_2 antiplazmin) molekulák nagy részét egy plazma proteáz hasítja, és a trunkált izoforma (N1- α_2 PI) igen fontos szubsztrátja az FXIII-A₂*-nak. Az N1- α_2 PI fibrinhez való keresztkötése az FXIIIa által nagy szerepet játszik a fibrin fibrinolízissel szembeni védelmében.

Munkánk során az FXIII két alegysége közötti kölcsönhatás biokémiáját, és az FXIII-A₂* N1- α_2 PI N-terminális szakaszának megfelelő dodekapeptid glutamin donor szubsztrátjával (N1- α_2 PI(1–12)) kialakított kölcsönhatását tanulmányoztuk. Felszíni plazmon rezonanciát és ELISA-típusú kötődési vizsgálatot alkalmazva az FXIII alegységek kölcsönhatását jellemző K_d -t 10^{-10} M tartományban állapítottuk meg. A mért K_d érték alapján kiszámítottuk, hogy az FXIII-A₂ kb. 1%-a szabad formában található a plazmában. Ezt az eredményt kísérletesen is megerősítettük a szabad FXIII-A₂ mérésével, miután immundeplécióval a plazmából mind az FXIII-A₂B₂-t mind az FXIII-B₂-t eltávolítottuk. A szabad FXIII-A₂ funkcionálisan intakt, trombinnal és Ca^{2+} -mal aktiválható volt, és aktiváció után a fibrint keresztkötötte. A sokkal alacsonyabb FXIII alegység koncentrációjú cerebrospinális folyadékban és könnyben az FXIII-A₂ több mint 80%-a van szabad formában.

Az N1- α_2 PI(1–12)-t és trunkált vagy szintetikus mutánsait jellemző kinetikai paramétereket spektrofotometriás FXIIIa aktivitás méréssel határoztuk meg. Az N1- α_2 PI(1–12) és az FXIII-A₂* kölcsönhatását proton mágneses magrezonanciával (NMR) és telítés-

átviteli differencia (STD, saturating transfer difference) NMR-rel tanulmányoztuk. A peptidek Asn1-trunkált vagy alaninra cserélt változataival kapott kinetikai eredmények, és az FXIIIA₂*– N1- α_2 PI(1–12) komplex proton NMR analízise egyértelműen mutatták, hogy az Asn1 esszenciális a hatékony enzim-szubsztrát kölcsönhatáshoz. A C-terminálisan trunkált peptidekkel végzett kísérletek igazolták, hogy a 7-12 pozíciójú aminosavak esszenciális szerepet játszanak az N1- α_2 PI(1–12) és az enzim közötti kölcsönhatásban, mely egy másodlagos szubsztrát kötőhely létezésére enged következtetni az FXIII-A₂*-on. Úgy tűnik, hogy a hidrofób reziduumok, elsősorban a Leu10 és a C-terminális Lys12 különösen fontosak ebben a tekintetben. A közvetlen kölcsönhatást a hidrofób C-terminális reziduumok és az FXIII-A₂* között STD NMR technikával bizonyítottuk.

2. Summary

Coagulation factor XIII (FXIII) is a heterotetramer consisting of two catalytic A subunits (FXIII-A₂) and two protective/inhibitory B subunits (FXIII-B₂). FXIII-B, a mosaic protein consisting of ten sushi domains, significantly prolongs the lifespan of catalytic subunits in the circulation and prevents their slow progressive activation in plasmatic conditions. Considering the importance of complex formation between the two FXIII subunits, it is surprising that the biochemistry of their interactions is only superficially explored. So far two values have been reported for the equilibrium dissociation constant (K_d) but calculations based on these values are contradictory to experimental data.

Activated factor XIII (FXIIIa), a dimer of the Ca²⁺ activated truncated A-subunits (FXIII-A₂*), is a transglutaminase that crosslinks primary amines to peptide-bound glutamine residues. Because in the few natural substrates of FXIII-A₂* no consensus sequence could be identified around the reactive glutamine, studying the interaction between individual substrates and FXIII-A₂* is of primary importance. Most of the α_2 plasmin inhibitor (α_2 PI) molecules become truncated by a plasma protease, and the truncated isoform (N1- α_2 PI) is an important substrate of FXIII-A₂*. The crosslinking of N1- α_2 PI to fibrin plays a major role in protecting newly formed fibrin from fibrinolysis. The N-terminal dodecapeptide N1- α_2 PI(1–12) of this molecule is an excellent glutamine donor peptide substrate of FXIIIa.

In this study the biochemistry of the interaction between the two FXIII subunits and the interaction of FXIII-A₂* with N1- α_2 PI(1–12) were investigated. Using surface plasmon resonance technique and an ELISA-type binding assay the K_d for the interaction of FXIII subunits was established in the range of 10⁻¹⁰ M. Based on the measured K_d , it was calculated that in plasma approximately 1% of FXIII-A₂ should be in free form. This value was confirmed experimentally by measuring FXIII-A₂ in plasma samples immuno-depleted of FXIII-A₂B₂ and free FXIII-B₂. Free plasma FXIII-A₂ became functionally active, when activated by thrombin and Ca²⁺, it cross-linked fibrin. In cerebrospinal fluid and tears with much lower FXIII subunit concentrations higher than 80% of FXIII-A₂ existed in free form.

Kinetic parameters for N1- α_2 PI(1–12) and for its truncated or synthetic mutants were determined by a spectrophotometric FXIIIa assay. The interaction of N1- α_2 PI(1–12) with FXIII-A₂* was investigated by proton nuclear magnetic resonance (NMR) and saturating transfer difference (STD) NMR. Kinetic experiments with peptides in which the Asn1 residue was either truncated or replaced by alanine and proton NMR analysis of the FXIIIa₂*–N1- α_2 PI(1–12) complex demonstrated that Asn1 is essential for effective enzyme–substrate interaction. Experiments with C-terminally truncated peptides proved that amino acids 7–12

are essential for the interaction of N1- α_2 PI(1–12) with the enzyme, and suggested the existence of a secondary binding site on FXIII-A₂*. Hydrophobic residues, particularly Leu10, and the C-terminal Lys12 seemed to be especially important in this respect. The direct interaction between hydrophobic C-terminal amino acid side-chains and FXIII-A₂* was demonstrated by STD NMR.

3. Rövidítések jegyzéke

AP-FXIII	XIII-as faktor aktivációs peptid
APCE	antiplasmin cleaving enzyme, antiplazmint hasító enzim
BSA	bovine (szarvasmarha) szérum albumin
cFXIII	celluláris XIII-as faktor
CSF	cerebrospinális folyadék
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, immunológiai módszerrel, enzimhez kötött ellenanyagok segítségével történő meghatározás
FC	flow cell, áramlási cella
FnbA	Staphylococcus aureus-ból származó fibronectin-kötő protein A
FXIII	XIII-as faktor
FXIII-A	XIII-as faktor A alegysége
FXIII-A'	trombin által proteolitikusan hasított XIII-as faktor A alegység
FXIII-A ₂	XIII-as faktor A alegység homodimer
FXIII-A ₂ 'B ₂	trombin által hasított XIII-as faktor tetramer
FXIII-A ₂ *	trombinnal és Ca ²⁺ -mal aktivált A alegység dimer
FXIII-A ₂ B ₂	XIII-as faktor heterotetramer szerkezetű formája
FXIII-A ₂ ^o	nem proteolitikusan aktivált A alegység dimer
FXIII-B	XIII-as faktor B alegysége
FXIIIa	aktív XIII-as faktor
GLDH	glutamát dehidrogenáz
Gly-O-ET	glicin-etil észter
HRPO	horseradish peroxidase, tormaperoxidáz
IA	iodacetamid, jódaacetamid
k _a	asszociációs sebességi állandó
k _{cat}	katalitikus sebességi állandó (átviteli szám)
k _{cat} /K _m	katalitikus hatékonyság
k _d	disszociációs sebességi állandó
K _d	egyensúlyi disszociációs állandó
K _m	Michaelis állandó
M1-α ₂ PI	az α ₂ plazmin inhibitor N-terminálisan metioninnal kezdődő formája
N1-α ₂ PI	az α ₂ plazmin inhibitor N-terminálisan aszparaginnal kezdődő formája
N1-α ₂ PI(1–12)	az N-terminálisan aszparaginnal kezdődő α ₂ plazmin inhibitor N-terminális szekvenciájának megfelelő dodekapeptid

N1- α_2 PI(1–12;XY)	az N-terminálisan aszparaginnal kezdődő α_2 plazmin inhibitor N-terminálisával megegyező szekvenciájú dodekapeptid szintetikus mutánsa (X = aminosav pozíciója a peptidben; Y = aminosav, melyre az eredetit kicseréltük)
NADP ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NAD(P)H	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid(-foszfát)
NMR	nuclear magnetic resonance; mágneses magrezonancia
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy, mag Overhauser effektuson alapuló kétdimenziós NMR spektroszkópia
pFXIII	plazma XIII-as faktor
pFXIII-B ₂	plazma XIII-as faktor B alegység homodimer
rFXIII-A ₂	rekombináns XIII-as faktor A alegység homodimer
rFXIII-B ₂	rekombináns XIII-as faktor B alegység homodimer
SDS-PAGE	sodium dodecil sulphot poliacrilamide gel elektroforesis, nátrium dodecil szulfát gél elektroforézis
SE	standard error, standard hiba
SPR	surface plasmon resonance, felszíni plazmon rezonancia
STD	saturating transfer difference, telítés-átviteli differencia
TAFI	trombin által aktiválható fibrinolízis inhibitor
TOCSY	total correlation spectroscopy, kétdimenziós teljes korrelációs spektroszkópia
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
α_2 PI	α_2 plazmin inhibitor

4. Bevezetés

4.1. A XIII-as faktor szerkezete

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy különleges véralvadási faktor, ugyanis ellentétben a többi zimogén alvadási faktorra nem egy proteolitikus enzim prekursora, hanem egy protranszglutamináz. A véralvadási kaszkád utolsó fázisában trombin és kalcium együttes hatására alakul át aktív formává (FXIIIa). A transzglutaminázokra jellemző, hogy peptid láncokat kötnek keresztbe $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})$ lizil kötésekkel. Az FXIIIa fő feladata a fibrin α - és γ -láncainak keresztkötése, ill. α_2 plazmin inhibitor ($\alpha_2\text{PI}$) kovalens rögzítése a fibrin α -láncához. Ez a mechanizmus esszenciális a hemosztázis fenntartásához; megvédi az újonnan képződött fibrint a keringő vér áramlása által kiváltott nyírófeszültség mechanikai hatásától, és a fibrinolitikus rendszer által okozott degradációtól [1, 2].

A plazma FXIII (pFXIII) egy heterotetramer (FXIII-A₂B₂), mely a két potenciálisan aktív A alegységből (FXIII-A₂) és a két hordozó/gátló B alegységből (FXIII-B₂) áll. A pFXIII molekulatömege 326 kD, plazma koncentrációja 14-28 mg/L [1].

Az enzim aktív centruma a 83 kD-os FXIII-A-ban található, mely négy strukturális doménből (β -szendvics domén, katalitikus központi „core” domén, β -hordó 1 és -2 domének) és a molekula N-terminális végén található 37 aminosavat tartalmazó aktivációs peptidből (AP-FXIII) áll. Az aktív centrum 314-es pozíciójú ciszteinje körül az aminosav szekvencia a transzglutaminázokra jellemző: Gly-Gln-Cys-Trp. Az FXIII-A-ban még további öt szabad –SH csoport található, melyek nem képeznek diszulfid-hidakat.

Az FXIII-A monomerek egy-egy nagyobb affinitású Ca^{2+} kötőhellyel rendelkeznek, melyek egy Ca atom megkötésére képesek [3, 4]. A Ca^{2+} , Sr^{2+} és Yb^{3+} ionokkal kristályosított FXIII-A₂ röntgen szerkezetvizsgálati eredményei szintén egy elsődleges kation kötőhelyet azonosítottak alegységenként [5]. A 0,1 mM K_d értéket egyensúlyi dialízis, ill. intrinsic fluoreszcens vizsgálatokkal állapították meg [3], míg ^{43}Ca NMR titrálással 0,51 mM-os K_d értéket kaptak [4]. Ezek az eredmények felvetik egy alacsony affinitású, másodlagos Ca^{2+} kötőhely létezését. A röntgen krisztallográfia és a Ca^{2+} mutáns FXIII-A₂-höz való kötődési vizsgálatai azonosították, hogy az Asp438, a Glu485 és a Glu490 oldalláncok karboxilált csoportjai csakúgy, mint a gerinc Ala457 karbonil O atomja egy Ca^{2+} kötő zsebet alakít ki [5, 6]. Az Ala457 köti közvetlenül a Ca^{2+} -t. A többi aminosav oldallánc nincs elég közel a direkt kölcsönhatáshoz; ezen molekulák valószínűleg a víz molekulákon keresztül vesznek részt a Ca^{2+} kötésben.

A Ca ionok kötődése az A alegységeken lévő nagy affinitású Ca^{2+} kötőhelyhez

elegendő a trombin által hasított FXIII-A alegységek disszociációjához, és a felszabadult A⁺ dimer aktiválódásához [7, 8]. In vitro a cFXIII trombinnal és Ca²⁺-mal való aktiválódása ugyanúgy zajlik, mint a pFXIII-é, eltekintve az FXIII-B disszociációjától. Extrém magas Ca²⁺ koncentrációnál (≥100 mM) az A₂B₂ komplex képes disszociálni az előzetes proteolitikus hasítás nélkül is, és a nem-trunkált FXIII-A₂ aktív transzglutaminázzá alakul (FXIII-A₂^o) [9, 10]. Az alacsony affinitású Ca²⁺ kötőhelyek telítődése szerepet játszhat ebben a folyamatban. A cFXIII és a pFXIII nem-proteolitikus aktiválódása alapvetően különbözik. A cFXIII esetében az alacsony Ca²⁺ koncentráció elégséges a cFXIII lassú progresszív aktivációjának előidézéséhez fiziológias körülmények között; az ionerő növelésével az aktiváció sebessége nagy mértékben nő [11]. FXIII-B-vel való komplex kialakítása teljesen megszünteti ezt az aktivációs folyamatot [11]. Valószínűsíthető, hogy trombocitákban és monocitákban a cFXIII fiziológias aktivációs mechanizmusa a nem-proteolitikus útvonal [12].

Az FXIII-B szignifikánsan meghosszabbítja a katalitikus alegység élettartamát a keringésben, és megóvjá a plazma körülmények okozta lassú proteolitikus degradációtól. FXIII-B egy mozaik fehérje, mely 10, ún. „sushi” doménből áll. A sushi domének mindegyikét 2-2 diszulfid-híd tartja össze. Ez a 80 kD molekulatömegű glikoprotein 8,5% szénhidrátot tartalmaz. In vivo a pFXIII fibrinogénhez kötve kering, a kötődés Ca²⁺ jelenlététől független. A plazma fibrinogén 15%-át kitevő fibrinogén 2 (γAγ' fibrinogén) γ' lánc az FXIII fő kötőhelye. A kötődés az FXIII-B-n keresztül jön létre [13].

Az FXIII nem csak a plazmában, hanem trombociták és monociták/makrofágok citoplazmájában is előfordul FXIII-A₂ homodimerként (cFXIII) [1, 2].

Az FXIII-A-t csontvelő eredetű sejtek, míg az FXIII-B-t a hepatociták szintetizálják [14-19]. A két típusú alegység plazmában képez komplexet; az FXIII-B feleslegben található, kb. 50%-a szabad formában [19] kering, nagy valószínűséggel dimerként [20, 21]. A komplex képződésnek fontos szerepe van a normál hemosztázis fenntartásában. Az FXIII-B fő feladata az FXIII-A élettartamának meghosszabbítása a keringésben [22]. Az FXIII-B ezen szerepe összefüggésbe hozható az FXIII-A₂ lassú progresszív aktivációjának megakadályozásával, ami FXIII-B hiányban a plazmában bekövetkezne [11]. Az FXIII-B deficiens betegekben az FXIII-A koncentrációja a plazmában szignifikánsan csökkent, és köszönhetően az alacsony FXIII-A₂ szintnek, ezekben a betegekben enyhe vérzés jelentkezik [22-24].

