

Doktori értekezés

A nemkatalitikus domének szerepe a C1r komplement szerin proteáz működésének szabályozásában

Készítette: Major Balázs

Témavezető: Dr. Závodszy Péter
Kutató Professor, az MTA rendes tagja

MTA Természettudományi Kutató Központ
Enzimológiai Intézet

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola (Vezetője: Dr. Erdei Anna)
Szerkezeti Biokémia Program (Vezetője: Dr. Gráf László)



Budapest, 2012.



Köszönöm **Dr. Friedrich Péternek, Dr. Závodszy Péternek** és **Dr. Buday Lászlónak**, hogy doktori disszertációmhoz a kutatásokat az MTA SZBK Enzimológiai Intézetében végezhettem.

Köszönöm **Dr. Erdei Annának**, a Biológia Doktori Iskola vezetőjének és **Dr. Gráf Lászlónak** a Szerkezeti Biokémia program vezetőjének, hogy a képzésben részt vehettem.

Köszönettel tartozom **Dr. Závodszy Péternek**, hogy lehetővé tette a csoport munkájába való bekapcsolódásomat, valamint megteremtette a munka feltételeit; figyelemmel kísérte munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani mentoraimnak **Dr. Gál Péternek, Dr. Kardos Józsefnek** és **Dr. Dobó Józsefnek** munkám irányításáért és minden részletre kiterjedő gondos figyelmükért, tanácsaikért.

Hálás vagyok **Dr. Hajdú Istvánnak, Dr. Kékesi Adrienna Katalinnak, Dr. Lőrincz Zsoltnak, Cseh-Szilágyi Katalinnak**, valamint köszönetemet szeretném kifejezni a **Závodszy csoport minden munkatársának** és a **TargetEX Kft. minden munkatársának** hogy bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzájuk és kérhettem segítségüket.

Külön elismerés illeti **Sajó Ráchelt, Paréj Katalint, Varga Jánost, Megyeri Mártont, Baksa Attilát**, hogy a kutatásainkon túl is segíteni tudtuk egymást.

Köszönet illeti **Dr. Perczel Andrást, Dr. Láng Andrást** a közösen végzett kísérleti munkában nyújtott kimagasló teljesítményeikért.

Természetesen a legnagyobb és legmélyebb köszönet **családomnak** és a **barátaimnak** szól, mert kiálltak mellettem feltétel nélkül bármely pillanatban.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések és definíciók	3
I. Bevezetés	6
II. Irodalmi áttekintés.....	7
1. A komplementrendszer története, aktiválódása és funkciója.....	7
1. 1. A klasszikus útvonal	9
1. 1. 1. A C1 komplex, a C1r ₂ S ₂ tetramer és a C1r felépítése	10
1. 2. Az alternatív útvonal.....	16
1. 3. A lektin útvonal	17
1. 4. A komplementrendszer egyéb hatásai és új aktivációs útvonalai.....	18
2. A CCP domén felépítése és előfordulása.....	20
3. A CUB domén felépítése és előfordulása.....	23
III. Célkitűzés.....	25
IV. Anyagok és módszerek.....	27
1. Kompetens sejtek készítése és DNS transzformálása baktériumsejtekbe.....	27
2. Polimeráz láncreakció (PCR).....	28
3. DNS tisztítás, izolálás, ligálás.....	28
4. Gélelektroforézis.....	29
5. Immunblott.....	29
6. Rekombináns fehérje expressziója E. coli sejtekben	30
7. A biomassa feltárása és inklúziós test preparálása.....	30
8. Renaturáció	31
9. Fehérjetisztítás	32
10. Cirkuláris Dikroizmus spektroszkópia(CD)	33
11. Differenciális Páztázó Kalorimetria (DSC).....	34
12. Izotermális Titrációs Kalorimetria (ITC).....	34
13. Tömegspektroszkópia (MS).....	35
14. Hidrogén-Deutérium kicserélődés (H-D csere)	35

15. Mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR)	35
16. A zimogén C1r preparálása szérumból és az autoaktiváció sebességének meghatározása különböző Ca^{2+} koncentrációk jelenlétében.....	36
V. Eredmények és megbeszélésük.....	38
1. A C1r CUB2-CCP1, a C1r CCP1 és a C1r CCP1-CCP2 fragmentumok előállítása	38
2. A C1r CUB2-CCP1, a C1r CCP1 és a C1r CCP1-CCP2 fragmentumok hőstabilitásának meghatározása és Ca^{2+} kötésének kimutatása DSC segítségével.....	40
3. A C1r CUB2-CCP1 és a C1r CCP1, valamint a C1r CUB2 fragmentumok szerkezetének jellemzése CD spektroszkópiával.....	43
4. A C1r CUB2 domén Ca^{2+} kötési erősségének a jellemzése ITC-vel.....	45
5. A C1r CUB2 domén flexibilitásának jellemzése H-D izotópkicserélődés segítségével.....	47
6. A C1r CCP1, a C1r CCP2 és a C1r CCP1-CCP2 domének flexibilitásának jellemzése és a kialakuló kölcsönhatások leírása NMR spektroszkópia segítségével	49
7. Zimogén C1r szerin proteáz preparálása vérből és a Ca^{2+} koncentráció befolyásoló hatásának kimutatása az autoaktiváció sebességére	56
VI. Összefoglalás	61
VII. Summary	63
VIII. Irodalomjegyzék	65
IX. Ábrajegyzék.....	72
X. Publikációk	74
Konklúzió.....	75
Conclusion	76

Rövidítések és definíciók

Ampicillin	D (-) - α - Aminobenzilpenicillin
APS	ammónium-peroxi-diszulfát
aSFP	acidic seminal fluid protein (spermadhezinek családjába tartozó fehérje)
BCIP	5-bróm-4-klór-3-indolil foszfát
C1/2/3...9	A komplementrendszer első/második/harmadik...kilencedik komponense
C4BP	C4 Binding Protein (C4 kötő fehérje)
CCP	complement control protein, (komplement kontroll protein domén)
CD	cirkuláris dikroizmus
eDNS	copy DNS (mRNS-ről reverz transzkriptáz enzimmel készült DNS másolat)
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (borjú bélből izolált alkalikus foszfatáz)
CPN	carboxypeptidase N (karboxi-peptidáz N)
CR1/2	Complement Receptor 1/2
CUB	a CUB elnevezés három fehérje nevéből származik, melyekben elsőik között találták meg a domént: C1r, sea urchin (tengeri sün) protein Uegf, human Bone morphogenetic protein-1
dNTP's	dezinukleotid-5'-trifoszfátok gyűjtőneve (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DAF	Decay-Accelerating Factor
DSC	Differential Scanning Calorimetry (differenciális pásztázó kalorimetria)
DTT	ditriotreitol, (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol
EGF	epidermal growth factor (epidermális növekedési faktor)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	2-[2-[bisz(karboximetil)amino] etil-(karboximetil)amino]-ecetsav (etilén-diamin-tetraecetsav)

FPLC	fast protein liquid chromatography (fehérjékre alkalmazott középnyomású folyadékkromatográfia)
Gu*HCl	guanidin-hidroklorid
HEPES	2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etánszulfonsav
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Heteronukleáris egyszeres kvantum korrelátatott spektroszkópia)
IgG / M	immunglobulin G/M
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid
ITC	Isothermal Titration Calorimetry (izotermális titrációs kalorimetria)
LB	Luria-Bertani Médium
LMW	Low Molecular Weight (kis molekulásúlyú SDS-PAGE standard)
MAC	membrane attack complex (membránkárosító komplex)
MASP	mannan-binding lectin associated serine protease (mannánköttő lektinhez kötődő szerin proteáz)
MBL	mannan binding lectin (mannánköttő lektin)
MCP	membrane cofactor protein (membrán kofaktor fehérje)
mRNS	messenger (hírvivő) RNS
MS	Mass Spectrometry (Tömegspektroszkópia)
NBT	nitro blue tetrazolium
NHS-activated	N-hidroxi-szukcinimid csoporttal aktivált gyanta
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (mágneses magrezonancia)
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NPGB	p-nitrophenyl-p ³ -guanidinbenzoate
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
pET	plasmids for expression by T7 RNA polymerase (Novagene [®]) (expressziós vektor)
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride (fenil-metil-szulfonil-fluorid)
primer	PCR-nél alkalmazott oligonukleotid
RCA	Regulators of Complement Activation

SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)
SP	serine protease domain (szerin proteáz domén)
T ₁ , T ₂	Spin-Rács relaxációs idő-, Spin-Spin relaxációs idő az NMR-es mérésekben
TAE	Tris+Nátrium-Acetát+EDTA puffer
TE	Tris + EDTA puffer
Temed	N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometán (2-amino-2-hidroximetil- 1,3-propándiol)

I. Bevezetés

A gerincesek veleszületett immunrendszerének fontos része a komplementrendszer, amelynek legfontosabb feladata a kórokozók felismerése és elpusztítása, továbbá a megváltozott saját struktúrák eliminálása. A komplementrendszer több mint 30 különböző fehérjemolekulából (szerin proteázok, regulátorok, receptorok) áll. Komponensei három egymással összefüggő kaszkárendszerbe szerveződnek: a klasszikus, az alternatív és a lektin út rendszerébe.

A klasszikus út aktiválásának első lépése az ellenanyagok által megjelölt antigének (pl.: kórokozók) – azaz az immunkomplexek – felismerése, majd egy bonyolult enzimátikus kaszkárendszer beindítása. Nagyon fontos, hogy a komplement komponensei csak akkor aktiválódjanak, mikor valóban szükség van rájuk.

A klasszikus út első komponense a C1 komplex. A C1 komplex vázát a C1q felismerő molekula alkotja, amelyhez egy szerin proteáz zimogénekből felépített heterotetramer (C1s-C1r-C1r-C1s) kapcsolódik. A C1r és a C1s molekulák 6-6 doménből felépített szerin proteáz proenzimek, amelyeknek komplexbéli helyzetét és működését 5-5 nem katalitikus domén határozza meg és szabályozza.

A C1 komplex szerkezetéről nem teljesek az ismereteink. Működésére és működésének szabályozására több funkcionális szerkezeti modell létezik, amelyekről a későbbiekben részletesen beszámolunk. Legkevesebbet a nem katalitikus modulok funkcionális szerepéről tudunk, pedig a komplementrendszer komplexeinek és a működésének minél pontosabb ismerete meghatározó szereppel bír a kórokozók elleni küzdelem és az autoimmun folyamatok megértésében.

Munkám célja az volt, hogy a C1r szerin proteáz ezen nem katalitikus, nehezen preparálható és vizsgálható doménjeinek szerepét tisztázzam és ennek alapján finomítsam a C1 funkcionális modelljét.

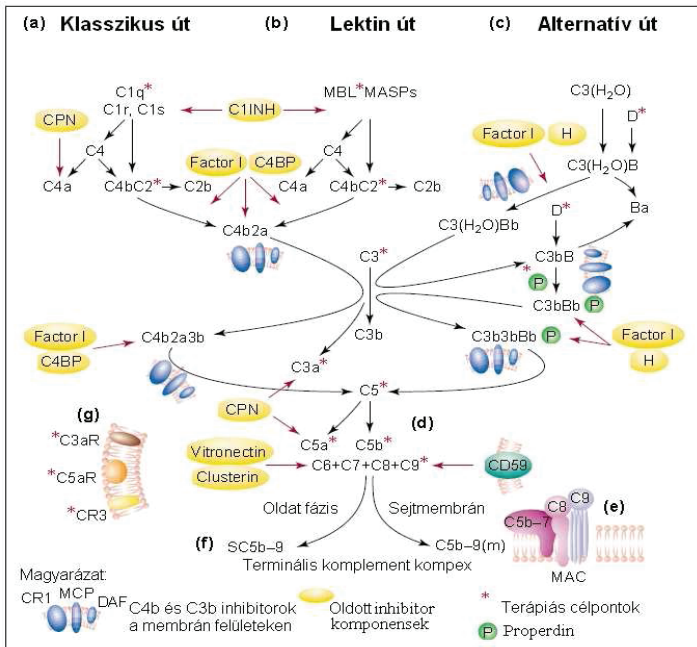
A jelenleg elfogadott modell jelentős komplexen belüli szerkezet átrendeződéseket feltételez az aktiválás során. Ezen feltételezésekből kiindulva a nem katalitikus domének és domén kombinációk előállítására, szerkezetük és konformációs flexibilitásuk leírására törekedtem. Célom volt továbbá a Ca^{2+} kötő hely behatárolása és a Ca^{2+} kötés funkcionális, szabályozó szerepének tisztázása is.

II. Irodalmi áttekintés

1. A komplementrendszer története, aktiválódása és funkciója

A komplementrendszer aktiválódásának három útvonalát különbözteti meg a szakirodalom: a klasszikus útvonalat, az alternatív útvonalat és a lektin útvonalat (1. ábra).

A komplementrendszerre utaló felfedezések már a 19. században napvilágot láttak. Fodor József az 1880-as években vizsgálatokat végzett a vér baktériumölő képességével kapcsolatban és több tanulmányt is írt az eredményeiről. Paul Ehrlich, Jules Bordet és George Nuttall szintén leírták a vér savójának baktericid jellemzőjét. A vérsavó elpusztítja az antrax kórokozóját, ha nem hevítik 55 °C fölé vagy nem tárolják hosszabb ideig szobahőmérsékleten. Később kimutatták hőstabil „baktericid faktor”-t is a vérsavóban.



1. ábra. A komplementrendszer felépítése Mollnes és munkatársai cikk alapján [1].

Bebizonyosodott, hogy az immunizálás hatására nem növekedik a „baktericid faktor” mennyisége a vérben. A rendszer elnevezése (complement – kiegészítő) onnan származik, hogy annak működése az antitestek mellett valósul meg.

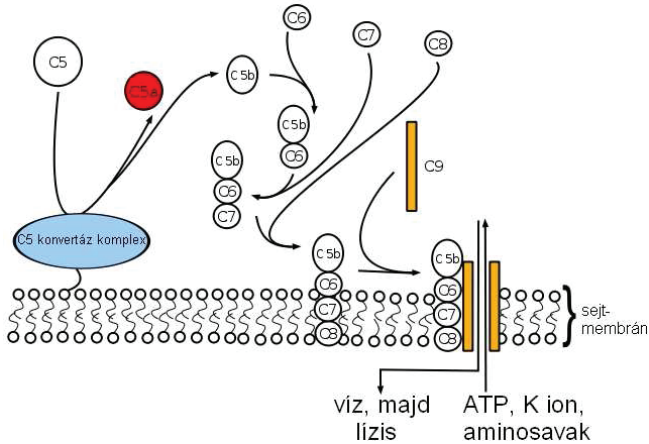
Az 1920-as évekre már ismerték a C1, C2, C3, C4 fehérjemolekulákat és meg tudták állapítani, hogy az ismert fehérjék csak antitestek jelenlétében indítják be a védekező mechanizmust, a komplementrendszer. A későbbiekben elnevezték klasszikus útvonalnak ezt a típusú aktivációt.

1954-ben fedezték fel a „properdin útvonalat”, amit ma már alternatív útvonalaként ismerünk. Az alternatív útvonal antitestektől függetlenül fejt ki a hatását [2].

„Csak” 1978-ban írták le, hogy a vérben megtalálhatók MBL molekulák, amelyekről később bebizonyosodott, hogy MASP-okat kötnek [3]. Az MBL-hez (és a később felfedezett ficolinokhoz) kötődő MASP szerin proteázok felfedezése 1992-ben történt [4]. Az MBL-MASP, ficolin-MASP komplexek szintén antitestektől függetlenül indítják be a komplementrendszer kaszkádját.

A komplementrendszer mindhárom útvonalának aktiválódása a kaszkád C3 komponensében található [1, 5]. Majd az aktivált C5b kötve marad a patogén felszínén és összegyűjti a vérben inaktív formában található C6, C7, C8 komponenseket, valamint mintegy 10-15 C9 monomer molekulát, amelyek kialakítják a membránkárosító komplexet (MAC) a patogén sejt sejtthártyájában (2. ábra). Olyan szerkezeti változások történnek már a C7 molekula megkötésénél is, amik nagy hidrofób felszínnek megjelenését eredményezik. A létrejövő komplex a célsejt sejtmembránjába ékelődik. A kialakult póruson keresztül folyadék áramlik a sejtbe és ez ozmotikusan instabil állapotot eredményez. A MAC kialakulása a felismert kórokozó líziséhez, pusztulásához vezet.

Ha a fenti reakció nem egy sejt felületén zajlik, akkor a komplex leválik a molekula felületéről és a közelben lévő sejtek sejtmembránjába ágyazódik. Ezek a folyamatok károsíthatják a saját sejteket.



2. ábra. A komplementrendszer „második része”, a közös effektor szakasza [6].

1. 1. A klasszikus útvonal

A klasszikus útvonal aktivációja antitestfüggő [1, 5, 7]. A klasszikus út első komponensét – a C1 komplexet – egy IgM pentamer vagy két IgG (monomer) molekula képes aktiválni. Az antigén-antitest komplex Fc részét képes kötni a C1 komplex [8]. A C1 komplexben az antitest felismerést a C1q molekula végzi. A C1q globuláris feje az antitest CH2 doménjéhez kötődik [9]. Feltételezhető, hogy a kötődés hatására végbemenő konformációs változás váltja ki a C1 komplexben elhelyezkedő zimogén C1r autoaktiválódását. Az aktív C1r hasítja a vele egy komplexben található C1s-t, majd a C1s hasítja a C4-et C4a- és C4b-re. A C4b kötődik a patogén felszínhez, a C4a felszabadul mint anafilatoxin. A C2 kötődik a patogén felszínén kitapadt C4a-hoz. A C1s hasítja a C2-t is C2a- és C2b-re. A patogén felszínén kialakul a C3 konvertáz (C4bC2a). A C3 konvertáz hasítja a C3-at C3a- és C3b-re. A C3a-nak anafilaxiás hatása van, míg a C3b kötődik a C3 konvertázhoz (C4bC2a). A kialakult komplex (C4bC2aC3b) lesz a C5 konvertáz. A hasadó C5-ből felszabaduló C5a-nak erős anafilaxiás hatása van.

A C1r és C1s molekulákat a C1 inhibitor gátolja a vérben, így tudja a szervezet szabályozni a komplement aktiválódást [1, 5, 7]. A C1 inhibitor megakadályozza a C4

és C2 molekulák elhasítását. A klasszikus út egy másik szabályzó eleme a C4BP. Ez a szolubilis komponens kötődik a C4b molekulához és gyengíti a C3 konvertáz stabilitását [5].

Az I faktor hasítja a C3b α -láncát és a C4b-t mind a szérumban, mind sejt felszínén kofaktor (H faktor, komplement receptor 1/CD35, C4BP, membrán kofaktor protein/CD46) jelenlétében, ezáltal szabályozva a komplement komponensek aktiválódását [5].

Kimutatták, hogy a klasszikus útvonal is beindítható antitest független módon. Testidegen molekulák, a C reaktív protein, vírus fehérjék, β -amiloid, valamint mitokondrium fragmentumok, nekrotikus/apoptotikus sejttermelékek (RNS, DNS) képesek önmagukban is aktiválni a klasszikus útvonalat [5].

