

A kutatási eredmények összefoglalása

A komplement rendszer a természetes immunitás fontos komponense szervezetünkben, normális működése elengedhetetlen a homeosztázis fenntartásához. A komplement rendszer elsődleges védelmi vonalat képez a patogén baktériumokkal és más kórokozókkal szemben, ezenkívül részt vesz a megváltozott saját struktúrák (pl. rákos sejtek, apoptotikus sejtek) eliminációjában is. Rendellenes működése azonban súlyos betegségek forrása lehet, ezért fontos, hogy minél jobban megértsük a rendszer aktiválódásának és szabályozásának mechanizmusát, hogy szükség esetén a megfelelő pontokon be tudjunk avatkozni. A komplement rendszer egy szerin proteázokból álló kaszkárendszer, amely háromféle úton: a klasszikus, a lektin és az alternatív úton keresztül aktiválódhat. Kutatásaink súlypontját nagyobb részben a legkevésbé jellemzett lektin útra, valamint kisebb mértékben a klasszikus útra helyeztük. A komplement proteázokra jellemző, hogy több doménből álló mozaikfehérjék, szubsztrátspecifitásuk rendkívül szűk, és hatásukat nem egyedül, hanem más proteázokkal és felismerő fehérjékkel alkotott komplexekben fejtik ki. A klasszikus út felismerő fehérjéje a C1q, ehhez kapcsolódik két C1r és két C1s szerin proteáz molekula. A C1q aktivátor struktúrához kötődése után a C1r autoaktiválódik és limitált proteolízis útján aktiválja a C1s-t. Az aktivált C1s hasítja a kaszkád soron következő komponenseit (C2, C4). A lektin út esetén a felismerő molekula az MBL (mannóz-kötő lektin) és hozzá három különböző proteáz: a MASP-1, MASP-2 és MASP-3 kapcsolódhat. Ezek közül a proteázok közül egyértelműen csak a MASP-2-ről sikerült kimutatni, hogy képes beindítani a komplement kaszkádot. A MASP-2 képes autoaktiválódni és C2/C4 komponenseket hasítani. A másik két proteáz (MASP-1 és MASP-3) fiziológiai szerepe még nem tisztázott. A C1r, C1s, MASP-1, és MASP-2 enzimek közös fiziológiás inhibitora a C1-inhibitor. Ez a szerpín típusú inhibitor a korai komplement proteázokon kívül még egyéb proteázokat is gátol a vérben (pl. plazma kallikrein, faktor XI, faktor XII), ezért fiziológiás szerepe kiemelkedően fontos.

A proteázokkal kapcsolatban a legfőbb célkitűzéseink voltak az autoaktiváció és a szubsztrátspecifitás szerkezeti alapjainak felderítése, valamint az egyes domének funkcióinak meghatározása. A proteázok katalitikus régióját (a szerin proteáz (SP) domén és a hozzá kapcsolódó két komplement kontrol protein (CCP) modul) rekombináns formában fejeztük ki és szerkezetvizsgálathoz megfelelő mennyiségű és minőségű (tisztaságú) preparátumot állítottunk elő.

Röntgendiffrakció segítségével meghatároztuk az aktív MASP-2 CCP2-SP fragmentumának térszerkezetét 2.25Å felbontásban (Harmat et al. 2004). A kristályszerkezet alapján két fontos megállapítást tettünk. 1.) A CCP2 és az SP domének határfelülete nem merev, hanem flexibilis, ezért „hinge” pontnak tekinthető. A domének egymáshoz képesti elmozdulása kulcsszerepet játszhat az enzim működése során. A MASP-2 dimer képes mindazon funkciókat ellátni, amit a nála kétszer nagyobb C1s-C1r-C1r-C1s tetramer lát el a komplement aktiváció klasszikus útja során. Ehhez pedig nagyfokú flexibilitás kell. 2.) Összehasonlítva a MASP-2 és a nagyon hasonló szubsztrátspecificitással rendelkező C1s szerin proteáz doménjének térszerkezetét megállapítottuk, hogy a szubsztrátspecificitás finomhangolásáért felelős hurokrégiók eltérő szerkezettel rendelkeznek a két enzimben. Ez arra utal, hogy a MASP-2 és a C1s más-más kontaktusokat alakít ki ugyanazokkal a szubsztrátokkal.