Figyelembe véve az FXIII alegységek közötti komplex kialakulásának fontosságát meglepő, hogy a két alegység kölcsönhatásának biokémiája csak felületesen tanulmányozott. Habár általánosan elfogadott, hogy az FXIII-A a keringésben teljes mennyiségben komplexben található, ez kísérletesen még nem bizonyított. Ez idáig két munkacsoport foglalkozott az A és B alegységek közötti kölcsönhatás erősségének vizsgálatával. Radek és

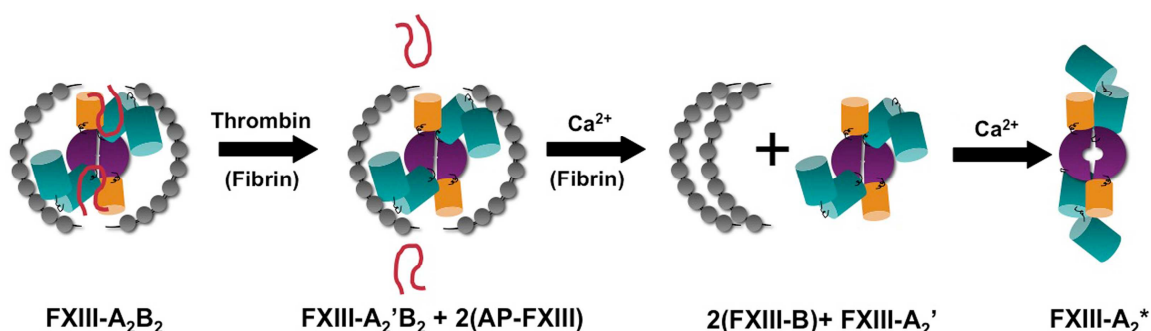
munkatársai [25] ELISA technikával vizsgálták az FXIII alegységeinek kötődési kinetikáját, és 4×10^{-7} M egyensúlyi disszociációs állandót (K_d) állapítottak meg. Komanasin és munkatársai [26] az FXIII-A₂ és két különböző genotípusú FXIII-B₂ (FXIII-B₂-His95 és FXIII-B₂-Arg95) közötti steady-state kötődést tanulmányozták. A kialakult FXIII-A₂B₂ komplex koncentrációját ELISA-val határozták meg. Az FXIII-B His95Arg polimorfizmus mindkét formájára meghatározták a K_d -t, mely a His95 esetén $8,06 \times 10^{-8}$ M, az Arg95 esetén pedig $8,13 \times 10^{-8}$ M-nak adódott. Ezekben a kísérletekben viszonylag magas ($>10^{-8}$ M) FXIII-B koncentrációt alkalmaztak receptorként. Amennyiben a totál receptor koncentrációk lényegesen magasabbak, mint a kalkulált K_d ($[Rt] \gg K_d$), akkor a K_d értéket lényegesen felülmérhetjük [27]. Valójában, ha a fenti két kötődési állandóval és az FXIII-A ill. FXIII-B átlagos plazma koncentrációival számolnánk, akkor a plazma FXIII-A₂ 87% ill. 55%-ának szabad formában kellene lennie, ami nyilvánvalóan nem tükrözi a valóságot. A közelmúltban vezették be a rekombináns FXIII-A₂ (rFXIII-A₂) alkalmazását az FXIII-A deficiens betegek szubsztitúciós terápiájaként [28]. Tény, hogy az rFXIII-A₂ hosszú idejű túlélése (félélet idő 9-14 nap [29-31]) a keringésben nagyban függ az elérhető szabad FXIII-B₂-vel való komplex képződéstől, ami nyomatékosítja az FXIII-A₂B₂ komplex képződés tanulmányozásának fontosságát.

Az kölcsönhatásban résztvevő epitópok sem ismertek jelenleg. Souri és munkatársai olyan rekombináns FXIII-B-t állítottak elő, melyben az 1. (N-terminális) sushi domén hiányzott, s ez a „trunkált” FXIII-B elvesztette FXIII-A₂-t kötő képességét [21]. Bár az epitópot nem azonosították, ennek alapján feltételezhető, hogy a kötődésért felelős epitóp az FXIII-B molekula N-terminális részén van. Az FXIII-A-n lévő, a kötődésért felelős epitóp(ok)ról nincs kísérletes adat.

4.2. A XIII-as faktor aktiválódása, működése

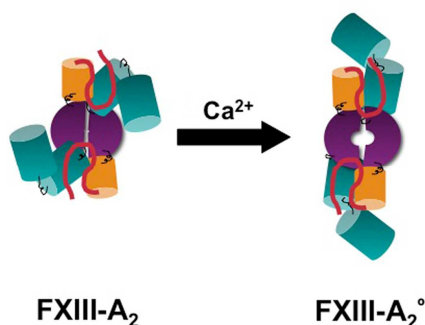
A véralvadási folyamat során a pFXIII egy többlépcsős folyamatban aktív transzglutaminázzá (FXIIIa; protein-glutamine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) alakul trombin és Ca^{2+} hatására (1. ábra). A trombin proteolitikusan lehasítja az AP-FXIII-t az FXIII-A N-terminális végéről, mely egy módosított tetramer szerkezetet eredményez (FXIII-A₂'B₂). Ezt követően Ca^{2+} jelenlétében az FXIII-B alegységek disszociálnak, és a trunkált FXIII-A dimer aktív konformációt vesz fel (FXIII-A₂*), melyben az aktív centrum eredetileg fedett 314-es pozíciójú ciszteinje elérhetővé válik, és reagálni képes az adott szubsztráttal. Polimerizált fibrin jelenlétében igen nagy mértékben (80-100-szorosára) felgyorsul az aktiváció folyamata. Amennyiben jelen van a fibrin, az aktiváció a fibrin polimerek felszínén

megy végbe [1, 32].



1. ábra. A plazma XIII-as faktor (pFXIII) aktivációja trombin és Ca^{2+} hatására. Az FXIII komplex proteolitikus aktivációja során először a trombin lehasítja az aktivációs peptidet (AP-FXIII) az A alegységről (FXIII-A₂'B₂), ezt követően Ca^{2+} jelenlétében a B alegységek disszociálnak, majd a hasított A dimer (FXIII-A₂') enzimatikusan aktív konformációt vesz fel (FXIII-A₂*). A zöld és narancssárga hengerek az FXIII-A β -hordó és β -szendvics doménjeit, a lila félkörök a központi katalitikus domént reprezentálják, az AP-FXIII piros hurokként van jelölve. A 10 gyöngyszerű képletből álló hajlított struktúra az FXIII-B-t ábrázolja. Az ábra az [1] referencia komplex ábrájának egy részlete.

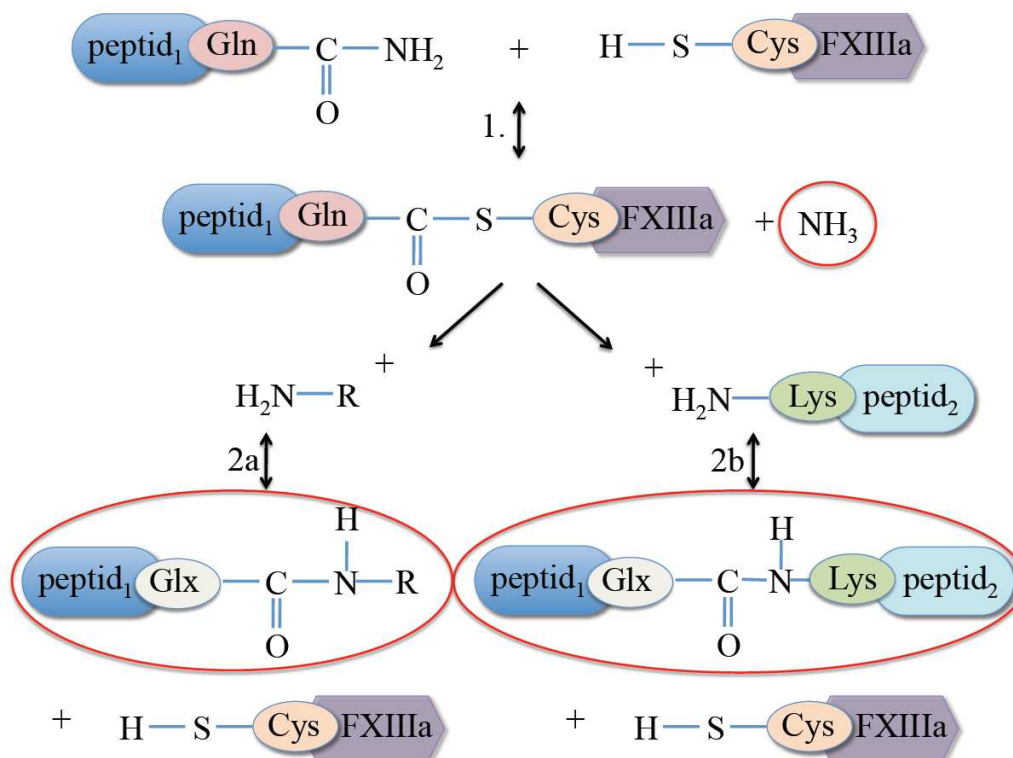
A cFXIII aktivációja fiziológiásan nem-proteolitikus aktiváció révén zajlik (2. ábra). Az aktiváció során - az FXIII-B hiányában - az FXIII-A₂ Ca^{2+} jelenlétében struktúrális változáson megy keresztül és enzimatikusan aktív konformációt vesz fel (FXIII-A₂^o).



2. ábra. A celluláris XIII-as faktor (cFXIII) nem-proteolitikus aktivációja Ca^{2+} hatására. Az FXIII intracelluláris aktivációjához nincs szükség proteolitikus hasításra; az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése elegendő ahhoz, hogy az FXIII-A₂ aktív konfigurációt vegyen fel (FXIII-A₂^o). A zöld és narancssárga hengerek az FXIII-A β -hordó és β -szendvics doménjeit, a lila félkörök a központi katalitikus domént reprezentálják, az AP-FXIII piros hurokként van jelölve. Az ábra a [1] referencia komplex ábrájának egy részlete.

Van olyan közlés is, mely szerint Ca^{2+} jelenlétében a zimogén pFXIII egy alacsony hatásfokú, ún. innate aktivitással bír és képes keresztkötni a fiziológiás szubsztrátjait a fibrinogént, a fibrint és az $\alpha_2\text{PI}$ -t [33, 34].

Kémiaailag az FXIIIa egy módosított két lépéses acil transzfer (transzglutamináz) reakciót katalizál [35-37], melyben egy peptid kötésben lévő glutamin karboxamid csoportja az acil donor és egy primer amin az acil akceptor. Az első lépésben a peptid kötésben lévő glutamin egy tioészter kötésen keresztül az aktív centrum ciszteinjéhez kötődik, és ammónia szabadul fel. Ezt követően egy alkalmas elsődleges amin szubsztrát jelenlétében az acil csoport az acil enzim közvetítésével az acil akceptor aminra kerül át. Az amin izopeptid kötésen keresztül kovalensen kötődik a γ -glutamil oldallánchoz. Fiziológiás körülmények között az elsődleges amin szubsztrát a peptid kötésben lévő lizin oldallancának ϵ -amino csoportja, és az FXIIIa által katalizált reakció végeredménye a peptid láncok $\epsilon(\gamma$ -glutamil)lizil-en keresztül történő keresztkötése. A transzglutamináz reakció 3. ábrán látható egyszerűsített sémáját összefoglaló cikkünkben közöltük [38]. A felszabaduló ammónia, a jelölt amin inkorporációja egy fehérjébe, ill. a keresztkötött termék (az ábrán piros ellipszisekkel jelölve) meghatározása mind alkalmas az FXIII aktivitásának mérésére.



3. ábra. Az aktivált FXIII (FXIIIa) által katalizált transzglutamináz reakció sematikus ábrázolása [38]. A különböző FXIII tesztek a piros színnel bekarikázott termékek meghatározásán alapszanak.

4.3. A XIII-as faktor szubsztrátjai

Az FXIIIa elsődleges fiziológiás szubsztrátjai a fibrin α - és γ -láncok, az α_2 PI és a

fibronektin [35, 36]. A fibrin láncok keresztkötésével és az α_2 PI fibrinhez való kovalens rögzítésével a fibrin alvadék mechanikai erősítése és a fibrinolitikus rendszer általi gyors proteolitikus lebontásától való védelme valósul meg.

A metionin reziduummal kezdődő 464 aminosavból felépülő α_2 PI-t (M1- α_2 PI) a hepatociták termelik [39]. Egy plazma proteáz (APCE, antiplasmin cleaving enzyme) egy dodekapeptidet távolít el a fehérje N-terminális végéről, így az α_2 PI körülbelül 70%-a kering 12 aminosavval megrövidített, aszparaginnal kezdődő izoformaként (N1- α_2 PI) [40]. Kizárólag az utóbb említett trunkált izoforma hatékony acildonor szubsztrát az FXIIIa által katalizált keresztkötési reakcióban [41, 42]. Ezenkívül több más fehérjéről bizonyosodott be, hogy szubsztrát glutamin oldallánccal járul hozzá az FXIIIa által katalizált transzglutamináz reakcióhoz. Amint azt a közleményünkben szereplő összefoglaló 1. táblázat mutatja [43], néhány esetben az acil donor glutamint és a környezetében lévő aminosavakat sikeresen azonosították a fehérje elsődleges szerkezetében [44-53]. Az elsődleges struktúrák összehasonlításából azonban nem vonható le általános konklúzió az FXIIIa szubsztrát specificitását illetően. Nincs egyértelmű konszenzus szekvencia a szubsztrát glutamin körül, ezért különösen fontos fényt deríteni azon szerkezeti követelményekre, melyek az adott aminosav sorrendet alkalmassá teszik, hogy individuális peptid szubsztrátként kötődjön az FXIIIa-hoz. Több tanulmány vizsgálta a béta-kazein [54-56] és az N1- α_2 PI [55, 56] reaktív glutaminja körüli szekvenciát tartalmazó szintetikus oligopeptidek felhasználásával az FXIIIa szubsztrátokkal történő kötődési mechanizmusát.

1. táblázat. Az elsődleges acil donor glutamin körüli szekvenciák összehasonlítása az FXIIIa szubsztrát fehérjékben/peptidekben.

Fehérje/peptid szekvenciája	Fehérje/peptid
N-Q ₂ -E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K-	N1- α_2 PI [44]
-S-Q ₁₆₇ -S-K-V-L-P-V-P-Q-K-A-	β kazein [45]
-G-Q ₅ -S-K-V-I-G	K9 peptid [46]
-Q-Q ₃₉₉ -H-H-L-G-G-A-K-Q-A-G-	γ -lánc fibrin(ogén) [47]
-S-Q ₂₂₁ -L-Q-K-V-P-P-E-W-K-A-	α -lánc fibrin(ogén) [48]
-P-Q ₂₃₇ -M-R-M-E-L-E-R-P-G-G-	α -lánc fibrin(ogén) [48]
-N-Q ₃₂₈ -N-P-G-S-P-R-P-G-S-T-	α -lánc fibrin(ogén) [49]
-G-Q ₃₆₆ -W-H-S-E-S-G-S-F-R-P-	α -lánc fibrin(ogén) [49]
-A-Q ₃ -Q-I-V-Q-P-Q-S-P-L-T-	Fibronektin [50]
-E-Q ₉₃ -T-P-V-L-P-E-E-E-A-P-	Vitronektin [51]
-S-Q ₂₉₂ -H-I-V-F-P-Y-S-Y-T-R-	TAFI [52]
-D-Q ₁₀₃ -R-Q-V-D-L-I-P-K-K-A-	FnbA [53]

Az elsődleges reaktív acil donor glutamin pozíciót félkövér dőlt karakterrel emeltük ki. A γ lánc fibrin(ogén)ben, egy második glutamint is megjelöltünk; N1- α_2 PI: az α_2 PI N1 izoformája; A K9 egy, a β kazein szekvenciáját utánzó szintetikus FXIIIa szubsztrát oligopeptid; TAFI, trombin-aktiválható fibrinolízis inhibitor; FnbA, Staphylococcus aureus-ból származó fibronektin-kötő protein A.

