

A XII-ES FAKTOR ÚJRAFELFEDEZÉSE GYULLADÁSOK KÖZVETÍTŐJEKÉNT: ÉLETTANI SZEREPE ÉS EGY ÚJ KUTATÁSI PROJEKT ELŐZETES EREDMÉNYEI

Szakács Dávid^{1*} és Beinrohr László^{2*}

**egyenrangú szerzők*

¹ ELTE Biokémiai Tanszék, Budapest

e-mail: szakacsdauid@caesar.elte.hu

² MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Budapest

e-mail: laszlo.beinrohr@ttk.mta.hu

Összefoglalás

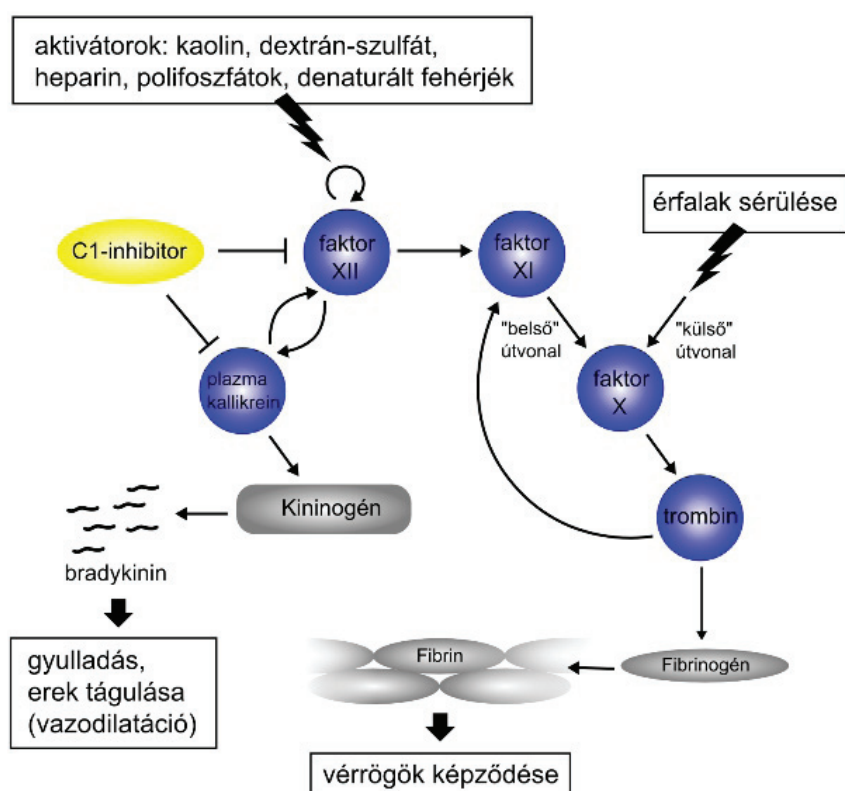
A véralvadás XII-es faktorának (fXII) *in vivo* szerepe, valamint működésének szabályozása a mai napig nem ismert részletesen. A fXII-t a véralvadás belső útvonalát elindító szerin proteáz enzimként írták le [2]. Ugyanakkor korán felismerték, hogy hiánya mégsem okoz vérzékenységet. Az *in vitro* és *in vivo* tapasztalatok ellentmondása évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat. Az elmúlt évtizedben fXII deficiens egerekben kimutatták, hogy ezek az állatok védettek a szívinfarktusz és iszkémiás stroke kialakulásával szemben [3]. Egészen friss felismerés, hogy a fXII részt vesz a keletkező vérrög szerkezetének stabilizálásában [4]. Ez merevebb vérrögök kialakulásához vezet, amelyek képesek vérereket elzárni. Az utóbbi években a fXII szerepét feltárták a véralvadáshoz nem kapcsolódó folyamatokban is. A fXII a közelmúltban felismert fiziológiás aktivátorai, pl. polifoszfátok és heparin hatására aktiválja a kallikrein-kinin vagy kontakt rendszert [5, 6]. A kallikrein-kinin rendszer aktivitása bradykinin felszabadulásával jár. A bradykinin gyulladásos és allergiás folyamatok fontos mediátora, többek között egy potenciálisan halálos betegség, az örökletes angioödéma tüneteinek okozója is [7]. Ezek a megfigyelések ígéretes gyógyszercélpont molekulává teszik a fXII-t. Gátlásán keresztül lehetőség nyílna a kóros vérrögződést és gyulladásos folyamatokat megakadályozni úgy, hogy közben a véralvadás képessége nem sérül. Kutatócsoportjainkban rekombináns úton állítunk elő fXII konstrukciókat az aktiváció mechanizmusának feltárásához és irányított evolúciós megközelítéssel fejlesztettünk kanonikus szerin proteáz inhibitorokat. Az inhibitorok segítségével megismerhetjük a fXII aktiválódásának és szabályozásának szerkezeti hátterét, valamint hosszabb távon potenciális új terápiák bevezetésére is mód nyílna.