1. 1. 1. A C1 komplex, a C1r₂s₂ tetramer és a C1r felépítése

A C1q molekula térszerkezete „egy hat szál tulipánból álló csokorra emlékeztet”, hat globuláris fejből és a fejekhez tartozó hat kollagén szárból áll (3-4. ábra). A hat szál három-három különböző polipeptid láncból épül fel. A láncok N-terminálisa a tulipáncsokor szára, a glonuláris fej a láncok C-terminálisa. A szálak N-terminálisán a fehérjeláncokat diszulfid-hidak erősítik [10]. A szárhoz kötődően, hajlított monomerekből felépülve helyezkedik el a C1r₂s₂ tetramer, amely felelős a C1 komplex enzimatis aktivitásáért (5. ábra B). A C1r és a C1s is 6 doménből felépülő, moduláris szerin proteáz (5. ábra A) [11]. A szerin proteáz domének a PA klánba, a PA(S) alklánba, az S1 családba és A alcsaládba tartozó kimotripszin szerkezetű domének (C1r: S01.192, C1s: S01.193) [12]. A szerin proteáz (SP) domén a C-terminálison található, amit megelőz a CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2 nem katalitikus doménből felépülő szakasz. A C1 komplexet kalcium-ionok stabilizálják a CUB és EGF doméneken keresztül valamint hidrofób kötőfelszínek a C1r CCP1 és C1r SP doméneken keresztül (5. ábra A, B).

A legutóbbi kutatások eredményei alapján több C1 komplex modell is született [13, 14, 15, 16]. Én az aktuálisan két legnépszerűbb modellen keresztül mutatom be, hogy a C1 komplex szerkezetére miként próbálnak rávilágítani. A Phillips és munkatársai cikk szerzőinek modellje (3. ábra) szerint a komplexben a C1q kollagén

száraikhoz a C1r₂S₂ tetramer a C1r CUB1 doménen, a C1r CUB2 doménen és a C1s CUB1 doménen keresztül kötődik [16]. A komplex 2009-ben közölt modellje abban különbözik a Gaboriaud és munkatársai által (Arlaud modell) közölt C1 komplex modelljétől (4. ábra), hogy a szerin proteázok a C1q kollagén szárai között foglalnak helyet, míg az Arlaud modellnél a proteázok a C1q kollagén szárait külső felületük felől koordinálták [15]. A két modell nagyban különbözik, a C1r₂S₂ tetramer elhelyezkedésének tekintetében. A Phillips *et al.* cikkben közöltek szerint a tetramer kompaktabb az Arlaud modellben leírtakhoz képest.

A tetramer összeszerelődésének menete már a 2004-es Gaboriaud és munkatársai cikk megszületésekor is ismert volt és azóta a tudásunk e tekintetben nem változott [15]. A tetramer felépülésének első lépése a C1r dimerizációja. A C1r molekulák hidrofób felszíneken keresztül képesek egymáshoz kapcsolódni. A C1r molekulák CCP1 doménjei kerülnek kölcsönhatásba a másik C1r SP doménjeivel [17, 18]. Így egy fej-láb illeszkedésű komplex, két felületen kapcsolódó C1r₂ képződik. A C1r dimerekhez Ca²⁺-okat kell adni a C1s molekulákon kívül, hogy tetramer kialakulhasson [19, 20, 21, 22]. A C1r CUB1-EGF fragmentuma és a C1s CUB1-EGF fragmentuma is köt Ca²⁺-t és a fehérjék kalcium kötött állapotukban fej-láb kötődéssel kialakítják a tetramert (5. ábra B).

A fellelhető kristályszerkezetek alapján és az általuk végzett felületi plazmon rezonancia mérések eredményei alapján Phillips és munkatársai részleges C1 komplex modellt építettek [16]. Modellükben a C1q kollagén száraihoz a tetramer C1r CUB1, a C1s CUB1 és a C1r CUB2 domének kötődnek. Feltételezéseik szerint a hat kollagén szárhoz hat CUB típusú domén kapcsolódik. A C1s CUB2 doménje valószínűleg nem vesz részt a komplex kialakításában. A cikk szerzői szerint a tetramer CUB1-EGF-CUB2 fragmentumai egy szinten helyezkednek el a kollagén szárok között kifesztve (3. ábra), míg a tetramer CCP1-CCP2-SP fragmentumai a C1q globuláris fejeihez közelebb, a CUB-EGF részek „felett” foglalnak helyet [16].

A C1 komplex és az antigén-antitest immunkomplex kötődése konformáció változást okoz a C1q molekulában. C1q konformáció változása aktivációs jel a C1r számára. A C1r-ben is konformáció változások mennek végbe, aminek hatására hasítja a vele tetramerben levő másik C1r-t. Az aktív C1r molekulák hasítják a komplexben található C1s molekulákat, létrehozva az aktív C1 komplexet. A C1 komplex aktiválódása során egy mechanikai jel enzimatikus jellé alakul át [14, 22, 23, 24].

A C1r komplex aktiválódásának első lépésére két mechanizmust tartanak lehetségesnek. Mindkét esetben azonos a kiinduló állapota, miszerint a C1r molekulák dimer formájukban helyezkednek el a C1 komplexben. Az egyik modell szerint a dimert alkotó C1r szerin proteázok az autoaktivációjuk során elcsúsznak egymáshoz képest, a kölcsönhatás fenntartása mellett valósul meg az autoaktiváció. A másik modell szerint a dimer állapot felbomlik, a két C1r proteáz között a kötődés megszűnik. Ez az első lépés vezet a C1r molekulák autoaktiválódásához, majd az aktív C1r szerin proteázok aktiválják a velük komplexet alkotó C1s szerin proteázokat. Mindkét aktiválódási modell megvalósulásához szükség van egy olyan flexibilis molekula szakaszra a C1r-en belül, amely lehetővé teszi, hogy a már aktív C1r molekula képes legyen a C1s aktiválásához szükséges elmozdulásra. Ez a C1r SP domének 92 Å-ös elmozdulását jelenti a Gaboriaud és munkatársai cikk szerint [15].

Egyes kutatók felvetik, hogy a zimogén proteázok a C1 komplexben feszült konformációban helyezkednek el. Ez a feszült konformáció csak az aktiváció során oldódik fel és a nyugalmi helyzetbe csak az aktív komplex szerin proteázai kerülnek.

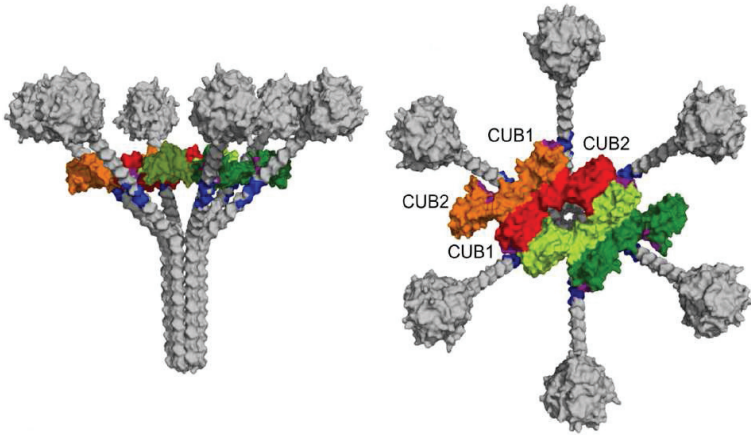
Kardos és munkatársai a C1r γ B dimer szerkezetét közlő cikkben megmutatják, hogy a fehérjekomplex a kristályrácsban a kristályosítás körülményei között a szomszédos komplexszel enzim-szubsztrát kapcsolatban áll [25]. A cikk eredményei között látható, hogy milyen kölcsönhatás alakul ki a C1r SP domének valamint a C1r SP – C1r CCP2 domének között. Az enzim-szubsztrát kölcsönhatás ismeretében a szerzők bemutatnak egy, az előzőeknél valószínűsíthetőbb aktiválódási mechanizmust. Ez az autoaktiválódási sorozat a fragmentum szerkezetének ismeretével azt mutatja, hogy a C1r SP doméneknek nincs szükségük 92 Å-ös elmozdulásra – mint későbbi publikációkban ezt feltételezik a Phillips és munkatársai cikk szerzői is. Ez az elmozdulás nem is volna lehetséges, ismerve a C1q szárai közötti tér méreteit.

A C1 komplexben a két C1r CCP1-CCP2-SP rész a proteáz molekula oldal irányába történő elhajlásával, kissé megcsavarodva egymással kölcsönhatásba lép. Állítják a szerzők a C1r γ B szerkezet alapján, hogy a CCP1 és a CCP2, valamint a CCP2 és az SP domének közötti szakaszok merevek, szerkezetüket nem képesek változtatni. Ezen eredmények alapján mondható, hogy a C1r CUB2 domén lehet az eredete a flexibilitásnak, amit a cikk szerzői is feltételeznek. A C1r CUB1 és az EGF domének a komplex felépítésében betöltött szerepük miatt nem játszhatnak szerepet az aktiválódás folyamatában.

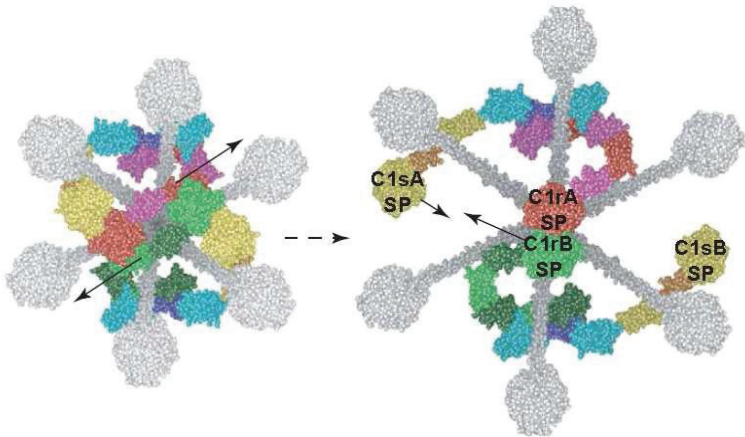
Az irodalomban közöltek alapján feltételezhetjük, hogy a CUB1 domén köt egy Ca^{2+} -t, valamint a CUB1-EGF fragmentumban a két domén közösen koordinál még egy Ca^{2+} -t [20].

A CCP2 és az SP domének közötti linker régióban található az a peptid kötés, aminek az elhasítása szükséges az aktív proteáz kialakulásához. Ezt a részt aktivációs peptidnek nevezik a C1r, a C1s és a MASP proteázoknál is. A C1r autoaktivációja során az Arg^{446} után hasad a fehérje gerinc peptid kötése. Ez a régió egy triptofánban és prolinban gazdag, viszonylag merev szegmens, ami a komplement proteázokon kívül más extracelluláris proteázokra is jellemző [26, 27]. Az aktivációs peptidet megelőző részt (a zimogén enzim N-terminális szakasza) A láncnak-, ez utáni részt (a zimogén enzim C-terminális szakasza) B láncnak nevezzük. Az A láncot felosztják még α -, β - és γ fragmentumokra [28]. A CCP1 és az SP domének felelősek a C1r dimerizációjáért, a létrejövő kölcsönhatás Ca^{2+} -t nem igényel [17].

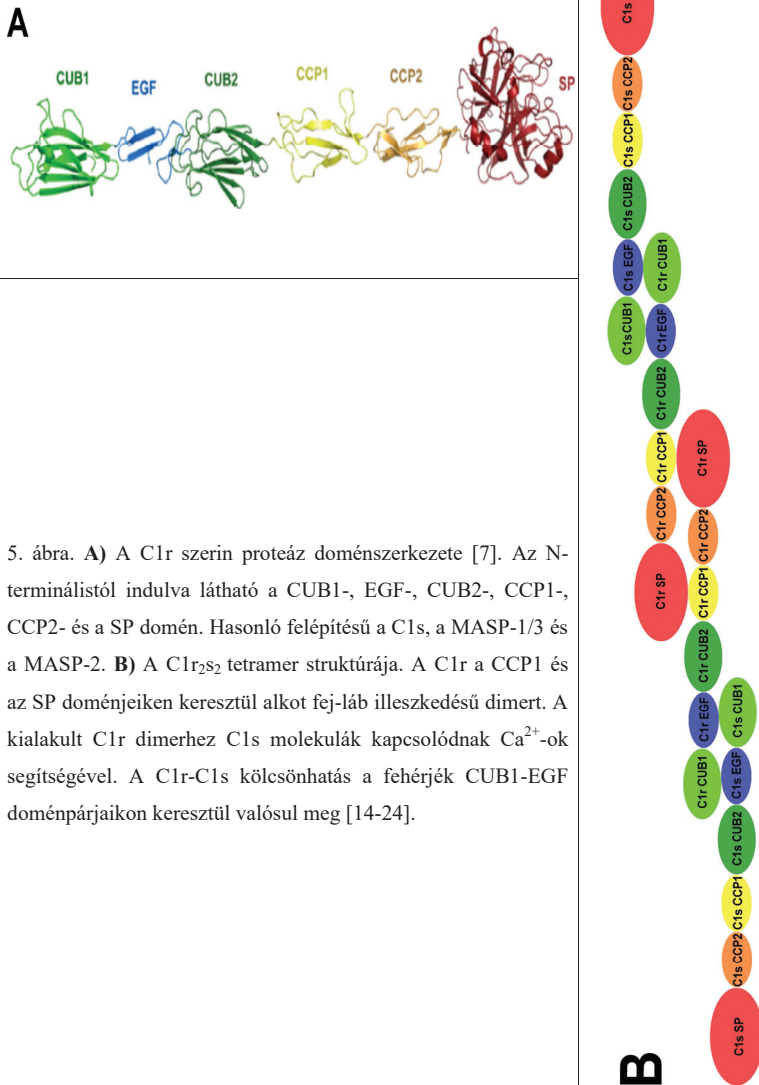
A komplementrendszer receptoraiban és regulátor fehérjeiben gyakoriak a CCP domének, de megtalálhatóak más komplementrendszeri szerin proteáz fehérjékben is. A CUB típusú domén ritka nem komplement fehérjékben. A CUB domének feltételezhetőleg a fehérje-fehérje kölcsönhatás (pl.: C1s-hez való kötődés, C1q-hoz való kötődés) kialakításában játszanak szerepet.



3. ábra. A C1 komplex részleges modellje a C1q-val, C1r- és C1s CUB1-EGF-CUB2 fragmentumokkal [16].

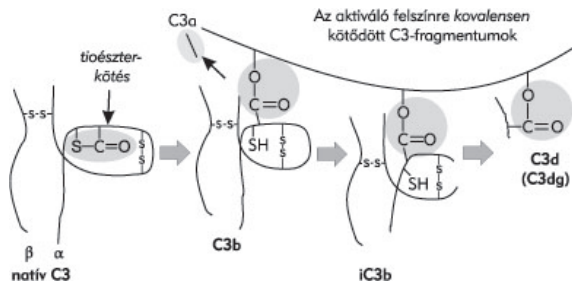


4. ábra. A Gaboriaud és munkatársai által készített C1 komplex modellje és a komplex aktiválódásának a mechanizmusa [15]. A komplexet felülről, a globuláris fejek felől látjuk.



1. 2. Az alternatív útvonal

Az alternatív útvonal aktiválódását baktériumok felszínéről, élesztő sejtek felszínéről vagy vírusfertőzött sejtek felszínéről hiányzó védekező struktúrák okozzák [6]. A szialsavban szegény sejt felszín nagyobb valószínűséggel indítják be a kaskádrendszert ezen az útvonalon, mint ahol a szialsav normál sűrűségben fordul elő. Az aktiválódás antitestet nem igényel. Az aktiválódás a C3 fehérje α -láncán belül megtalálható reaktív tioészter kötés spontán hidrolízisével kezdődik (6. ábra). A szerkezet saját sejtjei különböző mechanizmusokkal rendelkeznek, amikkel megakadályozzák a C3 kikötődést a saját felszínükre. Ezek a szabályzó mechanizmusok mind oldott-, mind sejt felszíni fehérjéket jelentenek (DAF - Decay Accelerating Factor/CD55, komplement receptor 1/CD35, membrán kofaktor fehérje/CD46, H faktor, I faktor).



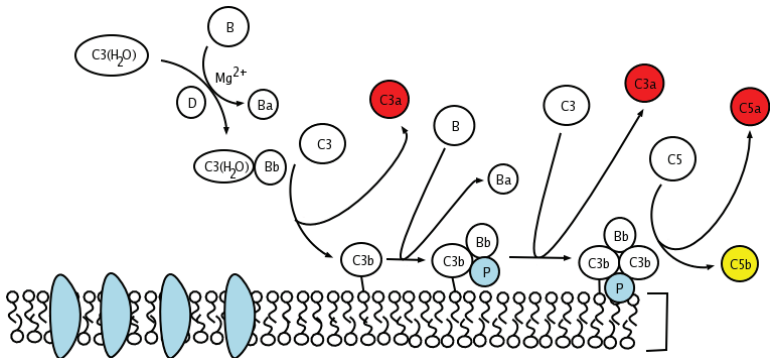
6. ábra. A C3 molekula tioészter kötésének hasadása és degradációjának folyamata [29].

A C3 fehérjének van egy folyamatos, spontán hidrolízise, ami hozzávetőlegesen 1% óránként [6]. A hidrolizált C3-at $C3(H_2O)$ -ként jelöljük és funkcionálisan hasonlít a C3b-re. A $C3(H_2O)$ megköti a B faktort. A B faktor konformáció változást szenved el a kötődés hatására. Ebben a kötött formában a D faktor képes elhasítani a B faktort fBb-re és fBa-ra. A $C3(H_2O)$ és a D faktor kötés kialakulásához a B faktornak Mg^{2+} -ra van szüksége (7. ábra). Így létrejön a C3 konvertáz ($C3(H_2O)Bb$ – Initiation C3-convertase). A keletkezett C3 konvertáz a C3 molekulákat C3a- és C3b fragmentumokra hasítja. A sejt felszínhez a properdin nevezetű fehérjemolekula kötődik, majd ezen a felszínen kötött properdinen keresztül kötődik a C3b. A patogén felszínen kikötött C3bP komplex

másik B faktort köt meg. Ezt a B faktort is hasítania kell a D faktornak Mg^{2+} jelenlétében, hogy újabb C3 konvertáz jöhessen létre. Így C3bBbP komplex keletkezik (C3bBbP – Amplification C3-convertase). Amennyiben egy C3b a már meglévő C3 konvertázhoz (C3bBbP) kötődik, úgy C5 konvertáz keletkezik (C3bBbPC3b) [30].

A H faktornak hasonló a hatása, mint a klasszikus útvonalon a C4BP-nek. Szolubilis szabályzó, amely a C3 konvertáz stabilitását csökkenti. A H faktor verseng a C3 konvertáz felületén a B faktoral a kötőhelyért.

A szabályzásban részt vesz az I faktor a klasszikus útvonal ismertetésénél (a 1. 1. fejezetben) leírtak szerint, vagyis hasítja a C3b α -láncát és a C4b-t kofaktor jelenlétében.



7. ábra. A komplementrendszer alternatív útvonalának működése [31].

1. 3. A lektin útvonal

A lektin útvonalon a láncindító egy MBL-MASP vagy egy ficolin-MASP komplex lehet [1, 5, 7]. Ezekben a komplexekben a felismerést az MBL vagy a ficolin végzi. A patogének felszínén megjelenő mannózt vagy acetilált molekulák részleteket ismernek fel. Látható, hogy a lektin útvonal antitestfüggetlen.