4.4. A XIII-as faktor aktivitás meghatározásának lehetőségei

A klinikai gyakorlatban és a klinikai kutatásban két okból kifolyólag indokolt az FXIII meghatározása: 1/ az FXIII-hiány diagnosztikája, és a deficiens betegek FXIII szubsztitúciójának monitorozása céljából; 2/ trombotikus betegség kialakulásának megnövekedett kockázata vizsgálata céljából, ugyanis bizonyos körülmények között az emelkedett FXIII szint jelezheti egy trombotikus esemény bekövetkeztének veszélyét [57].

A nem-szubsztituált betegekben az FXIII-A hiány súlyos haemorrhagiás diathesis-t jelent, a relatíve gyakori intracraniális vérzés miatt nem ritkán fatális kimenetellel. Összefoglaló tanulmányunk [37] átfogó, kritikai értékelést nyújt az FXIII aktivitás plazmában történő meghatározására alkalmas módszerekről, forgalomban lévő tesztekéről. A tradicionális, alvadék oldhatóságon alapuló tesztek használata nem javasolt az FXIII deficiencia szűrésére. Az első vonalbeli (szűrő) vizsgálatnak funkcionális kvantitatív FXIII aktivitás tesztnek kell

lennie. Ezen módszerek két elven alapulnak: 1/ jelölt aminoszubsztrát fehérje glutaminjába történő, FXIIIa által katalizált inkorporációjának mérésén, 2/ egy peptidkötésben lévő glutaminból FXIIIa által katalizált transzglutamináz reakcióban felszabaduló ammónia NAD(P)H függő glutamát dehidrogenáz (GIDH) indikátor reakcióban való monitorozásán. Az inkorporációs tesztek igen érzékenyek, de időigényesek, nehezen standardizálhatóak, és nem automatizálhatóak. Az ammónia felszabaduláson alapuló tesztek kevésbé érzékenyek, ám gyorsak, jól standardizálhatóak és automatizálhatóak. Mivel kísérleteinkben ez utóbbi elven alapuló FXIII aktivitás meghatározást használtuk, ezért ennek háttérét az alábbiakban részletezem.

Ammónia felszabaduláson alapuló FXIII aktivitást meghatározó tesztek

1969-ben publikálták az első FXIII tesztet, melyet az FXIIIa általi, glutamin donor fehérje szubsztrátjából felszabaduló ammónia mérésére használtak [58]. Ebben az esetben az ammóniát rekalcifikált, megalvasztott plazmában határozták meg. Más korábbi módszerek ammónia szelektív elektróddal [59], vagy módosított Berthelot reakcióval [60] detektálták az ammónia kialakulását plazmában ill. fibrinogénnel kiegészített plazmában. Ezek a végpontos mérések nehezen kivitelezhetőek voltak és nagy mennyiségű plazmát igényeltek. A keletkezett ammónia monitorozásához GIDH-t használó első tesztet 1985-ben intézetünkben fejlesztették ki [61]. Ez az elv tette lehetővé az első valódi kinetikus FXIII meghatározást. Ebben a mérésben a fibrinogént bentonitos kezeléssel eltávolították. A reakció lag fázisa alatt történt meg az FXIII aktiválása trombinnal és Ca^{2+} -mal. Az FXIIIa keresztkötötte az aminoszubsztrátot (etilamin) az acetilált, defoszforilált β -kazein egyedüli glutamin oldalláncához, a reakció az ammónia felszabadulással járt. Az ammónia felszabadulás folyamatosan monitorozható volt a GIDH-mediálta indikátor reakcióban, melyben a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfáttá (NADP^+) alakult, így a 340 nm-en mért abszorbancia csökkenése mérhető volt. A fenti elvet két kinetikus ammónia felszabadulás mérésén alapuló teszt fejlesztésében is felhasználták [46, 62]. Az új, módosított tesztekben a fibrin polimerizációt gátló peptideket használtak a fibrin alvadék kialakulásának a gátlására, az acil donor fehérje szubsztrátot glutamin tartalmú oligopeptidekre cserélték, aminoszubsztrátként és glicin-etil észtert használtak (2. táblázat). Mindkét módosított teszt kereskedelmi forgalomban elérhető. A Fickenscher és mtsai által módosított tesztet [46] "Berichrom FXIII" néven a Siemens cég (Marburg, Németország) forgalmazza. A "REA-chrom FXIII" (Reanal-ker, Budapest, Magyarország), ill. "TECHNOCHROM FXIII" (Technoclone, Bécs, Ausztria) néven forgalomba hozott tesztek Kárpáti és mtsai módszerén alapulnak [62]. E tesztek széles körben használják az FXIII

deficiencia szűrésére. Egyik tesztet sem befolyásolja az FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa [46, 62, 63]. Berichrom és a TECHNOCHROM tesztek a 2. táblázatban hasonlítottuk össze (a REA-chrom teszt teljes mértékben megegyezik a TECHNOCHROM teszttel). A két teszt különböző glutamin tartalmú oligopeptideket alkalmaz szubsztrátként; a Berichrom tesztben használt dekapeptid aminosav szekvenciája hasonló a β -kazein szubsztrát glutamin körüli szekvenciájához, míg a TECHNOCHROM (és REA-chrom) kitben használt dodekapeptid szekvenciája azonos az N1- α_2 PI N-terminális szekvenciájával. A Berichrom tesztben NADH-t, a TECHNOCHROM tesztben NADPH-t használnak az indikátor reakcióban.

2. táblázat. Kereskedelmi forgalomban lévő ammónia felszabadulás mérésén alapuló (kromogén) FXIII aktivitás tesztek.

	Berichrom FXIII	TECHNOCHROME FXIII
	Siemens, Marburg, Németország	Technoclone, Bécs, Ausztria
Fibrin polimerizációs inhibitor peptid	G-P-R-P-A	G-P-R-P
FXIII aktivátor	Trombin + Ca ²⁺	Trombin + Ca ²⁺
Acil donor Q-peptid	L-G-P-G-Q-S-K-V-I-G	N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K
Acil akceptor aminosav	Gly-O-ET	Gly-O-ET
Indikátor reakció	GLDH NADH-val	GLDH NADPH-val
Plazma vak reagens a kitben	Nem tartalmazza	Tartalmazza
Plazma reagens térfogat arány	1:10	1:10

A Berichrom kitben lévő peptid aminosav szekvenciája néhány helyen módosítva, megfelel a β -kazein szubsztrát glutamin reziduum körüli szekvenciájának. A TECHNOCHROM kitben található szubsztrát megfelel az FXIIIa szubsztrát N1- α_2 PI N-terminális szekvenciájának [64]. Gly-O-ET, glicin-etil észter. GLDH, glutamát dehidrogenáz. NADPH, redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát.

5. Célkitűzés

Kutatásunkban az FXIII kölcsönhatásait különböző aspektusokból vizsgáltuk. Célul tűztük ki az FXIII alegységek egymással való kölcsönhatásának, és az FXIIIa glutamin tartalmú szubsztrátokkal kialakított kölcsönhatásának tanulmányozását.

1. Korábban két munkacsoport eltérő eredményeket publikált az FXIII-A₂B₂ komplex képződési kinetikáját illetően, melynek oka feltehetően a kevésbé adekvát módszerek alkalmazása volt. Ezért a fehérjék közötti kölcsönhatás jellemzésére kiválóan alkalmas felszíni plazmon rezonancia (SPR, surface plasmon resonance) technikával szándékoztuk tanulmányozni az alegységek kölcsönhatását, és tisztázni az eddig közölt kinetikai paraméterekből adódó ellentmondásokat. Emellett a kötődési vizsgálatokhoz adekvát alacsony FXIII alegység koncentrációknál egy igen érzékeny ELISA típusú kötődési assay-vel is meg kívántuk határozni a kölcsönhatás kinetikai paramétereit és a két módszerrel kapott értékeket össze kívántuk hasonlítani.

2. A fenti két módszerrel meghatározott kinetikai paraméterek felhasználásával célunk volt a plazmában esetlegesen szabadon keringő FXIII-A₂ mennyiségének kalkulálása és amennyiben az eredmények szabad FXIII-A₂ jelenlétére utalnak, annak kísérletes bizonyítása.

3. Mivel élettani szempontból az N1- α_2 PI FXIIIa által történő fibrinhez való keresztkötése igen nagy jelentőséggel bír, célul tűztük ki az FXIIIa és az N1- α_2 PI N-terminális végének megfelelő dodekapeptid (N1- α_2 PI(1-12)) közötti kölcsönhatás molekuláris mechanizmusának tanulmányozását. Ezen belül: a) kinetikus mérésekben tanulmányozni kívántuk a dodekapeptid szintetikus mutánsainak, ill. trunkált változatainak a hatását az FXIIIa aktivitásra b) proton NMR és telítés-átviteli differencia (STD, saturation transfer difference) NMR technikával identifikálni kívántuk azokat az aminosav oldalláncokat az N1- α_2 PI(1-12) szubsztrátban, melyek fiziológiás pH-n kölcsönhatásba lépnek az FXIIIa-val.

6. Anyagok és módszerek

6.1. Az FXIII alegységek kölcsönhatásának vizsgálatánál alkalmazott anyagok és módszerek

6.1.1 Anyagok

A humán trombint, a hirudint, a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) szubsztrátot, a szarvasmarha szérum albumin (BSA) V frakcióját, a tormaperoxidáz (HRPO, horseradish peroxidase) VI-os típusát, a biotinamido-hexánsav hidrazidot a kecske anti-egér immunoglobulin G-t (IgG) (Fc specifikus) és a tripszint a Sigma Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) rendeltük. A Batroxobin moojeni a Pentapharm-tól (Basel, Svájc) származik. A birka anti-humán FXIII-A poliklonális antitestet az Affinity Biologicals-tól (Ancaster, Kanada), a nyúl anti-humán FXIII-B poliklonális antitestet a Calbiochem-től (La Jolla, Kalifornia, USA) szereztük be. A Vectastain ABC reagens gyártója a Vector (Burlingame, CA, USA). A HRPO-val konjugált anti-nyúl IgG-t a Jackson Immunoresearch Laboratories-től (Westgrove, PA, USA) rendeltük. A streptavidinnel fedett mikrolemezeket a Thermo Fisher Scientific-től (Vantaa, Finnország) vásároltuk. A BALB/c egerekben termelt monoklonális anti-FXIII-A and anti-FXIII-B antitesteket intézetünkben Katona Éva kollégám állította elő. Az IgG-t ascitesből szeparáltuk affinitás kromatográfiával protein G Sepharose oszlopon (GE Healthcare, Uppsala, Svédország). A kötődési vizsgálatokhoz az, anti-FXIII-B IgG-t a szénhidrát oldalláncain biotinamido-hexánsav hidrazid reagenssel biotináltuk [65]. A CNBr-aktivált Sepharose 4B gél és a CM5 szenzor chippek a GE Healthcare-től származnak.

6.1.2 FXIII preparátumok és FXIII antigén meghatározások

A tisztított humán pFXIII-at [10] és a plazma FXIII-B₂-t (pFXIII-B₂) egészséges véradóktól gyűjtött humán plazmából állítottuk elő [66, 67]. A cFXIII-t humán placentából preparáltuk [11]. Az rFXIII-A₂ Dr. Eva H.N. Olsen, (Novo Nordisk, Måløv, Dánia) nagylelkű ajándéka volt. A Zedira-tól (Darmstadt, Németország) beszerzett rekombináns FXIII-B₂-t (rFXIII-B₂) rovarsejtekben állították elő. Az FXIII-A₂B₂ és FXIII-A₂ antigén koncentrációk meghatározását a korábban leírtak alapján végeztük el [68, 69].

6.1.3 Felszíni plazmon rezonancia vizsgálatok

A felszíni plazmon rezonancia jelenségén alapuló mérés technika különböző biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas. A két alegység komplex képződésének kinetikáját SPR technikával korábban még nem vizsgálták. A módszer előnye más interakciót vizsgáló módszerekkel szemben, hogy a kölcsönhatások vizsgálata valós időben, jelöletlen molekulákkal történik. Az egyik legismertebb és legelterjedtebb SPR technikát alkalmazó rendszer a Biacore. A felszíni plazmon rezonancia vizsgálatokat az intézetünkben rendelkezésre álló Biacore X készülékkel (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) végeztük el. Az "amine coupling protocol" szerint 100 µg/mL pFXIII-B₂-t vagy rFXIII-B₂-t immobilizáltunk CM5 típusú szenzor chip 2-es áramlási cellájára (FC2 - flow cell 2). A kontrollként használt 1-es áramlási cellát (FC1 - flow cell 1) bovin szérum albuminnal (BSA-val) fedtük le. Az alegységek kölcsönhatásának vizsgálatához analitként különböző koncentrációjú cFXIII-A₂-t vagy rFXIII-A₂-t alkalmaztunk 150 mM NaCl-ot, 3 mM EDTA-t és 0,005% v/v surfactant-t tartalmazó 10 mM-os HEPES pufferben (pH 7,4). A kölcsönhatások tanulmányozásához 10 µL/min-es, míg a regeneráláshoz 4 µL/min-es áramlási sebességet állítottunk be. Az asszociációs sebességi konstans (k_a), a disszociációs sebességi konstans (k_d) és a K_d -t Biaevaluation szoftver (GE Healthcare) segítségével kalkuláltuk.

Mivel a gyártó által ajánlott regeneráló oldatok egyike sem volt képes a bekötődött analitok (cFXIII-A vagy rFXIII-A) maradéktalan eltávolítására, ezért az ajánlásoktól eltérve a regenerálásokat minden esetben 50 U/mL trombin-t, 250 mM CaCl₂-t, 10 mM HEPES-t, 150 mM NaCl-ot, és 0,005% v/v surfactant-t tartalmazó oldattal (pH: 7.4) végeztük el. Ebben a rendszerben az aktivációs peptid trombin által történő eltávolítást követően a kötött FXIII-A disszociál a szenzor chip-hez kötött FXIII-B-ről.

6.1.4 ELISA-típusú kötődési vizsgálatok

A különböző koncentrációjú cFXIII-A₂-t vagy rFXIII-A₂-t 0.25 nM FXIII-B₂-vel inkubáltuk együtt 1 órán keresztül 23 °C-on. Eközben 100 µL biotinált monoklonális anti-FXIII-B antitestet (1 µg/mL) mértünk egy streptavidinnel fedett mikrotiter lemez vályúiba. 30 perc inkubáció után a nem-kötődött biotinált antitesteket mosással távolítottuk el. Ezt követően 100 µL, a kialakult komplexet tartalmazó inkubációs keveréket vittük át a vályúba és egy órán át inkubáltuk. Alapos mosást követően a kialakult komplex mennyiségét HRPO-val (horseradish peroxidase, tormaperoxidáz) jelzett anti-FXIII-A antitest és TMB szubsztrát felhasználásával határoztuk meg. A kialakult komplex koncentrációját az FXIII-A₂B₂ standard görbéje segítségével állapítottuk meg. A K_d kiszámításához a GraphPad (San Diego, CA) Prism Software, Version 5.0-t használtuk.