Bevezetés

A véralvadás XII-es faktora (fXII) több más véralvadási faktorhoz hasonlóan C-terminális szerin proteáz doménnel rendelkező többdoménos fehérje. A véralvadási rendszerről alkotott klasszikus ismeretek szerint a fXII a véralvadás belső vagy kontakt aktivációs útvonalának inicializáló enzime (1. ábra). Ismert, hogy a fXII akkor aktiválódik, amikor negatívan töltött mesterséges felszínekkel (pl. kaolin vagy dextrán-szulfát) érintkezik. Az aktiválódott fXII (fXIIa) két legfontosabb szubsztrátjai maguk is szerin proteáz proenzimek (zimogének):

a prekallikrein és a véralvadás XI-es faktora (fXI). Az aktivált fXII-nek több formája létezik (2A. ábra). Az α fXIIa (aktivált teljes hosszúságú fXII) esetében az egy peptidkötés mentén történő proteolízissel aktiválódott szerin proteáz domént és az N-terminális doméneket még mindig összeköti egy diszulfidhíd. Ez a forma sokszor aktivátor felszínhez kötött, és hatékonyan képes aktiválni fXI-et és plazma kallikrein egyaránt. Az α fXIIa-t a plazma kallikrein képes más pozíciókban is elhasítani, aminek következtében β fXIIa (processzált aktív fXII) keletkezik. A β fXIIa már csak a szerin proteáz domént tartalmazza. A β fXIIa nem kötődik aktivátor felszínekhez és nem képes fXI aktiválására [8].

Az aktivált fXI a véralvadási kaszkád beindításáért felelős. A fXII hiánya a véralvadás belső útvonalának épségét jellemző tesztben kapott érték, az ún. aktivált parciális tromboplastin idő (APTT) megnövekedésével jár. Azaz a fXII aktivitása a belső útvonal aktiválásán keresztül – a teszt során alkalmazott körülmények között jelentősen – hozzájárul a fibrin képződéshez. Ezzel látszólag ellentmondásban van, hogy a fXII hiánya nem jár együtt vérzékenységgel. A jelenség magyarázata legalábbis részben az, hogy a fXI leghatékonyabb aktivátora *in vivo* a véralvadási kaszkád központi enzime, a trombin. A belső útvonal tehát nem elsősorban a véralvadás független útvonalaként működik, szerepe a véralvadásban inkább egy trombin által aktivált erősítő hurokként képzelhető el [9, 10].



1. ábra. A fXII a klasszikus ismeretek szerint a véralvadás belső útvonalát elindító enzim. A fXII szerepe a véralvadásban részleteiben máig tisztázatlan. A közelmúltban kimutatták, hogy felelős lehet a vérrögök stabilizálásáért és ezáltal artériás trombózissal összefüggő betegségek kialakulásáért. Az elmúlt években napvilágot látott eredmények alapján a fXII a kallikrein-kinin rendszer aktiválásán keresztül hozzájárul a gyulladásos mediátor bradykinin felszabadulásához és ezáltal gyulladásos és allergiás betegségek kialakulásához is. Ezek a megfigyelések a fXII-t potenciális gyógyszer célpont molekulává teszik.

Régóta célozzák kutatások a fXII *in vivo* szerepének minél pontosabb feltárását és a fXII aktiválására az élő szervezetben képes molekulák azonosítását. A közelmúltban fXII-/- egerekkel [3], kismolekulájú fXII inhibitorral [11], valamint egy, a csókospoloskából (*Triatoma infestans*) izolált inhibitor fehérjével [12, 13] végzett kísérletek során kimutatták, hogy a fXII aktivitása hozzájárul különböző artériás trombózissal összefüggő betegségek kialakulásához. Ezek az eredmények a fXII-re, mint gyógyszer-célpont molekulára irányították a figyelmet. Kísérleteket főemlős modellen is végeztek már hasonló eredménnyel, de máig csak nagyon kevés állat bevonásával [14].

Az emberi vérplazmával és izolált vérrögökkel végzett kísérletekben azt mutatták ki, hogy a fXII a merevebb, sűrűbb fibrinhálójú vérrögök kialakulásához járul hozzá. Ezek a vérrögök képesek a vérereket elzárva trombotikus betegségeket okozni. Fontos, hogy ez a hatás nem függ a trombin jelenlététől, ugyanis olyan trombin mentes szérumban is megfigyelték, amiben a véralvadást kigyómeleg proteázzal indították el. Vagyis a fXII nem a belső útvonalon keresztül történő trombin aktiválás révén járul hozzá a vérrög képződéshez, hanem a keletkező vérrög szerkezetét modulálja [4]. Ez magyarázhatja, hogy miért jelenthet védettséget a fXII aktivitás hiánya az artériákban keletkező vérrögök által okozott betegségek kialakulásával szemben. Epidemiológiai vizsgálatok ugyanakkor azt találták, hogy a fXII-nek fontos szerepe van a szervezet védelmében. Egy közel 9000 embert követő tanulmány azt mutatta ki, hogy a szérumban mért fXII aktivitás és a túlélés (overall survival) között U-alakú összefüggés áll fenn. A fXII hiány és a nagyon alacsony (< 10%) fXII aktivitás előnyt jelenthet, azonban az átlagosnál alacsonyabb, de nem szélsőségesen alacsony szérum fXII aktivitás inkább általános rizikófaktornak tekinthető [15].