Az MBL felépítése hasonló a C1q felépítéséhez. Minden szál három-három fehérjeláncból épül fel. Az MBL jellemzően 3 és 6 közötti százból alakul ki, bár legjellemzőbb a tetramer forma. A lektin út láncindító komplexeinek szerin proteázai

(MASP-1, MASP-2) hasonlóak a klasszikus út kaskádindító komplexének proteáz molekuláihoz (C1r, C1s). A MASP-2 szintén hasítja a C4 és C2 molekulákat, amik kialakítják a C3 konvertázt (C4bC2a). A MASP-1 képes hasítani a C2 molekulát, bár kissé lassabban, mint a MASP-2. A MASP-3 a MASP-1-től és MASP-2-től eltérő funkcióval bír [32]. Az MBL mellett három különböző típusú ficolin molekulát írtak le (M-ficolin, L-ficolin, H-ficolin), amelyek MASP molekulákkal komplexet képeznek és a mikroorganizmusok acetilált struktúrájához kötődnek [33].

A C1 inhibitor a MASP-1 és MASP-2 proteázokat is gátolja, hasonlóan a klasszikus út első két tagjához (C1r, C1s).

1. 4. A komplementrendszer egyéb hatásai és új aktivációs útvonalai

A komplement aktiválódást mindhárom útvonalon befolyásolják egyéb molekulák is. A H faktor vagy a C4BP kötődik az I faktorhoz és segíti a funkciójának ellátásában. A I faktor gátolja a komplement aktiválódást a C3b és C4b hasításán keresztül.

Egyéb, sejtfelszínhez kötött molekulák is befolyással vannak a komplement aktivációjára. Az egyik ilyen molekula a DAF (Decay Accelerating Factor/CD55), amely szintén a C3 konvertázak stabilitását csökkenti.

A C3b, C4b és C5b molekulák befedik a felismert patogén felszínét, ezáltal elősegítik az antigénbemutató sejtek számára a fagocitózist. Hasonló opszonizációs képessége van a C1q-nak és az MBL-nek is. A C3b és C4b komponensei hozzákötnek az antitest-antigén immunkomplexhez és a teljes szerkezet kötődik a komplement receptor 1/CD35-hez, így az eritrociták segítségével eljutnak a lépbe és a májba.

A C3 hasítási termékei képesek kapcsolatot teremteni a természetes- és a szerzett immunitás között. A C3d képes kötődni a B sejtek felszínén található komplement receptor 2/CD21-hez. Így alakulnak ki a specifikus antitestek és a B memória sejtek.

A C3a és a C5a anafilaxiás hatásának köszönhetően elősegíti a fagociták vándorlását, a simaizom relaxációját és a vazóaktív anyagok megjelenését. A C3a a C3a receptorhoz, a C5a a C5a receptorhoz köt.

A komplementrendszer összefüggésben van még a véralvadási kaskáddal, hatással van az apoptózis szabályozásra és a sejtnövekedésre [5]. A MASP-1 szerin

proteáz az endotél sejteken kifejeződő PAR4 receptorokon keresztül hat az immunrendszer távolabbi elemeire gyulladási mediátorok megjelenésével (IL-6, IL-8, TNF α) [34].

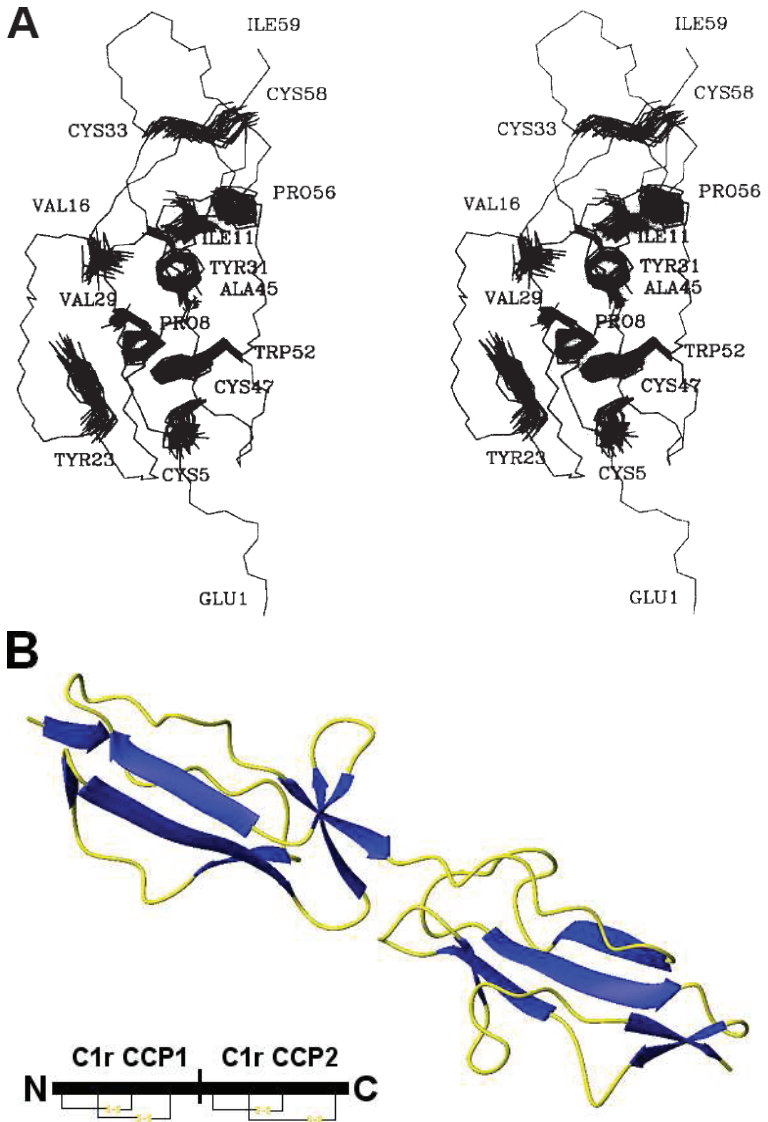
A komplementrendszer nem egy elszigetelt kaszkárendszer a vérben. Kölcsönhatásban van a vérben fellelhető más rendszerekkel: az opszonizáció, a kemotaxison és a agglutináción kívül kapcsolatban áll a kinin-kallikrein rendszerrel [35], a fibrinolízis rendszerrel és a véralvadási rendszerrel [36]. A vérben található kaszkád rendszerek közösen lépnek működésbe a különböző típusú gyulladási folyamatokban.

2. A CCP domén felépítése és előfordulása

A komplement kaszkád fehérjéinek doménjei között nagy gyakorisággal található meg egy kb. 60 aminosavból felépülő domén (SCR – Short Consensus Repeat, vagy más néven Sushi domén, esetleg CCP domén). A CCP domének különösen gyakoriak az immunrendszeri fehérjékben is [37]. A domén leginkább a komplementrendszer szabályozó fehérjéiben fordul elő. A CR1 – alléltól függően – több mint 40 kópiát is tartalmazhat a doménből. Szerepe a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában van. Szabályzó fehérjékben segítik a kölcsönhatások kialakulását. Az RCA (Regulators of Complement Activation) tagjai olyan molekulák, amelyek csak kölcsönhatások révén gátolják a komplement aktivációját. Az RCA tagjai (komplement receptor 1/CD35, MCP/CD46, C4BP, DAF/CD55, H faktor) nagy százalékban CCP doménekből épülnek fel.

Nagyjából 60 aminosav építi fel a domént. A domén β -szendvics szerkezetű, amit 1991-ben írtak le először Norman és munkatársai a H faktor tizenhatodik CCP doménje tanulmányozásának az eredményeként [38]. A szálak antiparallel elhelyezkedésűek, így építik fel a két β -redőzött réteget (8. ábra). Két diszulfid-híd alakul ki a doménben az 1. és a 3., valamint a 2. és a 4. ciszteinek között. „A konzervált régiók a két diszulfid-híd körül csoportosulva teremtik meg az alapját annak, hogy a variábilis régiókba hosszabb-rövidebb szakaszok épüljenek be, ami által a modulok különféle funkciót tölthetnek be.” (Láng András, *Doktori értekezés*, 2010) A domén N-terminálisától az első cisztein, a C-terminálisától a negyedik cisztein található néhány aminosav távolságra.

Az N-terminális vég közelében kialakuló 1. és 3. cisztein között kialakuló diszulfid-hídhoz koordinálódik egy konzervatív triptofán oldallánc. A C-terminális közelében 2. és 4. ciszteinekből kialakuló diszulfid-hídhoz egy aromás és egy apoláros oldallánc koordinálódik.



8. ábra. **A)** A H faktor tizenhatodik CCP doménjének szerkezete látható [38]. **B)** A C1r CCP1-CCP2 szerkezete a Láng és munkatársai cikk alapján [39].

A komplement fehérjék között igen elterjedtek a CCP domének (1. táblázat). Főként a szubsztrátkötésben és orientálódásban játszanak szerepet. A membránhoz kötött komplement receptor 1 és 2 extracelluláris része kizárólag CCP modulokból áll, a H faktor 30 CCP-je egymás után helyezkedik el. A C4b-t kötő fehérje (C4BP) pókra emlékeztető szerkezetében a 6 hosszú kar 8 – 8 CCP-ből, a rövid kar 3 CCP-ből épül fel. Azonban megtalálhatók a CCP domének a vérárvadás kaszkádjában a XIII. faktorban, illetve α_2 -glikoprotein I-ben és az interleukin-2 receptorban is.

C4b-kötő fehérje (C4BP)	51 CCP
Komplement receptor 1 (CR1)	23/30/37/44 CCP
H faktor	20 CCP
Komplement receptor 2 (CR2)	15/16 CCP
Membrán kofaktor protein (MCP)	4 CCP
Decay-accelerating factor (DAF)	4 CCP
B faktor, C2	3 CCP
MASP-1,2,3	2 CCP
C1s, C1r	2 CCP
C6, C7	2 CCP

1. táblázat

Néhány komplementfehérje a bennük található CCP domének számával.

3. A CUB domén felépítése és előfordulása

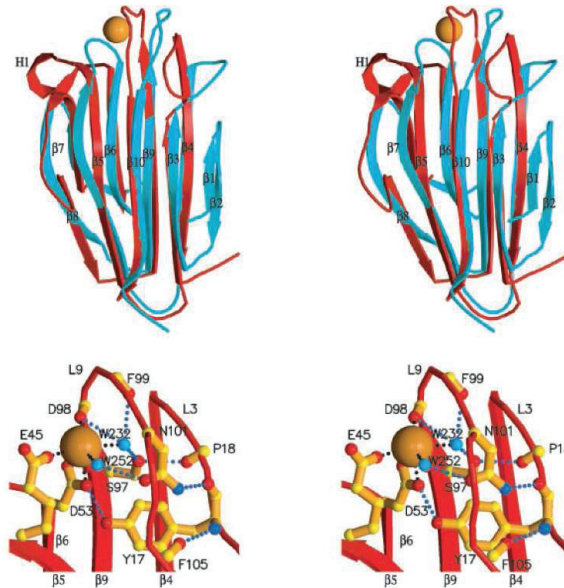
Az egyetlen domén típus, aminek a szerkezete nem ismert a C1r-ből, a CUB domén (C1r CUB1, C1r CUB2). Más fehérjékből származó CUB doméneket használtak már fel szerkezetük meghatározására: C1s CUB1-EGF [40], MAP19 CUB1-EGF [41], MASP-2 CUB1-EGF-CUB2 [42] és a MASP-1/3 CUB1-EGF-CUB2 [43].

A CUB domén nagyjából 120 aminosavból felépülő domén. A domének többségéről már leírták, hogy Ca^{2+} -t köt. A CUB domének kétszer öt, esetleg kétszer négy szálal β -redős szerkezetűek. A β -redős szerkezet kétszer négy antiparallel szálból épül fel, amihez az N-terminális részről kötődhet még egy-egy parallel szál. A parallel szálak a domének β -redőinek szélein helyezkednek el. A doméncsalád egyes tagjainál a $\beta 5$ és $\beta 6$ szálak közötti résznél hiányozhat a doménre jellemző H1 hurok. Ez a H1 hurok 3/10 hélixre jellemző szerkezettel rendelkezik (9. ábra). A CUB domének hidrofób magja 18 darab konzervált hidrofób és aromás aminosavból alakul ki.

A CUB doménen belül két diszulfid-híd alakul ki. Az egyik diszulfid-híd a $\beta 5$ és a $\beta 6$ szálak közötti hurok, valamint a $\beta 7$ és a $\beta 8$ szálak közötti hurok ciszteinjei által jön létre. A másik a $\beta 2 - \beta 4$ szálak ciszteinjei között alakul ki.

A CUB domének általában Ca^{2+} -t kötnek, amelyet hat oxigénnel koordinálnak. A C1s CUB1 doménjének esetében a Ca^{2+} kötésében négy aminosav és két víz molekula vesz részt. Az egyik aszparaginsav az oldallánc mind a két karboxil csoportbéli oxigénjével-, egy másik aszparaginsav a gerincben lévő amid csoport oxigénjével- és egy glutaminsav az oldallánc egyik karboxil oxigénjével koordinálja a fémiont. A térben szomszédos aminosavak hidrogén-híd hálózatot építenek ki a Ca^{2+} -t koordináló aminosavak körül, stabilizálva a domén szerkezetét [40]. A MAP19 CUB1 doménjénél a koordinációt 5 aminosav és egy víz molekula látja el. A C1s esetében bemutatott két aszparaginsav és egy glutaminsav mellett a fémion kötésében részt vesz egy szerin- és egy aszparagin amid kötésbéli oxigénje [41].

A doménnek feltételezhetőleg a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában van szerepe.



9. ábra. A C1s CUB1 doménjének szerkezete és a domén Ca^{2+} kötő régiójának kinagyított ábrája a Gregory és munkatársai cikkéből átvéve [40]. A piros a C1s CUB1, a kék az aSFP-ből származó CUB domén szerkezete.

III. Célkitűzés

Az immunrendszer fontos molekuláris eleme a komplement aktiválás klasszikus útvonala. A klasszikus út első, indító komponensének, a C1 komplexnek a pontos szerkezete nem ismert.

A heteropentamer molekulát 2 C1r és 2 C1s multidomén szerin proteáz és a C1q felismerőmolekula alkotja. Az egyes alkotóelemek szerkezete és funkcionális kísérletek alapján számos modellt állítottak fel, amelyek közül legelfogadottabb az Elméleti áttekintésben bemutatott modell [16]. Ez a modell további finomításra szorul. Különösen sok a nyitott kérdés a nem katalitikus domének szerkezetével, kölcsönhatásával és funkciójával kapcsolatban.

Munkám céljával azt tűztem ki, hogy ezen nem katalitikus domének szerkezetének, funkcionálisan releváns szerkezet változásainak és kölcsönhatásainak módszeres felderítésével egy pontosabb C1 komplex modell kialakításához járuljak hozzá.

Első lépésben számos technikai problémát kellett megoldanom. Megoldatlan kérdés volt a C1r hat domén szerin proteáz nem katalitikus doménjeinek és domén kombinációinak előállítására. Ehhez rekombináns és proteolitikus technikák kombinálására volt szükség.

A nehézség abban jelentkezett, hogy az egyes domének konformációs stabilitása csekély, ezért olyan domén párok preparálására törekedtem, amelyek a megfelelő stabilitással rendelkezve megőrizték natív, vagy a natívhoz közelálló szerkezetüket.

Ismert dolog volt, hogy a C1r Ca^{2+} kötő enzim, és az is hogy a Ca^{2+} a nemkatalitikus régióhoz kapcsolódik. Szerkezeti analógiák alapján három Ca^{2+} kötő helyet feltételezhetünk a C1r CUB1-EGF-CUB2 fragmentumban.

Céлом volt a Ca^{2+} kötési helyének igazolása, a Ca^{2+} kötési erősségének számszerű meghatározása és a Ca^{2+} kötési konformációs hatásának leírása. A Ca^{2+} indukált szerkezetváltozások lokalizálása után céлом volt a C1r konformációs flexibilitásának és az ebből adódó funkcionális következmények értelmezése.

A fenti célok elérésére az alábbi lépéseket végeztük el. A C1r CUB2-CCP1 és a C1r CCP1-CCP2 doménpárokat előállítottuk, hogy a C1r-en belül a flexibilitást hordozó

szakaszt megtaláljuk. Várható volt, hogy ezen domének vagy interdomén régiók között található meg a flexibilitásért felelős régió.

Kísérleteink során a C1r CUB2-CCP1 és C1r CUB2-CCP1-CCP2 fragmentumait klónoztuk, bakteriális expressziós rendszerben előállítottuk és renaturáltuk. A C1r CCP1 domén és a C1r CCP1-CCP2 doménpár preparálása során limitált proteolízist alkalmaztunk. A natív formájukban előállított mintákat tiszta állapotukban biofizikai mérésekkel jellemeztük.

Végül eredményeimet a vérből preparált natív, zimogén C1r Ca^{2+} kötésének vizsgálatával igazoltam és funkcionális kontextusba helyeztem.

Az alábbiakban összefoglalom a kutatásaim főbb lépéseit:

- ↳ A C1r CUB2 domén Ca^{2+} kötő képességének kimutatása, a kötés erősségének meghatározása.
- ↳ A domének stabilitásának meghatározása.
- ↳ Az adott fragmentumokon belül az aktivációhoz szükséges flexibilis szakasz azonosítása.
- ↳ A CUB2 doménre vonatkozó eredmények ellenőrzése vérből preparált zimogén C1r molekulán.

És a fentiek alapján sikerült a C1 komplex aktiválódását leíró funkcionális, szerkezeti modellt pontosítani.

IV. Anyagok és módszerek

1. Kompetens sejtek készítése és DNS transzformálása baktériumsejtekbe

Az *E. coli* sejteket elő kell készíteni, hogy azok a környezetükben lévő DNS-t képesek legyenek felvenni. A két bemutatott példán kívül még számos eljárás létezik arra, hogy sejtekbe DNS molekulát juttassunk, amikre jelen dolgozatban nem térek ki [44].

1. 1. Ca^{2+} – Mg^{2+} -os kompetens sejt készítése

A sejtekkel $A_{600\text{nm}}$ 0,8 sűrűségűre felnőtt tápoldatot lecentrifugáltuk 4 °C-on, majd a leülepedett sejteket 0,1 M Mg^{2+} -t tartalmazó oldatba felszuszpendáltuk. Ezt követően a sejteket ismét centrifugáltuk 4 °C-on, majd 0,1 M Ca^{2+} -t tartalmazó oldattal szuszpendáltuk fel. A Ca^{2+} oldatban 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket jégén.

1. 2. Transzformálás Ca^{2+} – Mg^{2+} -os módszerrel

A kompetens sejtekhez plazmid DNS-t vagy ligálási elegyet adtunk. A kompetens sejteket és a DNS-t tartalmazó szuszpenziót jégén inkubáltuk 1 órán keresztül, majd hősokkoltuk a sejteket (42 °C 2 perc, majd 0 °C 2 perc). Ezután tápoldatot adtunk a sejtekhez és 37 °C-on inkubáltuk a szuszpenziót. Az 1-2 órás inkubáció leteltével a szelekció szempontjából megfelelő antibiotikumot tartalmazó táplemezen szélesztettük a sejteket és overnight inkubáltuk 37 °C-on.

1. 3. Elektroporációs transzformálás

A sejtekkel $A_{600\text{nm}}$ 0,8 sűrűsége felnőtt tápoldatot centrifugáltuk 4 °C-on, majd a leülepedett sejteket steril MQ vízben szuszpendáltuk fel. A centrifugálás – felszuszpendálás lépéseket négyszer-öttször ismételtük, hogy minél kevesebb ion maradjon a sejtek mellett. Az előkészített sejtekhez preparált DNS-t vagy ligálási

elegyet adtunk és jégbe hűtött elektroporáló cellába pipettáztuk a szuszpenziót. Az elektroporálás feszültségértékét az adott sejttípushoz választjuk (*Eschericia coli* sejteket 2500 V-tal elektroporáljuk). A rendszert Eppendorf csőbe vittük át, majd 37 °C-on inkubáltuk 1-2 órán keresztül. Az inkubáció leteltével a szelekció szempontjából megfelelő antibiotikumot tartalmazó táplemezen szélesztettük a sejteket és overnight inkubáltuk 37 °C-on.

