

A lektin út aktivációs modelljének korrigálása irányított evolúcióval létrehozott, monospecifikus MASP inhibitorok segítségével

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Héja Dávid

Szerkezeti Biokémia Program, Biológia Doktori Iskola,
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Témavezető:

Dr. Pál Gábor

A program vezetője:

Dr. Nyitrai László

A doktori iskola vezetője:

Prof. Erdei Anna



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biokémiai Tanszék

Budapest, 2012

BEVEZETÉS

A komplement rendszer a veleszületett immunitás egyik alappillére, amelyet egy 35-40 tagból álló fehérjehálózat alkot a vérben. A komplement rendszer központi modulja egy proteolitikus kaszkád. A kaszkád három eltérő útvonalon aktiválódhat útvonalanként eltérő molekuláris események hatására. A klasszikus utat immunkomplexek (antigén-antitest komplexek) aktiválják, így ha a szervezet egy számára új antigénnel találkozik, a klasszikus út mindaddig nem lép működésbe, amíg az adaptív immunválasz ki nem alakul. Ez hetekig is eltarthat. A lektin és az alternatív útvonalak ezzel szemben ellenanyagtól független módon működnek, így azonnali védvonalat képeznek a szervezet számára. A lektin és az alternatív utat olyan molekuláris mintázatok aktiválják, amelyek felismerésére evolúciós léptékben adaptálódott a komplement rendszer. Ilyen struktúra a lektin út esetében pl. a mannántartalmú bakteriális sejtfa. A komplement rendszer fő funkciója a szervezetet támadó kórokozó mikroorganizmusok és a szervezet saját, pusztuló sejtjeinek eltávolítása. A klasszikus és a lektin út esetében a molekuláris felismerést követően aktiválódnak a felismerő molekulákhoz kapcsolódó zimogén állapotú szerin proteázok, majd komplement fehérjék hasításába kezdenek. A C4 és a C2 komponensek hasítása eredményezi a sejtfelszínen lerakódó (C4b2a összetételű) C3 konvertáz kialakulását, amelyben a proteáz aktivitást hordozó C2a komponens végzi a C3 komplement fehérje hasítását. A C3 hasítási termékei közül a C3b szintén lerakódik a sejtfelszínre. Ezáltal további folyamatok indulnak el. Egyrészt ezen a ponton kapcsolódik be az alternatív út, másrészt további komplement fehérjék is hasításra kerülnek. Mindez a komplement működés utolsó lépéséhez vezet, amelynek során az elpusztítandó sejt membránjában a C5-9 komponensekből összeáll a membrán-károsító komplex (C5b-9). A komplex által a komplement rendszer minden egyéb sejtet támogatás nélkül, pusztán fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül képes közvetlenül a sejteket lízisét előidézni. Sejtet immunválaszt indukálnak viszont a komplement komponensek hasadása során felszabaduló, illetve a sejtfelszínen lerakódó komplement fragmentumok.

A komplement rendszer szabályozásának meghibásodása számos betegség kialakulásához vezet. A szívinfarktus és a szélütés során a komplement rendszer az oxigénhiányt túlélt, még funkcióképes sejteket pusztít el. A tömeges sejtpusztulás jelentős részben a lektin út túlzott aktiválódása miatt következik be. Többek között emiatt került a lektin út az érdeklődés