A fXII-nek a véralvadás mellett szerepe van a gyulladásos mediátor bradykinin peptidhormon felszabadításában is (1. ábra). A fXII által aktivált plazma kallikrein pozitív visszacsatolással további fXII-t aktivál. A plazma kallikrein nagy molekulatömegű kininogént hasít. A reakció terméke a gyulladásos mediátor bradykinin peptid. Ez a három fehérje, a fXII, a plazma kallikrein és a nagy molekulatömegű kininogén alkotja az ún. kallikrein-kinin rendszert. A bradykinin hatása az endotélsejtek membránjába ágyazott bradykinin receptorokon keresztül érvényesül. A bradykinin receptorok (1-es és 2-es típusú bradykinin G-fehérje kapcsolt receptorok) gyulladásos folyamatokért felelős jelátviteli útvonalakat aktiválnak, aminek következménye az erek tágulása, az érfal átjárhatóságának növekedése és neutrofil granulociták toborzása.

A bradykinin jelentősége megmutatkozik patológiás esetekben is. Az örökletes angioödéma (HAE) egy ödémás rohamokkal járó betegség, ami a duzzanat helyétől és mértékétől függően akár életveszélyes állapotot is előidézhet. A HAE hátterében minden esetben a kallikrein-kinin rendszer szabályozásának rendellenessége húzódik meg [16]. A kontakt rendszer aktiválódásakor a hibás szabályozás következtében nagy mennyiségű bradykinin keletkezik. A HAE I-es típusában csökkent mennyiségben van jelen a fXII és a plazma kallikrein gátlására képes inhibitor, a C1-inhibitor fehérje. A II-es típusban a C1-inhibitor mennyisége normális, de mutáció következtében nem képes a funkcióját hatékonyan ellátni

[7]. A közelmúltban kimutatták, hogy a női HAE betegek egy részénél a C1-inhibitor koncentrációja és működése is normális [17]. Ezeknél a betegeknél a tünetek általában magas ösztrogén szint esetén jelentkeznek, például terhesség alatt. Ismert, hogy az ösztrogén serkenti a fXII termelését. Ezek a betegek szinte kivétel nélkül a fXII-nek egy, a vadtypusnál nagyobb enzimatis aktivitással rendelkező változatát hordozzák [18, 19].

Az utóbbi idők egyik jelentősebb közleménye szerint a hízósejtek által közvetített allergiás és gyulladásos folyamatok előidézésében a hisztamin mellett a bradykinin is részt vesz. Az elmúlt években kimutatták, hogy a hízósejtek által termelt heparin *in vivo* is képes aktiválni a fXII-t, és általa a bradykinin felszabadulásáért felelős kontakt rendszert [6]. Ezzel összhangban van az a megfigyelés is, hogy az angioödémás rohamokat gyakran valamilyen allergénnel való érintkezés váltja ki [16]. A fXII tehát nem csak bizonyos trombotikus betegségek megelőzésében lehet gyógyszercélpont molekula, hanem a HAE és bizonyos allergiás rohamok is kezelhetőek lehetnek fXII gátlásával.

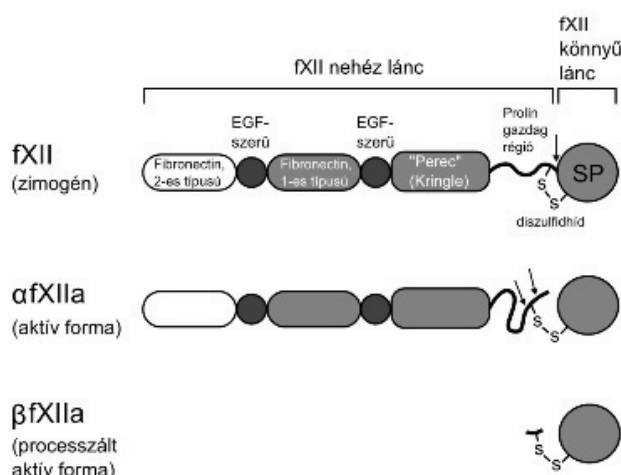
Az elmúlt években napvilágot látott több olyan eredmény is, ami a fXII és a kontakt rendszer részleteiben nem ismert, finom és bonyolult szabályozására utal. A kontakt rendszer aktiválása ugyanis sok esetben nem jár együtt a véralvadási kaszkád beindításával. A kontakt rendszer aktiválódásával összefüggő allergiás és gyulladásos betegségek esetében nem írták le, hogy ezek megnövelnék a trombotikus betegségek kialakulásának valószínűségét. Különböző mesterséges fXII aktivációs felszínek vizsgálata során észlelték, hogy az alkalmazott felszín minőségétől függően tapasztalható csak a kontakt rendszer vagy a kontakt és a véralvadási rendszer együttes aktiválódása. A fXII szerin proteáz doménjének felismerésére fejlesztett ellenanyag fragmentumok segítségével kimutatták, hogy a fXII-nek az alkalmazott aktivációs felszíntől függően eltérő formái jelennek meg a szérumban [20]. Kimutatták azt is, hogy fehérje aggregátumok és amiloid peptidek képesek aktiválni a fXII-t anélkül, hogy ez a véralvadási kaszkád beindításával járna [21]. Azaz az aktivációs felszín minősége befolyásolja, hogy milyen arányban keletkezik α fXIIa és β fXIIa a rendszerben.