2. Polimeráz lánreakció (PCR)

A polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction (PCR)) alkalmazásával egy adott DNS szakaszt a kívánt mennyiségben felszaporíthatunk. A PCR reakcióinkat a Molecular Cloning: A laboratory Manual útmutatásai alapján végeztük [44].

A humán C1r-t kódoló cDNS könyvtárból PCR segítségével felszaporítottuk a C1r CUB2-CCP1 és a C1r CUB2-CCP-CCP2 génszakaszokat. A PCR reakcióhoz a C1r CUB2-CCP1 fragmentum esetében a CGCGCTAGCATGACTCAGGCTGAGTGC AGCAGC és a CGCGAATTCTCAGTCCTT GATCTTGCATCTGGG primereket, míg a C1r CUB2-CCP1-CCP2 fragmentum előállításához a CGCGCTAGCATG ACTCAGGCTGAGTGCAGCAGC és a CGCGAATT CTCACACTGGCAAGCACCG AGGAATC primereket használtuk.

3. DNS tisztítás, izolálás, ligálás

3. 1. PCR termék tisztítása

A PCR reakciók termékeit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) segítségével tisztítottuk meg [45].

3. 2. Plazmidpreparálás sejtekből

A konstrukcióink kialakításához felhasznált pET-17b (Novagen) plazmidot [46] *E. coli* TOP10 (Invitrogen) típusú sejtekből izoláltuk QIAprep Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) alkalmazásával [45]. Esetleg „hagyományos” fenol/kloroformos módszerrel tisztíthatjuk meg a plazmidunkat [44]. A DNS preparátumok koncentrációját

denzitometrálassal határoztuk meg Bio-Rad Gel Doc XR rendszerrel. Az 1%-os agaróz gélen megfuttatott [44] minták sávjait az 1kb GeneRuler DNA Ladder (Fermentas) [47] sávjával hasonlítottuk össze.

3. 3. DNS ligálás

A ligálás folyamatában enzimatikusan kovalens módon összekapcsolunk adott DNS 3'-OH végét egy DNS 5'-fosztát végével [44].

A tisztított DNS fragmentumok és preparált plazmid esetében *NheI* és *EcoRI* restriktációs endonukleázokkal alakítottuk ki a ragadós végeket. Az emésztett pET-17b plazmidről az 5' foszfát csoportot borjúbélből izolált alkalikus foszfatáz enzim (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)) lehasítottuk [44, 48]. Az emésztett C1r CUB2-CCP1 szakaszt kódoló DNS-t és az emésztett pET-17b (Novagen) plazmidot, valamint az emésztett C1r CUB2-CCP1-CCP2 szakaszt kódoló DNS-t és az emésztett pET-17b (Novagen) plazmidot T4 DNS (New England Biolabs) ligázzal építettük össze [49].

4. Gélelektroforézis

4. 1. Agaróz gélelektroforézis

A különböző méretű DNS molekulákat 1%-os agaróz gélben választottuk el egymástól TAE puffer felhasználásával (50 mM Tris, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA, pH 8,05).

4. 2. SDS-PAGE

Az SDS-PAGE-t Laemmli útmutatásaiból kiindulva végeztük [50].

5. Immunblott

Az SDS-PA gélen megfuttatott mintákat nitrocellulóz membrán (Bio-Rad Trans-blot) felszínére vittük át, hogy specifikus antitestekkel azonosítsuk a rekombináns fehérjéinket. A membrán felületén a C1r fragmentumainkat kecskében termeltetett,

emberi C1r elleni antitestekkel (kecske anti-humán C1r) ismertettük fel (Bio-Rad 80297). A humán C1r – kecske antitest komplexnek az Fc részét nyúlban termeltetett IgG alkalikus foszfatáz konjugátummal (nyúl anti-kecske IgG AP) (Sigma A4187) mutattuk ki.

6. Rekombináns fehérje expressziója *E. coli* sejtekben

A nagymennyiségű rekombináns fehérje termelését *E. coli* BL21 (DE3) pLysS sejtekkel, egyszerre 8×500 ml-es ampicillint (100 µg/ml) és klóramfenikolt (30 µg/ml) tartalmazó LB médiumban valósítottuk meg [44, 51]. (LB: 5 g/l NaCl, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l trypton.) Amikor a 200 rpm-el, 37 °C-on rázatott médium sűrűsége elérte a (A_{600nm}) a 0,7 értéket 0,4 mM végkoncentrációban IPTG-vel indukáltuk a sejteket. A sejtek által felvett IPTG kötődés megváltoztatja a lac represszor szerkezetét, így a lac represszor már nem tud kötődni a lac operátorhoz. Szabaddá válik a T7 RNS polimeráz és ezáltal megvalósulhat az inszertált gén transzkripciója. Az indukció 5-6 órán át folyt 37 °C-on.

7. A biomassza feltárása és inklúziós test preparálása

A rázatott kultúrából a sejteket (*E. coli* BL21 (DE3) pLysS) centrifugálással preparáltuk [52]. 12 percig 8.000 g erővel centrifugáltuk a sejteket 4 °C-on. A sejteket T.E. pufferben szuszpendáltuk fel és -20 °C-n fagyasztva tároltuk. (T.E. puffer: 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA pH 7,5.) A fagyasztás hatására a sejtek egy része feltáródott és a bennük termelődött lizozim enzim a T.E. pufferben lévő sejtek falát elemésztette és az ozmotikusan instabil sejtek feltáródtak. Az ép sejteket mechanikai behatással tártuk fel (szonikálás). A feltárt sejtekből nem oldódó inklúziós testet preparáltunk T.E. pufferes mosás és centrifugálás lépéseinek négyszeri-ötszöri ismétlésével. A mosott inklúziós test nagy százalékban a rekombináns fehérjéből áll. A T.E. pufferben szuszpendált rekombináns fehérjét -20 °C-n tároltuk.

8. Renaturáció

Az inklúziós testben megtalálható fehérjéket oldatba visszük guanidin hidroklorid vagy karbamid segítségével. A rendezetlenül összeoxidálódott diszulfidhidakat β -merkaptó-etanollal vagy DTT redukáljuk. Az inklúziótest mennyiségét és a szolubilizáló puffer térfogatát úgy választjuk meg, hogy 1-50 mg/ml közé essen a koncentrációja a rekombináns fehérjének [52, 53]. A szolubilis inklúziótestet kihígítjuk egy olyan megfelelően kiválasztott pufferben, ami elősegíti a rekombináns fehérjék natív szerkezetének újbóli felvételét.

A renaturációt a dialízis követi, mikor a renaturációnál használt kismolekulákat fokozatosan eltávolítjuk a rekombináns fehérjénk mellől egy féligáteresztő hártvány keresztül. A dialízis folyamata alatt éri el a renaturált fehérje a végleges szerkezetét. A nem megfelelő szerkezettel rendelkező fehérjék a felszínükön megmaradt hidrofób felületekkel összetapadnak, a misfoldált fehérjék aggregálódnak. Az oldatban maradt nem natív szerkezetű izoformáktól kromatográfias úton lehet megtisztítani a rekombináns fehérje mintánkat.

A C1r fragmentumok inklúziós test szuszpenzióját lecentrifugáltuk és a csapadékot 6 M guanidin hidroklorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3 oldat (szolubilizáló puffer) segítségével oldatba vittük. 200 mg inklúziós testet 5 ml szolubilizáló pufferben oldottunk fel. Az 5 ml-es C1r CUB2-CCP1 fehérjét tartalmazó szolubilizáló puffert 500 ml 750 mM arginin, 500 mM guanidin hidroklorid, 5 mM CaCl_2 , 3 mM redukált glutation, 1 mM oxidált glutation, pH 8,5 renaturációs pufferhez adtuk 750 $\mu\text{l}/15$ perc-es sebességgel 15 °C-on. A C1r CUB2-CCP1-CCP2 fehérjét hasonló pufferben és körülmények között renaturáltuk. A renaturációs oldatokat 5-7 napig kevertettük 10 °C-on. A renaturációs oldatokat 10 liter 20 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 8,0 összetételű pufferrel szemben dializáltuk 10 °C-on kétszer egymás után. A dialízist egy-egy napig végeztük közepesen intenzív kevertetés mellett. A dializált renaturációs oldatot 0,45 μm -es membránnal szűrtük, majd a rekombináns fehérjét kromatográfias módszerekkel tisztítottuk.

9. Fehérjetisztítás

Már az inklúziós test preparálás során végzett mosási lépések is fehérjetisztításnak számítanak. A leggyakrabban használt fehérjetisztítási módszerek a következők: kisózás, szelektív kicsapás, ioncserés kromatográfia, hidrofób kromatográfia, géliszűrés, affinitás kromatográfia [54]. A C1r CUB2-CCP1 és a C1r CUB2-CCP1-CCP2 tisztítására a következőket használtuk fel:

9. 1. Ioncserés kromatográfia

Az oszlopban található gyöngyök anionok – (kvaterner ammónium csoportot tartalmazó polimer, kationos) vagy kationok – (propil szulfát csoportot tartalmazó polimer, anionos) megkötésére alkalmasak. Két különböző NaCl koncentrációjú puffert használunk, így koncentrációgradienst (ionerősséggradienst) hozhatunk létre. Az elméleti izoelektromos pont (pI) számítógépes programmal kiszámolható, bár a program nem tud információval szolgálni a töltések felületi eloszlásáról [55]. Más-más felületi töltéssel rendelkező izoformák eltérő NaCl koncentrációnál eluálódnak a gyantákról. A klasszikus fehérjetisztításnál a detektálást 280 nm-en és 254 nm-en végeztük; a fehérjék maximális abszorpciója 280 nm-en található, míg a DNS-é 254 nm-en. Ezek mellett nyomon követtük a vezetőképességet és a pH-t.

A C1r CUB2-CCP1 és a C1r CUB2-CCP1-CCP2 fragmentumokat Q Sepharose XL (GE Healthcare Life Science) gyanta felhasználásával tisztítottuk első lépésben [54]. A kis ionerősségű puffer megegyezett a dialízisnél használt 20 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 8,0 pufferrel. Az ioncseréhez használt nagy ionerősségű puffer 20 mM Tris-HCl, 1000 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 8,0 összetételű volt. Az ioncserénél az elválasztást biztosító gradiens a kromatográfias oszlop térfogatának 12-15-szöröse volt. Az elúció során kapott frakciókat SDS-PA gélen megfutattuk redukáló és nem-redukáló mintapuffer felhasználásával.

A tisztítást megismételtük 20 mM Tris-HCl, 5 mM / 1000 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 8,8 összetételű puffer rendszerben Q Sepharose HP (GE Healthcare Life Science) oszlop felhasználásával [54].

A C1r CCP1 domént és a C1r CCP1-CCP2 fragmentumot úgy állítottuk elő, hogy a konstrukciók N-terminálisáról elemésztettük a CUB2 domént. Az emésztést

termolizinnel végeztük. A liofilizált termolizint 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 8,0 oldatban oldottuk fel. A termolizin törzsoldatot 1 mM koncentrációjúra készítettük. A CUB2 domén leemésztését 37 °C-on, 1:40 enzim:szubsztrát arány alkalmazásával végeztük (8 μ M:320 μ M). Az előzetes kísérletek alapján a reakció 50-60 perc alatt teljesen végbement. A reakciót EDTA hozzáadásával állítottuk le. A hozzáadott EDTA végkoncentrációja 20 mM volt. Az emésztés leállítását után a kapott C1r CCP1 domén, és a C1r CCP1-CCP2 fragmentum oldatát dialízissel (50 mM NaOAc, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 4) készítettük elő a kationcserés tisztításra. A kationos tisztítást a dialízis pufferrel megegyező kis ionerősségű pufferrel és 50 mM NaOAc, 1000 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 4 összetételű nagy ionerősségű pufferrel végeztük el. Az oszlop SP Sepharose HP (GE Healthcare Life Science) szemcsékből állt. Az ioncserénél az elválasztást biztosító gradiens a kromatográfiai oszlop térfogatának 12-15-szöröse volt. Az elúció során kapott frakciókat SDS-PA gélen megfutattuk redukáló és nem-redukáló mintapuffer felhasználásával.

9. 2. Géliszűrés

A fehérjék méret szerint elválaszthatók kis pórusú (~2000 Å) rendelkező szemcsék segítségével.

A különböző konstrukciók tisztításához a géliszűrés Sephacryl S100 (GE Healthcare Life Science) gyantából felépülő oszloppal végeztük [54]. A felhasználó puffer 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 100 μ M EDTA, pH 7,4. Az elúció során kapott frakciókat SDS-PA gélen megfutattuk redukáló és nem-redukáló mintapuffer felhasználásával.

10. Cirkuláris Dikroizmus spektroszkópia (CD)

Fehérjeminták esetében cirkuláris dikroizmus mérésrel másodlagos szerkezeti információt nyerhetünk a polarizált fény amid csoportokon történő elnyelése segítségével [56]. A CD spektrum függ a fehérje másodlagos szerkezetétől és érzékeny annak változására.

A CD méréseket Jasco J-720 típusú készüléken végeztük el. A másodlagos szerkezeti elemek meghatározásához 0,1 mm-es úthosszúságú, hengeres, termosztálható

kvarcküvetét használtunk. A spektrumokat 250 nm-től 190 nm-ig vettük fel 10 nm/perc sebességgel. A résszélesség 1 nm, a pontok átlagolási ideje 8 vagy 16 másodperc volt. Az alkalmazott fehérjekoncentráció 0,2-0,4 mg/ml.

11. Differenciális Pásztázó Kalorimetria (DSC)

A fehérjék hőmérsékletemeléssel hatására denaturálódnak. Fehérjék denaturációjánál a növekvő hőmozgás hatására olyan hidrofób részek válnak láthatóvá, amik a rendezett proteinekben el voltak rejtve. A hidrofób felszín és a vizes közeg kölcsönhatása kedvezőtlen, csökken az adott fehérje stabilitása. A fehérjék denaturációs folyamatának mérése mellett mérjük a fehérjementes puffer hőmennyiség-változását is. Az üres puffer változását mint referenciát használjuk fel. A hőmérséklet függvényében csak tisztán a fehérjék hőmennyiség-változását ábrázoljuk [57].

A méréseinket MicroCal VP-DSC készülékkel végeztük. A hőprogramok 5 °C-tól 90 °C-ig futottak 1 °C/perc fűtési sebességgel. A fehérjeminták koncentrációja 0,1-0,4 mg/ml volt. Minden betöltött mintát 15 percig csökkentett nyomáson légtelenítettük szobahőmérsékleten. A kiértékelést Microcal Origin 5.0 programmal végeztük.

12. Izotermális Titrációs Kalorimetria (ITC)

A technika két folyékony rendszer elegyedésével járó különböző hőeffektusok mérésére szolgál állandó hőmérsékleten. Általában a vizsgálandó fehérjemintát a készülék mintaterébe kell tölteni. A fehérjéhez kötődő másik anyagot (fehérje, kofaktor, ion) tartalmazó oldatot az adagolótube kell elhelyezni. Az injektorban lévő oldatot meghatározott program szerint a mintaterbe injektáljuk, és a keletkezett hőmennyiséget a lezárt referenciater hőtartalmához viszonyítjuk. Tisztán a kölcsönhatásból származó hőmennyiség-változásokat az idő függvényében ábrázoljuk [58].

A méréseinket 30 °C-on végeztük el MicroCal VP-ITC készülékben. Méréseket 1,0 – 1,2 mg/ml koncentrációjú fehérjemintákkal végeztük el 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4 pufferben. A titrálást 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM Ca²⁺, pH 7,4 pufferrel végeztük. A titrálás során 4 µl-eket, 8 µl-eket és 16 µl-eket injektáltunk. A kiértékelést Microcal Origin 5.0 programmal végeztük.

13. Tömegspektroszkópia (MS)

A vizsgálandó minta molekuláit tömeg/töltés szerint analizálja és jeleníti meg a tömegspektrométer. A számítógépes szoftver segítségével kiszámíthatjuk a molekula pontos tömegét.

Az MS méréseinket egy HP-1100 típusú készüléken végeztük el, ami HPLC-electrospray ionizációs rendszerrel volt egybeépítve. Az áramlást 0,2 ml/perc sebességgel áramló 10 mM ammónium-formiát, pH 3,5 pufferrel valósítottuk meg. A szárító nitrogén 300 °C-on, 10 liter/perc sebességgel áramlott 30 font/inch² (206,8 kPa) nyomáson. A kapilláris feszültség 3000 V volt. A dekonvolúcióhoz az Agilent ChemStation szoftvert használtuk.

14. Hidrogén-Deutérium kicserélődés (H-D csere)

Konformációs dinamika nyomon követésére alkalmas módszer a proton-deutérium kicserélődés. A liofilizált fehérjeminta lecserélődni képes protonjai annál később cserélődnek deutériumra, minél később érhetőek el a nehézvíz molekulák illetve deutérium ionok számára.

A C1r CUB2-CCP1 fragmentumot folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd liofilizáltuk 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH=7,4 pufferben és 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ pH=7,4 pufferben. A mérés megkezdése előtt 37 °C-on előinkubált D₂O-ban visszaoldottuk a fragmentumokat. Ezt követően fenntartva a hőmérsékletet, a mintákat kis részleteikben MS készülékbe injektáltuk, hogy nyomon követhessük a hidrogén-deutérium kicserélődése miatti tömegnövekedéseket.

15. Mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR)

Az NMR (mágneses magrezonancia spektroszkópia (nuclear magnetic resonance)) egy modern szerkezetvizsgálati módszer. Az atommagok felvilágosítást adnak arról, hogy körülöttük milyen az elektronok sűrűsége. Az elektronfelhő sűrűségét befolyásolják a molekula kémiai kötési és a nemkötő elektronpárokhoz való közelség.

A méréseinket egy Bruker DRX500-as készüléken végeztük. A minták hőmérséklete 300 és 320 K között változott. A fehérjék tipikusan ~1,5 mM

koncentrációjúak voltak. A 10 mM Na-acetát, 10 mM NaCl pufferben feloldott minták további 2 mM NaN_3 -ot és 9:1 $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ -t tartalmazott. Az oldatok pH-ja 4; 4,5 és 7 volt. A spektrumok 2 dimenzióban tipikusan $4\text{K}\times 64$ pontban lettek felvéve, 3 dimenzióban $2\text{K}\times 256\times 64$ adatpontban.

A detektálás HSQC, NOESY-HSQC spektrumok esetében komplex, TOCSY-HSQC esetében TPPI séma szerint történt. A T_1 , T_2 és NOE mérések Echo-AntiEcho detektálással történtek. A kémiai eltolódások pontos megállapításához referenciaanyagként DSS-t használtunk. A nyers mérési adatok (FID) feldolgozását NMRPipe programmal végezte Láng András.

16. A zimogén C1r preparálása szérumból és az autoaktiváció sebességének meghatározása különböző Ca^{2+} koncentrációk jelenlétében

A zimogén C1r molekulát Arlaud et al. cikke alapján preparáltuk [59]. A preparáció lépései a következők voltak. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Science) gyantára IgG-t immobilizáltunk [60], aminek a segítségével C1 komplexet tudunk a szérumból kikötni. 1 g gyantára 35 mg IgG-t kötöttünk fel.