6.1.4.1 A testfolyadékokban keringő szabad FXIII-A₂ mennyiségének kiszámítása
 Az alábbi képlet [27] felhasználásával kalkuláltuk a szabad FXIII-A₂ mennyiségét:

$$[RL] = \frac{([R] + [L] + K_d) - \sqrt{([R] + [L] + K_d)^2 - 4[R][L]}}{2}$$

[R]: a receptor koncentrációja [totál FXIII-B₂]

[L]: a ligand koncentrációja [totál FXIII-A₂]

[RL]: a komplex koncentrációja [totál FXIII-A₂B₂]

A plazma totál FXIII-B₂ és a totál FXIII-A₂ koncentrációját 35 egészséges önkéntes plazmájából meghatározott koncentrációik átlaga jelentette [69]. A cerebrospinális folyadék (CSF) és könny esetében az intézetünkben már korábban meghatározott átlag, ill. medián koncentrációkat használtuk a számításokhoz [70, 71].

6.1.4.2 A testfolyadékokban keringő szabad FXIII-A₂ mennyiségének mérése

11 egészséges egyéntől származó citráttal alvadásgátolt plazma mintákból Sepharose 4B oszlophoz kovalensen kötött monoklonális anti-FXIII-B antitest felhasználásával immunabszorpcióval eltávolítottuk az FXIII-A₂B₂-t és a szabad FXIII-B-t. Az immundepletált plazma mintákban nem volt kimutatható FXIII-A₂B₂, ami bizonyította, hogy a komplexben lévő FXIII-A₂ maradéktalan eltávolítása sikeres volt. Ezt követően a plazma mintákból meghatároztuk a szabad FXIII-A₂ koncentrációját. A CSF és a könny esetében a szabad FXIII-A₂ koncentráció megfelel a totál FXIII-A₂ és a komplexben lévő FXIII-A₂ koncentrációk közötti különbségnek.

6.1.5 Az FXIII-A₂B₂ komplex plazmából való eltávolítása után maradt szabad FXIII-A₂ funkcionális aktivitásának vizsgálata

Az immundepláció után a plazmában maradt szabad FXIII-A₂ fibrin keresztkötő aktivitását vizsgáltuk meg. A plazma mintákat 2 U/mL trombinnal és 10 mM CaCl₂-dal alvasztottuk 2 mM jódetamid jelenlétében és hiányában 37 °C-on, 60 percig. Alapos fiziológiás NaCl-dal történő mosást követően a kinyert alvadékokat feloldottuk redukáló SDS-PAGE minta pufferben, és SDS-PAGE segítségével analizáltuk. Az egyes kísérletekben a trombint batroxobin moojeni-vel (11 U/mL) helyettesítettük, mely egy trombinhoz hasonló kígyóméreg proteáz. A batroxobin moojeni a fibrinogen Aα-láncáról képes lehasítani a fibrinopeptid A-t, így megalvasztani a fibrinogént, de nem aktiválja az FXIII-A₂-t. Ez esetben

a plazmában a koagulációs kaszkád Ca^{2+} általi aktiválódása eredményeként keletkezett trombint 10 U/mL hirudinnal gátoltuk.

6.2 Az FXIII és szubsztrátjai kölcsönhatásának vizsgálatánál alkalmazott anyagok és módszerek

6.2.1 Fehérjék és reagensek

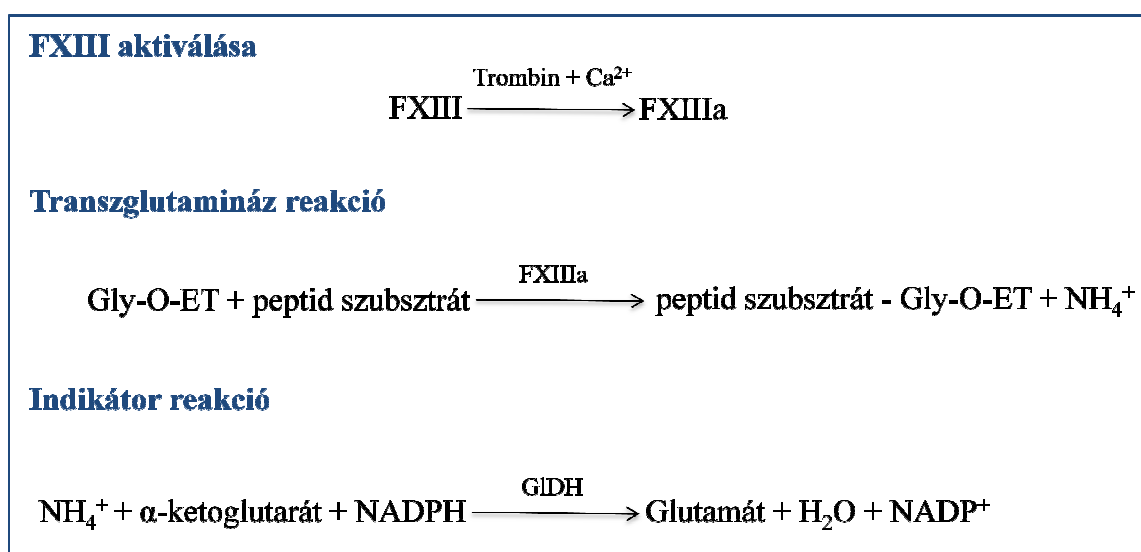
Az ezen kísérletekhez használt tisztított plazma FXIII [10] és a szarvasmarha trombin [72, 73] preparálása intézetünkben történt. A szarvasmarha máj glutamát dehidrogenázt és a NADPH-t a Roche-tól (Meylan, France) vásároltuk. Az ADP-t, az α -ketoglutarátot, a glicin-etil észtert, a ditiotreitolt, a HEPES-t és a jódcetamidot a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) gyártotta. Az N,N-diciklohexilkarbodiimid, az 1-hidroxibenzotriazol hidrát, az Fmoc-O-t-butyl-L-szerin, az Fmoc-O-t-butyl-L-treonin, az N α -Fmoc-N ϵ -Boc-L-lizin, az Fmoc-L-alanin és a Wang gyanta a Fluka-tól (Sigma-Aldrich Group), az Fmoc-L-prolin, az Fmoc-L-valin, az Fmoc-L-leucin és az Fmoc-L-glutamát-5-t-butyl észter a REANAL-Ker Kft-től (Budapest), az N α -Fmoc-N δ -trityl-L-glutamin és az N α -Fmoc-N γ -trityl-L-asparagin a Novabiochem-től (Darmstadt, Germany) származnak. Az N1- α_2 PI(1–12) dodekapeptidet, és 19 szintetikus mutánsát (3. táblázat) Merrifield-féle szilárd fázisú szintézissel állítottuk elő [74]. A minimum 95%-osra becsült peptidek tisztaságának vizsgálatát analitikai reverz fázisú HPLC-vel állapítottuk meg. A peptidek molekulatömegének meghatározása Voyager DESTROMATRIX-segített lézer deszorpció/ionizáció repülési idő (MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) analizátorral (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) történt.

6.2.2 Kinetikus FXIIIa tesztek

A tisztított plazma FXIII aktiválása és az FXIIIa aktivitásának meghatározása a korábban az intézetünkben kifejlesztett egy lépéses UV kinetikai teszttel [62] történt, a méréseket Cobas Mira (Roche, Meylan, France) analizátorral végeztük. A módszer az FXIIIa hatására felszabaduló ammónia enzimatis, kinetikus spektrofotometriás mérésén alapszik (5. ábra). Az FXIII trombin és Ca^{2+} hatására aktiválódik. Az aktív transzglutamináz FXIIIa az aminoszubsztrát glicin-etilészter (Gly-O-ET) és a specifikus glutamin donor N1 α_2 PI(1-12) peptid szubsztrát izopeptid kötéssel történő összekapcsolódását katalizálja. A reakció során ammónia szabadul fel. A keletkezett ammónia mennyiségét GLDH által katalizált, $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ átalakulással járó indikátor reakcióban fotometriásan mérjük. A NADPH fogyásának

sebessége, azaz 340 nm-en mért abszorbanáciájának csökkenése arányos az FXIII aktivitással (4. ábra). A $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ a mérés 5-10 percében lineáris. Az első 5 percben (lag fázis) történik meg az endogén ammónia konszumpciója és az FXIII aktiválása.

A keverék (assay mixture) tartalmazott 7 nM FXIII-t, 20 U/mL marha trombint, 10 mM CaCl_2 -t, 0,1 mM DTT-t, 5 mM Gly-O-ET-t, 0,35 mM NADPH-t, 20 U/mL GlDH-t, 0,6 mM ADP-t, 7 mM ketoglutarátot, 5.4 mg/mL BSA-t (bovine serum albumin) és különböző mennyiségű peptid szubsztrátokat 60 mM HEPES pufferben (pH 7,7). Minden mérést legalább duplikátumban végeztünk el, a kapott értékeket átlagoltuk, és k_{cat} , K_m ill. k_{cat}/K_m paramétereket kalkuláltunk GRAFIT version 6 adatelemző szoftver (Erithacus Software, Horley, UK) használatával.



5. ábra. A kinetikus FXIII meghatározás elve [62]. Az FXIII trombin és Ca^{2+} együttes hatására aktiválódik, majd ezt követően az aktív FXIII (FXIIIa) a glicin-etil észter (Gly-O-ET) és peptid szubsztrát összekapcsolódását katalizálja, mely során felszabaduló NH_4^+ α -ketoglutaráttal való reakcióját a GlDH katalizálja. A GlDH reakció NADPH függő. A NADPH fogyása arányos az FXIII aktivitással.

6.2.3 NMR vizsgálatok

Az NMR spektroszkópia napjaink egyik legelterjedtebb, a természettudományok minden területén nélkülözhetetlen, rendkívül sokoldalúan alkalmazható, hihetetlen gyorsasággal fejlődő és terjedő hatékony szerkezetkutató módszere. A fehérjék szerkezetének és működésének megértése alapvető fontosságú a biológia és az orvostudomány számára. Az NMR spektroszkópia azon ritka kísérleti módszerek egyike, mely a molekuláris kölcsönhatásoknak mind a szerkezeti, mind a dinamikai aspektusát képes

megvilágítani. A módszer további előnye, hogy az így nyert atomi szintű információ makroszkópicusan mérhető termodinamikai és kinetikai paraméterekkel hozható összefüggésbe.

Az NMR kísérleteket Bruker Avance DRX 500 (^1H frekvencia 500 MHz) spektrométeren végeztük 5 mm-es multinukleáris (BBI) z-gradiens mérőfej alkalmazásával a vizsgált peptid vizes oldatán ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 9:1 v/v). A kétdimenziós (2D) teljes korrelációs (TOCSY) és a mag Overhauser (NOESY) kísérleteknél az intenzív vízjel elnyomására hatékony szekvenciát alkalmaztunk, megfelelő víz-szelektív ('water flip-back') és térgradiens impulzusok kombinációjával [75].

500 μL 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O 22 mM borát pufferben 2 mM $\text{N1-}\alpha_2\text{PI}(1-12)$ vagy $\text{N1-}\alpha_2\text{PI}(1-12;2\text{E})$ 500 MHz-es ^1H -NMR spektrumait vizsgáltuk 10 μM FXIIIa jelenlétében és hiányában, 310 K (pH 7.4) vagy 290 K (pH 5.5) hőmérsékleteken.

A mérések előtt az FXIII-t 40 U/mL trombinnal és 10 mM CaCl_2 -dal aktiváltuk 20 percen keresztül; az aktivációs idő további növelése nem eredményezte az FXIII aktivitás emelkedését, az FXIII-t teljesen aktiváltnak tekintettük.

A telítés-átviteli differencia (Saturation Transfer Difference, STD) spektroszkópia a kis affinitású, azaz gyengén kötődő ligandumok fehérjével alkotott komplexeiről ad információt. Ha a ligandum gyengén kötődik a fehérjéhez, akkor a ligandum kötött- és szabad formája gyors cserében van. Ilyenkor az ^1H NMR spektrumban a ligandumhoz egy jelsorozat tartozik [76]. Az STD mérésnél a fehérje proton-átmeneteit szelektíven besugározzuk (telítjük). Gyenge kölcsönhatás esetén a gyors csere miatt a telítés hatása áterjed a szabad ligandum molekulákra, és azok proton-jelének intenzitása csökkenését eredményezi. Minél közelebb kerül a ligandum a fehérje kötőhelyéhez, illetve az ott lévő H-atomokhoz, annál erősebb lesz az effektus. A jelintenzitás változását differencia kísérlettel mérjük. Ehhez két kísérletet kell végezni: az egyikben a fehérjét szelektíven besugározzuk, a másikban nem. Az utóbbi kísérlet adja a referencia spektrumot, a ligandumok proton-jelének referencia intenzitását. A két kísérlet eredményeként kapott spektrumok különbsége a telítés átviteli differencia, azaz STD-spektrum. Az STD spektrumban csak akkor van jel, ha a ligandum kötődik a fehérjéhez. A ligandum azon atomjai, ill. csoportjai, amelyek közelebb kerülnek a fehérje kötőhelyéhez, nagyobb STD effektust mutatnak.

Az STD ^1H -NMR spektrumokat [76] 10 μM FXIIIa-n és 20 mM $\text{N1-}\alpha_2\text{PI}(1-12)$ peptiden vettük fel pH 7,4-en és 310 K-en, a fehérje metil rezonancia-jelét (0 ppm-nél, 'on-resonance') 2 másodpercig szelektíven besugározva. A referencia kísérletnél a besugárzás frekvenciáját -15 000 Hz-re ('off-resonance') állítottuk. A fehérje szelektív telítését Gauss-impulzusok sorozatával (40 darab 50 ms-os Gauss-impulzus, köztük 1 ms-os várakozási idő)

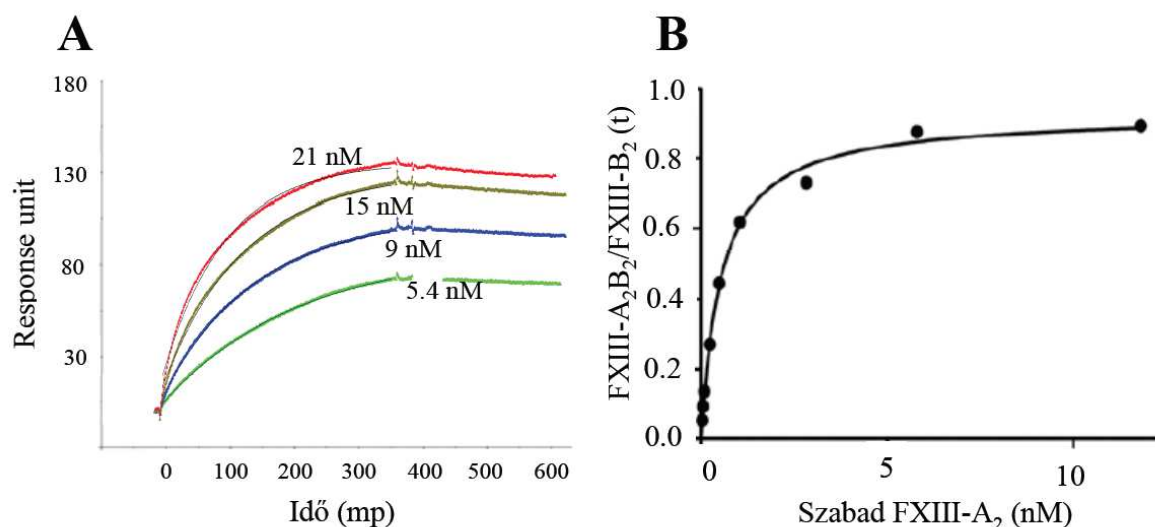
értük el. Az STD ^1H -NMR spektrumokat 30 perces intervallumokban rögzítettük. Az N1- $\alpha_2\text{PI}(1-12)$ peptid teljes ^1H NMR jelhozzárendelését a két dimenziós TOCSY és NOESY kísérleteken alapuló Wütrich-féle stratégiát alkalmazva végeztük el [77].