A természetből több reverzibilis fXII inhibitor fehérje is ismert. Ezek közül kettő tekinthető igazán hatékonynak. Az ecotint az *Escherichia coli* baktérium termeli. Ez az inhibitor számos szerin proteáz hatékony gátlására képes, azaz nem specifikus a fXII-re [22]. Az infestin-4 a csókospoloskából (*Triatoma infestans*) származik. Ez nemcsak hatékony, de viszonylag specifikusnak is bizonyult a fXII-re [23]. A kutatási projekt céljaként azt tűztük ki, hogy fág bemutatás alkalmazásával feltárjuk a fXII gátlását lehetővé tevő aminosav mintázatot az SGPI-2 (*Schistocerca gregaria* protease inhibitor 2) kanonikus szerin proteáz inhibitorból kiindulva. Az SGPI-2 vázat felhasználva már számos jelentős eredmény született kutatócsoportjainkban. A feltárt mintázat rengeteg információt tartalmaz arról, hogy a fXII milyen aminosavakat preferál az inhibitor enzimmel kapcsolatban levő pozícióiban. A mintázat alapján újfajta fXII inhibitorok tervezésére és előállítására nyílik lehetőség, amelyek hatékonysága és specifitása ideális esetben vetekedhet az infestin-4 tulajdonságaival.

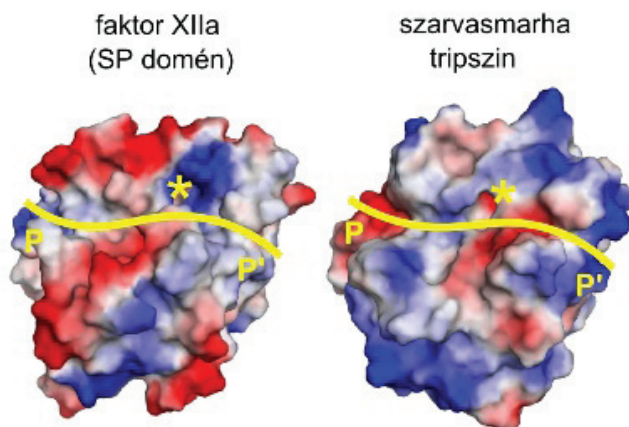
Kísérletes megközelítés és a kezdeti eredmények

A fXII zimogént 6 domén alkotja, amelyeket flexibilis linkerek kötnek össze (2A ábra). A negatív töltésű mesterséges felszínekkel érintkezve könnyen aktiválódik, és a szérumban jelen levő más proteázok több ponton hasíthatják. Ezenkívül, mint a vérben található fehérjék általában, a fXII poszttranszlációs glikozilálva van. A fXII prolin gazdag régiója különösen sűrűn van O-glikozilálva. Ezért teljes láncú formájában a szérumból tisztított fehérje szerkezetileg rendkívül heterogén.

A



B



2. ábra. A zimogén fXII-t hat domén alkotja.

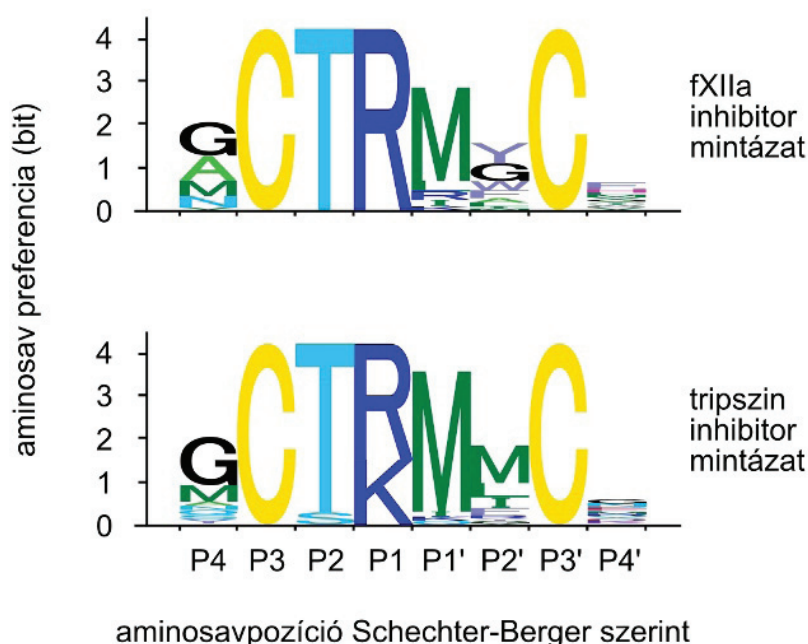
A) Az N-terminális felől rendre 2-es típusú fibronectin, EGF-szerű, 1-es típusú fibronectin, EGF-szerű, „perec” (kringle), majd egy hosszú prolin gazdag régiót követően a szerin proteáz domén (SP) következik. Az aktiváció első lépése során a szerin proteáz domén N-terminális végéhez közel hasad el egy peptid kötés. Az így keletkező aktív αfXIIa forma diszulfid híd által összekötve tartalmazza az öt N-terminális domént (nehéz lánc) és az immár aktív szerin proteáz domént (könnyű lánc). Az aktív plazma kallikrein képes a fXII prolin gazdag régiójában egy másik peptid kötés elhasítására is. Ez a hasítás βfXIIa-t eredményez, ami gyakorlatilag az aktív szerin proteáz doménnek felel meg. B) A fXII szerin proteáz domén és a szarvasmarha tripszin felszíni töltésmintázata. A fXII felszíne tagoltabb, a szubsztrátkötő árkot savas karakterű hurkok határolják. Az enzimek szubsztrát megkötése szempontjából kiemelt fontosságú S1 kötőzsebét csillaggal jelöltük. A szubsztrátkötő árkot sárga szalaggal kiemeltük.