A humán plazmát 1 mM PMSF és 1 mM NPGB hozzáadásával előinkubáltuk, majd 20 mM CaCl_2 hatására szobahőmérsékleten megalvasztottuk a plazmát. Az alvadáskor kialakult csapadékot (fibrin hálót) centrifugálással választottuk el a felülúszótól. A felülúszót pH 7-es, Ca^{2+} -t tartalmazó pufferrel háromszorosára hígítottuk és friss 1 mM PMSF-t és 1 mM NPGB-t adtunk hozzá. A hígított szérumot átfolyattuk az IgG-NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow oszlopunkon. A C1 komplexet az IgG molekulával immobilizáltuk. Ezt követően, a tisztítás minden pufferébe 1 mM PMSF-t és 1 mM NPGB-t adtunk. A szérum hígításához használt pufferrel mostuk az oszlopot, majd egy EDTA tartalmú pufferrel a C1 komplexet disszociáltattuk, így a zimogén C1r-t és a zimogén C1s-t keverékben eluáltuk. Végül a C1q-t nagy ionerősségű pufferrel eluáltuk az IgG-ről.

A zimogén C1r-t és a zimogén C1s-t anion cserélő oszlopon választottuk el 1 mM PMSF és 1 mM NPGB tartalmú pufferek felhasználásával. A tisztított zimogén C1r frakcióihoz 1 mM PMSF-t és 1 mM NPGB-t adtunk és hidegen töményítettük 30.000 Da permeabilitású membránt tartalmazó töményítővel. Az autoaktivációs mérések

elvégzéséhez el kellett távolítani az alkalmazott proteáz inhibitorokat és fiziológiás pufferre kellett cserélni a tisztítás során használt rendszereket. Az inhibitorok eltávolításához és a puffercseréhez egy HiPrepTM 26/10 Desalting (GE Healthcare Life Science) oszlopot használtunk [52], aminél a mozgófázis 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 puffer volt. A puffercserét a teljes kromatográfiás rendszer 5 °C-ra hűtése mellett végeztük el. A puffercsere után azonnal aliquotoltuk a kapott mintánkat és folyékony nitrogénben fagyasztottuk az aliquotokat, majd -80 °C-on tároltuk.

A zimogén C1r autoaktivációjának a sebességét 37 °C-on, 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4 pufferben végeztük el 100 μ M EDTA, 250 μ M Ca²⁺, 500 μ M Ca²⁺, 1000 μ M Ca²⁺ és 2000 μ M Ca²⁺ jelenlétében. Az inkubáció során 0, 20, 40, 60 és 80 perc elteltével vettünk mintákat. A mintákat előmelegített redukáló SDS-PAGE mintapufferbe pipettáztuk, majd 2 percig inkubáltuk 95 °C-on, hogy a reakciót leállítsuk. A mintákat 12,5%-os SDS-PAGE-en megfuttattuk, majd nitrocellulóz (Bio-Rad Trans-Blot) membránra blottoltuk át. A membrán felületén a fragmentumainkat kecskében termeltetett, emberi C1r elleni antitestekkel (kecske anti-humán C1r) ismertettük fel (Bio-Rad 80297). A humán C1r – kecske antitest komplexnek az Fc részét nyúlban termeltetett IgG alkalikus foszfatáz konjugátummal (nyúl anti-kecske IgG AP) (Sigma A4187) mutattuk ki.

A kapott blottokat Bio-Rad Gel Doc XR rendszerrel denzitometráltuk. A denzitometrlásnál az eltűnő zimogén C1r sávot követtük nyomon. A sávok intenzitását normáltuk a nulla időpont sávjának az intenzitás értékével.

V. Eredmények és megbeszélésük

1. A C1r CUB2-CCP1, a C1r CCP1 és a C1r CCP1-CCP2 fragmentumok előállítása

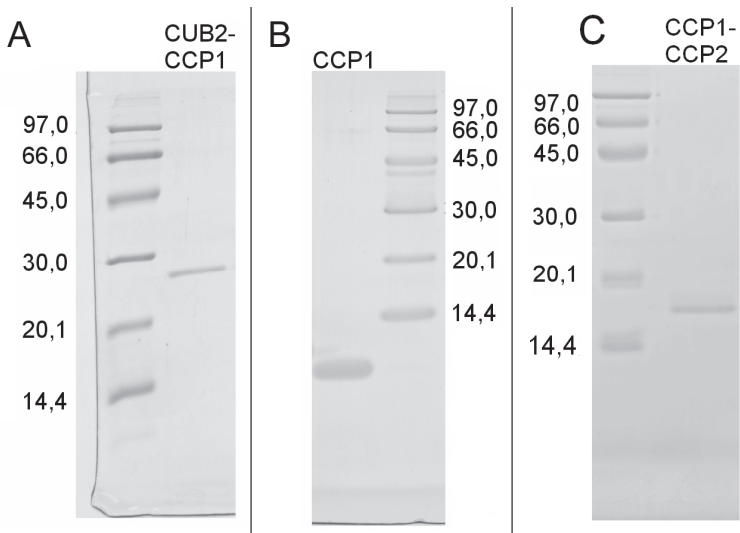
A pET-17b-C1r CUB2-CCP1 és pET-17b-C1r CUB2-CCP1-CCP2 plazmidokkal *E.coli* BL-21 (DE3) pLysS sejtvonalában rekombináns fehérjéket expresszáltattunk, azokat izoláltuk, renaturáltuk és tisztítottuk (10. ábra) [39, 61]. A kromatográfiás tisztítási lépések után a rekombináns fragmentumok tisztasága meghaladta a 95%-ot.

A C1r CCP1 domént nem sikerült bakteriális expressziós rendszerben előállítani direkt módon. A korábbi években laboratóriumunkban megkísérelték a C1r CCP1-CCP2 fragmentum szerkezetét meghatározni. A kísérletek azt mutatták, hogy a konstrukció CCP1 doménje nem volt a domén natív állapotban, vagyis a renaturálás során nem nyerte vissza maradéktalanul natív szerkezetét. Ezért új módszerrel kísértem meg a C1r CCP1 és C1r CCP1-CCP2 konstrukciók előállítását.

A C1r CCP1 domént és C1r CCP1-CCP2 fragmentumot részleges proteolízissel állítottuk elő. A CUB2 domént az adott konstrukcióról teljes elemésztettük, így kaptuk meg C1r CCP1 domént és a C1r CCP1-CCP2 doménpárt.

A tisztított C1r CUB2-CCP1 és C1r CUB2-CCP1-CCP2 fragmentumok oldatához annyi CaCl_2 oldatot adtunk, hogy a kalcium-ion koncentráció 5 mM-os legyen. A részleges proteolízist termolizinnel végeztük. A liofilizált termolizint 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 8,0 oldatban oldottuk fel. A termolizin törzsoldat 1 mM koncentrációjú volt. A CUB2 domén leemésztését 37 °C-on, 1:40 enzim:szubsztrát arány alkalmazásával végeztük (8 μM :320 μM). Az előzetes kísérletek alapján a reakció 50-60 perc alatt teljesen végbement. A reakciót EDTA hozzáadásával leállítottuk. A hozzáadott EDTA végkoncentrációja 20 mM volt. A CCP domének elméleti izoelektromos pontját figyelembe véve – a C1r CCP1 (pI 6,63) és C1r CCP1-CCP2 (pI 8,76) – a fragmentumokat kationcserés tisztítással választottuk el a termolizintől és az emésztés során keletkezett peptidektől. Tisztítási lépés előtt dializáltuk a mintákat 50 mM NaOAc, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 4,0 oldattal szemben. A kationos tisztítást SP Sepharose HP (GE Healthcare Life Science) szemcsékből álló oszlopon végeztük. A

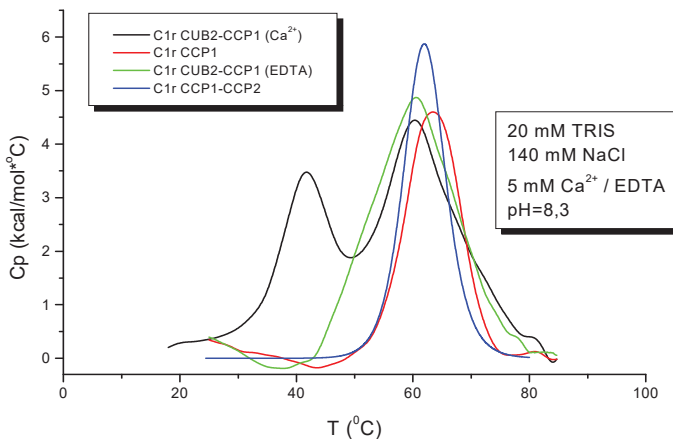
rekombináns fehérjéket tartalmazó frakciókat egyesítettük, majd dialízissal eltávolítottuk az elúciót biztosító NaCl többletet. AC1r CUB2-CCP1, C1r CCP1 és C1r CCP1-CCP2 fragmentumokat SDS-PAGE gélen megfuttattuk (10. ábra), a sávokat kivágtuk és tömegspektrometriásan ellenőriztettük az aminosav sorrendjüket.



10. ábra. A fehérje fragmentumok SDS-PAGE-en analizálva redukáló körülmények között. Marker segítségével azonosíthatók méretük szerint. **A)** C1r CUB2-CCP1 (21.968,6 Da), **B)** C1r CCP1 (8.564,7 Da), **C)** C1r CCP1-CCP2 (17.217,6 Da).

2. A C1r CUB2-CCP1, a C1r CCP1 és a C1r CCP1-CCP2 fragmentumok hőstabilitásának meghatározása és Ca^{2+} kötésének kimutatása DSC segítségével

A fragmentumok térszerkezetének ellenőrzését DSC segítségével végeztük el [61]. Megbizonyosodtunk a fragmentumok natív térszerkezetének meglétéről és a Ca^{2+} CUB2 domén szerkezetére gyakorolt hatásáról. A CUB típusú doménekről megjelent tudományos cikkek beszámolnak a domén család Ca^{2+} kötő tulajdonságáról (II. 3. fejezete). A fragmentumokat azonos pufferrel szemben dializáltuk, hogy a különböző pufferrendszerekből fakadó eltéréseket kiküszöböljük. A Kardos és munkatársai cikkében [27] leírt puffert használtuk, ami 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 vagy 5 mM EDTA, pH 8,3 összetételű volt. A fehérjék koncentrációját az aromás oldalláncok elnyelésének a 280 nm-en történő mérésével határoztuk meg, ismerve az adott fragmentum 1 mg/ml koncentrációjú oldatának elméleti abszorpcióját. A DSC-s mérési görbékből az alapvonalat levontuk és a fehérje fragmentumok koncentrációjával normáltuk azokat (11. ábra). A kapott termogramokat közös rendszerben ábrázoltuk.



11. ábra. A C1r leírt fragmentumainak DSC-vel felvett hődenaturációs görbéi. A C1r CUB2 domén kooperatív átmenete csak Ca^{2+} jelenlétében volt kimutatható. A C1r CUB2 domén közel van a stabilitása határához az emberi test hőmérsékletén.

A C1r CUB2-CCP1 fragmentumot mind Ca^{2+} -t (—), mind EDTA-t tartalmazó pufferben (—) vizsgáltuk. A termogramok azt mutatják, hogy a C1r CUB2-CCP1 fragmentumnál két kooperatív átmenet volt kimérhető Ca^{2+} jelenlétében, de Ca^{2+} hiányában csak egy hődenaturációs átmenetet kaptunk. A Ca^{2+} jelenlététől független csúcs (T_m 60,4 °C) a C1r CCP1 domén hődenaturációját jelzi. Ez a hődenaturációs csúcs 3 °C-al alacsonyabb az önálló C1r CCP1 domén (—) hődenaturációs maximumánál (T_m 63,4 °C). A C1r CUB2 domén hődenaturációja (T_m 41,5 °C) csak Ca^{2+} jelenlétében megy végbe. Mindezekből arra következtethetünk, hogy a C1r CUB2 domén csak Ca^{2+} jelenlétében veszi fel a rendezett szerkezetét.

A hődenaturációs görbéknel megfigyelhető félérték szélesség eltérések abból adódnak, hogy a CCP1 domén össze van-e kötve a denaturálódott CUB2 doménnel vagy sem. A C1r CCP1 domén (—) hődenaturációs görbéje magasabb hőmérsékleti értéknél mutat maximumot és kisebb félérték szélességet, mint a C1r CUB2-CCP1 fragmentum hődenaturációs görbéjének CCP1 doménjéhez rendelhető kooperatív átmenete akár Ca^{2+} (—), akár EDTA jelenlétében (—).

A C1r CCP1 önálló hődenaturációs átmenetet mutat a C1r CUB2 domén hődenaturációjától. A C1r fehérje CCP1 és a CCP2 doménjeinél közös hődenaturációs átmenetet mutattunk ki.

A C1r esetében a CCP1 domén (—) termodinamikailag a legstabilabb a vizsgált fragmentumok közül. A C1r CCP1-CCP2 fragmentumnak (—) alacsonyabb a kooperatív hődenaturációs átmenete. Vagyis a CCP2 domén csökkenti a fragmentum stabilitását a CCP1 domén stabilitásához képest. A képet módosítja az a tény, hogy a C1r CCP1 denaturációja irreverzibilis, míg a C1r CCP1-CCP2 átmenete reverzibilis. Tehát a két CCP domén alkot egy folding egységet.

A C1r CUB2 domén natív szerkezete csak Ca^{2+} jelenlétében alakul ki. Az átmenet maximumát tekintve (T_m 41,5 °C) a domén a stabilitása határán van az emberi test 36 °C közeli hőmérsékletén. A C1r CUB2 hődenaturációs átmenete reverzibilis.

A hődenaturációs görbe csúcs alatti területét integrálva megkapjuk a C1r CUB2 domén átmeneti entalpiáját (144 kJ·mol⁻¹). A kapott eredményt az ITC-s kísérleteknél használtuk fel a CUB2 domén Ca^{2+} kötését kísérő entalpiaváltozással való összehasonlítás céljából.

A DSC-vel elvégzett kísérletek bizonyítják, hogy a C1r CUB2 domén köt Ca^{2+} -t és csak a fémionnal betöltött domén veszi fel a rendezett szerkezetét. A fémiont koordináló, rendezett C1r CUB2 stabilitása kisebb, mint az átlagosnak mondható

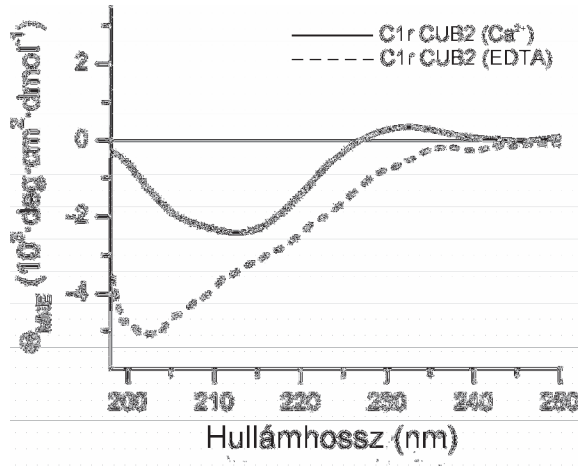
doméneké. A 41,5 °C-os hődenaturációs maximum azt mutatja, hogy a domén a 36 °C körüli testhőmérsékleten a stabilitása határán van. A mérések azt mutatják, hogy a Ca^{2+} kötés és a domén hődenaturációja reverzibilis. A stabilitása határán lévő és a Ca^{2+} -t reverzibilisen kötő és reverzibilisen fellazuló domén alkalmas a „flexibilitási kapcsoló” feladat ellátására, így szabályozva az autoaktiválódáshoz szükséges domén átrendeződését.

3. A C1r CUB2-CCP1 és a C1r CCP1, valamint a C1r CUB2 fragmentumok szerkezetének jellemzése CD spektroszkópiával

A C1r CUB2-CCP1 fragmentum és a C1r CCP1 domén szerkezetét spektropolariméterrel vizsgáltuk [61]. A C1r CUB2-CCP1 fragmentumot Ca^{2+} -ot tartalmazó pufferben tudtuk vizsgálni, de az EDTA-s puffer a CD készülékben nem használható. A Ca^{2+} -os pufferben lévő C1r CUB2-CCP1-hoz EDTA-t adtunk – a Ca^{2+} koncentrációjának kétszeresét – majd dialízissel eltávolítottuk mind a Ca^{2+} -ot, mind az EDTA-t. A C1r CCP1 domén eredeti puffere nagyon eltérő a C1r CUB2-CCP1 puffertől és a puffer szintén tartalmazott EDTA-t, ezért dialízissel EDTA-mentesítettük és lecseréltük a puffert. Így azonos körülmények között végezhetjük el a méréseket.

A méréseket 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 8,3 oldatban végeztük, ami bizonyos kísérleteknél még 5 mM CaCl_2 -ot is tartalmazott. A C1r CUB2-CCP1 Ca^{2+} jelenlétében és Ca^{2+} hiányában felvett CD spektrumaiból kivontuk a C1r CCP1 azonos koncentrációra átszámított CD spektrumát, feltételezve, hogy az izolált C1r CCP1 domén szerkezete megegyezik a C1r CUB2-CCP1 fragmentumban lévővel és független a Ca^{2+} koncentrációtól. Az eljárás jogosságát a DSC mérések alátámasztották. A kapott görbék a C1r CUB2 domént jellemző CD görbék, amelyek a domén másodlagos szerkezeti elemeiről adnak információt Ca^{2+} jelenlétében és annak hiányában (12. ábra).

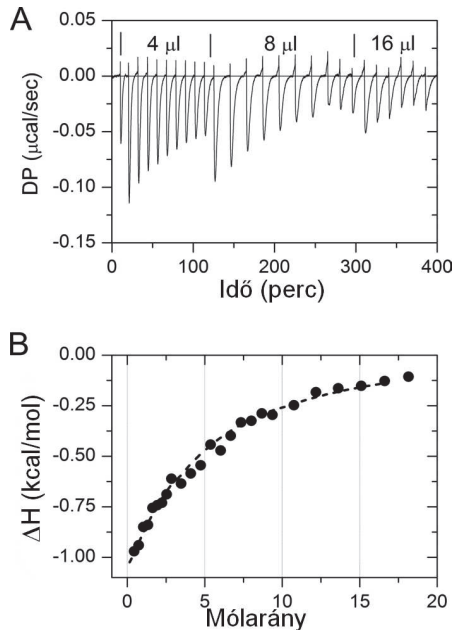
A C1r CUB2 domén másodlagos szerkezeti elemei Ca^{2+} jelenlétében (—) β -redős szerkezetre emlékeztető görbét eredményeztek. A C1r CUB2 domén Ca^{2+} hiányában (– –) a rendezetlen fehérjékre jellemző CD görbét mutatott. Ha a C1r CUB2 domén nem koordinálja a Ca^{2+} -t, akkor a domén szerkezete olyan, mint a rendezetlen fehérjéké. Így jön létre a flexibilis rész a C1r molekulán belül, ez a lépés segítheti a C1r autoaktivációját, a C1s aktiválódását a C1 komplexen belül.



12. ábra. A C1r CUB2 domén származtatott CD spektrumai Ca^{2+} kötött és Ca^{2+} nélküli állapotában. A domén csak Ca^{2+} jelenlétében mutat rendezett szerkezetet.