7. Eredmények

7.1 Az FXIII alegységek kölcsönhatásának vizsgálata

7.1.1 Az FXIII alegységek kölcsönhatását jellemző egyensúlyi disszociációs állandó (K_d) és egyéb kinetikai paraméterek meghatározása

Az FXIII-A₂ és FXIII-B₂ kölcsönhatását jellemző K_d -t SPR technikával és ELISA típusú kötődési vizsgálattal határoztuk meg. Egy jellegzetes SPR szenzorgram (6A ábra) és az ELISA vizsgálatokkal kapott kötődési görbe (6B ábra) szemlélteti az rFXIII-A₂ plazmából származó FXIII-B₂-hez történő kötődését. Amint a 6A ábra mutatja, az illesztett görbe szépen követi a szenzorgramokat. A kísérletet elvégeztük humán placentából preparált cFXIII-A₂-vel is. A két eltérő technikával meghatározott K_d értékek egyaránt 10^{-10} M tartományban voltak (átlagban $4,17 \times 10^{-10}$ M), jelezvén a kötés erősségét (4. táblázat). A k_d körülbelül $2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ -nek adódott, ami igen lassú disszociációra utal. Amint várható volt, az rFXIII-A₂-vel és a cFXIII-A₂-vel kapott eredmények alig különböztek egymástól. SPR-rel az rFXIII-A₂ rFXIII-B₂-hez való kötődését is tanulmányoztuk. A rovarsejtekben termeltetett rFXIII-B₂ N-glikozilációs mintázata különbözik az emlős sejtektől [78, 79]. Az FXIII-B N-glikán reziduumaiban lévő különbség az alacsonyabb molekulatömegben nyilvánul meg, ez azonban nem befolyásolta szignifikánsan az FXIII-A₂-vel való kölcsönhatását (4. táblázat).



6. ábra. Különböző koncentrációjú rFXIII-A₂ kötődése az FXIII-B₂-höz. A oldal: a humán plazmából preparált FXIII-B-t CM5 chiphez rögzítettük, és az FXIII-A₂ kötődését a felszíni plazmon rezonancia mérésével nyomon követtük. Az egyes szenzorgramok az ábrán feltüntetett rFXIII-A₂ koncentrációknak felelnek meg. Az adatokat egy egyszerű 1:1 interakciós modellre illesztettük a Biaevaluation szoftver teljes adat analízis opcióját használva.

B oldal: az rFXIII-A₂ kötődését a plazmából származó FXIII-B₂-höz ELISA-típusú kötődési vizsgálattal detektáltuk; a kötődési görbe három, egymástól nem több, mint 10%-ban különböző kísérleti eredmény átlagát ábrázolja. FXIII-A₂B₂/FXIII-B₂(t): a mért FXIII-A₂B₂ moláris koncentrációját elosztottuk a totál FXIII-B₂ moláris koncentrációjával.

4. táblázat. Az FXIII-A₂B₂ komplex kialakulását jellemző kinetikai paraméterek.

	n	k_a ± SE (1/Ms x 10⁵)	k_d ± SE (1/s x 10⁻⁴)	K_d ± SE (M x 10⁻¹⁰)
SPR vizsgálat				
cFXIII-A ₂ + FXIII-B ₂	7	6,35 ± 0,80	2,62 ± 0,30	5,17 ± 1,44
rFXIII-A ₂ + FXIII-B ₂	4	5,76 ± 0,79	1,69 ± 0,08	3,14 ± 0,55
rFXIII-A ₂ + rFXIII-B ₂	3	1,38 ± 0,30	0,76 ± 0,26	6,26 ± 2,76
ELISA-típusú teszt				
cFXIII-A ₂ + FXIII-B ₂	4			2,93 ± 0,68
rFXIII-A ₂ + FXIII-B ₂	3			5,43 ± 0,95

A táblázatban a mérési eredmények átlaga ± SE (standard error, standard hiba) szerepel. SPR, surface plasmon resonance, felszíni plazmon rezonancia; cFXIII-A₂, celluláris (placenta) FXIII-A₂; rFXIII-A₂, rekombináns FXIII-A₂; rFXIII-B₂ rekombináns FXIII-B₂

7.1.2 Szabad FXIII-A₂ a plazmában és egyéb testfolyadékokban

A két technikával mért K_d értékek átlagát, és a totál FXIII-A₂ és FXIII-B₂ koncentrációk átlagát használva meghatároztuk a komplexben lévő FXIII-A₂ és a szabad FXIII-A₂ mennyiségét a plazmában (5. táblázat). A számítás alapján az FXIII-A₂ körülbelül 1%-a az FXIII-B₂-hez nem kötve, szabad formában található. Ezt a meglepő felismerést kísérletekkel támasztottuk alá. A szabad és a komplexben lévő FXIII-B-vel egyaránt reagáló anti-FXIII-B monoklonális antitest segítségével immunabszorpcióval 11 egészséges önkéntes plazmájából teljes mértékben eltávolítottuk az FXIII-A₂B₂-t és az FXIII-B₂-t. Az FXIII-A₂B₂ teljes mennyiségének eltávolítását nagy érzékenységgű ELISA-val bizonyítottuk. Az ELISA 0,003 nM FXIII-A₂B₂ detektálási határral jellemezhető, ami megfelel a plazma átlagos FXIII-A₂B₂ koncentráció 0,004%-ának [68]. Ezzel a módszerrel az immundepletált plazmában FXIII-A₂B₂ nem volt kimutatható. Az immundepletált plazmákban 1,06±0,49 nM szabad FXIII-A₂-t mértünk, azaz a plazmában található FXIII-A₂ 1,38±0,55%-a szabad formában kering (5. táblázat). Ahhoz, hogy ellenőrizzük a megállapított K_d validitását, a kalkulált és a mért szabad FXIII-A₂ értékeket egyaránt összehasonlítottuk cerebrospinális folyadékban és könnyben is, melyekben az FXIII alegységek koncentrációja legalább 3 nagyságrenddel alacsonyabb, mint a plazmában. Ilyen körülmények között várható, hogy sokkal magasabb a szabad FXIII-A₂ aránya. Valóban, mind a kalkulált, mind a mért értékek 80% felett voltak, és megfelelő egyezést mutattak.

5. táblázat. A kinetikai paraméterek alapján számított és a mért szabad FXIII-A₂ koncentrációk összehasonlítása plazmában és más testfolyadékokban.

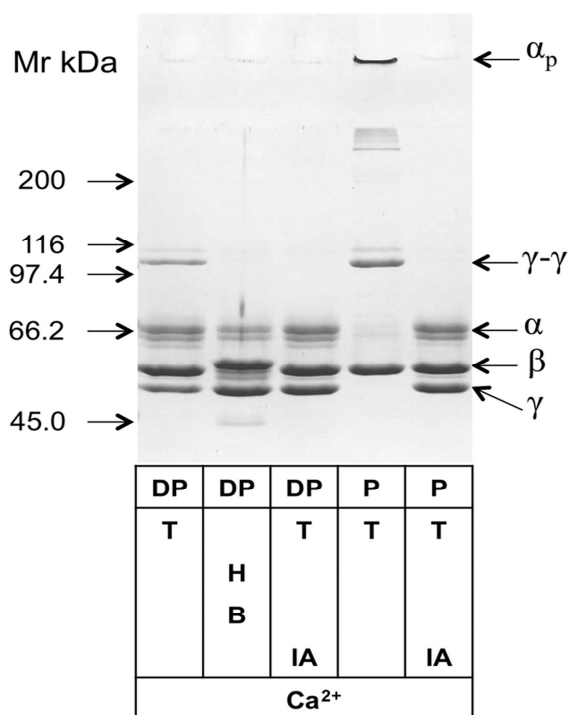
	Átlag/medián totál FXIII-B ₂	Átlag/medián totál FXIII-A ₂	Kalkulált FXIII-A ₂ komplexben	Kalkulált FXIII-A ₂ szabad formában	Kalkulált szabad FXIII-A ₂ %	Mért szabad FXIII-A ₂ %
Plazma	113,1 nM	69,9 nM	69,2 nM	0,7 nM	1,0	1,38±0,55
CSF*	113,0 pM	80,4 pM	3,37 pM	12,9 pM	81,0	95,8
Könny*	45,1 pM	12,8 pM	2,00 pM	24,7 pM	89,5	83,7

A plazmában mért szabad FXIII-A₂ koncentrációkat a totál FXIII-A₂ koncentráció százalékaként fejeztük ki. Az eredmények a 11 önkéntes mintájából mért értékek átlagát ±SD mutatják.

*Mivel az FXIII alegység koncentrációk eloszlása cerebrospinális folyadékban (CSF) és könnyben nem parametrikus, ezért korábbi publikációkban [70, 71] közölt medián értékeket használtunk a számításokhoz.

7.1.3 A plazmában lévő szabad FXIII-A₂ működőképes

Azon kérdés megválaszolására, miszerint a plazmában jelen lévő szabad FXIII-A₂ funkcionálisan intakt-e, az FXIII-A₂B₂-mentesített plazmát trombinnal és Ca²⁺-mal kezeltük, majd a kialakult alvadék fibrin keresztkötöttségét analizáltuk (5. ábra). A nem-depletált plazmában (P) a fibrin γ -láncai teljes dimerizációt mutatták, míg az α -láncok döntő többsége nagy molekula tömegű keresztkötött polimerekké (α_p) alakult át. A fibrin láncok keresztkötését az FXIIIa inhibitor jóacetamid (IA) megakadályozta. Az immundepletált plazmában (DP) a γ -lánc dimerek (γ - γ) transzglutamináz-dependens kialakulása jól detektálható volt, mely bizonyítja, hogy a szabad FXIII-A₂ trombinnal és Ca²⁺-mal aktiválható, azaz képes aktív transzglutaminázzá alakulni. Ellentétben a nem-depletált plazmával itt csak γ -lánc dimerek képződtek, α_p nem volt detektálható a koncentrált gél felső részében. Ez nem volt meglepő; a γ -lánc dimerizáció egy igen szenzitív indikátora az FXIIIa aktivitásának, míg az α -lánc polimerizációhoz sokkal magasabb FXIIIa koncentráció szükséges, és egy sokkal lassabb folyamat, mint a γ -láncok közötti keresztkötés kialakulása [35, 80]. A fibrin keresztkötés mintázata az immundepletált plazmában jól megfelel annak az eredménynek, miszerint a plazmában mindösszesen az FXIII-A₂ kb. 1%-a van szabad formában. A következő kérdésünk az volt, hogy a szabad FXIII-A₂ nem-aktivált, vagy aktivált állapotban van-e. Ezen kérdés megválaszolásához a fibrin alvadék kialakulását batroxobin moojeni-vel (B) és Ca²⁺-mal idéztük elő az immundepletált plazmában. A batroxobin moojeni lehasítja a fibrinről a fibrinopeptid A-t, de a fibrinopeptid B-t nem, és nem aktiválja az FXIII-at. Mivel Ca²⁺ jelenlétében a plazmában endogén trombin képződik, ennek aktivitását a batroxobinnal végzett kísérletekben hirudinnal (H) gátoltuk meg. Ilyen rendszerben a fibrin láncok között nem alakult ki keresztkötés, ami azt jelzi, hogy a szabad FXIII-A₂ a plazmában nem-aktivált formában kering.



5. ábra. A szabad, nem-komplexben lévő FXIII-A₂ általi fibrin keresztkötés kimutatása. A szabad és a komplexben lévő FXIII-B-vel egyaránt reagáló Sepharose-hoz kötött anti-FXIII-B monoklonális antitest segítségével immunabszorpcióval a plazmából depletáltuk az FXIII-A₂B₂-t és az FXIII-B₂-t. A depletált (DP) és a normál plazmát (P) trombinnal (T) alvasztottuk meg az FXIIIa inhibitor jódiacetamid (IA, iodacetamide) jelenlétében, és hiányában. A depletált plazmát batroxobinnal (B) is megalvasztottuk a trombin inhibitor hirudin (H) jelenlétében. A fibrin alvadékokat mostuk, és SDS-PAGE segítségével analizáltuk; az ábrán feltüntettük a fibrin α -, β - és γ -láncokat, γ -lánc dimereket (γ - γ), és a nagy molekulatömegű α -lánc polimereket (α_p). A gél alatt látható táblázat a fibrin alvadékot eredményező inkubációs elegy összetételét mutatja a megfelelő sávnál.

7.2 Az aktivált FXIII és szubsztrátjai kölcsönhatásának vizsgálata

A szubsztrát peptid analógok (3. táblázat) reverz fázisú HPLC-vel történő tisztaság vizsgálata minden esetben minimum 95%-osnak bizonyult, MALDI-TOF-fal meghatározott molekulatömegük a kalkulált molekulatömeggel megegyezett.

3. táblázat. Az N1- α_2 PI(1-12) dodekapeptid általunk megszintetizált és levizsgált szintetikus mutánsai.

A peptid szekvenciája	A peptid rövidítése
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12)
• N-Q-E-N-V-S-P-L-T-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 4N)
• N-N-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 2N)
• N-N-E-N-V-S-P-L-T-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 2,4N)
• N-E-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 2E)
• A-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 1A)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-S-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 9S)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-A-L-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 9A)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-A-L-K	N1- α_2 PI(1-12; 10A)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-A-K	N1- α_2 PI(1-12; 11A)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-A-A-K	N1- α_2 PI(1-12; 10,11A)
• Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K	N1- α_2 PI(2-12)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L	N1- α_2 PI(1-11)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L	N1- α_2 PI(1-10)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L-T	N1- α_2 PI(1-9)
• N-Q-E-Q-V-S-P-L	N1- α_2 PI(1-8)
• N-Q-E-Q-V-S-P	N1- α_2 PI(1-7)
• N-Q-E-Q-V-S	N1- α_2 PI(1-6)
• N-Q-E-Q-V	N1- α_2 PI(1-5)
• N-Q-E-Q	N1- α_2 PI(1-4)

7.2.1 Az N1- α_2 PI(1-12) N-terminális szakaszán létrehozott szintetikus mutációk hatása a kinetikai konstansokra

Amint azt már korábban közölték [55], az acil donor Gln2 aszparaginnal való helyettesítésével az N1- α_2 PI(1-12) peptid elvesztette FXIIIa szubsztrát tulajdonságát, az ilyen módon módosított peptiddel transzglutamináz aktivitás nem volt mérhető (6. táblázat). Ez azt is jelenti, hogy a Gln4 nem szolgál acil-donor helyként. Az Gln4 Asp-nal való cseréje eredményeképpen kapott N1- α_2 PI(1-12; 4N) peptiddel mért emelkedett K_m érték a k_{cat} érték szignifikáns változása nélkül azt sugallja, hogy a Gln4 oldallánc részt vesz az enzim-szubsztrát kölcsönhatásban, de nem befolyásolja a bekötődött szubsztrát katalitikus átalakulásának sebességét. A transzglutamináz reakcióban az N-terminális Asn1 fontosságát világosan mutatja, hogy eltávolítása, vagy alaninnal való helyettesítése drasztikusan megváltoztatta a kinetikai paramétereket. Az N1- α_2 PI(2-12) esetében a 9-szer magasabb K_m érték és a katalitikus sebességi konstans csökkenése együtt óriási, 1/30-adára való csökkenést eredményezett a katalitikus efficienciában. Az Asn1Ala csere a K_m 7-szeres növekedéshez vezet. Ez azt mutatja, hogy az aszparagin oldallánc – sokkal inkább, mint Gln2-höz kötött aminosav jelenléte – elsődleges fontosságú a szubsztrát FXIIIa-hoz történő kötődésének elősegítésében.