A heterogenitás problémáját a fXII rekombináns előállításával oldottuk meg. Első megközelítésben a minimális katalitikus egységet, a szerin proteáz domént fejeztük ki. A laboratóriumunkban fehérjék szerkezetmegoldáshoz való előállítására már sikeresen használt *Pichia pastoris* élesztő rendszert használtuk [1, 24, 25]. A *Pichia* rendszer eukarióta expressziós rendszer, így a bakteriális *Escherichia coli* rendszerrel szemben képes a fehérje aktivitásához szükséges poszttranszlációs módosítások végrehajtására. A fXII katalitikus doménje számos diszulfidhidat tartalmaz, amik szükségesek a szerkezet stabilitásához és a katalitikus aktivitáshoz.

A kutatásainkhoz elegendő mennyiséget kívántunk előállítani nemcsak fágbemutatáshoz, hanem a fXII szerkezetének röntgenkristallográfiás módszerrel való vizsgálatához is. A röntgenkristallográfia a fehérjepreparátum nagyfokú tisztasága mellett a minta konformációs homogenitását is igényli. Ezért a fXII-nek maltózkötő fehérjéhez (MBP) fuzionáltatott formáját fejeztük ki és amilóz affinitás kromatográfiával tisztítottuk > 95%-os tisztaságúra. A glikozilációs heterogenitást Endoglikozidáz H enzimes kezeléssel szüntettük meg. A fúziós fehérjét úgy terveztük meg, hogy a – fXII aktiválás során – hasadó kötés elé a DDDDK szekvenciát illesztettük be a természetes szekvencia helyett. Ezt a szekvenciát specifikusan hasítja a Lys után a kereskedelembe kapható enterokináz proteáz. A hasítás eredményeképpen aktivált fXII szerin proteáz domént kapunk. A természetes szekvenciát nem egyetlen helyen hasíthatják a szérumban jelen levő proteázok (lásd α és β fXII formák), így az enterokinázos hasítással a heterogenitás egy lehetséges forrását is megszüntettük. Végeredményben ~1-5 mg nagyságrendben tudtunk tisztított és homogén fXIIa preparátumot előállítani, ami elégségesnek bizonyult arra, hogy feltérképezzük a fXII gátlását lehetővé tevő aminosav mintázatot fág bemutatással és a mintázat alapján előállított fXII inhibitorok tulajdonságait meghatározzuk oldatfázisú aktivitásmérések során.

A fág bemutatás a legsikeresebben alkalmazott irányított evolúciós eljárás. Segítségével lehetőség nyílik nagy kölcsönható felszínek gyors feltérképezésére, valamint új interakciós partnerek kifejlesztésére [26]. A fág bemutatás alkalmazható proteáz inhibitor fehérjék fejlesztésére is [27]. A fXII inhibitor fejlesztés alapjául az SGPI-2 nevű kis kanonikus inhibitor fehérjét választottuk. Ebből a molekulából kiindulva korábban sikerült hatékony inhibitorokat fejlesztenünk a tripszin aktivitásának szabályozásáért felelős kimotripszin C [28], valamint a komplement rendszer lektin útjának beindításáért felelős MASP-1 és MASP-2 enzimekkel szemben [29, 30]. Az SGPI-2 esetében feltérképeztük a szarvasmarha tripszinhez és kimotripszinhez, valamint a sertés pankreatikus elasztázhoz való kötődést lehetővé tevő szekvencia mintázatot is.

Az inhibitornak az enzimmel kölcsönhatásba lépő központi régiójának összes lehetséges változatát reprezentáló fág-fehérje könyvtárat hoztunk létre. A könyvtárban az inhibitor Schechter-Berger nevezéktan [31] szerinti P4-P4' közti szakaszán minden pozícióban megengedtük az összes aminosav előfordulását. Ez alól kivételt képeztek a P3 és P3' pozíciókban található, a 3. ábrán sárga színnel feltüntetett ciszteinek. Ezek a ciszteinek az inhibitor hurok megfelelő szerkezetének kialakítása szempontjából nélkülözhetetlen diszulfid hidakat alkotnak. A könyvtárból kiválogattuk a fXIIa-hoz szelektíven kötő változatokat. A szelekció során rekombináns fXIIa szerin proteáz domént alkalmaztunk célpont fehérjeként. A szelekciót követően 52 egyedi fXIIa kötő fehérje variáns génjét szekvenáltuk, és a fXIIa kötés képességét az inhibitorok számára biztosító aminosav szekvencia mintázatot szekvencia logó formájában ábráztuk [32] (3. ábra).



3. ábra. A szekvencia logó egyes oszlopainak magassága azt tükrözi, hogy az adott oszlopban az aminosavak előfordulási gyakorisága milyen messze van az egyenletestől. A legegyenetlenebb eloszlás az, amikor csak egyetlen aminosav fordul elő egy pozícióban. Ezeknek az oszlopoknak maximális, bitekben kifejezve $\log_2 20$ a magassága. Ha egy pozícióban mind a 20 aminosav előfordul, ráadásul egyforma gyakorisággal, akkor tökéletesen egyenletes az eloszlás. Ebben az esetben az adott pozícióban az oszlop magassága nulla lenne. A magasabb oszlopokban tehát kevesebb féle aminosav fordul elő a megvizsgált klónokban, azaz itt komoly feltétele van a vizsgált enzimhez való kötésnek. Az egyes betűk magassága egy pozícióban az aminosavak előfordulási gyakoriságával arányos. A betűk színe az aminosavak kémiai karakterére utal: a hasonló karakterű aminosavak azonos színnel vannak feltüntetve.