4. A C1r CUB2 domén Ca^{2+} kötési erősségének a jellemzése ITC-vel

A C1r CUB2-CCP1 fragmentumot használtuk fel, hogy jellemezhessük a CUB2 domén Ca^{2+} kötésének sztöchiometriáját, a kötés erősségét és termodinamikai paramétereit. A Ca^{2+} -kötés erősségét izotermális titrációs kaloriméterrel határoztuk meg [61]. A C1r CUB2-CCP1 fragmentumot 48 μM koncentrációban töltöttük be az ITC mintacellájába 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4 pufferben. A titráláshoz használt puffer – amivel az injektort töltöttük meg – annyiban különbözött a fehérje pufferétől, hogy 5 mM CaCl_2 -ot is tartalmazott (13A. ábra). A telítési görbe pontjaira történő illesztés 1:1 arányú sztöchiometriát mutat. A telítési izotermán illesztett görbéből a Ca^{2+} kötés erősségét is megkaphatjuk. A C1r CUB2 domén disszociációs állandója Ca^{2+} -al $430 \pm 20 \mu\text{M}$ (13B. ábra).



13. ábra. **A)** A C1r CUB2 domén titrálása Ca^{2+} -al ITC készüléssel mérve. **B)** A C1r CUB2 Ca^{2+} telítési görbéje. A titrációs profil 1:1 sztöchiometriát mutatott, a C1r CUB2 domén Ca^{2+} -al disszociációs állandója $430 \pm 20 \mu\text{M}$.

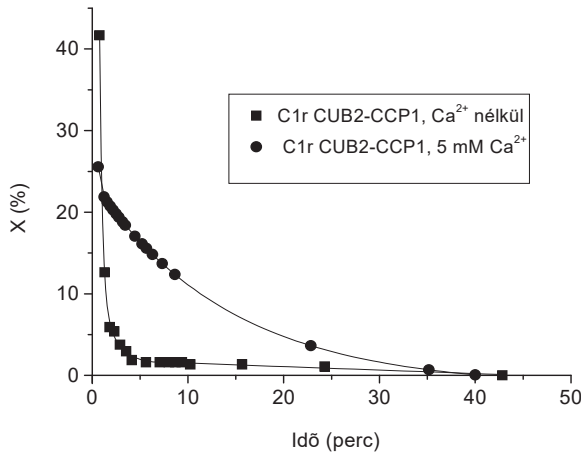
Az emberi vér szabad kalcium-ion koncentrációja 1,2 mM [61]. Ha a vérben lévő Ca^{2+} koncentrációját vesszük alapul, akkor a 430 μM disszociációs állandó alapján C1r molekulák 26%-a nem köt Ca^{2+} -t a CUB2 doménjén keresztül. Ilyenkor a CUB2 domén szerkezete rendezetlen, flexibilis. Feltételezésünk szerint a rendezett-rendezetlen állapotok megoszlási aránya szabályozó szerepet tölt be a C1 komplex aktiválódásában.

Összehasonlítottuk a DSC-s kísérleteknél meghatározott hődenaturációs entalpiaváltozást (V. 2. fejezet) a C1r CUB2 domén esetében az ITC-s mérésekből meghatározott Ca^{2+} kötődésnél fellépő entalpiaváltozással. A C1r CUB2 domén Ca^{2+} kötődése során 30°C-on 43,5 $\text{kJ}\times\text{mol}^{-1}$ entalpiaváltozást határoztunk meg ITC-vel. Az ITC mérést 30 °C-on végeztük, C1r CUB2 letekeredése pedig 41,5 °C-on következik be. Hogy az összehasonlítást elvégezhessük, az eltérő hőmérsékletekből adódó hőkapacitás különbséget is ki kell számítanunk a C1r CUB2 domén esetében [62]. A globuláris fehérjék fajlagos parciális hőkapacitása megközelítőleg $50 \text{ J}\times\text{mol}^{-1}\times\text{K}^{-1}\times\text{aminosav}^{-1}$ [63]. A kiszámított hőkapacitás a C1r CUB2 domén esetében $120 \text{ aminosav}\times 50 \text{ J}\times\text{mol}^{-1}\times\text{K}^{-1}\times\text{aminosav}^{-1}\times 11,5 \text{ K} = 69 \text{ kJ}\times\text{mol}^{-1}$. Ha a DSC-vel kimért ($144 \text{ kJ}\times\text{mol}^{-1}$) entalpiaváltozást a hőkapacitás birtokában átszámoljuk 30 °C-ra ($144 \text{ kJ}\times\text{mol}^{-1} - 69 \text{ kJ}\times\text{mol}^{-1} = 75 \text{ kJ}\times\text{mol}^{-1}$), akkor összehasonlíthatjuk a két folyamat entalpiaváltozását. Látható, hogy a domén stabilitásának ($75 \text{ kJ}\times\text{mol}^{-1}$) jelentős részét a Ca^{2+} kötése ($43,5 \text{ kJ}\times\text{mol}^{-1}$) adja 30°C-on.

A C1r autoaktiválódásához szükséges nagymértékű flexibilitást a Ca^{2+} mentes CUB2 rendezetlen, fellazult állapota biztosíthatja.

5. A C1r CUB2 domén flexibilitásának jellemzése H-D izotópkicserélődés segítségével

A konformációs dinamika követésére alkalmas módszerrel is igazolni kívántuk, hogy a C1r CUB2-CCP1 doménpár esetében a CUB2 domén a rendezett szerkezetét csak Ca^{2+} jelenlétében veszi fel (fémion nélkül rendezetlen). Ezért a domén hidrogén-deutérium cseréjének nyomonkövetését terveztük MS-el [61]. A C1r CUB2-CCP1 mintákat Ca^{2+} mentes és Ca^{2+} -os pufferben liofilizáltuk, majd $37\text{ }^\circ\text{C}$ -ra előmelegített D_2O -vel visszaoldottuk. $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk a visszaoldott mintákat és adott időpontokban a minta kis részleteit az MS készülékbe injektáltuk. Meghatároztuk a deutériumra cserélődött labilis hidrogének számát. A szekvencia ismeretében kiszámítottuk a fragmentumok maximálisan lecserélhető hidrogénjeinek számát és az ábrán a kalkulált nem cserélt hidrogének arányát ábrázoltuk az idő függvényében (14. ábra).



14. ábra. C1r CUB2-CCP1 H-D kicserélődésének kinetikája Ca^{2+} jelenlétében és anélkül. X a még ki nem cserélődött hidrogének százalékos aránya. A C1r CUB2-CCP1 fragmentum Ca^{2+} mentes állapotban majd egy nagyságrenddel gyorsabban cseréli deutériumra labilis hidrogénjeit, mint Ca^{2+} jelenlétében.

A Ca^{2+} mentes C1r CUB2-CCPI fragmentum H-D kicserélődése gyors és öt percen belül közel teljes. Ez arra utal, hogy ebben az állapotban az amid és a labilis hidrogének hozzáférhetőek az oldószer számára, vagyis a szerkezet nagymértékű flexibilitással és rendezetlenséggel bír. Ezzel szemben a Ca^{2+} jelenlétében mért lényegesen lassabb kicserélődésből arra következtethetünk, hogy a CUB2 domén rendezett szerkezetet vesz fel, kialakul a tömör, rendezett szerkezet.

6. A C1r CCP1, a C1r CCP2 és a C1r CCP1-CCP2 domének flexibilitásának jellemzése és a kialakuló kölcsönhatások leírása NMR spektroszkópia segítségével

A DSC mérések bizonyították, hogy a C1r CCP1-CCP2 fragmentumot felépítő két domén közös kooperatív átmenetet mutat hődenaturálódásuk során. A két domén foldja egységet alkot, kölcsönhatás alakul ki közöttük.

A domének méretére való tekintettel az NMR spektroszkópiát választottuk, hogy a két domén flexibilis régióit leírassuk és a kölcsönható felszíneket felderíthessük. A C1r CCP2 doménből és a C1r CCP1-CCP2 fragmentumból már korábban rendelkezésünkre álltak eltérő módon előállított minták. A doménpár CCP1 doménjének NMR spektrumait csak részlegesen sikerült asszignálni. A jelek arról árulkodtak, hogy a CCP1 doménnek nem sikerült felvennie a natív szerkezetét.

A munkatársaim közül Cseh-Szilágyi Katalin állította elő a C1r CCP2 domént. Az én munkám volt a C1r CCP1 domén preparálása a helyes szerkezettel, míg a helyesen foldált C1r CCP1-CCP2 doménpár közös munkánk eredménye. A C1r CCP1 és a C1r CCP1-CCP2 mintákat a CUB2 domén proteolízisével állítottuk elő a már renaturált C1r CUB2-CCP1 és a C1r CUB2-CCP1-CCP2 konstrukciókból. A Láng és munkatársai cikkben [39] egy egész bekezdést szenteltünk annak, hogy bizonyítsuk, az első – direkt módon készített – minták szerkezetükben eltérnek a második – proteolízissel előállított – minták szerkezetétől.

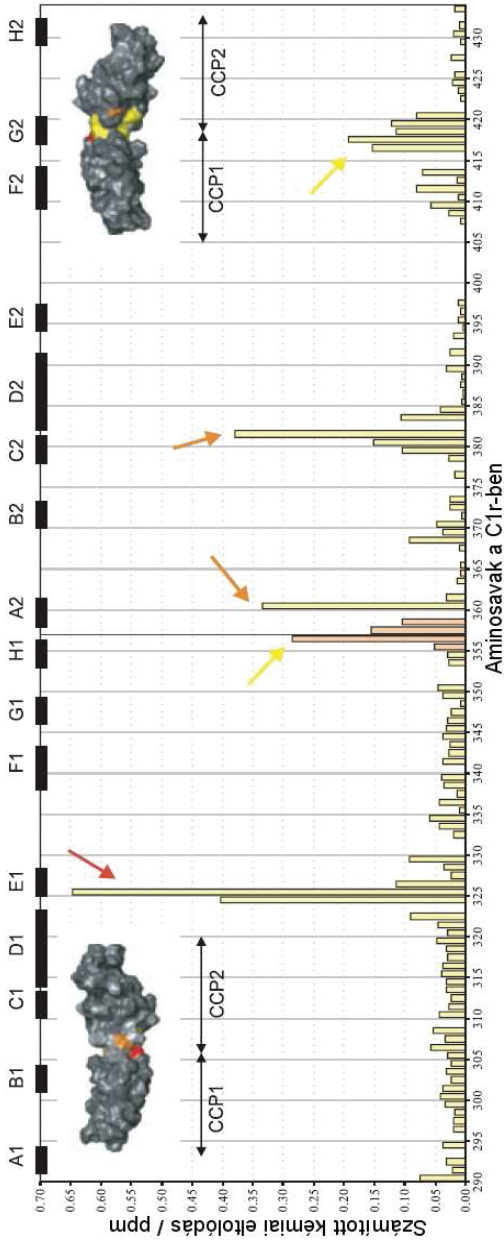
Az NMR-es mérések elvégzéséhez ^{15}N izotópot tartalmazó minimál médiumban expresszáltatott rekombináns fehérje doménekre, fragmentumra volt szükségünk. Majd a konstrukciókat renaturáltuk, tisztítottuk, proteolitikusan kialakítottuk a végleges hosszúságukat (kivéve a C1r CCP2 domént) és egy végső tisztítási lépéssel kinyertük. Az NMR-es metódusok közül főként a HSQC és NOE alapú pulzusszekvenciákkal végzett mérések adtak információkat a mintákban található kémiai eltolódásokról. Az NMR-es méréseket és a mérések kiértékelését Láng András végezte.

Az önálló C1r CCP1 és a C1r CCP2 domének HSQC spektumaikban található jeleket sikerült különösebb nehézségek nélkül asszignálni, sikerült a szerkezetüket megoldani, az egyes aminosavakhoz flexibilitási értékeket rendelni. A flexibilitásról kapott információinkat a relaxációs időkből tudjuk kiszámolni (T_1 , T_2).

A C1r CCP1-CCP2 fragmentum szerkezetének felderítése már akadályokba ütközött. A fragmentum HSQC spektrumát csak 320 K-en sikerült a megfelelő jeldiszperzióval felvennünk. Alacsonyabb hőmérsékleten a jelek nem váltak el egymástól, az azonosításuk nem volt lehetséges. A magashőmérsékletű mérések azt mutatták, hogy a C1r CCP1-CCP2 fragmentum önmagával kölcsönhatásba lép. A csoport korábbi munkája alapján ismert volt, hogy a C1r CCP1 doménnek szerepe van a C1r dimerizációjában [25, 27]. Elképzelhető, hogy ez a tulajdonság a CCP1-CCP2 fragmentum esetében is kifejeződik valamilyen mértékben.

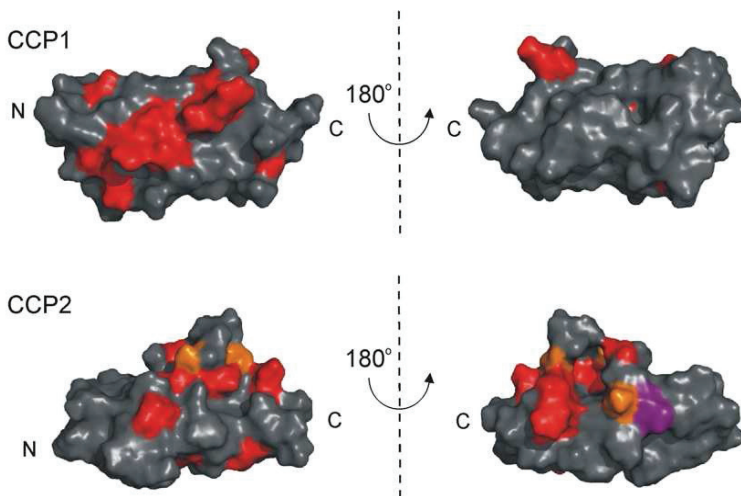
A monomer domének $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ kémiai eltolódás értékeit összehasonlítottuk a két doménből álló fragmentumnak, a megfelelő amid csoportok kémiai eltolódás értékeivel. Így a domének közötti „kölcsönhatásból” származó perturbáció mértéke számszerűsíthető” (Láng András, *Doktori értekezés*, 2010). A kémiai eltolódás értékek nagymértékű megváltozása mutatja, hogy mely aminosavak kémiai környezete változott meg a két doménes mintában az egydoménes mintákhoz képest. Meghatározható, hogy a két domén közötti kölcsönhatásban mely aminosavak vesznek részt (15. ábra). Az ábrán eltérő színnel jelöltük a különböző mértékű kémiai eltolódással megváltozott amid csoportokhoz tartozó aminosavakat. Jelentős amid eltolódást mértünk a CCP1 doménél a G324, Y325, a linkernél a I356, K357, a CCP2 doménél a G360, T380, Y381, G416, I417 aminosavaknál. Ezek az aminosavak a két domén határán helyezkednek el. A linker térbeli közelségében elhelyezkedő egy-egy tirozin oldallánc köré rendeződnek (CCP1: Y325, CCP2: Y381) a nagymértékű változást elszenvedő aminosavak. Az ábrán látható eltérések színekódja: piros $\Delta\delta > 0,5$ ppm, narancs $\Delta\delta > 0,3$ ppm, sárga $\Delta\delta > 0,15$ ppm.

A CCP domének között kialakult kölcsönhatás erős. Ezt bizonyítja a DSC-vel elvégzett kísérletek eredményi is. A C1r CCP1-CCP2 fragmentum egyetlen része sem lehet a flexibilitás forrása.



15. ábra. A C1r CCP1-CCP2 fragmentum amid eltolódásainak eltérése a szimpla domének megfelelő amid csoportjainak kémiai eltolódás értékeihez viszonyítva [39]. A színek az eltolódások közötti különbségeket érzékelteik: piros $\Delta\delta > 0,5$ ppm, narancs $\Delta\delta > 0,3$ ppm, sárga $\Delta\delta > 0,15$ ppm. A felső részen a β -redőket jelölik a fekete téglalapok. A CCP domének között kialakult kölcsönhatás erős. Ez a fragmentum nem lehet a forrás az aktiválódáshoz szükséges flexibilitáshoz.

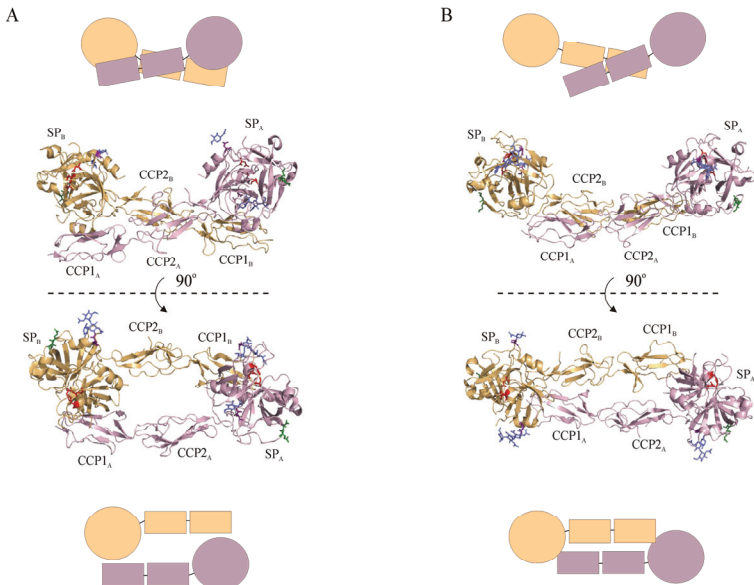
Annak kiderítésére, hogy a monomer domének milyen felszínen kerülnek egymással kölcsönhatásba oldat fázisban, a kialakuló kötőfelszínek megfelelnek-e a két domén természetes kötőfelszíneinek a következő kísérletsorozatot terveztük [64]: az egyik monomer domént ^{15}N jelölt formában állítottuk elő, HSQC mérést végeztünk rajta, majd NMR csőben megittiráltuk a nem jelölt másik monomer doménnel és fordítva (^{15}N C1r CCP1 + C1r CCP2, ^{15}N C1r CCP2 + C1r CCP1). A keresztittirálást 1:1 sztöchiometriáig végeztük. A kísérleteket 300 K hőmérsékleten és semleges pH-n végeztük el. Reményeink szerint, így a domének között fellépő minden kölcsönható felszínt le tudunk írni (16. ábra). Az eredményeket bemutató ábrákon piros színnel jelöltük az átlagos kémiai eltolódás $\pm 0,5$ SD tartományokat. A CCP2 domén E425 aminosav kémiai eltolódása kiugróan magas értéket mutatott, ezért a E425 aminosavat lilával jelöltük ($\Delta\delta_{\text{átlag}} \pm 4$ SD). Ha az E425 aminosav kémiai eltolódás-változását kihagytuk a számításainkból, akkor egyéb aminosavak is elérték az átlagos kémiai eltolódás $\pm 0,5$ SD intervallumot. Azokat az aminosavakat, amik csak ebben az esetben kerültek a jelölendő aminosavak közé, narancs színnel lettek feltüntetve.



16. ábra. A domének keresztittirálása során felfedezett kölcsönható felületek [64]. A monomer C1r CCP1 és a C1r CCP2 doménjeinél a keresztittirálás alkalmazásával megmutattuk, hogy mely aminosavak kémiai eltolódása változott meg. A színek az eltolódás mértékére utalnak (lásd fent a szövegben). Ezen kötőfelszínek segítségével alakulhat ki egy új C1r dimer.