6. táblázat. Az N1- α_2 PI(1-12) N-terminális szakaszán végrehajtott módosítások hatása az FXIIIa által katalizált reakciót jellemző kinetikai konstansokra.

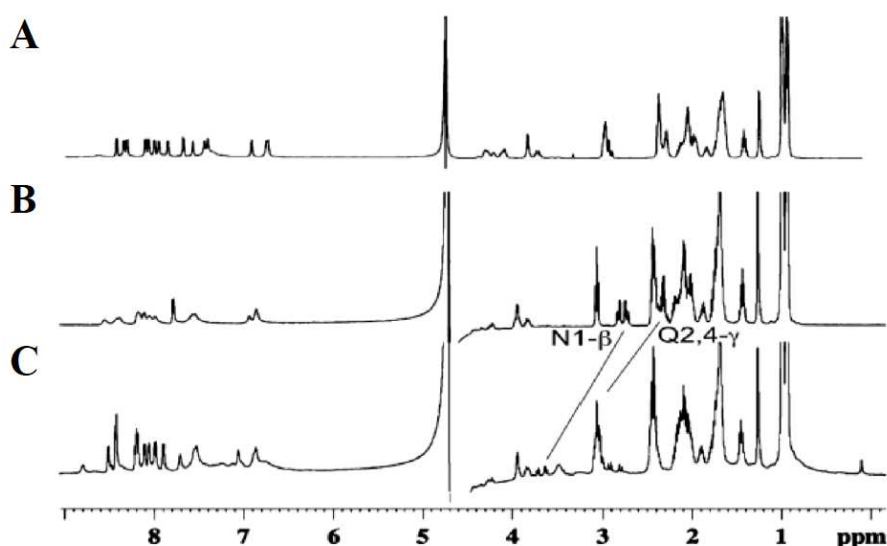
	K_m (mM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m (1/s / mM)
N1- α_2 PI(1-12)	0,54	390,5	722,2
N1- α_2 PI(1-12; 4N)	1,56	431,0	276,2
N1- α_2 PI(1-12; 2N)	nincs transzglutamináz aktivitás		
N1- α_2 PI(1-12; 2,4N)	nincs transzglutamináz aktivitás		
N1- α_2 PI(1-12; 1A)	3,75	294,1	78,4
N1- α_2 PI(2-12)	4,87	113,0	23,3

A szintetikus peptidek különböző koncentrációit használtuk szubsztrátként a Módszereknél részletezett spektrofotometriás kinetikus FXIIIa tesztben. A meghatározásokat legalább két alkalommal, minden alkalommal 2 párhuzamos vizsgálatban végeztük el. A kinetikai paramétereket kiszámítottuk és átlagoltuk. Az egyes értékek egy esetben sem különböztek a kalkulált átlagtól több mint 5%-ban. Az első sorban szereplő N1- α_2 PI(1-12) az N1- α_2 PI N-terminális szekvenciájának megfelelő dodekapeptid. A peptidek szekvenciái a 3. táblázatban láthatók.

7.2.2 Gln2 közeli aminosav oldalláncok FXIIIa-val való kölcsönhatásának bizonyítása proton NMR technikával

5,5-ös pH-t és 290 K-t alkalmazva az N1- α_2 PI(1-12) amid jelei élesek és jól feloldottak (8A ábra), ám a pH 7,4-re és a hőmérséklet 310 K-re növelésekor kiszélesedtek (8B ábra), ami a víz protonokkal egy felgyorsult kémiai kicserélődést jelez. Az oldószerből árnyékolt amid protonok hőmérséklet függése vagy más téren átható (NOESY) kölcsönhatások alapján, a szabad peptid nem rendelkezik másodlagos szerkezettel, nyújtott konformációban van. A szabad peptid ^1H -NMR spektrumát összehasonlítva az FXIIIa-val komplexet alkotó peptid spektrumával - ugyanazon körülményeket alkalmazva (pH=7,4, T=310 K; 8C ábra) - a legfeltűnőbb különbség a spektrumok amid régiójában figyelhető meg. FXIIIa jelenlétében a spektrum ezen régiója hasonlít ahhoz a spektrumhoz, amit a szabad peptiden vettünk fel 5,5-ös pH-n, 290 K-en. Az N1- α_2 PI(1-12) FXIIIa-val való kölcsönhatásának fiziológiás pH-n való tanulmányozásakor figyelembe kellett vennünk, hogy tioészter kötés alakul ki a glutamin oldalláncok között és az aktív hely tiol csoportja között, mely hidrolizál, s így a Gln2 átalakul Glu2-vé. 7,4-es pH-n a terméknek, azaz az N1- α_2 PI(1-

12; 2E)-nak, ugyanolyan kiszélesedett amid jelei voltak, mint a szubsztrátnak (a dolgozatban nem mutatjuk be). Ez a megállapítás igazolja, hogy az FXIIIa jelenlétében az amid proton spektrumban bekövetkezett változások nem a szubsztrát-termék átalakulásnak, hanem az N1- α_2 PI(1-12) FXIIIa-val való kölcsönhatásának köszönhetőek. A jól feloldott amid proton jelek mutatják, hogy az amid hidrogének hidrogén-kötésben vannak, vagy az oldószer molekulák számára nem hozzáférhetők a peptid-fehérje komplexben. Szintén megfigyelhető volt, hogy az N1- α_2 PI(1-12) peptid N-terminális szakaszán bizonyos oldallánc proton rezonanciajelek, nevezetesen az Asn1- β és a Gln2,4- γ , szintén nagy mértékű eltolódást mutattak az FXIIIa jelenlétében. A rezonanciajelek kémiai eltolódásában észlelt változások azt tükrözik, hogy a lokális kémiai környezet az FXIIIa jelenlétében lényegesen megváltozik. Az NMR és a kinetikus adatok együttesen bizonyítják az Asn1 és a Gln4 oldalláncok támogató szerepét a szubsztrát enzimhez való kötődésében.



8. ábra. Az N1- α_2 PI(1-12) dodekapeptid N-terminális szakasz aminosav oldalláncainak az aktivált FXIII-mal való kölcsönhatásának vizsgálata proton mágneses magrezonanciával (NMR-rel). Az ¹H-NMR spektrumokat 500 MHz-n vettük fel 500 μ L 90% H₂O-t, 10% D₂O-t és 2 mM N1- α_2 PI(1-12)-t tartalmazó borát pufferben A: 290 K, pH 5,5; B: 310 K, pH 7,4; C: 310 K, pH 7,4, 10 μ M FXIIIa jelenlétében. Feltűnő különbség látható az amid régióban. Az amid protonok árnyékoltak a komplexben, és gátolt a vízzel való kicserélődésük. Az N1- β és Q2,4- γ proton rezonanciák erősen eltolódnak a komplexben.

7.2.3 Az N1- α_2 PI(1-12) C-terminális szakaszán létrehozott szintetikus mutációk hatása a kinetikai konstansokra

A 7. táblázat adatai szerint a peptid C-terminális része – nevezetesen a 7-12 reziduumok – esszenciális szerepet játszanak a szubsztrát aktív enzimhez való kötődésében és a katalitikus aktivitásban. A dodekapeptid sorozatos C-terminális rövidítése a mért enzimatisz aktivitás fokozatos csökkenését, a 7-nél kevesebb aminosavat tartalmazó peptidek esetében pedig a teljes megszűnését eredményezte. A C-terminális lizin (K12) eltávolítása majdnem 3-szoros növekedést okozott a K_m értékében, a k_{cat} szignifikáns változása nélkül. Ez a megállapítás azt sugallja, hogy a Lys12 hozzájárul a dodekapeptid kötődéséhez, viszont nem fontos az enzimatisz aktivitáshoz. A következő két leucin (Leu11, Leu10) egyesével történő eltávolítása mérsékelt és fokozatos emelkedést okozott a K_m értékében és élesebb csökkenést a katalitikus efficienciában. Annak érdekében, hogy különbséget tegyünk a két leucin szerepe között, külön-külön az egyiket vagy mindkettőt alaninnal helyettesítettük. Mindkét aminosav csere megnövelte a K_m értékét a k_{cat} szignifikáns változása nélkül. A drasztikusabb növekedés a K_m értékében az N1- α_2 PI(1-12; 10A) variáns esetében volt tapasztalható, mely azt sugallja, hogy a Leu10 terminális metil csoportja sokkal fontosabb az enzim-szubsztrát kapcsolatban, mint a Leu11-é. Ezt a következtetést alátámasztják az N1- α_2 PI(1-12; 10,11A) variánssal - melyben mindkét leucint alaninra cseréltük - kapott eredmények is, melyek alapján a K_m hasonló a N1- α_2 PI(1-12; 10A) variánssal kapott K_m -hez. A Thr9 eltávolítása az N1- α_2 PI(1-9)-ről nem befolyásolta szignifikánsan a K_m értékét, ám csökkentette a k_{cat} -ét. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a poláris - OH csoportot és terminális metil csoportot tartalmazó treonin funkcióját, a nem-trunkált peptidben kicseréltük a poláris csoportot igen, viszont terminális metil csoportot nem tartalmazó szerinre, vagy a rövid láncú, metil csoporttal rendelkező apoláros alaninra. Érdekes módon mindkét helyettesítés csökkentette a K_m értékét, és az N1- α_2 PI(1-12; 9S) variáns esetében a katalitikus efficiencia magasabbnak bizonyult, mint a módosítatlan, eredeti szekvenciájú dodekapeptid esetében.

7. táblázat. Az N1- α_2 PI(1-12) C-terminális részében előidézett szintetikus mutációk hatása az FXIIIa által katalizált reakció kinetikai konstansaira.

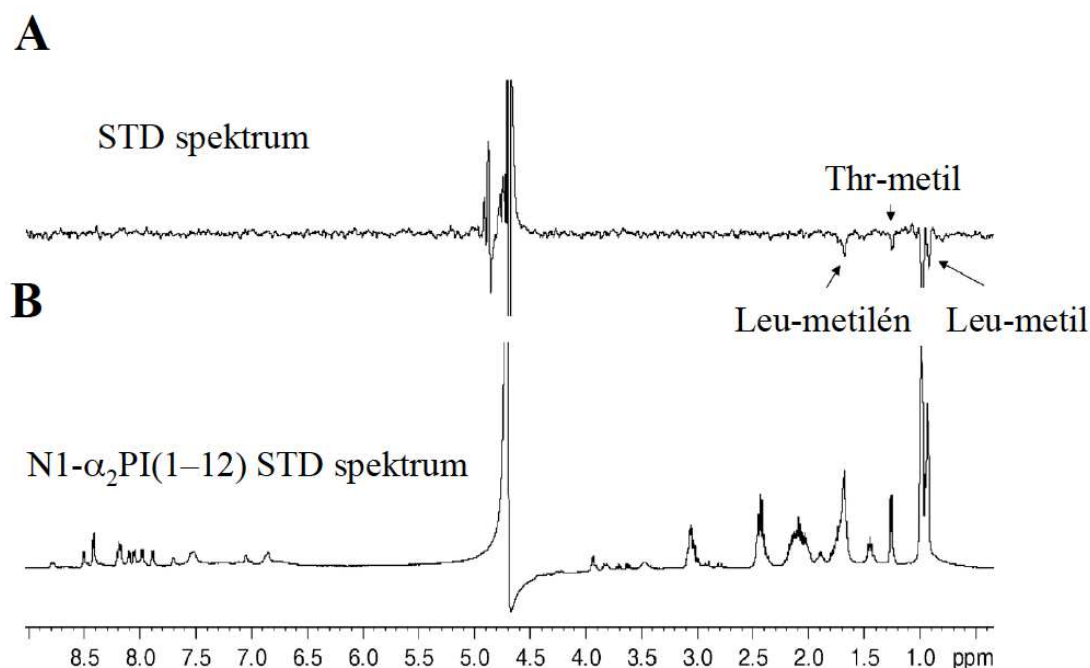
Peptidek	K_m (mM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m (1/s / mM)
N1- α_2 PI(1-12)	0,54	390,5	722,2
N1- α_2 PI(1-12; 9S)	0,33	416,6	1262,6
N1- α_2 PI(1-12; 9A)	0,37	324,6	877,5
N1- α_2 PI(1-12; 10A)	2,66	490,2	184,3
N1- α_2 PI(1-12; 11A)	0,98	362,3	369,7
N1- α_2 PI(1-12; 10,11A)	2,12	294,1	138,7
N1- α_2 PI(1-11)	1,43	357,1	249,7
N1- α_2 PI(1-10)	1,62	215,5	133,0
N1- α_2 PI(1-9)	2,18	120,2	55,1
N1- α_2 PI(1-8)	2,30	62,0	26,9
N1- α_2 PI(1-7)	5,18	48,4	9,3
N1- α_2 PI(1-6)	nincs transzglutamináz aktivitás		

A szintetikus mutánsokban a molekula C-terminális részét képező aminosavakat kicseréltük, vagy eltávolítottuk. A szintetikus peptideket különböző koncentrációkban szubsztrátként alkalmaztuk a Módszereknél ismertetett spektrofotometriás kinetikus FXIIIa tesztben. A meghatározásokat legalább két alkalommal, minden alkalommal 2 párhuzamos vizsgálatban végeztük el. A kinetikai paramétereket kiszámítottuk és átlagoltuk. Az egyes értékek egy esetben sem különböztek a kalkulált átlagtól több mint 5%-ban. Az első sorban szereplő N1- α_2 PI(1-12) az N1- α_2 PI N-terminális szekvenciájának megfelelő dodekapeptid.. A peptidek szekvenciái a 3. táblázatban láthatók.

7.2.4 Az FXIIIa és az N1- α_2 PI(1-12) kölcsönhatásának vizsgálata STD NMR technikával

Az STD kísérletben a receptor fehérje szelektíven van besugározva (telítve) egy, a ligandum rezonanciajeleitől mentes spektrális régióban. A 2,0-5,0 mp-es telítési idő alatt a mágnesezettség átvitele történik a receptor protonjairól a kötött ligandum fehérjéhez közeli protonjaira. Az STD spektrumban látható rezonanciajelek ezen fehérje közeli ligandum protonoktól származnak, intenzitásuk arányos a kölcsönhatás erősségével. Az FXIIIa-N1-

α_2 PI(1-12) komplex STD 1 H-NMR módszerrel történő tanulmányozása során detektált STD csúcsok a C-terminális leucinok metil csoportjaitól származnak (9A ábra). A mérés felbontóképessége nem képes különbséget tenni a Leu10 és a Leu11 között. Továbbá, a detektált gyengébb STD csúcsok a Thr9 metil, ill. az egyik leucin metilén csoportjához rendelhetők. A 9B ábrán mutatott spektrum az első fél órában rögzített adatokat jelenti, mely alatt a szubsztrát koncentrációja 20-ról 2 mM-ra csökkent. Az utóbbi koncentráció még mindig 4-szer magasabb, mint a K_m értéke, és megtartja az enzim szubsztráttal való telítettségét. Majd párhuzamosan az N1- α_2 PI(1-12) N1- α_2 PI(1-12; 2E)-vé történő további transzformációjával, a jelek fokozatosan gyengülnek, majd eltűnnek. Megegyezően a kinetikai adatokkal, az eredmények arra engednek következtetni, hogy az intermolekuláris hidrofób kölcsönhatások az N1- α_2 PI(1-12) C-terminális aminosav oldalláncai és az FXIIIa hidrofób régiói között igen fontos szerepet töltenek be a kötés kialakulásában.



