

A kutatási eredmények összefoglalása

Jelen OTKA pályázat (64196) a „Szerin proteázok az immunrendszerben: szerkezet, funkció, fiziológiai jelentőség” című, 46444 azonosítójú OTKA pályázat kiegészítő pályázatának tekintendő, különös tekintettel a nemzetközi együttműködésben végzett kutatásokra. A teljes kutatásról szóló szakmai zárójelentést a 46444 számú OTKA pályázat keretében nyújtottam be. Jelen beszámoló keretében ezért elsősorban a nemzetközi együttműködésben végzett kutatások eredményeit ismertetem.

A komplement rendszer a természetes immunitás részeként fontos szerepet tölt be a fertőzések elleni védekezésben. A komplement rendszer egyrészt képes közvetlenül megsemmisíteni a kórokozó mikroorganizmusokat, másrészt az immunrendszer sejtjes elemeinek (leukociták, endotél sejtek) aktiválása révén gyulladós folyamatot gerjeszt. A komplement rendszer normális működése elengedhetetlen a homeosztázis fenntartásához, működésének zavara azonban súlyos betegségek forrása lehet. Kutatásunk fő célkitűzése volt a komplement rendszer legkésőbb felfedezett és legkevésbé ismert aktiválódási útjának, a lektin útnak a minél részletesebb jellemzése. A lektin út aktiválódása során lektinek (manóz kötő lektin=MBL, fikolinok) kötődnek a betolakodó mikroorganizmusok felszínén található szénhidrát molekulákhoz. A felismerő lektin molekulák kötődése után a hozzájuk kapcsolódó szerin proteáz zimogének aktiválódnak és beindítják a proteolitikus kaszkárendszer. Az MBL-hez háromféle szerin proteáz: a MASP-1, MASP-2 és MASP-3 kapcsolódhat. A MASP-2 a lektin út kulcsenzimének tekinthető, mivel képes autoaktiválódni és C2/C4 szubsztrátot hasítani. A MASP-1 és MASP-3 biológiai szerepe még nem tisztázott.

Célul tűztük ki, hogy a MASP-2 autoaktiválódási mechanizmusát atomi szinten jellemezzük. Ehhez rekombináns formában előállítottuk az aktív és a zimogén MASP-2 katalitikus régiójának különböző hosszúságú fragmentumait. A katalitikus régió a szerin proteáz (SP) doménból és a hozzá kapcsolódó két CCP (komplement kontroll protein) modulból áll. Előállítottuk az SP, CCP2-SP és a CCP1-CCP2-SP fragmentumokat. Jellemeztük a különböző formák enzimatis aktivitását természetes (C2 és C4) és szintetikus szubsztrátokon. Mivel a zimogén forma gyorsan autoaktiválódik helyspecifikus mutagenézissel stabilizáltuk. Kétféle zimogén mutánst készítettünk, az egyikben a hasadó kötést mutáltuk el (R444Q) míg a másikban az aktív centrum szerinjét cseréltük ki alaninra (S633A). Röntgendiffrakció segítségével meghatároztuk az aktív CCP2-SP és az R444Q zimogén CCP1-CCP2-SP fragmentumok térszerkezetét (Harmat et al. 2004; Gál et al. 2005). A zimogén forma térszerkezete inaktív enzimre jellemző sajátságokat mutat, sem az oxianion

lyuk, sem pedig a szubsztrátkötő zseb nincs kialakulva. Kis szintetikus szubsztrátokon a zimogén forma nem mutat aktivitást, viszont a nagyméretű fehérjeszubsztrátot (C4) meglepően nagy hatékonysággal hasítja. Enzimatis méréseinkből megállapítottuk, hogy a CCP2 modul jelenléte nagymértékben megnöveli a C4 hasítás hatékonyságát. A CCP2 modul valószínűleg „exosite”-ot tartalmaz a fehérje szubsztrát számára. A kristályszerkezetek összehasonlításából megállapítottuk, hogy a CCP modulok szerkezete nem változik az autoaktiválódás során, tehát a C4 kötőhely a zimogén formán is jelen van. A zimogén SP domén szerkezete flexibilis, hasadás nélkül is fel tudja venni az aktív szerkezetre jellemző konformációt. A CCP modul által kötött fehérje szubsztrát indukálja ezt az átalakulást. Hasonló szubsztrát-indukációs mechanizmus lehet felelős az autoaktiválódásért is, ahol az MBL-hez kötött zimogén MASP-2 hasítja és aktiválja a másik zimogén MASP-2 molekulát. Ezt az is megerősíti, hogy az R444Q zimogén mutáns képes volt elhasítani az S633A zimogén mutánst. Az általunk megoldott röntgenszerkezeteket felhasználva számítógépesen modelleztük a szubsztrát-indukálta autoaktiválódás mechanizmusát (Gál et al. 2005).

