

Kutatási programunk fő célkitűzése, az α_2 -plazmin inhibitornak (α_2 PI) és az aktivált XIII-as faktor (FXIIIa) közötti interakció felderítése az α_2 PI N-terminális szakaszának megfelelő különböző hosszúságú peptidek szubsztrát esetleg inhibitor tulajdonságainak tanulmányozásával.

A kutatási program első szakaszában olyan oligopeptid aktivált XIII-as faktor szubsztrátokat kerestünk és szintetizáltunk, melyek – az általunk kialakított FXIII meghatározásban jelenleg használt dodekapeptidnél – jobb katalitikus paraméterekkel rendelkeznek és segítségével a módszer érzékenysége tovább fokozható.

A program második felében olyan oligopeptid szubsztrátokat kerestünk és szintetizáltunk, melyek az aktivált XIII-as faktort gátolják. Csak azok a peptidek jöhettek számításba, amelyeknek elhanyagolhatóan kicsi a szubsztrát aktivitása, de elég jól gátolják az aktivált FXIII-as faktort.

A véralvadás plazma XIII-as faktora egy A_2B_2 alegység összetételű protranszglutamináz, ahol A a potenciálisan aktív, B a gátló/stabilizáló alegységet jelenti. A FXIII a véralvadási kaszkád utolsó szakaszában aktiválódik trombin és Ca^{2+} együttes hatására (FXIIIa). Az FXIIIa egy acil-transzfer reakciót katalizál, melyben egy peptidláncban található glutamin γ -karboxamid-csoportja reakcióba lép és összekapcsolódik egy másik peptidláncban található lizin ϵ -amino-csoportjával ún. izopeptid kötéssel keresztül. A reakció során ammónia szabadul fel. A plazma FXIII fő fiziológiai funkciója a fibrinláncok keresztükötése és az α_2 -plazmin inhibitornak, a fibrinolitikus rendszer elsődleges inhibitorának a fibrin polimerekhez való kovalens kötése.

I, A FXIII plazmaszintjének a meghatározása rutin diagnosztikai laboratóriumi körülmények között sokáig megoldatlan volt. Intézetünkben korábban egy, a transzglutamináz reakció során felszabaduló ammónia monitorozásán alapuló UV-kinetikus FXIII meghatározást fejlesztettek ki. Mi ezt a módszert fejlesztettük tovább. Egy új glutamin donor dodekapeptid szubsztrátot vezettünk be: Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys, mely megfelel az α_2 PI N-terminális szekvenciájának és a 2-es pozícióban lévő Gln az acil donor transzglutamináz szubsztrát. Az új szubsztrát bevezetése és a komponensek koncentrációjának az optimalizációja következtében a módszer érzékenysége jelentősen megnőtt.

Mivel az általunk bevezetett új dodekapeptid szubsztrátot elég magas koncentrációban kell használni az assayben és a vegyület különösen nagyobb mennyiségben történő előállítására igen

költséges, ezért célszerűnek mutatkozott egy rövidebb szekvenciájú és kisebb koncentrációban is magas aktivitást mutató szubsztrát előállítás.

Ezt kétféle módon próbáltuk megvalósítani:

1, A dodekapeptid szubsztrát szekvenciájából kiindulva: Asn-Gln(2-es pozícióban)-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys szisztematikusan, egyesével lecsökkentettük a szubsztrát tagszámát egészen négy aminosavig (Asn-Gln-Glu-Gln) és megszintetizáltuk, majd nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással megtisztítottuk az egyre rövidebb oligopeptideket. Az általunk kialakított FXIII meghatározással megmértük a peptid aktivitását és meghatároztuk a telítési görbéből és a Lineweaver-Burk-féle egyenesből a K_M és a V_{max} értékeket. Az eredmények alapján a tizenegytagú oligopeptid majdnem olyan jó enzimkinetikai paraméterekkel bír, mint a használatban lévő dodekapeptid, míg a tíztagú szubsztrát jobb és erősebb kötődést, de valamivel kisebb aktivitást mutatott.

A kilenctagúaktól rövidebbek egészen a négy aminosavig lényegesen kisebb enzimaktivitást és gyengébb kötődést adtak.