9. ábra. Az FXIIIa és az N1- α_2 PI(1-12) közötti kölcsönhatás vizsgálata telítés-átviteli differencia (STD, saturation transfer difference) mágneses magrezonanciával (NMR). (A) 10 μ M FXIIIa és 20 mM N1- α_2 PI(1-12) peptid STD 1 H-NMR spektruma [76] pH 7,4-en, 310 K-en, a fehérje metil rezonancia-jelét (0 ppm-nél, 'on-resonance') 2 másodpercig szelektíven besugározva. (B) 20 mM N1- α_2 PI(1-12) 10 μ M FXIIIa-val alkotott komplexének 500 MHz-es 1 H-NMR spektruma 500 μ L 90% H_2O /10% D_2O összetételű 7,4-es pH-jú borát pufferben 310 K hőmérsékleten. Az eredmények a Thr9 és Leu10,11 aminosavak metil csoportjai és az FXIIIa hidrofób részei közötti intermolekuláris hidrofób kölcsönhatásokat szemléltetik.

8. Megbeszélés

A két különböző technikával kapott eredmények világosan mutatják, hogy az FXIII alegységek kölcsönhatását 10^{-10} M-os nagyságrendű K_d értékkel jellemezhetjük, ami nagyságrendekkel alacsonyabb, mint a korábban közölt kötődési állandók [25, 26]. A meghatározott K_d a nagy affinitású antigén-antitest kölcsönhatásokat jellemző tartományban van, és egy nagyon szoros kötődésre utal az FXIII-A₂ és az FXIII-B₂ között. Általánosan elfogadott tény, hogy a plazmában az FXIII-A₂ teljes mennyisége komplexben van az FXIII-B₂-vel. Ezzel szemben a K_d értéken és az FXIII alegységek plazma koncentrációin alapuló számításaink arra engedtek következtetni, hogy a szoros kötődés ellenére az FXIII-A₂ egy kisebb frakciója (körülbelül 1%) szabad formában, nem-komplexben kering. A szabad FXIII-A₂ jelenlétét kísérletekkel is megerősítettük. Könnyben és cerebospinális folyadékban az FXIII alegység koncentrációk minimum három nagyságrenddel alacsonyabbak, mint a plazmában. Ennek megfelelően az említett testfolyadékokban a szabad FXIII-A₂ aránya jóval magasabb a plazmában mért értékhez képest. A megállapított K_d érték azáltal is megerősítést nyert, hogy a számított és a mért szabad FXIII-A₂ jó egyezést mutatott a három testfolyadékban. Kimutattuk azt is, hogy a mért szabad FXIII-A₂ az FXIII-nak nem degradált, hanem funkcionálisan intakt formája; nem aktív, de trombin és Ca^{2+} hatására aktívvá válik és képes a fibrin keresztkötésére. Az eddigi ismereteink alapján csak spekulálni tudunk a plazmában lévő szabad FXIII-A₂ élettani jelentőségéről. Az FXIII-A₂ az FXIII-B₂ hiányában nem igényli az aktivációs peptid eltávolítását az aktiváció létrejöttéhez. A nem-hasított FXIII-A₂ egy lassú proteolitikus aktiváción megy keresztül, mely Ca^{2+} és NaCl jelenlétében megy végbe a plazmában. Ezt a nem-proteolitikus aktivációt a fibrinogén gyorsíthatja. Évekkel ezelőtt leírták a nem-aktivált plazma FXIII fibrin és fibrinogént keresztkötő gyenge "konstitutív" aktivitását [33]. Érdekes volna, ha ez a konstitutív aktivitás éppen az FXIII-A₂ szabad frakciójának lenne tulajdonítható. Ennek a feltételezésnek látszólag ellentmond, hogy az immundepletált plazmában - mely kizárólag szabad FXIII-A₂-t tartalmaz - a batroxobin által alvasztott plazmában a fibrin nem keresztkötött, azaz a szabad FXIII-A₂ nem aktiválódott. Elképzelhető azonban, hogy a nem-proteolitikusan aktivált szabad FXIII-A₂ kötődik sejtes elemekhez vagy fibrin(ogén) szálakhoz és ezáltal a plazmából eltűnik. Lehetséges az is, hogy az újonnan képződött fibrinben ez a sokkal könnyebben aktiválható plazma FXIII frakció hozzájárul a fibrin γ -láncok rendkívül gyors keresztkötéséhez [32].

Az N1- α_2 -PI egy kiváló glutamin, ám nem lizin donor szubsztrátja az FXIIIa-nak. A véralvadás folyamán az FXIIIa gyorsan keresztköti az N1- α_2 -PI-t a fibrin α -láncához, majd a fibrin α -lánc-N1 α_2 -PI heterodimerek inkorporálódnak a nagy molekulatömegű α -lánc

polimerekbe. A fibrinhez kötött N1- α_2 -PI megtartja teljes plazmint gátló kapacitását [40, 81]. Mára már világossá vált, hogy az intakt N1- α_2 -PI-ben az egyetlen acil donor glutamil oldallánc az N-terminális rész utolsó előtti pozíciójában lévő Gln2 [82]. Jóllehet ha a Gln2-t kiiktatták a Q2A N1- α_2 PI mutáns fehérjében három további glutamin donor helyet találtak a molekula 21-es, 419-es és 447-es pozícióiban, ezek kinetikus hatékonysága sokkal alacsonyabbnak bizonyult a Gln2-nél [83]. A propeptid jelenléte miatt az M1- α_2 PI igen gyenge szubsztrátja az FXIIIa-nak [40, 42, 82]. A propeptid mindössze utolsó három C-terminális aminosavának az N1- α_2 PI N-terminális végéhez való kapcsolása már elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy meggátolja fibrinhez való keresztkötését [84].

Jelen tanulmányban megvizsgáltuk az FXIIIa N1- α_2 PI(1-12)-vel létrejövő kölcsönhatásának molekuláris mechanizmusát. Az N1- α_2 PI(1-12) kiváló szubsztrátja az FXIIIa-nak és kompetitív módon gátolja az N1- α_2 PI fibrinhez történő keresztkötését [62, 84, 85]. Az N1- α_2 PI(1-12) általunk mért kinetikai paraméterei jó egyezést mutattak a korábbi tanulmányokban közölt adatokkal; a K_m érték azonosnak bizonyult az N1- α_2 PI N-terminális szakaszával megegyező 15 tagú oligopeptid (N1- α_2 PI(1-15)) K_m értékével [56]. A Cleary és Maurer által az N1- α_2 PI(1-15)-re megállapított alacsonyabb k_{cat} és katalitikus efficencia értékek valószínűleg a fagyasztott és újraolvasztott FXIIIa preparátumok használatának, vagy esetleg az utolsó három aminosav gátló hatásának volt köszönhető.

A korábban 6,5-ös pH-n kivitelezett NMR tanulmányokkal szemben [55, 56] az FXIIIa N1- α_2 PI(1-12)-vel való kölcsönhatását fiziológiás pH-n tanulmányoztuk. Az interakciót egyértelműen demonstrálják az N1- α_2 PI(1-12) spektrum amid régiójában bekövetkező szembetűnő változások. Az N1- α_2 PI(1-12) peptid fiziológiás pH-n is éles amid jeleket ad az FXIIIa jelenlétében, míg FXIIIa hiányában viszont kiszélesednek a szignálok. Ez arra enged következtetni, hogy az az enzim szubsztrát komplexben az amid protonok az oldószertől elzártak, és gátolt a vízzel való kicserélődésük.

Megvizsgáltuk az N1- α_2 PI(1-12)-ben az N-terminális aminosavak szerepét az FXIIIa-val való kölcsönhatásban. Ahogyan arra számítottunk, a Q2N változás teljesen megszüntette az enzimaktivitást. Egy korábbi kutatásban [56] beszámoltak a Gln4 támogató szerepéről, melyet megerősítettünk. Megjegyzendő, hogy az FXIIIa két másik természetes szubsztrátjának is van a reaktív glutamintól C-terminális irányban elhelyezkedő glutamin reziduuma (1. táblázat). "Fág-display" technikával létrehozott peptid könyvtár segítségével több olyan FXIIIa szubsztrát volt azonosítható, mely ezen pozíciójában glutamin reziduum található [86]. Drasztikus változást akkor tapasztaltunk a kinetikai paraméterekben, amikor az Asn1-et alaninnal helyettesítettük, vagy eltávolítottuk; ezzel elsőként bizonyítottuk az Asn1

fontosságát az N1- α_2 PI N-terminális peptid FXIIIa-val való kölcsönhatásában. A proton NMR-rel detekált Asn1- β proton jelének kis mértékű eltolódása szintén alátámasztja ezen reziduum fontosságát, és utal a szubsztrát-kötő üreget körülvevő poláros csoportokkal történő kölcsönhatásra. Érdekes módon, az FXIIIa számára a fág-display könyvtárból szelektált 28 preferált szubsztrát közül 24 szekvenciájában szintén csak egyetlen aminosav előzi meg a reaktív glutamint, melyek nagy része hidrofil karakterűnek bizonyult [86]. Összefoglalva, az Asn1-nek nagy szerepe van az N1- α_2 PI(1-12) FXIIIa-hoz való kötődésében, és a Gln4, ill. talán a Glu3 oldalláncaival együtt [56] direkt módon vesz részt a reaktív glutamin aktív helyhez való kötődésében a szubsztrát-kötő üregben.

Marinescu és munkatársai [55] az N1- α_2 PI(1-15) peptidről felvett 1D proton NMR rezonanciajelek szélesedéseinek kimutatásával és a 2D NOE-átviteli ('transfer NOESY') spektrumok segítségével, indirekt bizonyítékot szolgáltatottak a szubsztrát peptid C-terminális része és az FXIIIa közötti kölcsönhatásra. Tanulmányunkban, a C-terminálisan trunkált/cserélt szubsztrátokkal végzett kinetikai kísérletekkel és STD NMR-rel bizonyítottuk a transzglutamináz reakcióban fontos szerepet betöltő, második szubsztrát-kötő hely létezését. A katalitikus efficiencia fokozatos csökkenése párhuzamosan az aminosav reziduumok számának csökkenésével, ill. hét reziduum alatt a transzglutamináz aktivitás megszűnése egyértelműen demonstrálja az N1- α_2 PI(1-12) C-terminális részének fontosságát az FXIIIa-hoz való kötődésében. A Lys12 eltávolítása a K_m értékét kb. 2,5-szeresére emelte meg, ami mutatja a hosszú, pozitív töltésű oldalláncának fontosságát az N1- α_2 PI(1-12) FXIIIa-hoz való kötődésében. Az STD NMR kísérletek demonstrálják a hidrofób kölcsönhatások közreműködését az N1- α_2 PI(1-12) C-terminális részének kötődésében, és azonosították a hidrofób interakciók elsődleges forrásául szolgáló egy vagy két leucin metil, esetleg metilén csoportjait. A szintetikus mutánsokkal végzett kísérletek rámutattak a Leu10 fontosságára. Az STD NMR vizsgálatok arra utaltak, hogy a Thr9 metil csoportja is részt vehet a szubsztrát és az FXIIIa közötti hidrofób kölcsönhatás kialakulásában. A metil csoport eltávolítása a Thr9Ser cserével azonban nem változtatta meg a k_{cat} -ot, sőt a K_m értékét lecsökkentette; tehát a Thr9 metil csoportjának bizonyos hidrofób aminosavak oldalláncaival való kölcsönhatása kisebb jelentőségű az enzim-szubsztrát kapcsolat kialakításában.

Összefoglalva, az FXIIIa acil-donor peptid/fehérje szubsztrátokra vonatkozó irodalomban elérhető adatok, és a fentiekben részletezett eredmények alapján úgy tűnik, hogy a reaktív helyhez történő kötődésen felül, a különböző peptid szubsztrátok egy, az FXIIIa-n lévő másodlagos kötőhellyel is kölcsönhatásba lépnek. Egy ilyen másodlagos kötőhely elősegítheti a szubsztrát peptid FXIIIa-hoz történő kötődését, és a transzglutamináz reakció katalitikus hatékonyságának növelését. A szignifikáns konszenzus hiánya a különböző

hatékony glutamin szubsztrátok elsődleges szekvenciái között azt sugallja, hogy eltérő másodlagos kötőhelyek léteznek a különböző szubsztrátok számára. Ezen kötőhelyek feltérképezése jelentősen hozzájárulhat az FXIIIa-szubsztrát kölcsönhatással és az aktivált enzim transzglutamináz funkciójával kapcsolatos ismereteinkhez.

9. Új megállapítások

1. Meghatároztuk az FXIII alegységei közötti kölcsönhatásra vonatkozó K_d értékeket, melyek 10^{-10} M tartományba estek és így rendkívül nagy affinitású kötődést bizonyítanak.
2. Kiszámoltuk és kísérletesen bizonyítottuk, hogy a FXIII-A kb. 1 %-a a plazmában szabad formában kering.
3. Megállapítottuk, hogy a szabad FXIII-A a plazmában nem aktív formában van, de funkcionálisan intakt, trombin és Ca^{2+} hatására aktiválódik.
4. Kiszámoltuk a CSF-ban és a könnyben, igen alacsony FXIII alegység koncentrációknál, a szabad FXIII-A aránya meghaladja a total FXIII-A 80%-át.
5. Elsőként bizonyítottuk a N1- α_2 PI(1-12) peptidben az N terminális Asn fontosságát a FXIIIa-szubsztrát kölcsönhatásban.
6. C-terminálisan trunkált/cserélt szubsztrátokkal végzett kinetikai kísérletekkel és STD NMR-rel bizonyítottuk a transzglutamináz reakcióban fontos szerepet betöltő, második szubsztrát-kötő hely létezését, ill azt, hogy ennek a szubsztráttal való kölcsönhatásában hidrofób kötések lényeges szerepet játszanak.

10. Irodalomjegyzék

1. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011; **91**: 931-72.
2. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 2011; **9**: 9-20.
3. Lewis BA, Freyssinet JM, Holbrook JJ. An equilibrium study of metal ion binding to human plasma coagulation factor XIII. *Biochem J.* 1978; **169**: 397-402.
4. Ambrus A, Banyai I, Weiss MS, Hilgenfeld R, Keresztessy Z, Muszbek L, Fesus L. Calcium binding of transglutaminases: a ^{43}Ca NMR study combined with surface polarity analysis. *J Biomol Struct Dyn.* 2001; **19**: 59-74.
5. Fox BA, Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. Identification of the calcium binding site and a novel ytterbium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 4917-23.
6. Lai TS, Slaughter TF, Peoples KA, Greenberg CS. Site-directed mutagenesis of the calcium-binding site of blood coagulation factor XIIIa. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 24953-8.
7. Hornyak TJ, Shafer JA. Role of calcium ion in the generation of factor XIII activity. *Biochemistry.* 1991; **30**: 6175-82.
8. Lewis SD, Janus TJ, Lorand L, Shafer JA. Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates. *Biochemistry.* 1985; **24**: 6772-7.
9. Credo RB, Curtis CG, Lorand L. Ca^{2+} -related regulatory function of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; **75**: 4234-7.
10. Lorand L, Credo RB, Janus TJ. Factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *Methods Enzymol.* 1981; **80 Pt C**: 333-41.
11. Polgar J, Hidasi V, Muszbek L. Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J.* 1990; **267**: 557-60.
12. Muszbek L, Polgar J, Boda Z. Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thromb Haemost.* 1993; **69**: 282-5.
13. Uitte de Willige S, Standeven KF, Philippou H, Ariens RA. The pleiotropic role of the fibrinogen gamma' chain in hemostasis. *Blood.* 2009; **114**: 3994-4001.
14. Ichinose A, McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments. *Biochemistry.* 1986; **25**: 4633-8.