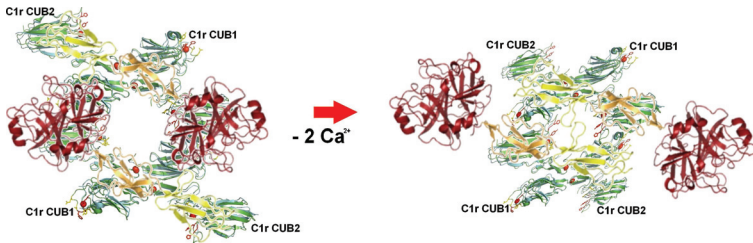
A titrálás hatására jelentős kémiai eltolódást elszenvedő aminosavak kötőfelszínét rajzolnak ki.

Láng András és munkatársai közreműködésével dokkolást végeztünk, hogy a C1r γ B fragmentum miként alkothat dimert az általunk kimutatott kötőfelszínének lefedésével. Így felállítottak egy elméletet arra nézve, hogy a C1r dimer milyen egyéb módon kapcsolódhat dimer formába a klasszikusan leírtak γ B forma mellett (C1r CCP1 és C1r SP domének közötti kölcsönhatás). A munkát leíró cikkünkben azt az elméletet tesszük közzé, amely szerint a kimutatott átmeneti dimernek szerepe lehet a C1 komplex aktivációjában (17. ábra) [64]. Ez a CCP1-CCP2 kötődési felszínének kialakuló dimer csak akkor jöhet létre, ha a C1r SP domén nem vesz részt a dimer kialakításában. Feltételezzük, hogy a C1r CCP1 és a C1r CCP2 újszerű dimerje a C1r SP domén a C1s SP domén kölcsönhatása során alakulhat ki, feltételezhetőleg amikor a C1s SP domén aktiválódik.



17. ábra. A C1r γ B fragmentumok lehetséges dimer állapotai [64] **A)** A régebben leírt, CCP1 – SP alapú dimer látható. **B)** Az NMR kísérletek alapján származtatott CCP1 – CCP2 kötődésű dimer ábrázolása.

A dokkolással létrehozott újszerű C1r dimert elhelyeztem egy részlegesen felépített heterotetramer modellben. A szemléltető ábrához (18. ábra) felhasznált szerkezeteket a Phillips és munkatársai [16] és a Gál és munkatársai [7] cikkekből vettem át. Feltételezésünk szerint a Ca^{2+} -ok kilépését követően a C1r CUB2 domén rendezetlen szerkezetű lesz, kialakul a C1r autoaktiválódáshoz és a C1s aktiváláshoz szükséges flexibilis molekularészlet. Az ábrán nem tüntettem fel a C1s CCP1-CCP2-SP részt, mert a lokalizációjáról nincsenek adatok, eredmények.



18. ábra. A szemléltető ábra az általunk leírt C1r dimernek a $\text{C1r}_2\text{S}_2$ tetramerbéli elhelyezkedését mutatja be a meglévő szerkezetek felhasználásával [7, 16]. A C1r- és a C1s CUB1-EGF-CUB2 fragmentumai zöld színnel vannak jelölve és a nézőpont felől a „hátsó” síkban foglalnak helyet. A piros gömbök a kötődő Ca^{2+} -okat jelképezik. A C1r N-terminális fragmentumok az ábrafeliratoknak megfelelően a komplex külső részén helyezkednek el (a C1q kollagén szárai nincsenek jelölve), a C1s CUB1-EGF-CUB2 fragmentumai a belső részen találhatóak. Összhangban a 3. ábrával, a C1r CCP1-CCP2-SP doméneket tartalmazó fragmentumok a CUB1-EGF-CUB2 részek felett helyezkednek el [16]. A C1s fragmentumok nehezen láthatók a kitakarás miatt. A C1r CCP1 domén citromsárga, a C1r CCP2 narancssárga és a C1r SP domén piros.

A relaxációs mérések, a megalkotott modell és a felállított elmélet szerint a C1r molekula esetében a CCP1-CCP2-SP fragmentum egyik doménje sem megy keresztül nagy konformációs változáson. A fragmentum egyetlen interdomén szakasza sem flexibilis annyira, hogy az autoaktiváció végbe tudjon menni. A fragmentum egyetlen szakasza sem lehet eredete az autoaktiváció során végbemenő nagy elmozdulásnak. Sem a C1r γB röntgen-szerkezete, sem a C1r CCP1-CCP2 fragmentum NMR szerkezete nem utalnak a szükséges flexibilitás jelenlétére [18, 25, 39, 64]. Ezt támasztották alá a

DSC mérések eredményei is. Így bizonyítottnak látjuk, hogy kizárólag a C1r CUB2 domén felelős a molekula autoaktivációjához szükséges flexibilitásáért. A C1r CUB2 domén az eredete a szükséges flexibilitásnak a marginális stabilitásával és a gyengén kötött Ca^{2+} által biztosított rendezett-rendezetlen szerkezetváltozás kapcsolóként való működésével.

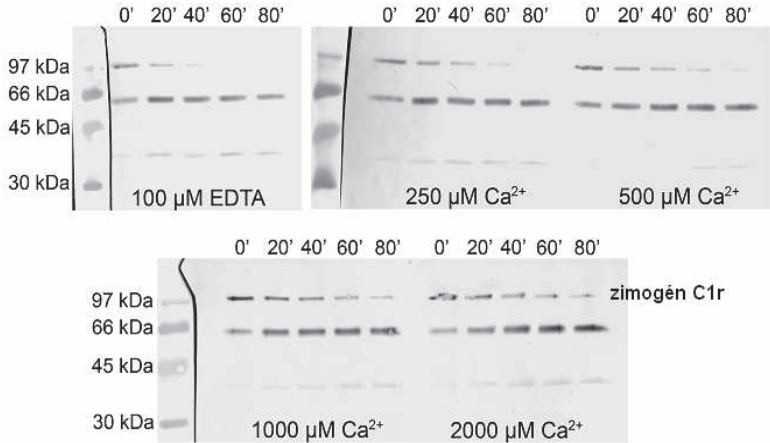
További célkitűzésünk, hogy a természetes forrásból (humán plazma) származó zimogén C1r szerin proteázon igazoljuk a renaturált fragmentumokon végzett mérési eredmények alapján javasolt modellünk funkcionális helyességét.

7. Zimogén C1r szerin proteáz preparálása vérből és a Ca^{2+} koncentráció befolyásoló hatásának kimutatása az autoaktiváció sebességére

A C1 komplex aktiválódásában és ezen a folyamaton belül a C1r autoaktivációjában fontos szerepe van a C1r elmozdulásának, flexibilitásának. A C1r CUB2 doménről sok adatot nyertünk, amelyek a CUB2 domén flexibilitását bizonyítják. A rekombináns C1r CUB2-CCP1 fragmentumot használtuk az eddigi méréseinkhez. Az NMR-es mérések eredményeiből láthatunk, hogy a molekula flexibilis része nem lehet a CCP1-CCP2 részen. Azért, hogy a rekombináns fragmentumon végzett mérési adatainkat ellenőrizzük és a kimondott hipotézisünket hitelesítsük, vérből preparált zimogén C1r molekulát használtunk fel arra, hogy az autoaktiváció sebességének Ca^{2+} függését meghatározzuk. Az autoaktiváció sebességének Ca^{2+} függéséért feltételezéseink szerint csak a CUB2 domén lehet a felelős, mert a fiziológiás Ca^{2+} koncentráció tartományában a fehérje többi Ca^{2+} kötő részei, a CUB1 és a EGF domén mindig telítve van Ca^{2+} -nal [20]. Az irodalomban közölt adatok szerint a C1r CUB1-EGF fragmentumnak $32 \mu\text{M}$ a disszociációs állandóval köt Ca^{2+} -t.

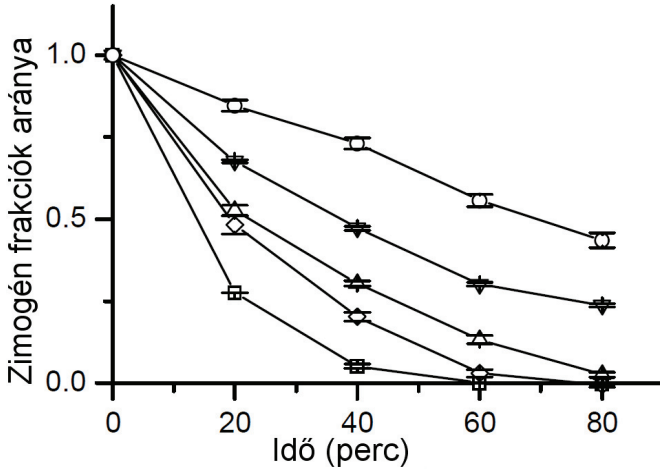
A zimogén C1r autoaktivációjának sebesség-meghatározási körülményeit és részleteit az Anyagok és Módszerek fejezet 16. részében (IV. 16. fejezet) ismertettem. A plazmából preparált zimogén C1r szerin proteáz molekulát különböző Ca^{2+} koncentráció jelenlétében inkubáltam 37°C -on. Adott időpontokban mintát vettem és az autoaktiválódást leállítottam. A mintákat SDS-PA gélen mefutattam, majd blotoláshoz nitrocellulóz membrán felületére vittem át. A C1r molekula sávjait specifikus antitest-alkalikus foszfatáz konjugátummal jelenítettem meg.

A zimogén C1r Ca^{2+} nélkül 60 perc elteltével eltűnik (40 percnél gyengén még látható, 19. ábra). Kalcium-ion hozzáadásának hatására a zimogén C1r egyre hosszabb ideig marad látható az ábra szerint. $250 \mu\text{M}$ Ca^{2+} mellett még 60 percnél is van zimogén enzim, $500 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -nál pedig a sáv gyengén látható még 80 perc után is. Az 1000 és $2000 \mu\text{M}$ -os Ca^{2+} koncentráció mellett mért zimogén C1r stabilitása túlmutat a 80 percen. A C1r CUB1-EGF része már $250 \mu\text{M}$ -os koncentráció mellett is telítve van Ca^{2+} -al.



19. ábra. A zimogén C1r fogyasztását bemutató immunoblott a különböző Ca²⁺ koncentrációk jelenlétében. A növekvő Ca²⁺ koncentráció stabilizálja a C1r szerin proteázt zimogén formájában.

Az adott Ca²⁺ koncentrációban több párhuzamos mérést is végeztünk. Az Anyagok és Módszerek fejezet 15. pontjában leírtak szerint a zimogén C1r fogyasztását az immunoblotok denzitometrikus kiértékelése útján követtük, majd az adott mérési sorozaton belül a kapott számértékeket normáltuk a nulla időpillanathoz tartozó denzitometrálnálási értékkel és a mintavételi idők függvényében ábrázoltuk (20. ábra).

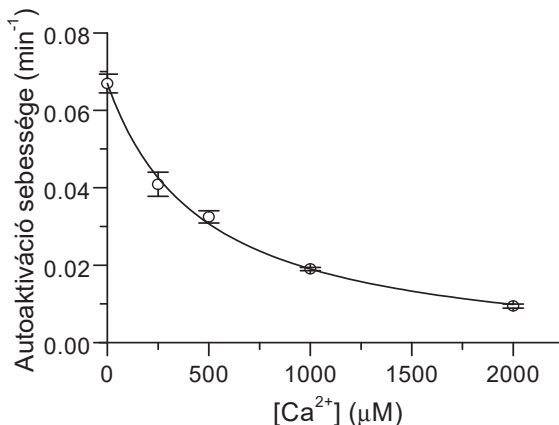


20. ábra. A denzitomerálással meghatározott zimogén frakciók aránya a normálást követően az idő függvényében [61]. A különböző méréseknél a változó paraméter a Ca^{2+} koncentrációja volt: 100 μM EDTA (\square), 250 μM Ca^{2+} (\diamond), 500 μM Ca^{2+} (\triangle), 1000 μM Ca^{2+} (∇), 2000 μM Ca^{2+} (\circ). A növekvő Ca^{2+} koncentráció növeli a C1r autoaktiválódásának a felezési idejét.

A megfelelő Ca^{2+} koncentráció mellett az átlagolt adatpontokra kinetikai görbét illesztettünk. Az illesztéshez elsőrendű csökkenő exponenciális görbét használtunk. Az illesztett görbe egyenletéből meghatároztuk a felezési időt. Minden Ca^{2+} koncentrációnál megkaptuk a felezési időt. A felezési idők reciprokát (21. ábra) és annak szórásait felhasználva sebességi görbét tudtunk illeszteni a pontokra. A következő képlet felhasználásával telítési görbét (22. ábra) illeszthettünk:

$$y = y(\text{min}) + \frac{(y(\text{max}) - y(\text{min}))}{1 + \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{K_D}}$$

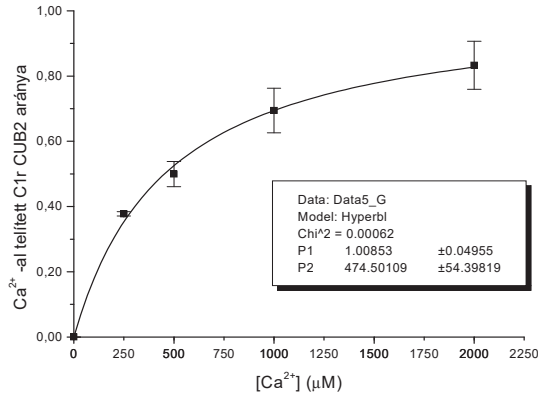
A képletben az $y(\text{min})$ az autoaktiváció legkisebb sebességét jelöli, teljes Ca^{2+} telítésnél; a $y(\text{max})$ az autoaktiváció legnagyobb sebességét jelöli, Ca^{2+} teljes hiányánál.



21. ábra. A zimogén C1r autoaktiválódásának a sebessége a Ca^{2+} koncentráció függvényében [61]. A növekvő Ca^{2+} koncentráció a C1r autoaktiválódásának a sebességét csökkenti. A C1r autoaktiválódása nullához tart.

A zimogén enzim Ca^{2+} -al telített C1r CUB2 doménjének arányát ábrázoltuk a Ca^{2+} koncentráció függvényében és az illesztett görbe megadta a disszociációs állandót. A disszociációs állandó értéke $475 \pm 54 \mu\text{M}$, ami jó egyezést mutat az ITC-s mérésnél kapott $430 \pm 20 \mu\text{M}$ -os értékkel (22. ábra).

A vérből preparált zimogén C1r-el végzett kísérleteink megerősítették azokat az előzőleg bemutatott kísérleti eredményeket, amiket *E. coli*-ban expresszáltott és renaturált C1r CUB2-CCP1 fragmentumon mértünk. A vérből izolált, teljes hosszúságú zimogén C1r autoaktivációjának Ca^{2+} függése megegyezett a rekombináns fragmentum CUB2 doménjének Ca^{2+} kötésével és egybevág a Ca^{2+} CUB2 doménre kifejtett hatásával. Érdeemes megjegyezni, hogy a zimogén enzim esetében végzett illesztésnél a Ca^{2+} telített formára vonatkozó autoaktivációs sebesség 0-hoz közelít, amiből arra lehet következtetni, hogy az autoaktivációhoz szükség van a Ca^{2+} mentes, rendezetlen, flexibilis CUB2 doménre.



22. ábra. A zimogén C1r szerin proteáz CUB2 doménjének Ca²⁺-al való telítési görbéje a fémion koncentráció függvényében. Az illesztett hiperbola egyenlete megadja a disszociációs állandót (K_D 475 ± 54 µM). A görbe illesztéséből kapott disszociációs állandó – a zimogén C1r-t felhasználva kaptuk a mérési pontokat – igen jó egyezést mutat az ITC-s mérésekből meghatározott disszociációs állandóval, amit a renaturált fragmentum segítségével határoztunk meg.

A munkánk legfontosabb eredménye, hogy vérből preparált zimogén C1r szerin proteázon mutattuk meg, a CUB2 doménon keresztül a Ca²⁺ koncentrációjának valóban fontos hatása van a C1r proteáz és a C1 komplex autoaktivációjának sebességére. Állítjuk, hogy a CUB2 doménon keresztül fejt ki a hatását a Ca²⁺. A C1r-en belül minden más Ca²⁺ kötő helyet (CUB1, EGF) telítve van a vér Ca²⁺ koncentrációjának szintjén. A zimogén C1r Ca²⁺-nal való telítési pontjaira görbét illesztettünk és meghatároztuk a kötés erősségét. Ez a kötődési állandó (475 ± 54 µM) szinte megegyezik az ITC-s méréseknél, a renaturált C1r CUB2-CCP1 doménpár CUB2 doménjénél megállapított Ca²⁺ kötődési állandóval (430 ± 20 µM). Ezek után azt feltételezzük, hogy a renaturált framentumban és a vérből preparált, zimogén C1r-ben lévő CUB2 domén a többi tulajdonságában is nagyon hasonlít egymásra. Valóban megállapíthatjuk, hogy a C1r szerin proteázban a CUB2 domén a rendezett-rendezetlen átmeneteivel kapcsoló funkciót lát el a C1 komplex működésében. A Ca²⁺-nak komoly befolyásoló szerepe van a C1r autoaktivációjára.

VI. Összefoglalás

A komplementrendszer klasszikus útvonalának első tagját, a C1 komplexet elsősorban immunkomplexek aktiválják. A C1 komplex aktiválódása során az első lépés a C1r molekula autoaktivációja, ezt követően az aktív C1r alegységek hasítják a C1s szerin proteáz alegységeket. Az autoaktivációhoz, majd a C1s aktiváláshoz a C1r szerin proteáz doménjének nagy elmozdulására van szüksége. Az általunk elvégzett kísérletek eredményei szerint a C1r CUB2 domén a legflexibilisebb részlet a proteázon belül, ami lehetővé teszi ezeket a mozgásokat. Kísérleteink eredményeit értelmezve azt a megállapítást tettük, hogy a Ca^{2+} koncentrációjának a C1r autoaktiváció sebességére komoly befolyásoló hatása van. E jelenség hatására a gyulladásoz területeken kimutatott Ca^{2+} koncentráció csökkenés nagymértékben elősegítheti a C1 komplex gyorsabb aktiválódását [65]. Így a Ca^{2+} a C1r autoaktivációjának a sebességét a CUB2 doménon keresztül szabályozhatja.

A DSC-s és ITC-s mérések eredménye alapján megállapítottam, hogy a C1r CUB2 domén egy Ca^{2+} -t köt. Csak a fémiont kötvé alakul ki a domén rendezett szerkezete de ez a szerkezet az átlagos fehérje doménekhez viszonyítva (pl.: CCP domén) kis termikus stabilitással rendelkezik (T_m 41,5 °C). A 41,5 °C-os hődenaturációs maximum azt mutatja, hogy a domén a 36 °C körüli testhőmérsékleten marginális stabilitással rendelkezik. A domén hődenaturációjának érdekessége, hogy a folyamat reverzibilis. A Ca^{2+} által szabályzott denaturációs-renaturációs folyamat felfogható egy „flexibilis kapcsoló” egység működésének a C1r CUB2 doménon belül.

A fémion kötésének entalpiája összemérhető a teljes domén stabilitásának az entalpiájával. Figyelemre méltó, hogy a Ca^{2+} disszociációs állandója a C1r CUB2 doménnel a rekombináns CUB2-CCP1 fragmentumon mérve $430 \pm 20 \mu\text{M}$. (A C1r CUB2 domén önállóan technikai okokból nem állítható elő.) 1,2 mM a szabad Ca^{2+} koncentráció a vérben, ezen körülmények mellett a C1r CUB2 domén kis affinitással köti a kalcium-iont, az idő negyedében nem koordinálja azt. Amikor a Ca^{2+} nem kötődik a doménhez, az elveszíti rendezett szerkezetét, rendezetlenné, flexibilissé válik. Feltételezések szerint a gyengébb fémion kötés – összehasonlítva a C1r CUB2 szekvenciáját a C1r CUB1 domén szekvenciájával – a 226-os pozícióban lévő Glu Asp-ra történő cseréje teszi lehetővé a Glu-Asp-Asp CUB doménekre jellemző Ca^{2+} kötő motívumban [66].