Az 3. ábrán látható, hogy az SGPI-2 inhibitor vázon végzett szelekció hasonló mintázatot eredményezett a fXIIa (felső logó) és a szarvasmarha tripszin (alsó logó) esetében. A legfontosabb különbség, hogy a fXIIa az enzim-inhibitor kölcsönhatás szempontjából kiemelt jelentőségű P1 pozícióban arginin mellett köteleződött el, míg a tripszin az arginint és a lizint egyaránt elfogadja. A tripszin emésztő enzim, feladata a táplálék fehérjéinek peptidekre történő hasítása. Ennek megfelelően szubsztrátkötő árka nyitott, szabadon hozzáférhető. Ezzel szemben a fXII felszíne - homológia modellezett szerkezet alapján - sokkal tagoltabb [1]. A szubsztrátkötő árkot savas karakterű felszíni hurkok leszűkítik, igaz, a modell alapján nem torlaszolják el azt (2B. ábra). A fentiek alapján mindenképpen váratlan eredmény, hogy a két enzim ennyire hasonló feltételeket támaszt az inhibitorokkal szemben. A jelenség háttérében meghúzódó szerkezeti okok felderítése a terveink között szerepel.

A szekvencia logó alapján előállítottunk három fXII inhibitor molekulát, és meghatároztuk ezek egyensúlyi inhibíciós állandó (K_i) értékeit a fXIIa szerin proteáz doménjével szemben (1. Táblázat). Mindhárom létrehozott inhibitor gátolja a fXIIa szerin proteáz doménjét, azonban hatékonyságuk elmarad az infestin-4-étől. Az irodalmi adatok szerint az infestin-4 K_i értéke a fXII-vel

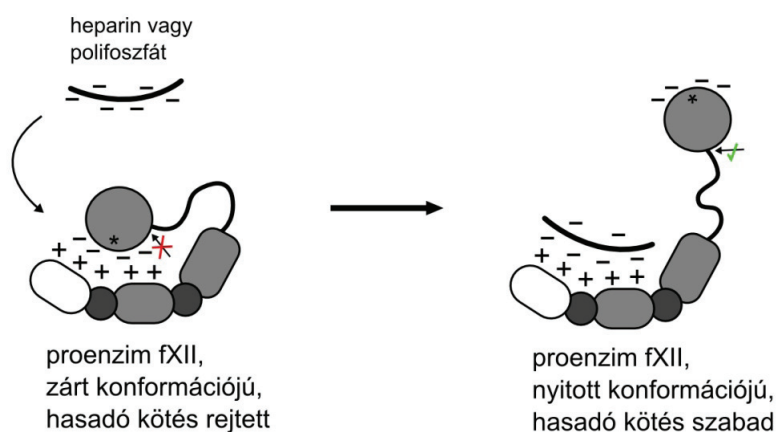
szemben 78 pM [33]. A leghatékonyabbnak bizonyult, a P4-P4' szakaszon ACTRMYCF szekvenciával rendelkező fXII inhibitor K_i értékét meghatároztuk szarvasmarha tripszinnel szemben is. Az inhibitor rendkívül hatékony tripszin inhibitornak bizonyult, a kölcsönhatás K_i értéke 10 pM-nál kisebb. A szekvencia mintázatok hasonlóságának fényében nem meglepő, hogy a fXII gátlására kifejlesztett inhibitorok a tripszint is hatékonyan gátolják.

1. táblázat. A létrehozott fXII inhibitorok K_i értékei.

P4-P4'	K_i (nM)	
	fXII	tripszin
GCTRMYCF	100	–
ACTRMYCF	25	<0,01
GCTRRFCF	100	–

Előretékinés – új munkahipotézis

A továbbiakban a fXII szerkezeti biokémiai módszerekkel történő vizsgálatát tervezzük. Mi lehet annak a szerkezeti oka, hogy a természetből ismert, illetve az irányított evolúcióval kifejlesztett fXII inhibitorok specifitása és hatékonysága ilyen nagy eltéréseket mutat? A fXII különböző rekombináns formáinak kristályosítását tervezzük apo állapotban, illetve különböző inhibitorokkal komplexben. A vizsgálatokba bevonjuk a pánspecifikus szerin proteáz inhibitor ecotint [22], valamint az infestin-4-et [23, 33] is. A megoldott kristályszerkezetektől reméljük, hogy segítségükkel fényt deríthetünk a fXII más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásainak szerkezeti hátterére, valamint az egyes inhibitorok eltérő tulajdonságainak szerkezeti okaira.



4. ábra. A zimogén fXII aktivációja során hasadó kötések aktivátor hiányában nem hozzáférhetőek. Az aktivátorral való kölcsönhatás eredményeképpen a fXII térszerkezete megváltozik és a hasadó kötés vagy kötések hozzáférhetővé válnak. A különböző aktivátorokkal a finom részletekben különböző kapcsolatokat alakíthat ki a fXII. Ennek következménye lehet, hogy a különböző aktivátorok hatása egymástól eltér. Bizonyos aktivátorok hatására stabil, a kallikrein-kinin rendszert és a véralvadást is hatékonyan aktiváló afXIIa keletkezik. Más aktivátorok hatására a keletkező afXIIa gyorsan β fXIIa-vá alakul. Ez a forma már csak a kallikrein-kinin rendszer aktiválására képes.