15. Poon MC, Russell JA, Low S, Sinclair GD, Jones AR, Blahey W, Ruether BA, Hoar DI. Hemopoietic origin of factor XIII A subunits in platelets, monocytes, and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies. *J Clin Invest*. 1989; **84**: 787-92.
16. Wolpl A, Lattke H, Board PG, Arnold R, Schmeiser T, Kubanek B, Robin-Winn M, Pichelmayer R, Goldmann SF. Coagulation factor XIII A and B subunits in bone marrow and liver transplantation. *Transplantation*. 1987; **43**: 151-3.
17. Nagy JA, Henriksson P, McDonagh J. Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood*. 1986; **68**: 1272-9.
18. Ikematsu S. An approach to the metabolism of factor XIII. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi*. 1981; **44**: 1499-505.
19. Yorifuji H, Anderson K, Lynch GW, Van de Water L, McDonagh J. B protein of factor XIII: differentiation between free B and complexed B. *Blood*. 1988; **72**: 1645-50.
20. Seelig GF, Folk JE. Noncatalytic subunits of human blood plasma coagulation factor XIII. Preparation and partial characterization of modified forms. *J Biol Chem*. 1980; **255**: 8881-6.
21. Souri M, Kaetsu H, Ichinose A. Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry*. 2008; **47**: 8656-64.
22. Rodeghiero F, Tosi A, Di Bona E, Castaman G. Clinical pharmacokinetics of a placenta-derived factor XIII concentrate in type I and type II factor XIII deficiency. *Am J Hematol*. 1991; **36**: 30-4.
23. Izumi T, Hashiguchi T, Castaman G, Tosi A, Rodeghiero F, Girolami A, Ichinose A. Type I factor XIII deficiency is caused by a genetic defect of its b subunit: insertion of triplet AAC in exon III leads to premature termination in the second Sushi domain. *Blood*. 1996; **87**: 2769-74.
24. Saito M, Asakura H, Yoshida T, Ito K, Okafuji K, Matsuda T. A familial factor XIII subunit B deficiency. *Br J Haematol*. 1990; **74**: 290-4.
25. Radek JT, Jeong JM, Wilson J, Lorand L. Association of the A subunits of recombinant placental factor XIII with the native carrier B subunits from human plasma. *Biochemistry*. 1993; **32**: 3527-34.
26. Komanasin N, Catto AJ, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Ariens RA. A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005; **3**: 2487-96.
27. Wilkinson KD. Quantitative analysis of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*. 2004; **261**: 15-32.

28. Inbal A, Oldenburg J, Carcao M, Rosholm A, Tehranchi R, Nugent D. Recombinant factor XIII: a safe and novel treatment for congenital factor XIII deficiency. *Blood*. 2012; **119**: 5111-7.
29. Lovejoy AE, Reynolds TC, Visich JE, Butine MD, Young G, Belvedere MA, Blain RC, Pederson SM, Ishak LM, Nugent DJ. Safety and pharmacokinetics of recombinant factor XIII-A2 administration in patients with congenital factor XIII deficiency. *Blood*. 2006; **108**: 57-62.
30. Muszbek L, Bagoly Z, Cairo A, Peyvandi F. Novel aspects of factor XIII deficiency. *Curr Opin Hematol*. 2011; **18**: 366-72.
31. Reynolds TC, Butine MD, Visich JE, Gunewardena KA, MacMahon M, Pederson S, Bishop PD, Morton KM. Safety, pharmacokinetics, and immunogenicity of single-dose rFXIII administration to healthy volunteers. *J Thromb Haemost*. 2005; **3**: 922-8.
32. Shemirani AH, Haramura G, Bagoly Z, Muszbek L. The combined effect of fibrin formation and factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma. *Biochim Biophys Acta*. 2006; **1764**: 1420-3.
33. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Protransglutaminase (factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost*. 2001; **86**: 1221-8.
34. Mosesson MW, Siebenlist KR, Hernandez I, Lee KN, Christiansen VJ, McKee PA. Evidence that alpha2-antiplasmin becomes covalently ligated to plasma fibrinogen in the circulation: a new role for plasma factor XIII in fibrinolysis regulation. *J Thromb Haemost*. 2008; **6**: 1565-70.
35. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res*. 1999; **94**: 271-305.
36. 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; **6**: 190-205.
37. Katona E, Penzes K, Molnar E, Muszbek L. Measurement of factor XIII activity in plasma. *Clin Chem Lab Med*. **50**: 1191-202.
38. Katona E, Penzes K, Molnar E, Muszbek L. Measurement of factor XIII activity in plasma. *Clin Chem Lab Med*. 2012; **50**: 1191-202.
39. Koyama T, Koike Y, Toyota S, Miyagi F, Suzuki N, Aoki N. Different NH₂-terminal form with 12 additional residues of alpha 2-plasmin inhibitor from human plasma and culture media of Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; **200**: 417-22.

40. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA. A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood*. 2004; **103**: 3783-8.
41. Sumi Y, Ichikawa Y, Nakamura Y, Miura O, Aoki N. Expression and characterization of pro alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biochem*. 1989; **106**: 703-7.
42. Bangert K, Johnsen AH, Christensen U, Thorsen S. Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem J*. 1993; **291 (Pt 2)**: 623-5.
43. Penzes K, Kover KE, Fazakas F, Haramura G, Muszbek L. Molecular mechanism of the interaction between activated factor XIII and its glutamine donor peptide substrate. *J Thromb Haemost*. 2009; **7**: 627-33.
44. Kimura S, Aoki N. Cross-linking site in fibrinogen for alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biol Chem*. 1986; **261**: 15591-5.
45. Gorman JJ, Folk JE. Structural features of glutamine substrates for human plasma factor XIIIa (activated blood coagulation factor XIII). *J Biol Chem*. 1980; **255**: 419-27.
46. Fickenscher K, Aab A, Stuber W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost*. 1991; **65**: 535-40.
47. Chen R, Doolittle RF. - cross-linking sites in human and bovine fibrin. *Biochemistry*. 1971; **10**: 4487-91.
48. Matsuka YV, Medved LV, Migliorini MM, Ingham KC. Factor XIIIa-catalyzed cross-linking of recombinant alpha C fragments of human fibrinogen. *Biochemistry*. 1996; **35**: 5810-6.
49. Cottrell BA, Strong DD, Watt KW, Doolittle RF. Amino acid sequence studies on the alpha chain of human fibrinogen. Exact location of cross-linking acceptor sites. *Biochemistry*. 1979; **18**: 5405-10.
50. McDonagh RP, McDonagh J, Petersen TE, Thogersen HC, Skorstengaard K, Sottrup-Jensen L, Magnusson S, Dell A, Morris HR. Amino acid sequence of the factor XIIIa acceptor site in bovine plasma fibronectin. *FEBS Lett*. 1981; **127**: 174-8.
51. Skorstengaard K, Halkier T, Hojrup P, Mosher D. Sequence location of a putative transglutaminase cross-linking site in human vitronectin. *FEBS Lett*. 1990; **262**: 269-74.
52. Valnickova Z, Enghild JJ. Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases. Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem*. 1998; **273**: 27220-4.
53. Anderson ET, Fletcher L, Severin A, Murphy E, Baker SM, Matsuka YV. Identification of factor XIIIa-reactive glutamine acceptor and lysine donor sites

- within fibronectin-binding protein (FnbA) from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*. 2004; **43**: 11842-52.
54. Gorman JJ, Folk JE. Structural features of glutamine substrates for transglutaminases. Role of extended interactions in the specificity of human plasma factor XIIIa and of the guinea pig liver enzyme. *J Biol Chem*. 1984; **259**: 9007-10.
 55. Marinescu A, Cleary DB, Littlefield TR, Maurer MC. Structural features associated with the binding of glutamine-containing peptides to Factor XIII. *Arch Biochem Biophys*. 2002; **406**: 9-20.
 56. Cleary DB, Maurer MC. Characterizing the specificity of activated Factor XIII for glutamine-containing substrate peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006; **1764**: 1207-17.
 57. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Shemirani AH, Katona E. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin Thromb Hemost*. **36**: 18-33.
 58. Wenzel E, Christ G. [The formation of ammonia in citrated plasma following recalcification]. *Thromb Diath Haemorrh*. 1969; **22**: 575-6.
 59. Hellstern P, Schilz K, von Blohn G, Wenzel E. Determination of factor XIII activity and of factor XIII inhibitors using an ammonium-sensitive electrode. *Thromb Haemost*. 1983; **50**: 563-6.
 60. Mousli S, Wakid NW. Ammonia production during clot retraction and its use in assay of fibrinolytic activity. *Clin Chem*. 1977; **23**: 1739-43.
 61. Muszbek L, Polgar J, Fesus L. Kinetic determination of blood coagulation Factor XIII in plasma. *Clin Chem*. 1985; **31**: 35-40.
 62. Karpati L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vamosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem*. 2000; **46**: 1946-55.
 63. Lawrie AS, Green L, Mackie IJ, Liesner R, Machin SJ, Peyvandi F. Factor XIII--an under diagnosed deficiency--are we using the right assays? *J Thromb Haemost*. **8**: 2478-82.
 64. Kohler HP, Ariens RA, Whitaker P, Grant PJ. A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb Haemost*. 1998; **80**: 704.
 65. O'Shannessy DJ. Antibodies biotinylated via sugar moieties. *Methods Enzymol*. 1990; **184**: 162-6.
 66. Chung SI, Lewis MS, Folk JE. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. *J Biol Chem*. 1974; **249**: 940-50.

67. Lorand L, Jeong JM, Radek JT, Wilson J. Human plasma factor XIII: subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol.* 1993; **222**: 22-35.
68. Katona E, Haramura G, Karpati L, Fachet J, Muszbek L. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost.* 2000; **83**: 268-73.
69. Katona EE, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods.* 2001; **258**: 127-35.
70. Orosz ZZ, Katona E, Facsko A, Modis L, Muszbek L, Berta A. Factor XIII subunits in human tears; their highly elevated levels following penetrating keratoplasty. *Clin Chim Acta.* 2011; **412**: 271-6.
71. Csapo A, Katona E, Szűcs G, Haramura G, Muszbek L. FXIII in cerebrospinal fluid. *J Thromb Haemost.* 2009; 7(Suppl 2): 386.
72. Bajaj SP, Mann KG. Simultaneous purification of bovine prothrombin and factor X. Activation of prothrombin by trypsin-activated factor X. *J Biol Chem.* 1973; **248**: 7729-41.
73. Workman EF, Jr., Lundblad RL. On the preparation of bovine alpha-thrombin. *Thromb Haemost.* 1978; **39**: 193-200.
74. Merrifield B. Solid phase synthesis. *Science.* 1986; **232**: 341-7.
75. Fulton DB, Ni F. ROESY with water flip back for high-field NMR of biomolecules. *J Magn Reson.* 1997; **129**: 93-7.
76. Mayer M, Meyer B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc.* 2001; **123**: 6108-17.
77. Wuthrich K. NMR - this other method for protein and nucleic acid structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1995; **51**: 249-70.
78. Betenbaugh MJ, Tomiya N, Narang S, Hsu JT, Lee YC. Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems. *Curr Opin Struct Biol.* 2004; **14**: 601-6.
79. Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj J.* 2004; **21**: 343-60.
80. Blomback B. Fibrinogen and fibrin--proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* 1996; **83**: 1-75.
81. Sakata Y, Aoki N. Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest.* 1982; **69**: 536-42.

82. Tamaki T, Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin catalyzed by activated fibrin-stabilizing factor. *J Biol Chem.* 1982; **257**: 14767-72.
83. Lee KN, Lee CS, Tae WC, Jackson KW, Christiansen VJ, McKee PA. Cross-linking of wild-type and mutant alpha 2-antiplasmins to fibrin by activated factor XIII and by a tissue transglutaminase. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 37382-9.
84. Holmes WE, Lijnen HR, Collen D. Characterization of recombinant human alpha 2-antiplasmin and of mutants obtained by site-directed mutagenesis of the reactive site. *Biochemistry.* 1987; **26**: 5133-40.
85. Ichinose A, Tamaki T, Aoki N. Factor XIII-mediated cross-linking of NH₂-terminal peptide of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin. *FEBS Lett.* 1983; **153**: 369-71.
86. Sugimura Y, Hosono M, Wada F, Yoshimura T, Maki M, Hitomi K. Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIII_A. *J Biol Chem.* 2006; **281**: 17699-706.

11. Tárgyszavak

A véralvadás XIII-as faktora

α_2 plazmin inhibitor

Komplex képződés

Kölcsönhatás

Szubsztrát

Felszíni plazmon rezonancia

Kinetikai paraméterek

NMR

12. Keywords

Factor XIII of blood coagulation

α_2 plasmin inhibitor

Complex formation

Interaction

Substrate

Surface plasmon resonance

Kinetic parameters

NMR

13. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Prof. Dr. Muszbek László akadémikus úrnak, hogy témavezetőként felkarolt, munkámat irányította, megteremtette a kutatás feltételeit, kitüntetett figyelmével és végtelen türelmével. Köszönöm, hogy követendő példát adott számomra munkaszeretetből, és a maximális igényességre való törekvésből.

Dr. Bereczky Zsuzsanna egyetemi docensnek, a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék igazgatójának, hogy biztosított a támogatásáról.

Külön köszönöm Prof. Dr. Kövér Katalin akadémikus asszonynak, hogy időt és fáradságot nem kímélve, nagy lelkesedéssel végezte el az NMR kísérleteket.

Dr. Katona Éva tudományos főmunkatársnak hálásán köszönöm a sok tanácsot és a közös munkát, Dr. Bagoly Zsuzsa tudományos munkatársnak pedig az inspiráló jelenlétét és kiváló ötleteit.

Köszönöm Haramura Gizella vezető analitikus és Molnár Éva analitikus hasznos észrevételeit, a felmerülő problémák megoldásában nyújtott segítségüket, és nagy szakmai hozzáértésüket, ill. Kun Mária PhD hallgatónak a Biacore mérésekben való közreműködést.

Köszönet illeti Dr. Kárpáti Leventét, akitől elsajátítottam a Merrifield-féle szilárd fázisú peptidszintézis technikáját.

A Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék csapatmunkája – beleértve a gazdasági és adminisztratív munkatársak teendőit – nélkül a bemutatott munka nem valósulhatott volna meg.

Hálámat szeretném kifejezni Családomnak a támogató háttér biztosításáért, drága Gyermekeimnek az erőt adó szeretetükért és Barátaimnak a tőlük kapott biztatásért.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatások megvalósítását a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 és az OTKA K109543 pályázati támogatások tették lehetővé.

14. Függelék

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



Iktatószám: DEENKÉTK/150/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Péntes-Daku Krisztina

Neptun kód: CW2AEH

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10036832

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Katona, É., **Péntes, K.**, Csapó, A., Fazakas, F., Udvardy, M.L., Bagoly, Z., Orosz, Z.Z., Muszbek, L.: Interaction of factor XIII subunits.
Blood. 123 (11), 1757-1763, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-10-533596>
IF:9.06 (2012)
2. Katona, É., **Péntes, K.**, Molnár, É., Muszbek, L.: Measurement of factor XIII activity in plasma.
Clin. Chem. Lab. Med. 50 (7), 1191-1202, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/ccim-2011-0730>
IF:3.009
3. **Péntes, K.**, Kövér, K.E., Fazakas, F., Haramura, G., Muszbek, L.: Molecular mechanism of the interaction between activated factor XIII and its glutamine donor peptide substrate.
J. Thromb. Haemost. 7 (4), 627-633, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03291.x>
IF:6.069





További Közlemények

4. Losonczy, G., Fazakas, F., Pfliegler, G., Komáromi, I., Balázs, E., **Pénzes, K.**, Berta, A.: Three novel germ-line VHL mutations in Hungarian von Hippel-Lindau patients, including a nonsense mutation in a fifteen-year-old boy with renal cell carcinoma.
BMC Med. Genet. 14 (3), 1-8, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-14-3>
IF:2.536 (2012)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20.674

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
18.138

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.06.20