Az aktív MASP-2 szerkezetéből nem tudtunk következtetni az autoaktiválódás mechanizmusára. Ehhez szükségünk volt a zimogén forma jellemzésére. Mivel a MASP-2 könnyen autoaktiválódik megfelelő mutációval (R444Q) stabilizáltuk a zimogén formát. Röntgendiffrakció segítségével meghatároztuk a zimogén CCP1-CCP2-SP fragmentum térszerkezetét 2.4Å felbontásban (Gál et al. 2005). A szerkezet analízise megerősítette korábbi megfigyelésünket a CCP2/SP határfelület flexibilitásával kapcsolatban, és az is bizonyítottá vált, hogy autoaktiválódás során csak az SP domén térszerkezete változik jelentősen, a két CCP modulé nem. A zimogén MASP-2 SP domén a tripszin-szerű szerin proteáz zimogénekre jellemző térszerkezetet mutatja: az oxianion lyuk és a szubsztrátkötő zseb hiánya megakadályozza a peptidkötés hasítását. A szerkezettel összhangban van az a kísérleti adat, hogy kisméretű szintetikus szubsztrátok hasítására nem képes a zimogén MASP-2. Meglepő volt azonban, hogy ugyanez a zimogén forma a nagyméretű C4 szubsztrátot igen jó hatékonysággal hasította (a zimogén forma katalitikus hatékonysága kb. 1/8-ada az aktív forma hatékonyságának). Ez csak úgy magyarázható, ha feltételezzük, hogy az egyláncú zimogén forma a szubsztrát hatására felveszi az aktív molekulára jellemző konformációt. Ennek a szubsztrát-indukciós mechanizmusnak a szempontjából fontos az a megfigyelésünk, hogy a CCP2 modul jelenléte elengedhetetlen a hatékony C4 hasításhoz. Ebből arra következtettünk, hogy a CCP2 modul külső kötőhelyet („exosite”) tartalmaz a fehérjeszubsztrát részére. Mivel a CCP modul szerkezete nem változik az autoaktiváció során, ezért az „exosite” már a zimogén formán is jelen van. A zimogén forma tehát képes megkötni C4 szubsztrátot (ezt időközben egy konkurens kutatócsoport kísérletesen is igazolta), ezért a szubsztrát lokális koncentrációja megnövekszik az SP domén körül. A fehérjeszubsztrát

többszörös kölcsönhatást alakít ki az SP doménnel, ezáltal stabilizálva annak aktív konformációját. A kisméretű szintetikus peptidszubsztrát viszont nem köt az „exosite”-hoz és csak az aktív centrum közvetlen környezetével alakít ki kölcsönhatásokat, ezért nem képes átbillenteni a zimogén formát az aktív konformációba. A MASP-2 autoaktivációja hasonló szubsztrát indukciós mechanizmus szerint mehet végbe a dimerben, ahol az egyik zimogén játssza az enzim a másik pedig a szubsztrát szerepét. Ezt a mechanizmust kísérletesen is igazoltuk kétféle zimogén szubsztrát R444Q és S633A reakciójával. Az ép katalitikus triáddal rendelkező de egyláncú formában stabilizált MASP-2 zimogén (R444Q) hasította a katalitikusan inaktív de hasítható zimogén mutánst (S633A). Az általunk megoldott szerkezeteket felhasználva számítógépesen (*in silico*) modelleztük az autoaktiválódási folyamatot. Tudomásunk szerint ez az első atomi szintű mechanizmus egy külső faktorok közreműködése nélkül autoaktiválódó szerin proteáz működésének magyarázatára.

A klasszikus út első enzimatis lépése a C1r zimogén autoaktiválódása. A C1r a katalitikus régióján keresztül dimert képez, amelyben döntő szerepet játszanak a CCP1 modulok. Elsőként nekünk sikerült kristályosítanunk az aktív C1r (CCP1-CCP2-SP)₂ katalitikus fragmentumát és megoldani térszerkezetét 2.6Å felbontásban (Kardos et al. 2008). A két C1r molekula fej-láb illeszkedéssel kapcsolódik egymáshoz, a dimert intermolekuláris CCP1-SP kölcsönhatások stabilizálják. A szerkezetnek két olyan fontos sajátága van, amelyből következtetni tudunk az autoaktiváció mechanizmusára. 1.) A szomszédos C1r molekulák enzim-termék komplexet alkotnak: az egyik molekula szubsztrátkötő zsebet a szomszédos C1r molekula aktiválódáskor hasadó kötésének P1 argininje foglalja el. Nagyon valószínű, hogy autoaktiválódás során is hasonló elrendezésben van a két C1r molekula. 2.) Másrészt az enzim-termék komplex stabilizálásában CCP2-SP kölcsönhatások is közreműködnek. Korábbi méréseinkben kimutattuk, hogy a CCP2 domének jelenléte megnöveli az autoaktiváció sebességét. Feltételeztük, hogy – hasonlóan a MASP-2-höz – a CCP2 modulok extra kötőhelyeket tartalmaznak. Ezt a feltételezésünket a szerkezet megerősítette. A szerkezetből nyert információkat felhasználva egy új modellt alkottunk a C1 komplex aktiválódására, amely feloldja a korábbi modellek ellentmondásait és jobban összhangban van a kísérleti eredményekkel.