középpontjába. Az útvonal aktivációs mechanizmusának egyik leghomályosabb pontja a benne szereplő proteázok, a MASP-ok szerepe. Az nem vitatott, hogy a MASP-2 a fő végrehajtó proteáz, mivel egymaga képes C4 és C2 komponenseket is hasítani, ami önmagában elegendő a teljes komplement kaskád aktiválásához. Ráadásul *in vitro* megfigyelések alapján a MASP-2 zimogének képesek „önaktiválásra” is. Tehát a MASP-2 enzimnek látszólag minden képessége megvan ahhoz, hogy egymaga aktiválja a lektin utat. Ezért tartják jelenleg a MASP-2-t a lektin út autonóm aktivátorának. A MASP-1 szerepét az utóbbi években, génkiütött egérben, és olyan humán szérumban vizsgálták, amelyből előzőleg a MASP-1 fehérjét affinitás kromatográfia segítségével kivonták. Azt tapasztalták, hogy a lektin út a MASP-1 hiányában is működőképes maradt. Ugyanakkor az aktiváció sebessége nagymértékben csökkent, ami arra utalt, hogy a MASP-1 a korábban feltételezettnél nagyobb szereppel bír. Az egyik legfrissebb ilyen jellegű tanulmány Kocsis Andrea nevéhez fűződik, aki doktori munkájában a világon elsőként fejlesztett ki lektin út specifikus inhibitorokat. Az SFMI-2 specifikusan gátolta a MASP-2 enzimet, míg az SFMI-1 a MASP-1 mellett, a MASP-2 enzimet is gátolta. Az SFMI inhibitorokkal végzett kísérletek is a MASP-1 lektin út aktivációban betöltött fontos szerepére utaltak. Mindazonáltal MASP-1 specifikus inhibitor híján a MASP-1 lektin út aktivációhoz való hozzájárulásának mértékét nem lehetett pontosan meghatározni. Összegezve, az utóbbi évek eredményei nem változtattak lényegileg a korábbi aktivációs modellen, amely szerint a MASP-2 a lektin út autonóm aktivátora. Az azonban világossá vált, hogy a MASP-1 szerepe a lektin út aktivációjában nem elhanyagolható, de nem sikerült kétséget kizárólag feltárni, hogy a MASP-1 milyen módon és milyen mértékben vesz részt a folyamatban.

Doktori munkámban a MASP proteázok szerepének tisztázására vállalkoztam.

CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetőben ismertetett előzmények alapján, doktori munkámban az alábbi, egymásra épülő kísérletes célokat tűztem ki.

1. Az SGPI-2 inhibitor vázon monospecifikus, nagy affinitású inhibitorok létrehozása mind a MASP-1, mind a MASP-2 proteázok ellen, fág bemutatás módszerével.
2. A MASP proteázok lektin út aktivációban betöltött szerepének feltárása az újonnan kifejlesztett, monospecifikus MASP inhibitorok (SGMI, SGPI-2 alapú MASP inhibitor) segítségével.
3. Az SGMI/MASP komplexek kristályszerkezetének meghatározása.

Az itt megfogalmazott kísérletes célok megvalósítása elérhető közelségbe hoz olyan távlati célokat, mint a lektin út túlműködéséhez köthető betegségek (pl. szívinfarktus) célzott kezelése, vagy a lektin út szerepének felderítése a komplement rendszerrel összefüggésbe hozható betegségek kialakulásában.

MÓDSZEREK

- Irányított fehérjeevolúció

Fág bemutatást alkalmaztam az SGPI-2 vázon való MASP inhibitorok kifejlesztéséhez.
- Alap rekombináns DNS technikák

Kunkel-féle mutagenézissel hoztam létre az inhibitor-fág könyvtárat.

A szelektált inhibitor variánsok aminosav sorrendjét DNS szekvenáláson keresztül határoztam meg.

PCR technikával előállított DNS kazettákból hoztam létre egy új expressziós vektort, amelybe szintén PCR alapú mutagenézis technikával létrehozott inhibitor variánsokat klónoztam.
- Rekombináns fehérjék előállítása és tisztítása

Beállítottam egy új rendszert, amelyben az SGMI inhibitor variánsok natív formában és nagy mennyiségben termelhetők. *E. coli* BL21 Star sejtekkel termeltem az inhibitor variánsokat. Durva frakcionálási és folyadék-kromatográfiás módszerekkel tisztítottam meg az inhibitorokat.
- Funkcionális mérések

Az inhibitorok hatékonyságát a MASP proteázokon mért egyensúlyi inhibíciós állandók meghatározásán keresztül állapítottam meg.

A MASP proteázok lektin út aktivációjában betöltött szerepét ELISA típusú tesztekben vizsgáltam az SGMI inhibitorok segítségével, normál humán szérumban és vérben.
- Szerkezet vizsgálatok

Az SGMI/MASP kölcsönhatás és a MASP proteázok működésének alaposabb megértéséhez az SGMI/MASP komplexek szerkezetét röntgen kristallográfia segítségével határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

