

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A XIII-AS VÉRALVADÁSI FAKTOR ALEGYSÉGEK EGYMÁSSAL,
ÉS GLUTAMIN TARTALMÚ SZUBSZTRÁTOKKAL VALÓ
KÖLCSÖNHATÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA**

Pénzes-Daku Krisztina

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2014

A XIII-AS VÉRALVADÁSI FAKTOR ALEGYSÉGEK EGYMÁSSAL, ÉS GLUTAMIN TARTALMÚ SZUBSZTRÁTOKKAL VALÓ KÖLCSÖNHATÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Pénzes-Daku Krisztina

okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris betegségek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Machovich Raymund, az MTA doktora
Dr. Csósz Éva, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Gyermekgyógyászati Intézet könyvtára
2014. szeptember 11. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Ajzner Éva, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Machovich Raymund, az MTA doktora
Dr. Csósz Éva, PhD
Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Ajzner Éva, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2014. szeptember 11. 13:00 óra

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy különleges véralvadási faktor, ugyanis ellentétben a többi zimogén alvadási faktoral nem egy proteolitikus enzim prekuzora, 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.

A plazma FXIII (pFXIII) egy heterotetramer (FXIII- A_2B_2), mely a két potenciálisan aktív A alegységből (FXIII- A_2) és a két hordozó/gátló B alegységből (FXIII- B_2) áll. A pFXIII molekulatömege 326 kD, plazma koncentrációja 14-28 mg/L.

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. A Ca^{2+} , Sr^{2+} és Yb^{3+} ionokkal kristályosított FXIII- A_2 röntgen szerkezetvizsgálati eredményei szintén egy elsődleges kation kötőhelyet azonosítottak alegységenként. A 0,1 mM K_d értéket egyensúlyi dialízis, ill. intrinsic fluoreszcens vizsgálatokkal állapították meg, míg ^{43}Ca NMR titrálással 0,51 mM-os K_d értéket kaptak. Ezek az eredmények felvetik egy alacsony affinitású, másodlagos Ca^{2+} kötőhely létezését. A röntgen krisztallográfia és a Ca^{2+} mutáns FXIII- A_2 -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. 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. In vitro a cFXIII trombinnal és Ca^{2+} -mal való aktiválódása ugyanúgy zajlik, mint a pFXIII-é, eltekintve az FXIII-B disszociációjától. Extrém magas Ca^{2+} koncentrációnál (≥ 100 mM) az A_2B_2 komplex képes disszociálni az előzetes proteolitikus hasítás nélkül is, és a nem-trunkált FXIII- A_2 aktív transzglutaminázzá alakul (FXIII- A_2°). Az alacsony affinitású Ca^{2+} kötőhelyek telítődése szerepet játszhat ebben a folyamatban. A cFXIII és a pFXIII nem-proteolitikus aktiválódása alapvetően különbözik. A cFXIII esetében az alacsony Ca^{2+} koncentráció elégséges a cFXIII lassú progresszív aktivációjának előidézéséhez fiziológias körülmények között; az ionerő növelésével az aktiváció sebessége nagy mértékben nő. FXIII-B-vel való komplex kialakítása teljesen megszünteti ezt az aktivációs folyamatot. Valószínűsíthető, hogy trombocitákban és monocitákban a cFXIII fiziológias aktivációs mechanizmusa a nem-proteolitikus útvonal.

Az FXIII-B szignifikánsan meghosszabbítja a katalitikus alegység élettartamát a keringésben, és megóvja 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 Ca^{2+} jelenlététől független. A plazma fibrinogén 15%-át kitevő fibrinogén 2 ($\gamma\text{A}\gamma'$ fibrinogén) γ' lánc a FXIII fő kötőhelye. A kötődés az FXIII-B-n keresztül jön létre.

Az FXIII nem csak a plazmában, hanem trombociták és monociták/makrofágok citoplazmájában is előfordul FXIII- A_2 homodimerként (cFXIII).