Az általunk javasolt és a korábbi C1 modellek is feltételezik a proteázok nagyfokú flexibilitását. Hasonlóan a MASP-2-höz a C1r katalitikus fragmentumában is flexibilis CCP2-SP interdomén régióra utalnak a röntgenszerkezetekből nyert információk. Ez a flexibilitás azonban nem elég nagy ahhoz, hogy megmagyarázza az autoaktiválódás során fellépő nagyfokú konformáció változást. Korábban felvetették, hogy a két CCP modult összekötő

régió rendelkezik nagyfokú flexibilitással. Ennek a kérdésnek a megválaszolására a röntgendiffrakció nem alkalmas, ezért NMR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk a CCP doménpárok oldatbeli viselkedését. Bakteriális expressziós rendszerben előállítottuk a C1r CCP1 és CCP2 modulját, valamint a CCP1-CCP2 modul párt. Az NMR mérésekhez szükséges N^{15} és C^{13} jelölt rekombináns fehérjéket is sikerült megfelelő mennyiségben és tisztaságban előállítani. Mind a CCP1 mind pedig a CCP2 modul jól definiált térszerkezettel rendelkezik oldat fázisban (Gál et al. 2006). Ezt a megfigyelésünket megerősítették a DSC (differenciális pásztázó kalorimetriás) méréseink is. Összehasonlítva az individuális CCP modulok NMR spektrumát a CCP1-CCP2 modulpár spektrumával megállapítottuk, hogy a két domén határán lévő kapcsolódási felületre (interface) lokalizálható NMR jelek jelentősen perturbálódnak a modulpár esetén. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a két CCP domén között erős kölcsönhatás van, az őket összekötő linker régió inkább rigid, mint flexibilis jellegű. A C1r molekula nagyfokú flexibilitását más régióban kell keresnünk. Legfrissebb kutatási eredményeink alapján ez a régió nagy valószínűséggel a CUB2-CCP1 fragmentumban található. Ezt a kérdést jelenleg is tovább vizsgáljuk.

Tanulmányoztuk a lektin út legkisebb mennyiségben jelenlévő és legkevésbé jellemzett proteázát, a MASP-3-t is. A MASP-1 és MASP-3 enzimek csak katalitikus doménjükben különböznek egymástól, a két fehérje egy génről képződik alternatív splicing által. A két szerin proteáz domén azonban szekvenciájában és méretében is jelentősen különbözik egymástól. Rekombináns formában expresszáltuk a MASP-3 SP doménjét. Eltérően a MASP-1 és MASP-2 proteázoktól, a MASP-3 nem autoaktiválódott és nem hasított komplement komponenseket sem (pl. C1r, C1s, MASP-1, MASP-2, C2, C3, C4). Ugyancsak különleges sajátága a MASP-3-nak, hogy tripszinnel felaktivált formája nem képzett komplexet a C1-inhibitorral. Mindezek a kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a MASP-3 aktiválódási mechanizmusa és biológiai funkciója eltérő a többi rokon szerin proteázétól.

Vizsgáltuk a lektin út proteázainak fiziológias szerepét is. Korábbi munkánkban megmutattuk, hogy a MASP-1 képes hasítani fibrinogént és a XIII-as faktort (transzglutamináz), ezáltal térhálós fibrin polimert hozva létre. A MASP-1 tehát kapcsolatot teremt a vérben található két proteolitikus kaszkád, a komplement és a véralvadás között. Jelen pályázat során pontosabban jellemeztük a MASP-1 aktivitását a fenti szubsztrátokon (Krarup et al. 2008). N-terminális szekvenálással bebizonyítottuk, hogy a MASP-1 és a trombin azonos helyen hasítja a XIII-as faktort. A trombin átalakítási száma (turnover number) azonban 650-szerese a MASP-1-ének. A fibrinogént a MASP-1 némileg eltérő módon hasítja, mint a trombin, azonban kimutattuk a gyulladáskeltő hatású fibrinopeptid B felszabadulását.

A MASP-2 szubsztrátspecifitását vizsgálva újabb kapcsolatot is sikerült kimutatnunk a véralvadási és a komplement kaskád között. Megmutattuk, hogy a MASP-2 képes hasítani és aktiválni a protrombint, amely azután hasítja a fibrinogént és a XIII-as faktort (Krarup et al. 2007). A jelenség fiziológiai jelentőségét jelzi az a tény, hogy az MBL-MASP-2 komplexszel borított baktérium felszínén kovalensen kötött fibrin mutatható ki. Valószínű, hogy hasonlóan a gerinctelenekhez, a limitált véralvadás szerepet játszik az emberi természetes immunválaszban is. Az is valószínű, hogy a két proteolitikus kaskádrendszer egy ősi kaskádrendszerből fejlődött ki az evolúció során (Gál et al. 2007).