1. Az SGPI-2 alapváz kötőhurok optimalizálásával nagy affinitású MASP-1 és MASP-2 inhibitorokat hoztam létre (SGMI-1 és SGMI-2)
2. Az SGMI inhibitorok nem gátoltak egyetlen véralvadási enzimet, és a megfelelő MASP-okon kívül egyetlen más komplement proteázt sem. Tehát mindkét SGMI monospecifikus inhibitornak mondható.
3. A MASP-2 specifikus SGMI-2 hatékonyan gátolta a C5b-9 kialakulását, a C3b és a C4b lerakódást is. A MASP-1 specifikus SGMI-1 is teljes mértékben gátolta ugyanezeket a folyamatokat, de csak abban az esetben, ha az inhibitor még a zimogén MASP-ok aktiválódása előtt a hígított szérumhoz adtam. A MASP zimogének aktiválódása után az SGMI-1 inhibitorral már nem lehetett gátolni a lektin utat.
4. Fiziológias körülmények között: normál humán szérumban és teljes vérben is gátolta a lektin utat mindkét SGMI inhibitor.
5. Mindkét SGMI inhibitorral teljes mértékű lektin út gátlást lehetett előidézni MBL-MASP és Fikolin-MASP összetételű aktivátor komplexek esetében is.
6. A produktív (C3 konvertáz kialakulással járó) C2 hasítás 60%-át a MASP-1, míg 40%-át a MASP-2 végzi.
7. Meghatároztuk az SGMI-1/MASP-1 (3,2 Å) és az SGMI-2/MASP-2 (1,3 Å) komplexek kristályszerkezetét is.
8. Az eredmények alapján a lektin út aktivációjának egy új modelljét állítottam fel, ami összhangban áll valamennyi idevonatkozó kísérletes eredménnyel.

KÖVETKEZTETÉSEK

A lektin út aktiváció korrigált modellje

A kísérleti eredmények a következő, lényegileg új megállapításokra vezettek a lektin út aktivációjára vonatkozólag:

1. A MASP-1 közvetlenül és kizárólagos módon aktiválja a MASP-2 zimogént normál humán szérumban és vérben.
2. Fiziológiás körülmények között tehát a MASP-2 nem önaktiválódik, így a MASP-2 valójában nem autonóm aktivátora a lektin útnak.
3. A fiziológiásan releváns C2 hasításban a MASP-1-nek jelentősebb szerepe van, mint a MASP-2-nek.
4. A fenti megállapítások az MBL/MASP és a fikolin/MASP komplexekre egyformán érvényesek, ezért a kétféle komplex azonos működési mechanizmusú.

Az 1. és a 2. pontban foglaltak ellentmondásban állnak a jelenleg elfogadott irodalmi nézettel a MASP-ok szerepét illetően. Az ellentmondások azonban csak látszólagosak, többnyire nem magukkal a korábbi eredményekkel, hanem azok értelmezésével kapcsolatosak. Egy új, korrigált aktivációs modell segítségével az ellentmondások feloldhatóak. A MASP-1 vérben mérhető koncentrációja 20-szor magasabb, mint MASP-2 enzimé. Emiatt feltételezhető, hogy az aktiváció során a sejtfelszínre lerakódó zimogén MASP-2 enzimek az esetek többségében MASP-1 zimogének gyűrűjében helyezkednek el. Ráadásul a MASP-2 zimogének aktiválását az aktív MASP-1 20-szor nagyobb sebességgel végzi, mint az aktív MASP-2 (Dobó József nem publikált eredményei alapján). Ezen ismeretek alapján érthetővé válik, hogy miért lehet a MASP-1 a MASP-2 professzionális aktivátora. Az itt ismertetett egyszerű felállás magyarázatot ad a 2. megállapításra is. A 20-szoros feleslegben lévő MASP-1 proteázok térben elválasztják, izolálják a MASP-2 zimogéneket, amelyek inherens önaktiváló képessége ezáltal nem érvényesülhet. Ezt mutatjuk ki akkor, amikor a MASP-1 molekulákat *in situ* gátoljuk. Modellünkben következik, hogy amennyiben a rendszerből teljes mértékben eltávolítanánk a MASP-1 enzimet, úgy a MASP-1 által üresen hagyott kötőhelyeket (legalább részben) MASP-2 enzimek töltenék fel a felismerő molekulákon. Ebben az esetben a MASP-2 zimogének kellő közelségbe kerülhetnek ahhoz,