Az FXIII-A-t csontvelő eredetű sejtek, míg az FXIII-B-t a hepatociták szintetizálják. A két típusú alegység plazmában képez komplexet; az FXIII-B feleslegben található, kb. 50%-a szabad formában kering, nagy valószínűséggel dimerként. A komplex képződésnek fontos szerepe van a normál hemosztázis fenntartásában. Az FXIII-B fő feladata az FXIII-A élettartamának meghosszabbítása a keringésben. Az FXIII-B ezen szerepe összefüggésbe hozható az FXIII- A_2 lassú progresszív aktivációjának megakadályozásával, ami FXIII-B hiányban a plazmában bekövetkezne. 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.

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 ELISA technikával vizsgálták az FXIII alegységeinek kötődési kinetikáját, és 4×10^{-7} M egyensúlyi disszociációs állandót (K_d) állapítottak meg. Komanasin és munkatársai 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. 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. Tény, hogy az rFXIII-A₂ hosszú idejű túlélése (félélet idő 9-14 nap) 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. Bár az epitópot nem identifikálták, 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.

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. 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.

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

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 α_2 PI-t.

Kémiaiailag az FXIIIa egy módosított két lépéses acil transzfer (transzglutamináz) reakciót katalizál, 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 egyszerűsített sémáját összefoglaló cikkünkben közöltük. A felszabaduló ammónia, a jelölt amin inkorporációja egy fehérjébe, ill. a keresztkötött termék meghatározása mind alkalmas az FXIII aktivitásának mérésére.

A XIII-as faktor szubsztrátjai

Az FXIIIa elsődleges fiziológiás szubsztrátjai a fibrin α - és γ -láncok, az α_2 PI és a fibronektin. 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. 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). Kizárólag az utóbb említett trunkált izoforma hatékony acildonor szubsztrát az FXIIIa által katalizált keresztkötési reakcióban. Ezenkívül több más fehérjéről bizonyosodott be, hogy szubsztrát glutamin oldallánccal járul hozzá az FXIIIa által katalizált transzglutamináz reakcióhoz. Néhány esetben az acil donor glutamint és a környezetében lévő aminosavakat sikeresen azonosították a fehérje elsődleges szerkezetében. 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 és az N1- α_2 PI reaktív glutaminja körüli szekvenciát tartalmazó szintetikus oligopeptidek felhasználásával az FXIIIa szubsztrátokkal történő kötődési mechanizmusát.

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.

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 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. Ebben az esetben az ammóniát rekalifikált, megalvasztott plazmában határozták meg. Más korábbi módszerek ammónia szelektív elektróddal, vagy módosított Berthelot reakcióval 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. 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, defoszforylált 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. 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, amin szubsztrátként és glicin-etil észtert használtak. Mindkét módosított teszt kereskedelmi forgalomban elérhető. A Fickenscher és mtsai által módosított tesztet “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. E tesztek széles körben használják az FXIII deficiencia szűrésére. Egyik tesztet sem befolyásolja az FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa. Összehasonlítottuk a Berichrom és a TECHNOCHROM tesztek (a REA-chrom teszt teljes mértékben megegyezik a TECHNOCHROM tesztel). 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) tesztben használt dodekapeptid szekvenciája az N1- α_2 PI N-terminális szekvenciájával. A Berichrom tesztben NADH-t, a TECHNOCHROM tesztben NADPH-t használnak az indikátor reakcióban.

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 meghatároztuk a kölcsönhatás kinetikai paramétereit és a két módszerrel kapott értékeket összehasonlítottuk.

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 kereszt kötése 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 kémiai 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 fiziológias pH-n kölcsönhatásba lépnek az FXIIIa-val.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az FXIII alegységek kölcsönhatásának vizsgálatánál alkalmazott anyagok és módszerek

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-tól (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. A CNBr-aktivált Sepharose 4B gél és a CM5 szenzor chippek a GE Healthcare-től származnak.

FXIII preparátumok és FXIII antigén meghatározások

A tisztított humán pFXIII-at és a plazma FXIII-B₂-t (pFXIII-B₂) egészséges véradóktól gyűjtött humán plazmából állítottuk elő. A cFXIII-t humán placentából preparáltuk. 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.