A mozaik szerin proteázok szerkezet-funkció vizsgálatához kiméra molekulát is terveztünk. A MASP-1 szerin proteáz doménjéhez a C1r CCP2 modulját illesztettük. A kiméra molekulát kifejeztük bakteriális expressziós rendszerben. A kiméra autoaktiválódott és képes volt C1s-t hasítani. A rekombináns fehérjét homogenitásig tisztítottuk és kristályosítottuk. A kristályokról röntgendiffrakciós adatkészletet vettünk fel szinkrotron sugárforrásnál. A szerkezet megoldása folyamatban van.

A C1r, C1s, MASP-1 és MASP-2 közös inhibitora, a C1-inhibitor, amely szerpin típusú inhibitor. A szerpin domén mellett a molekula tartalmaz egy erősen glikozilált N-terminális domént is. A C1-inhibitor fiziológiai jelentősége igen nagy, hiánya egy súlyos betegség, az örökletes angioödéma (HAE) kialakulásához vezet. Élettani fontossága miatt a C1-inhibitor térszerkezetét már évtizedek óta próbálják meghatározni a világ vezető laboratóriumaiban. Mi is régóta próbálkoztunk a fehérje kristályosításával. A vérből izolált fehérjét nem lehet kristályosítani, valószínűleg az erősen glikozilált N-terminális domén jelenléte miatt. Rekombináns DNS-technikával olyan C1-inhibitor konstrukciót hoztunk létre, amely proteázgátló aktivitását megőrizte, azonban gyakorlatilag nem tartalmazza az N-terminális domént. A maradék glikozilációs helyeket specifikus mutagenézissel távolítottuk el. A rekombináns expresszióhoz többféle expressziós rendszert is kipróbáltunk, és végül is az élesztő (*Pichia pastoris*) vezetett eredményre. Az élesztőben termeltetett C1-inhibitor kétféle formában volt jelen: egyrészt egy funkcionálisan aktív, másrészt egy inaktív, magasabb olvadáspontú (DSC-vel mérve) forma. Az utóbbi formát sikerült kristályosítani és szerkezetét meghatározni 2,35Å felbontásban (Beinrohr et al. 2007). A szerkezet a C1-inhibitor eddig még nem azonosított látens formáját mutatja, ahol a reaktív hurok (reactive center loop=RCL) egy hétszálú β -lemezbe van beintegrálódva. A szerkezet felszíni töltéseloszlásának elemzése alapján hipotézist dolgoztunk ki a C1-inhibitor működésének heparin általi modulációjára. A „szendvics modell” szerint a kötődő polianion (heparin) leányékolja a szerpin domén pozitív töltését, ami ezután megváltozott sebességgel inaktíválja a különböző

proteázokat. A kristályszerkezet elemzése alapján meg tudtuk magyarázni olyan betegséget okozó mutációk hatását, amelyeket a szerkezet ismerete nélkül eddig nem tudtak értelmezni.

Releváns publikációk:

- Beinrohr, L., Harmat, V., Dobó, J., Lőrincz, Zs., Gál, P., and Závodszy, P. (2007)
C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease
J. Biol. Chem. **282**, 21100-21109
- Gál, P., Barna, L., Kocsis, A. and Závodszy P. (2007) Serine proteases of the classical and lectin pathways: Similarities and differences
Immunobiol. **212**, 267-277
- Gál, P., Harmat, V., Kocsis, A., Bián, T., Barna, L., Ambrus, G., Végh, B., Balczer, J., Sim, R.B., Náray-Szabó, G. and Závodszy, P. (2005)
A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activation
J. Biol. Chem. **280**, 33435-33444
- Gál, P., Láng, A., Szilágyi, K., Lőrincz, Zs., Hajdú, I., Perczel, A. and Závodszy, P. (2006)
Flexibility analysis based on NMR studies reveals intensive contact between tandem CCP modules in the C1r complement protease
Mol. Immunol. **44**, 174
- Harmat, V., Gál, P., Kardos, J., Szilágyi, K., Ambrus, G., Végh, B., Náray-Szabó, G. and Závodszy, P. (2004)
The structure of MASP-2 reveals that nearly identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions
J. Mol. Biol. **342**, 1533-1546
- Kardos, J., Harmat, V., Palló, A., Barabás, O., Szilágyi K., Gráf, L., Náray-Szabó, G., Goto, Y., Závodszy, P., Gál, P. (2008) Revisiting the mechanism of the autoactivation of the complement protease C1r in the C1 complex: Structure of the active catalytic region of C1r
Mol. Immunol. in press (elektronikusan letölthető)
- Krarup, A., Gál, P. and Sim, R.B. (2008) The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen
manuscript under preparation
- Krarup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., Gál, P. and Sim, R.B. (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2
PLoS ONE 2(7): e623. doi:10.1371/journal.phone.0000623