N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K	α_2 PI(1-12)
N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L	α_2 PI(1-11)
N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L	α_2 PI(1-10)
N-Q-E-Q-V-S-P-L-T	α_2 PI(1-9)
N-Q-E-Q-V-S-P-L	α_2 PI(1-8)
N-Q-E-Q-V-S-P	α_2 PI(1-7)
N-Q-E-Q-V-S	α_2 PI(1-6)
N-Q-E-Q-V	α_2 PI(1-5)
N-Q-E-Q	α_2 PI(1-4)

2, A különböző tagszámú és szubsztrátként még jól használható – a mi esetünkben ez a tíz és tizenegytagúakra vonatkozik – oligopeptidek bizonyos aminosavait szisztematikusan más aminosavakkal cseréltük ki. Ezek az aminosavcserék a Leu-Gly és a Ser-Gly voltak a 6-os, 8-as, 10-es és 11-es pozícióban: Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser(6/Gly)-Pro-Leu(8/Gly)-Thr-Leu(10/Gly)-Leu(11Gly). Az adott peptidben egyszerre mindig csak egy aminosavat cseréltünk ki, egyidejűleg többet nem. A kapott eredmények alapján az a tíztagú peptid bizonyult a legmegfelelőbb szubsztrátnak, amelyiknek a 10-es pozíciójában a Leu helyett Gly van (Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Gly).

N-Q-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-G	α_2 PI(1-10G)
-------------------------	----------------------

II, A továbbiakban a 2-es pozícióban lévő Gln-t Asn-el helyettesítettük, hogy elhanyagolhatóan kicsi szubsztrát aktivitású vegyületet kapjunk. Sajnos ezek a Gln kötőhely hiányában nem tudnak erősen hozzákötődni a FXIII-as enzimhez.

N-Q-E-N-V-S-P-L-T-L-L-K α_2 PI(1-12;4N)

N-N-E-Q-V-S-P-L-T-L-L-K α_2 PI(1-12;2N)

N-N-E-N-V-S-P-L-T-L-L-K α_2 PI(1-12;2,4N)

III, A szintetikus és kísérletes munka mellett molekulamodellézési programokkal különböző tagszámú és szekvenciájú oligopeptid szubsztrátokat dockoltunk az enzim aktív formájához és meghatároztuk a kötődés relatív erősségét. A fent említett és kipróbált oligopeptideken túl-amelyek a FXIII természetes szubsztrátjának az α_2 PI-nek a Gln kötőhelyét tartalmazó molekularészletei-más természetes szubsztrátok Gln kötőhelyét tartalmazó molekularészleteire is végeztünk számításokat (β kazein: Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Gly, α fibrin: Gly-Ser-Thr-Gly-Gln-Trp-His-Ser-Glu-Ser és Ser-Thr-Gly-Asn-Gln-Asn-Pro-Gly-Ser-Pro). Megpróbáltuk azokat az aminosavakat azonosítani, amelyek lényeges szerepet játszhatnak az enzim-szubsztrát kölcsönhatás kialakításában.

Sokat gondolkoztunk azon, hogy az utolsó helyen szereplő lizinnek mi lehet a szerepe. Az a tény, hogy a lizin cseréje, pl. leucinra rontja a szubsztrát tulajdonságot azt igazolta, hogy a pozitív töltés valamilyen szerepet játszhat a molekula stabilizálásában (nevezetesen arra gondolunk, hogy erősebben be tud kötődni a szubsztrát az enzim aktív centrumába). Ezt bizonyítja az is, hogy a lizin argininnel való helyettesítése szintén nagyon jó szubsztrátot eredményezett. A pozitív töltésű oldalláncvég feltételezésünk szerint kölcsönhatásba lép a FXIII felületén található negatív töltésű csoportokkal és ez egy stabilabb enzim-szubsztrát kölcsönhatást eredményez.

A számítások azt is igazolták, hogy a Gln-Val-Ser-Pro molekularészlet egy olyan egyedi reakció/kötőfelületet biztosít a FXIII aktív centruma közelében, amely elősegíti a szubsztrát és az enzim kölcsönhatását.

Valamint az eredmények alapján az is egyértelmű, hogy a 2-es pozíciójú Gln nélkülözhetetlen.

A fenti három szempontot figyelembe véve szintetizáltuk meg a következő vegyületet:

Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Arg

N-Q-E-Q-V-S-P-R α_2 PI(1-8R)

Ez a vegyület azon túl, hogy erősen kötődő szubsztrát, közel 25%-os gátlást mutatott.

A megszintetizált oligopeptidek szubsztrátként való tesztelése

A megszintetizált oligopeptidek mindegyikének vizsgáltuk a szubsztrát tulajdonságát, melyhez az adott peptidet 8 különböző koncentrációban (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0 mM) alkalmaztuk a detektáló oldatokban. Minden egyes kísérletnél kontrollként használtuk az α_2 PI(1-12) peptidet, melyet a vizsgálandó peptidhez hasonlóan a fent leírt koncentrációkban alkalmaztunk a detektáló oldatokban. Vak értékek a peptidszubsztrátot nem tartalmazó reagenssel kapott eredményeket tekintettük. Az egyes, szubsztrát tulajdonságot mutató peptidekkel kapott FXIII aktivitás értékeket (U/L) az 1. táblázat mutatja (a táblázatban szereplő értékek a vak értékekkel korrigáltak). A következő peptidekkel nem kaptunk enzim aktivitást: α_2 PI(1-12;2N), α_2 PI(1-12;2,4N), α_2 PI(1-6), α_2 PI(1-5), α_2 PI(1-4).