A fXII aktiváció szerkezeti hátterének részletekbe menő vizsgálatára is lehetőségünk nyílhat, ha sikerül teljes láncú zimogén fXII-t tiszta formában előállítani. Ebben az esetben vizsgálhatnánk, hogy a különböző aktivációs felszínek, szubsztrátok és más interakciós partnerek pontosan hogyan befolyásolják azt, hogy elsősorban α fXIIa vagy β fXIIa keletkezik, és ennek függvényében a kontakt rendszer mellett aktiválódik-e a véralvadás belső útvonala is. A zimogén fXII esetében feltételezhető, hogy a nagyméretű negatívan töltött felszínekkel rendelkező szerin proteáz domén az N-terminális domének pozitívan töltött felszíneire fekszik. A szintén negatívan töltött aktivátor felszínnek leszoríthatják a szerin proteáz domént az N-terminális doménekről. A fXII finom részleteiben különböző kölcsönhatásokat alakíthat ki az eltérő aktivátor felszínekkel, aminek következtében a fXII aktiváció során hasadó kötések hozzáférhetősége is különbözhet. Ez magyarázhatná, hogy az interakció felszín minősége hogyan határozza meg, hogy milyen aktivált fXII forma jelenik meg a szérumban (4. ábra).

Az SGPI-2-ből kifejlesztett inhibitorok hatékonyságának és specifitásának növelésére is lehetőség van újabb irányított evolúciós kísérletekben. A megnövelt hatékonyságú inhibitorok vagy az infestin-4 alkalmazásával tervezzük olyan szérumban kísérletek elvégzését is, amelyek eredményei alapján jobban megérthetjük a fXII aktiválódásának molekuláris részleteit az élő szervezetben, illetve megismerhetjük a fXII más folyamatok elindításában és szabályozásában betöltött szerepének jelentőségét.

Irodalomjegyzék

- [1] Beinrohr, L., Harmat, V., Dobó, J., Lörincz, Z., Gál, P., Závodszy, P. (2007) C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem*, **282**: 21100–9.
- [2] Ratnoff, O.D., Colopy, J.E. (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma 1. *J Clin Invest*, **34**: 602–13.
- [3] Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H.-U., Burfeind, P., Gailani, D., Nieswandt, D. (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*, **202**: 271–81.
- [4] Konings, J., Govers-Riemslog, J.W.P., Philippou, H., Mutch, N.J., Borissoff, J.I., Allan, P., Mohan, S., Tans, G., ten Cate, H., Ariëns, R.A.S. (2011) Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood*, **118**: 3942–51.
- [5] Müller, F., Mutch, N.J., Schenk, W.A., Smith, S.A., Esterl, L., Spronk, H.M., Schmidbauer, S., Gahl, W.A., Morrissey J.H. Renné, T. (2009) Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*, **139**: 1143–56.

- [6] Oschatz, C., Maas, C., Lecher, B., Jansen, T., Björkqvist, J., Tradler, T., Sedlmeier, R., Burfeind, P., Cichon, S., Hammerschmidt, S., Müller-Esterl, W., Willemin, W.A., Nilsson, G., Renné, T. (2011) Mast Cells Increase Vascular Permeability by Heparin-Initiated Bradykinin Formation In Vivo. *Immunity*, **34**: 258–68.
- [7] Kaplan, A.P., Joseph, K. (2010) The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*, **104**: 193–204.
- [8] Revak, S.D., Cochrane, C.G., Bouma, B.N., Griffin, J.H. (1978) Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma. *J Exp Med*, **147**: 719–29.
- [9] Gailani, D., Broze, G.J. Jr. (1991) Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*, **253**: 909–12.
- [10] Matafonov, A., Sarilla, S., Sun, M., Sheehan, J.P., Serebrov, V., Verhamme, I.M. Gailani, D. (2011) Activation of factor XI by products of prothrombin activation. *Blood*, **118**: 437–45.
- [11] Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, H.-U., Burfeind, P., Renné, C., Gailani, D., Nieswandt, B., Renné, T. (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med*, **203**: 513–8.
- [12] Hagedorn, I., Schmidbauer, S., Pleines, I., Kleinschnitz, C., Kronthaler, U., Stoll, G., Dickneite G., Nieswandt, B. (2010) Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation*, **121**: 1510–7.
- [13] Chen, J.W., Figueiredo, J.-L., Wojtkiewicz, G.R., Siegel, C., Iwamoto, Y., Kim, D.-E., Nolte, M.W., Dickneite, G., Weissleder, R., Nahrendorf, M., (2012) Selective factor XIIa inhibition attenuates silent brain ischemia: application of molecular imaging targeting coagulation pathway. *JACC Cardiovasc Imaging*, **5**: 1127–38.
- [14] Matafonov, A., Leung, P.Y., Gailani, A.E., Grach, S.L., Puy, C., Cheng, Q., Sun, M.-f., McCarty, O.J.T., Tucker, E.I., Kataoka, H., Renné, T., Morrissey, J.H., Gruber, A., Gailani, D., (2014) Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model. *Blood*,
- [15] Endler, G., Marsik, C., Jilma, B., Schickbauer, T., Quehenberger, P., Mannhalter, C., (2007) Evidence of a U-shaped association between factor XII activity and overall survival. *J Thromb Haemost*, **5**: 1143–8.
- [16] Zuraw, B.L. (2008) Hereditary Angioedema. *N Engl J Med*, **59**: 1027–36.
- [17] Bork, K., Barnstedt, S.E., Koch, P., Traupe, H. (2000) Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet*, **356**: 213–7.
- [18] Cichon, S., Martin, L., Hennies, H.C., Muller, F., Van Driessche, K., Karpushova, A., Stevens, W., Colombo, R., Renné, T., Drouet, C., Bork, K., Nöthen, M.M. (2006) Increased Activity of Coagulation Factor XII (Hageman Factor) Causes Hereditary Angioedema Type III. *Am J Hum Genet*, **79**: 1098–104.
- [19] Bork, K., Wulff, K., Hardt, J., Witzke, G., Staubach, P. (2009) Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy. *J Allergy Clin Immunol*, **124**: 129–34.