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). Az kölcsönhatások tanulmányozásához 10 µL/min-es, míg a regeneráláshoz 4 µL/min-es áramlási sebességet állítottunk be. Az asszociációs sebességi konstanst (k_a), a disszociációs sebességi konstanst (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.

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 vályúkba 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.

A testfolyadékokban keringő szabad FXIII-A₂ mennyiségének kiszámítása

Wilkinson KD és munkatársai 2004-es közleményükben szereplő képlet felhasználásával kalkuláltuk a szabad FXIII-A₂ mennyiségét.

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

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.

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

Az immundepléción 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 jódatamid 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 A α -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 Ca²⁺ általi aktiválódása eredményeként keletkezett trombint 10 U/mL hirudinnal gátoltuk.

Az FXIII és szubsztrátjai kölcsönhatásának vizsgálatánál alkalmazott anyagok és módszerek

Fehérjék és reagensek

Az ezen kísérletekhez használt tisztított plazma FXIII és a szarvasmarha trombin 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 jódacetamidot 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 ₂PI(1–12) dodekapeptidet, és 19 kémiai mutánsát Merrifield-féle szilárd fázisú szintézissel állítottuk elő. A minimum 95%-osra becsült peptidek tisztaságának vizsgálatát analitikai reverz fázisú HPLC-vel állapítottuk meg. A peptidek molekulatömegének meghatározása Voyager DESTROMATRIX-mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció repülési idő (MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) analizátorral (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) történt.

Kinetikus FXIIIa tesztek

A tisztított plazma FXIII aktiválása és az FXIIIa aktivitásának meghatározása a korábban az intézetünkben kifejlesztett egy lépéses UV kinetikai teszttel történt, a méréseket Cobas Mira (Roche, Meylan, France) analizátorral végeztük. A módszer az

FXIIIa hatására felszabaduló ammónia enzimatikus, kinetikus spektrofotometriás mérésén alapszik. Az FXIII trombin és Ca^{2+} hatására aktiválódik. Az aktív transzglutamináz FXIIIa az amin szubsztrát glicin-etilészter (Gly-O-ET) és a specifikus glutamin donor $\text{N1}\alpha_2\text{PI}(1-12)$ peptid szubsztrát izopeptid kötéssel történő összekapcsolódását katalizálja. A reakció során ammónia szabadul fel. A keletkezett ammónia mennyiségét GIDH által katalizált, $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ átalakulással járó indikátor reakcióban fotometriásan mérjük. A NADPH fogyásának sebessége, azaz 340 nm-en mért abszorbanciájának csökkenése arányos az FXIII aktivitással. A $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ a mérés 5-10 percében lineáris. Az első 5 percben (lag fázis) történik meg az endogén ammónia konzumpciója 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 GIDH-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.

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 makroszkópiusan 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.

500 μL 90% H_2O /10% D_2O 22 mM borát pufferben 2 mM $\text{N1-}\alpha_2\text{PI(1-12)}$ vagy $\text{N1-}\alpha_2\text{PI(1-12;2E)}$ 500 MHz-es $^1\text{H-NMR}$ 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 $^1\text{H NMR}$ spektrumban a ligandumhoz egy jelsorozat tartozik. Az STD mérésnél a fehérje proton-átmeneteit szelektíven besugározzuk (telítjük). Gyenge kölcsönhatás esetén a gyors csere miatt a telítés hatása átterjed a szabad ligandum molekulákra, és azok proton-jelének intenzitás 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 $^1\text{H-NMR}$ spektrumokat 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 $^1\text{H-NMR}$ spektrumokat 30 perces intervallumokban rögzítettük. Az $\text{N1-}\alpha_2\text{PI(1-12)}$ peptid teljes $^1\text{H NMR}$ jelhozzárendelését a két dimenziós TOCSY és NOESY kísérleteken alapuló Wütrich-féle stratégiát alkalmazva végeztük el.