A MASP-2 C2 és C4 hasító képessége már régóta ismert. Nem zárható ki azonban, hogy egyéb, nem-komplement szubsztrátjai is lehetnek a vérben. Munkánk során kimutattuk, hogy a MASP-2 képes hasítani és aktiválni a protrombint, amely azután fibrinogén és XIII-as faktor hasítása révén térhálós fibrin polimert alakít ki (Krarup et al. 2007). Ezzel egy fontos összekötő kapcsolatot találtunk a vérben jelenlévő két proteolitikus kaszkárendszer, a véralvadás és a komplement között. Alacsonyabbrendű élőlények immunvédekezésében ismert mechanizmus a limitált koaguláció, ami meggátolja a fertőző mikroorganizmus szétterjedését a szervezetben. Hasonló mechanizmus jelenlétét emberben még nem vizsgálták, megléte azonban nem zárható ki. A jelenség fiziológiai relevanciáját jelzi, hogy MBL-MASP-2 komplexszel borított baktériumok felszínén fibrin lerakódás detektáltunk.

A MASP-1 esetében már régebben megmutattuk, hogy trombin-szerű aktivitással rendelkezik, vagyis képes fibrinogént és XIII-as faktort hasítani és térhálós fibrin polimert létrehozni. Jelen munka keretében részletesen jellemeztük a MASP-1 proteáz hatását ezeken a szubsztrátokon (Krarup et al. 2008). Megállapítottuk, hogy a XIII-as faktort azonos helyen hasítja a két proteáz. A fibrinogén esetében némileg eltérő a hasítási mintázat, azonban egyértelműen detektálható a gyulladáskeltő fibrinopeptid B felszabadulása MASP-1 hasítás után. A fenti megfigyelések megerősítik azt az elméletet, miszerint a két proteolitikus kaszkárendszer egy ősi kaszkádból fejlődött ki az evolúció során (Gál et al. 2007).

Szintetikus és természetes szubsztrátokon alapuló teszt rendszereket fejlesztettünk ki MASP-1 és MASP-2 aktivitásának mérésére. A rekombináns MASP-2 katalitikus

fragmentuma ellen antitesteket termeltettünk és beállítottunk egy olyan ELISA rendszert, amely alkalmas a MASP-2 mennyiségének mérésére szérumban. Ezeket a mérési rendszereket használjuk MASP szintek meghatározására különböző beteg populációkban (Széplaki et al. 2008).

A MASP-1 szerkezetének meghatározása céljából, olyan rekombináns konstrukciót terveztünk, amelyik stabilabb, mint a vad típus. Pontmutációval (R504Q) eltávolítottuk a molekula belső autolízis helyét. Az így kapott MASP-1 mutáns ugyanolyan aktív, mint a vad típus, aktivitását azonban hosszabb inkubálás után is megőrzi, ezért alkalmas enzimkinetikai mérésekre és kristályosításra. Ennek a formának a kristályosítása és szerkezetmeghatározása folyamatban van.

Releváns publikációk:

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., Balczér, 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

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

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.pone.0000623

Széplaki, G., Varga, L., Laki, J., Dosa, E., Rugonfalvi-Kiss, S., Madsen, H.O., Prohaszka, Z., Kocsis, A., Gal, P., Szabo, A., Acsady, G., Karadi, I., Selmei, L., Garred, P., Fust, G., Entz, L. (2007) Low C1-inhibitor levels predict early restenosis after eversion carotid endarterectomy
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **27**, 2756-62