[peptid] (mM)	FXIIIa aktivitás (U/L)						
	α_2 PI (1-12)	α_2 PI (1-12;4N)	α_2 PI (1-11)	α_2 PI (1-10)	α_2 PI (1-9)	α_2 PI (1-8)	α_2 PI (1-7)
0.0625	1.2	0	6.4	0	1.2	0.6	0
0.125	15.9	3	10.3	2.3	2.5	1.2	0
0.25	39	17.5	20.5	10.1	3.9	1.7	0
0.5	71.7	35.8	33.4	21.8	7.7	3.8	0
1	103.2	62.6	54.3	30.8	15.3	9.2	4.2
2	131.8	85.5	76.2	37.9	24.2	18.7	14.9
4	139.7	101.4	100.2	58.2	42	32.1	30.5

1. táblázat. Szubsztrátként tesztelt peptidekkel kapott FXIII aktivitás értékek

Felvettük az egyes oligopeptidek - mint potenciális FXIIIa szubsztrátok-telítési görbéit és ezekből kiszámítottuk az egyes peptidekre jellemző enzimkinetikai paramétereiket (2. táblázat), melynek alapját az eredmények Lineweaver-Burk szerinti ábrázolása adta.

	Vmax (mmol s ⁻¹)	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (s ⁻¹ mM ⁻¹)
α_2 PI (1-12)	172,4	0,62	431	695,1
α_2 PI (1-12; 4N)	163,9	1,48	409,7	276,8
α_2 PI (1-11)	142,8	1,44	365,8	254,0
α_2 PI (1-10)	86,2	1,64	215,5	131,4
α_2 PI (1-9)	43,1	1,93	110,4	57,2

α_2 PI (1-8)	34,6	3,40	88,6	26,1
α_2 PI (1-7)	18,9	4,89	48,4	9,9

2. táblázat. Az α_2 PI szubsztrát analógokkal mért enzimkinetikai paraméterek.

A 2. táblázat adataiból megállapítható, hogy a peptidlánc hosszának csökkentése a katalitikus efficencia (K_{cat}/K_m) drasztikus csökkenését eredményezi. Az N-terminális Asn hiánya jelentős mértékben befolyásolja a reakciót, hasonlóképpen a 4-es pozíciójú Gln Asn-ra történő cserélése is, azaz ezek az aminosavak nagy szerepet játszanak a hatékony enzim-szubsztrát kapcsolat létrejöttében.

A megszintetizált oligopeptidek gátlószerként való tesztelése

Az enzim aktivitást nem mutató peptidek esetleges gátló hatását is teszteltük. A peptidek szubsztrátként való teszteléshez hasonlóan különböző szubsztrát koncentrációjú (4, 2, 1, 0.5, 0.25, és 0 mM) és állandó gátlópeptid koncentrációjú (4 mM) detektáló oldatokat készítettünk. Tehát a detektáló oldat 2 peptidet tartalmazott: az egyik a szubsztrát, a másik a feltételezett gátló hatású peptid. Ezekhez a kísérletekhez minden esetben az α_2 PI(1-12) peptidet alkalmaztunk szubsztrátként. Kontroll mérésekhez különböző α_2 PI(1-12) szubsztrát koncentrációjú (4, 2, 1, 0.5, 0.25, és 0 mM) detektáló oldatokat használtunk. Vak értékeknek ebben az esetben is a peptidszubsztrátot nem tartalmazó reagenssel kapott eredményeket tekintettük.

A tesztelt peptidek nagy része nem mutatott számottevő inhibíciós hatást : α_2 PI(1-12;2N), α_2 PI(1-12;2,4N), α_2 PI(1-6), α_2 PI(1-5), α_2 PI(1-4), stb.

Két esetben tapasztaltunk gátló tulajdonságot. Az α_2 PI(1-10G) (Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Gly) peptiddel végzett kísérletekben a kontroll FXIII aktivitás (U/L) értékeihez viszonyítva durván 20 %-kal mértünk alacsonyabb aktivitásokat. Ennek eredményeit a vak értékkel korrigált FXIII aktivitás (U/L) értékeket tartalmazó 3. táblázat mutatja. Ezen eredmények Lineweaver-Burk szerinti ábrázolásából megállapítható, hogy a reverzibilis enzimgátlások közül az un. nem kompetitív típusról van szó, mely esetében nincs versengés a szubsztrát és az inhibitor között az aktív helyhez való kötődés folyamatában. Az inhibitor feltételezhetően nem az aktív helyhez kötődik. A gátlószer mind a szabad enzimmel, mind az enzim-szubsztrát komplexszel kapcsolódhat. Ebben az esetben az inhibitor nem változtatja meg a K_m értékét, de csökkenti az elérhető maximális reakciósebességet (V_{max}).