hogy önaktiváló képességük érvényesülhessen. Tehát MASP-1 hiányában is várható volna a lektin út aktiválódása, de csak jóval lassabb ütemben, mint a MASP-1 jelenlétében. Pontosan ezt figyelték meg azokban a kísérletekben, ahol géniütéssel vagy affinitás kromatográfiával teljesen eltávolították a MASP-1 enzimet (lásd bevezető). Ezekben a kísérletekben tehát nem fiziológiás összetételben voltak jelen a lektin út aktivációs komplexei. Ezzel szemben az új modell alapjául szolgáló kísérleteket normál humán szérumban és teljes emberi vérben végeztem. Így intakt állapotú lektin út aktivációs komplexekben vizsgáltam a MASP-1 enzimaktivitás *in situ* gátlásának hatását. Összefoglalva, a legfontosabb különbség a régi és az új modell között az, hogy amíg a régi modell autonóm útvonal aktivátornak tartotta a MASP-2 proteázot, addig az új modell azt teljes mértékben a MASP-1 enzim irányítása alá vonja. Az SGMI inhibitorokkal végzett kísérletek tehát felfedték, hogy az eddig másodhegedűsnek tartott MASP-1 valójában a lektin út aktivációjának karmestere.

A dolgozat egyik általános konklúziója, hogy a géniütéssel és az *in situ* gátlással végzett kísérletek eltérő eredményre vezethetnek egy-egy adott fehérje funkcióját illetően. Ezzel kapcsolatban a további következtetés az, hogy ilyen esetben folytatni kell a kísérleteket mindaddig, amíg olyan működési modellhez jutunk, ami az összes kísérleti rendszer eredményeivel összhangban áll. Csak így tárhatjuk fel az adott fehérje valós funkcióját.

Szerkezeti aspektusok

Az SGMI inhibitorok első ízben kínáltak lehetőséget arra, hogy a MASP enzimek szerkezetét szubsztrátszerű fehérje partnerrel komplexben is megfigyelhessük. A komplex képződés hatására a MASP-2 esetében nagymértékű átrendeződés következik be a szubsztrát-kötő felszint övező felszíni hurkok szerkezetében, míg a MASP-1 esetében alig észlelhető ilyen változás. A felszíni hurkok eltérő szerveződése lehet a szerkezeti alapja a MASP-2 rendkívül szűk, és a MASP-1 viszonylag széles szubsztrát specifikitásának.

Figyelemreméltó jelenség az is, hogy a MASP-2 milyen jelentős térszerkezeti változást követel meg a szubsztrátszerű inhibitor részéről a komplex kialakulása során. Logikus feltevés, hogy hasonló jellegű konformáció változásokat igényelhet a MASP-2 komplexképzése a természetes szubsztrátaival. Elképzelhető, hogy csak a komplexben válik a megfelelő enzim számára hozzáférhetővé a C2 illetve a C4 hasítandó peptidkötése.

Az SFTI és az SGPI-2 alapú MASP inhibitor fejlesztés eredményei, és az SGMI/MASP komplex szerkezetek összehasonlító vizsgálata rávilágított arra, hogy az optimális proteázkötő

szekvencia inhibitor vázától való függetlenségének Laskowski által bevezetett elmélete nem lehet érvényes a „kulcs-zár” mechanizmustól eltérő módon kialakuló, konformáció változással járó fehérje-fehérje kölcsönhatások esetében.

Terápiás vonatkozások

Új modellünk alapján a MASP-2 és a MASP-1 egyaránt tökéletes gyógyszer-célpont a lektin út által kiváltott szövetsérülések kivédésére. Ennek megfelelően mindkét SGMI inhibitor gyógyszer-jelölt molekulának tekinthető. Ezek a monospecifikus inhibitorok emellett hasznos eszközei lesznek a lektin út még ismeretlen élettani és kórélettani szerepeinek feltárásában is.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Héja, D., Kocsis, A., Dobó, J., Szilágyi, K., Szász, R., Závodszy, 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 U S A* **109**, 10498-503.

Héja, D., Harmat, V., Fodor, K., Wilmanns, M., Dobó, J., Kékesi, K. A., Závodszy, 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.

Gál P., Héja D., Pál G., Závodszy P. (2010)

Új fehérjék, eljárás előállításukra és alkalmazásuk

Lajstromszám: P1000366

Szabadalom

A dolgozat témájához szorosan nem kötődő egyéb közlemények

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.

Bozsó Zs., Hári P., Hegyi Gy., Héja D., Málnási Cs. A., Pál G., Penke B. (2011)

Keresztkötő reagens biopolimerekhez

Lajstromszám: P1100720

Benyújtott Szabadalom