A szubsztrát-termék átalakulás vizsgálata tandem tömeg spektrometriával

Az FXIIIa által katalizált N1- α_2 PI(1-12) szubsztrát N1- α_2 PI(1-12; 2E) terméké váló átalakulását tandem tömegspektrometriával követtük nyomon az API 2000 típusú készülékkel (MDS SCIEX, Concord, Kanada) többszörös reakció ellenőrző eljárást alkalmazva optimalizált körülmények alatt. A kísérleti körülmények azonosak voltak az STD NMR vizsgálatok során alkalmazottakkal. A transzglutamináz reakciót előre definiált időközökben leállítottuk 1 mM jódacetamid hozzáadásával, és a fragmentáció alatt kialakult, az N1- α_2 PI(1-12) első két aminosavát tartalmazó b2 fragmentet ($m/z = 243,2$) mértük.

EREDMÉNYEK

Az FXIII alegységek kölcsönhatásának vizsgálata

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 és az ELISA vizsgálatokkal kapott kötődési görbe szemlélteti az rFXIII-A₂ plazmából származó FXIII-B₂-hez történő kötődését. 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. 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. Az FXIII-B N-glikán reziduumaiban lévő különbség az alacsonyabb molekulatömegben nyilvánul meg, ez azonban nem befolyásolta szignifikánsan az FXIII-A₂-vel való kölcsönhatását.

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. 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 koncentrációja 0,004%-ának. Ezzel a módszerrel az immundepletált plazmában FXIII-A₂B₂ nem volt kimutatható. Az immundepletált plazmákban $1,06 \pm 0,49$ nM szabad FXIII-A₂-t mértünk, azaz a plazmában található FXIII-A₂ $1,38 \pm 0,55\%$ -a szabad formában kering. Ahhoz, hogy ellenőrizzük a megállapított K_d validitását, a

kalkulált és a mért szabad FXIII-A₂ értékeket egyaránt összehasonlítottuk cerebrospinalis 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.

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. A nem-depletált plazmában (P) a fibrin γ -láncai teljes dimerizációt, míg az α -lánc polimerek (α_P) erős keresztkötés kialakulását mutatták. 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. 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.

Az aktivált FXIII és szubsztrátjai kölcsönhatásának vizsgálata

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

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

Amint azt már korábban közölték, 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. 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 sugallják, 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.

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, ám a pH 7,4-re és a hőmérséklet 310 K-re növelésekor kiszélesedtek, ami a víz protonokkal egy felgyorsult kémiai kicserélődést jelez. Az oldószertől 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 $^1\text{H-NMR}$ spektrumát összehasonlítva az

FXIIIa-val komplexet alkotó peptid spektrumával - ugyanazon körülményeket alkalmazva (pH=7,4, T=310 K) - 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 fiziológias 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.

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

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 enzimatis 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 enzimatis 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 e 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.

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 mágneszettség 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 ^1H -NMR módszerrel történő tanulmányozása során detektált STD csúcsok a C-terminális leucinok metil csoportjaitól származnak. 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 spektrum az első fél órában rögzített adatokat jelenti, mely alatt a szubsztrát koncentrációja – ahogy azt tandem tömegspektrometriával is meghatároztuk – 20-ról

2 mM-re 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.

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. 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 által 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. 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.

Az N1- α_2 -PI egy kiváló glutamin, ám nem lizin donor szubsztrátja az FXIIIa-nak. A véralvadás folyamán az FXIIIa gyorsan keresztköti az 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. 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. 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. A propeptid jelenléte miatt az M1- α_2 PI igen gyenge szubsztrátja az FXIIIa-nak. 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.

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. 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. 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 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 enzimikus aktivitást. Egy korábbi kutatásban 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. "Fág-display" technikával létrehozott peptid könyvtár segítségével több olyan FXIIIa szubsztrát volt azonosítható, mely ezen pozíciójában glutamin reziduum található. 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 hidrofíl karakterűnek bizonyult. Összefoglalva, az Asn1-enk nagy szerepe van az N1- α_2 PI(1-12) FXIIIa-hoz való kötődésében, és a Gln4, ill. talán a Glu3 oldalláncaival együtt direkt módon vesz részt a reaktív glutamin aktív helyhez való kötődésében a szubsztrát-kötő üregben.

Marinescu és munkatársai 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.



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

Jelölt: Péntes-Daku Krisztina
Neptun kód: CW2AEH
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
Mtm 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/cclm-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



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.