α_2 PI (1-12) koncentráció (mM)	FXIIIa aktivitás (U/L)	
	α_2 PI (1-12)	α_2 PI (1-12) + 4mM (1-10G)
0.25	45.2	32.3
0.5	75.8	51.3
1	99.1	66.8
2	102.5	82.7
4	113.2	87.8

3. táblázat. A gátlószerként tesztelt α_2 PI(1-10G) peptiddel kapott FXIII aktivitás értékek

Az α_2 PI(1-8R) (Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Arg) peptiddel végzett kísérletekben a kontroll FXIII aktivitás (U/L) értékeihez viszonyítva szintén kb. 20 %-os aktivitás csökkenést észleltünk. Ennek eredményeit a vak értékkel korrigált FXIII aktivitás (U/L) értékeket tartalmazó 4. táblázat mutatja. Ezen eredmények Lineweaver-Burk szerinti ábrázolása a reverzibilis enzimgátlások közül az un. unkompetitív típusú gátlásra utal, amikor az inhibitor csak az enzim-szubsztrát komplexszhez kötődik, megakadályozva a reakció végbemenetelét. Ebben az esetben mind a K_m , mind a V_{max} értéke csökken.

α_2 PI (1-12) koncentráció a detektáló oldatban (mM)	FXIIIa aktivitás (U/L)	
	α_2 PI (1-12)	α_2 PI (1-12) + 4mM (1-8R)
0.5	38.4	35.3
1	59.8	53
2	65.3	61.4
4	94.1	75.1
8	102.1	82.5

4. táblázat. A gátlószerként tesztelt α_2 PI(1-8R) peptiddel kapott FXIII aktivitás értékek

Számos enzim vizsgálatok tapasztalták, hogy ha a szubsztrát az optimálisnál nagyobb koncentrációban van jelen, akkor a reakció sebessége nem marad állandó, hanem csökkenni fog. Ez a jelenség a szubsztrát felesleg-gátlás. Ez alapján azt mondhatjuk, hogy addig optimális a szubsztrát koncentráció, amíg nem észlelhető gátlás. Ezt a jelenséget

tapasztaltuk, amikor megemeltük az α_2 PI(1-12; 4N) és az α_2 PI(1-11) peptidek koncentrációját a FXIII aktivitásának meghatározására szolgáló reagensben.

A gátlásnak többféle oka lehet, pl. ha a szubsztrát több ponton kötődik az enzimhez, azaz az enzim több kötőcsoportjához kapcsolódik, és csak az így kötött szubsztrát vesz részt a reakcióban. Ha sok szubsztrát molekula van az elegyben, létrejöhet az az eset, hogy az enzimnek egyik kötőcsoportjához kapcsolódik egy szubsztrát molekula, a másik kötőcsoporthoz nem ugyanaz, hanem egy másik szubsztrát molekula. Az ilyen enzim-szubsztrát komplexek így inaktívak lesznek, ezáltal csökken a szabad, reakcióképes enzim koncentrációja, és az enzim aktivitását a valódinál kisebbnek fogjuk mérni.

A peptidek lánchosszának C-terminálison történő csökkentése a katalitikus hatékonyság fokozatos csökkenését eredményezi, azaz a 7-12-es aminosavak szükségesek az enzim-szubsztrát kapcsolathoz. A 4-es pozícióban lévő Gln nem szubsztrátja a FXIIIa-nak, ugyanakkor szerepe van a hatékony enzim-szubsztrát kapcsolatban.

A Leu és a Thr arra enged következtetni, hogy ezen csoportokkal való hidrofób kölcsönhatások jelentős szerepet töltenek be a FXIIIa és szubsztrátja közötti kapcsolatban. Ez összhangban van a peptidekkel végzett FXIII aktivitásának meghatározására irányuló kísérletekkel is, hiszen a 8, 10, 11 pozícióban lévő Leu-ok és a 9 pozícióban lévő Thr nélkül lényegesen kisebb a FXIIIa aktivitás. Emellett a Thr-t és Leu-kat tartalmazó α_2 PI(1-8R) és α_2 PI(1-10G) peptidek gátló (jóllehet kis mértékű) hatása is alátámasztja ezt a hipotézist.

A fent leírt részletes szakmai jelentésben elért eredményekről még ebben az évben fogunk írni egy tudományos közleményt.