- [20] De Maat, S., van Dooremalen, S., de Groot, P.G., Maas, C. (2013) A nanobody-based method for tracking factor XII activation in plasma. *Thromb Haemost*, **110**: 458–68.
- [21] Maas, C., Govers-Riemslog, J.W.P., Bouma, B., Schiks, B., Hazenberg, B.P.C., Lokhorst, H.M., Hammarström, P., ten Cate, H., de Groot, P.G., Bouma, B.N., Gebbink, M.F.B.G. (2008) Misfolded proteins activate Factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest*, **118**: 3208–18.
- [22] Ulmer, J.S., Lindquist, R.N., Dennis, M.S., Lazarus, R.A. (1995) Ecotin is a potent inhibitor of the contact system proteases factor XIIa and plasma kallikrein. *FEBS Lett*, **365**: 159–63.
- [23] Campos, I.T.N., Tanaka-Azevedo, A.M., Tanaka, A.S. (2004) Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Letters*, **577**: 512–6.
- [24] Beinrohr, L. (2009) A C1-inhibitor specificitásának és deficienciájának atomi szintű magyarázata. Doktori értekezés, Szerkezeti biokémia doktori program, ELTE Biológia Doktori Iskola (http://teo.elte.hu/minosites/ertekezes2009/beinrohr_l1.pdf).
- [25] Beinrohr, L., Murray-Rust, T.A., Dyksterhuis, L., Závodszky, P., Gál, P., Pike, R.N., Wijeyewickrema, L.C. (2011) Serpins and the complement system. *Methods Enzymol*, **499**: 55–75.
- [26] Pál, G. (2008) Milliárdok versengése: Irányított evolúciós módszerek a fehérjetudományban. *Biokémia*, **32**: 82–85.
- [27] Zani, M.-L., Moreau, T. (2010) Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie*, **92**: 1689–704.
- [28] Szabó, A., Héja, D., Szakács, D., Zboray, K., Kékesi, K.A., Radisky, E.S., Sahin-Tóth, M., Pál, G., (2011) High affinity small protein inhibitors of human chymotrypsin C (CTRC) selected by phage display reveal unusual preference for P4' acidic residues. *J Biol Chem*, **286**: 22535–45.
- [29] Héja, D., Harmat, V., Fodor, K., Wilmanns, M., Dobó, J., Kékesi, K.A., Závodszky, P., Gál, P., Pál, G. (2012) Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J Biol Chem*, **287**: 20290–300.
- [30] Héja, D., Kocsis, A., Dobó, J., Szilágyi, K., Szász, R., Závodszky, P., Pál, G., Gál, P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci*, **109**: 10498–503.
- [31] Schechter, I., Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**: 157–62.
- [32] Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, **14**: 1188–90.
- [33] Campos, I.T.N., Amino, R., Sampaio, C.A.M., Auerswald, .E.A, Friedrich, T., Lemaire, H.-G., Schenkman, S., Tanaka, A.S. (2002) Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol*, **32**: 991–7.



Szakács Dávid az ELTE Szerkezeti biokémia doktori programjának hallgatója. Doktori kutatását az ELTE Biokémiai Tanszékén, a Dr. Pál Gábor által vezetett Irányított fehérje-evolúció kutatócsoportban végzi. Munkája során érdekes biológiai funkcióval rendelkező szérum szerin proteázok hatékony és szelektív gátlására képes inhibitor fehérjéket fejleszt. Ezek az inhibitorok lehetővé teszik a vizsgált enzimek fiziológiás szerepének részletekbe menő tanulmányozását. A laboratórium kutatásait Dr. Pál Gábor OTKA NK 100769 projekt támogatja. Munkáját az elmúlt egy évben az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával megvalósuló TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt Apáczai Csere János doktoranduszi ösztöndíjjal támogatta.



Dr. Beinrohr László a MTA TTK tudományos munkatársa. Doktori munkája során meghatározta a humán C1-inhibitor röntgenszerkezetét, amivel a világon először magyarázta meg az örökletes angioödéma (HAE) betegség atomi hátterét [1]. Doktori dolgozatát a Qualitas Biologica Alapítvány díjazta. Kutatásaiért számos konferencián részesült elismerésben, és megkapta az Akadémiai Ifjúsági Díjat és a Bio-Science Díjat. Kutatásait Prof. Závodszy Péter és Dr. Gál Péter biofizikai kutatólaboratóriumában végzi. A laboratórium egyik szakterülete a vérben található proteolitikus kaszkádrendszerek tanulmányozása a rekombináns géntechnológia és szerkezeti biokémia eszközeivel. A laboratórium kutatásait Prof. Závodszy Péter és Dr. Gál Péter által vezetett OTKA NK 100834 és 108642 projektek támogatják.