A Ca^{2+} elvonása fellazítja a C1r CUB2 domén szerkezetét. A rendezetlen C1r CUB2 doménhez Ca^{2+} -ot adva pedig visszkapjuk a natív, merevbb szerkezetű domént. Ezt a CD spektroszkópiás görbéink és a domén hidrogén-deutérium kicserélődésének a nyomkövetése bizonyítja. A C1r CUB2 domén Ca^{2+} nélküli származtatott CD görbéje egy tipikus rendezetlen fehérje spektrumának felel meg. A hidrogén-deutérium kicserélődéssel a C1r CUB2-CCP1 konformációs dinamikáját követjük nyomon Ca^{2+} jelenlétében és annak hiányában. A labilis hidrogének kicserélődésének időfüggéséből kiolvasható, hogy a domén tömörebb szerkezete csak Ca^{2+} jelenlétében alakul ki. A Ca^{2+} jelenlétében kialakult rendezett szerkezet eredményez egy nagyságrenddel lassabb H-D kicserélődést.

Vérből preparált teljes hosszúságú zimogén C1r szerin proteázon ellenőriztük a Ca^{2+} autoaktivációra kifejtett hatását. A zimogén C1r autoaktivációjának a sebességéből megállapítottuk a C1r CUB2 domén Ca^{2+} kötésének az állandóját ($475 \pm 54 \mu\text{M}$). Ez az érték közel volt a renaturált fragmentum CUB2 doménjén meghatározott kötődési állandóhoz ($430 \pm 20 \mu\text{M}$). Megállapítottuk, hogy a C1r CUB2 domén marginális stabilitása és a Ca^{2+} kilépéssel kialakuló flexibilitása esszenciális a C1r dimer és a C1r₂S₂ tetramer működéséhez.

A zimogén C1r dimer általánosan elfogadott szerkezete a CCP1 és SP domének kölcsönhatásán alapuló struktúra. Bizonyítékot találtunk egy olyan lehetséges C1r dimer szerkezet létezésére, aminek kialakításában nem vesz részt a C1r SP domén. Ennek az újszerű C1r dimernek a C1s aktiválásában lehet szerepe a C1 komplexben.

Minden létező C1 komplex modell közös eleme annak feltételezése, hogy a C1r autoaktivációjához és a C1s aktiválásához nagy domén-domén elmozdulásokra van szükség. Ezekhez az elmozdulásokhoz egy nagymértékben flexibilis molekula részletnek kell lenni a komplexen belül. Megtaláltuk és jellemeztük ezt a részletet, a C1r CUB2 domént, valamint leirtuk a működésének a menetét. A C1r CUB2 doménjének Ca^{2+} által fiziológias körülmények között modulált flexibilitása, szerkezeti magyarázatot ad a flexibilitás helyére és természetére. Ezen felismerésünkkel jelentősen hozzájárultunk egy, a jelen tudásunk minden elemével konzisztens és szerkezeti alapon nyugvó funkcionális modell megalkotásához.

VII. Summary

The antigen-bound antibody (immunocomplex) triggers the first component of the classical pathway, the C1 complex. Upon activation, the C1r converts the recognition signal in an enzymatic signal and C1s conveys this signal from the C1 complex to the C4 and C2. Both the autoactivation of C1r and the activation of C1s require large scale movements of the different domains of the C1r proteases. The results of our experiments give evidence that the C1r CUB2 domain is the most flexible part of the protease. This high degree of conformational flexibility is required for the C1r autoactivation and the C1s activation. The interpretation of the results of our work is that the CUB2 domain of C1r plays a serious role in the mechanism of the autoactivation of C1r and the activation of the C1 complex. This effect could be more pronounced in areas of infection-inflammation, where the local Ca^{2+} concentration decreases [65]. The decreased Ca^{2+} level facilitates the activation of C1 via increasing the ratio of the Ca^{2+} -unbound disordered form of the C1r CUB2 domain. The unfolded CUB2 domain can provide the high flexibility that is needed for the autoactivation process.

This study provides the first direct evidence that the CUB2 domain of C1r binds calcium. It was demonstrated by DSC and ITC measurements. We managed, for the first time, to prove the calcium-binding ability of C1r CUB2 and quantitatively measured its affinity by means of ITC. Ca^{2+} ion induces the folding of C1r CUB2 domain and stabilizes its structure. The C1r CUB2 domain has significantly lower thermal stability than average protein domains (41.5 °C). We revealed that at physiological temperature (37 °C), in the presence of Ca^{2+} , the CUB2 domain is at its border of stability. It is important to note that the melting transition of CUB2 is reversible. The Ca^{2+} ion can serve as a switch between the folded and disordered forms of the C1r CUB2 domain.

We compared the enthalpy changes corresponding to the unfolding of CUB2 measured by DSC with that of Ca^{2+} binding measured by ITC at the same temperature. The K_D of Ca^{2+} binding of the CUB2 domain proved to be $430 \pm 20 \mu\text{M}$. The 1.2 mM free Ca^{2+} concentration observed in the human blood is close to this value, resulting in a theoretical 26% unsaturation of the CUB2 domain. The unstable, Ca^{2+} -unbound form of the CUB2 domain provides the flexibility that is required for the function of the C1r molecule. The weaker binding might be the consequence of the mutation at position 226

which changed the conserved Glu to Asp in the Glu-Asp-Asp consensus sequence of the CUB domain Ca^{2+} binding site.

The C1r CUB2 domain does not bind Ca^{2+} in 26% of its time. The removal of Ca^{2+} destroys the folded structure, whereas adding Ca^{2+} to the disordered CUB2 domain restores the correct folding. Ca^{2+} induces the folding of the C1r CUB2 domain and stabilizes its structure. DSC measurements, CD spectroscopy, and H-D exchange experiments unambiguously demonstrated it. In the presence of Ca^{2+} , C1r CUB2 showed a CD spectrum that is characteristic of proteins containing β -sheet and turn structure, whereas in the absence of Ca^{2+} the corresponding CD spectrum was random-like. With H-D exchange experiments we could follow the conformational dynamics of the C1r CUB2-CCP1 both in the absence and in the presence of the Ca^{2+} . In the presence of Ca^{2+} the H-D exchange was one order of magnitude slower, revealing a more compact, folded structure of the C1r CUB2. In the absence of Ca^{2+} the C1r CUB2 domain presented a loose, disordered structure.

We investigated the effect of Ca^{2+} on the autoactivation of the full-length zymogen C1r isolated from blood. The measured K_D value ($475 \pm 54 \mu\text{M}$) estimated from the autoactivation of the full-length zymogen C1r is comparable with the K_D of the renatured CUB2 Ca^{2+} binding ($430 \pm 20 \mu\text{M}$) determined by ITC. We can conclude that the C1r CUB2 domain operates at the margin of its stability providing flexibility for the C1r dimer and probably for the entire C1r₂S₂ tetramer in the blood.

The native structure of the zymogen C1r is a dimer, which is stabilized by intermolecular CCP1-SP interactions. We found evidence for the existence of a C1r dimer, which evolves without the participation of C1r SPs. The possible biological relevance of this dimer is to regulate the activation of the C1s in the C1 complex.

A consensus element of all existing models is that significant flexibility of the C1r₂S₂ tetramer is needed for the autoactivation of C1r and the subsequent activation of C1s in the C1 complex. The C1r CUB2 domain is the source of this flexibility. Based on our experimental results we refined the existing C1 model to give a mechanistic explanation for the activation of C1.

VIII. Irodalomjegyzék

- 1) Mollnes, T. E., Song, W.-C., Lambris, J. D. (2002) Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends in Immunology* **23**, 61–64
- 2) Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I., Ross, O., Todd, E., Wardlaw, A. (1954) The Properdin System and Immunity: I. Demonstration and Isolation of a New Serum Protein, Properdin, and Its Role in Immune Phenomena. *Science* **120**, 279–85
- 3) Kawasaki, T., Etoh, R., Yamashina, I. (1978) Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **81**, 1018–1204
- 4) Matsushita, M., Fujita, T., (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *The Journal of Experimental Medicine* **176**, 1497–1502
- 5) Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F., Huber-Lang, M. (2011) New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System *Molecular Medicine* **17**, 317–329
- 6) http://en.wikipedia.org/wiki/File:Formowanie_MAC-en.svg (2011. 03. 07.)
- 7) Gál, P., Dobó, J., Závodszy, P., Sim, R. B. M. (2009) Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions *Molecular Immunology* **46**, 2745–2752
- 8) Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J. C., Arlaud, G. J. (2003) The Crystal Structure of the Globular Head of Complement Protein C1q Provides a Basis for Its Versatile Recognition Properties. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46974–46982
- 9) Kovacs, H., Campbell, I. D., Strong, P., Johnson, S., Ward, F.J., Reid, K. B. M., Eggleton, P. (1998) Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin g motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry* **37**, 17865–17874

- 10) Reid, K. B., Porter, R. R. (1976) Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochemical Journal* **155**, 19–23
- 11) Rawlings, N. D., Barrett, A. J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **290**, 205–218
- 12) http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/name_index?id=P;action=C (2011. 12.30.)
- 13) Strang, C. J., Siegel, R. C., Phillips, M. L., Poon, P. H., Schumaker, V. N. (1982) Ultrastructure of the first component of human complement: electron microscopy of the crosslinked complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 586–590
- 14) Schumaker, V. N., Zavodszky, P., Poon, P. H. (1987) Activation of the first component of complement. *Annual Reviews of Immunology* **5**, 21–42
- 15) Gaboriaud, C., Thielens, N. M., Gregory, L. A., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J. C., Arlaud, G. J. (2004) Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends in Immunology* **25**, 368–373
- 16) Phillips, A. E., Toth, J., Dodds, A. W., Girija, U. V., Furze, C. M., Pala, E., Sim, R. B., Reid, K. B. M., Schwaeble, W. J., Schmid, R., Keeble, A. H., Wallis, R. (2009) Analogous Interactions in Initiating Complexes of the Classical and Lectin Pathways of Complement. *The Journal of Immunology* **182**, 7708–7717
- 17) Lacroix, M., Rossi, V., Gaboriaud, C., Chevallier, S., Jaquinod, M., Thielens, N. M., Gagnon, J., Arlaud, G. J. (1997) Structure and assembly of the catalytic region of human complement protease C1r: a three-dimensional model based on chemical cross-linking and homology modeling. *Biochemistry* **36**, 6270–6282
- 18) Budayova-Spano, M., Lacroix, M., Thielens, N. M., Arlaud, G. J., Fontecilla-Camps, J. C., Gaboriaud, C. (2002) The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *The EMBO Journal* **21**, 231–239
- 19) Villiers, C. L., Arlaud, G. J., Colomb, M. G. (1985) Domain structure and associated functions of subcomponents C1r and C1s of the first component of human complement *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 4477–4481

- 20) Thielens, N. M., Aude, C. A., Lacroix, M. B., Gagnon, J., Arlaud, G. J. (1990) Ca²⁺ binding properties and Ca²⁺-dependent interactions of the isolated NH₂-terminal alpha fragments of human complement proteases C1r and C1s. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 14469–14475
- 21) Gaboriaud, C., Teillet, F., Gregory, L. A., Thielens, N. M., Arlaud, G. J. (2007) Assembly of C1 and the MBL- and ficolin-MASP complexes: Structural insights. *Immunology* **212**, 279–288
- 22) Thielens, N. M., Illy, C., Bally, I. M., Arlaud, G. J. (1994) Activation of human complement serine-proteinase C1r is down-regulated by a Ca²⁺-dependent intramolecular control that is released in the C1 complex through a signal transmitted by C1q. *Biochemical Journal* **301**, 509–516
- 23) Arlaud, G. J., Colomb, M. G., Gagnon, J. (1987) A functional model of the human C1 complex: Emergence of a functional model. *Immunology Today* **8**, 106–111
- 24) Lőrincz, Zs., Gál, P., Dobó, J., Cseh, S., Szilágyi, K., Ambrus, G., Závodszy, P., (2000) The Cleavage of Two C1s Subunits by a Single Active C1r Reveals Substantial Flexibility of the C1s-C1r-C1r-C1s Tetramer in the C1 Complex. *The Journal of Immunology* **165**, 2048–2051
- 25) Kardos, J., Harmat, V., Palló, A., Barabás, O., Szilágyi, K., Gráf, L., Náráy-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. *Molecular Immunology* **45**, 1752–1760
- 26) Kardos, J., Gál, P., Szilágyi, L., Thielens, N. M., Szilágyi, K., Lőrincz, Zs., Kulcsár, P., Gráf, L., Arlaud, G. J., Závodszy, P. (2001) The Role of the Individual Domains in the Structure and Function of the Catalytic Region of a Modular Serine Protease, C1r *The Journal of Immunology* **167**, 5202–5208
- 27) Gál, P., Ambrus, G. (2001) Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL–Masps. *Current Protein and Peptide Science* **2**, 43–59

- 28) Gagnon, J., Arlaud, G. J. (1985) Primary structure of the A chain of human complement-classical-pathway enzyme C1r. N-terminal sequences and alignment of autolytic fragments and CNBr-cleavage peptides. *Biochemical Journal* **225**, 135–142
- 29) Dr. Erdei Anna (2003) A komplementrendszer szerepe az elsődleges felismerési mechanizmusokban és az immunválasz szabályozásában. *Magyar Immunol/Hun Immunol* **2**, 33–38
- 30) Thurman, J. M., Holers, V. M. (2006) The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease. *The Journal of Immunology* **176**, 1305–1310
- 31) http://en.wikipedia.org/wiki/File:Droga_alternatywna.png (2011. 03. 07.)
- 32) Sirmaci, A., Walsh, T., Akay, H., Spiliopoulos, M., Şakalar, Y. B., Hasanefendioğlu-Bayrak, A., Duman, D., Farooq, A., King, M.-C., Tekin, M. (2010) MASP1 Mutations in Patients with Facial, Umbilical, Coccygeal, and Auditory Findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels Syndromes. *The American Journal of Human Genetics* **87**, 679–686
- 33) <http://proteopedia.org/wiki/index.php/Ficolin> (2011. 11.25)
- 34) Megyeri, M., Makó, V., Beinrohr, L., Doleschall, Z., Prohászka, Z., Cervenak, L., Závodszy, P., Gál, P. (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *The Journal of Immunology* **183**, 3409–3416
- 35) Dobó, J., Major, B., Kékesi K. A., Szabó, I., Megyeri, M., Hajela, K., Juhász, G., Závodszy, P., Gál, P. (2011) Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PLoSone* 2011 e20036
- 36) Amara, U., Flierl, M. A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Brückner, U. B., Nilsson, B., Gerhard, F., Lambris, J. D., Huber-Lang, M. (2010) Molecular Intercommunication between the Complement and Coagulation Systems. *The Journal of Immunology* **185**; 5628–5636
- 37) Reid, K. B., Day, A. J. (1989) Structure-function relationships of the complement components. *Immunology Today* **10**, 177–180

- 38) Norman, D. G., Barlow, P. N., Baron, M., Day, A. J., Sim, R. B., Campbell, I. D. (1991) Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *Journal of Molecular Biology* **219**, 717–725
- 39) Láng, A., Szilágyi, K., Major, B., Gál, P., Závodszy, P., Perczel, A. (2010) Intermodule cooperativity in the structure and dynamics of consecutive complement control modules in human C1r. *FEBS Journal*. **277**, 3986–3998
- 40) Gregory, L. A., Thielens, N. M., Arlaud, G. J., Fontecilla-Camps, J. C., Gaboriaud, C. (2003) X-ray Structure of the Ca²⁺-binding Interaction Domain of C1s. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 32157–32164
- 41) Gregory, L. A., Thielens, N. M., Matsushita, M., Sorensen, R., Arlaud, G. J., Fontecilla-Camps, J. C., Gaboriaud, C. (2004) The X-ray Structure of Human Mannan-binding Lectin-associated Protein 19 (MAp19) and Its Interaction Site with Mannan-binding Lectin and L-ficolin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 29391–29397
- 42) Feinberg, H., Uitdehaag, J. C. M., Davies, J. M., Wallis, R., Drickamer, K., Weis, W. I. (2003) Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 region of mannose-binding protein associated serine protease-2. *The EMBO Journal* **22**, 2348–2359
- 43) Teillet, F., Gaboriaud, C., Lacroix, M., Martin, L., Arlaud, G. J., Thielens, N. M. (2008) Crystal Structure of the CUB1-EGF-CUB2 Domain of Human MASP-1/3 and Identification of Its Interaction Sites with Mannan-binding Lectin and Ficolins. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 25715–25724
- 44) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) (2001) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*
- 45) www.qiagen.com/hb/qiaquickgelextractionkit_en (2011. 11. 25.)
- 46) www.genomex.com/vector_maps/pET17_map.pdf (2011. 11. 25.)
- 47) http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_sm0312.pdf (2011. 11. 25.)
- 48) <http://www.neb.com/nebecomm/products/productm0290.asp> (2011. 11. 25.)
- 49) <http://www.neb.com/nebecomm/products/productm0202.asp> (2011. 11. 25.)

- 50) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
- 51) <http://lifesev.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf> (2011. 11. 25.)
- 52) Georgiou, G., Bowden, G. A. (1990) Recombinant DNA Technology and Applications. *McGraw-Hill, New York*
- 53) Thomas, J. G., Baneyx, F. (1996) Protein Misfolding and Inclusion Body Formation in Recombinant Escherichia coli Cells Overexpressing Heat-shock Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 11141–11147
- 54) http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/service_and_support~documents_and_downloads~handbooks (2011. 11. 25.)
- 55) http://kr.expasv.org/tools/pi_tool.html (2011. 11. 25.)
- 56) Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1751**, 119–139
- 57) Krell, T. (2008) Microcalorimetry: a response to challenges in modern biotechnology *Microbial Biotechnol* **1**, 126–136
- 58) Pierce, M. M., Raman, C. S., Nall, B. T. (1999) Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods San Diego Calif* **19**, 213–221
- 59) Arlaud, G. J., Thielens, N. M. (1993) Human complement serine proteases C1r and C1s and their proenzymes. *Methods in Enzymology* **223**, 61–82
- 60) [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/16B82F5A78EDA338C1257628001CF13D/\\$file/18111353AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/16B82F5A78EDA338C1257628001CF13D/$file/18111353AA.pdf) (2011. 11. 25.)
- 61) Major, B., Kardos, J., Kékesi, A. K., Lőrincz, Zs., Závodszy, P., Gál, P. (2010) Calcium-dependent Conformational Flexibility of a CUB Domain Controls Activation of the Complement Serine Protease C1r. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 11863–11869
- 62) Privalov, P. L. (1979) Stability of proteins: small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry* **33**, 167–241
- 63) Makhatadze, G. I., Privalov, P. L. (1995) Energetics of protein structure. *Advances in Protein Chemistry* **47**, 307–425

-
- 64) Láng, A., Major, B., Szilágyi, K., Gáspári, Z., Gál, P., Závodszy, P., Perczel, A. (2010) Interaction between separated consecutive complement control modules of human C1r: Implications for dimerization of the full-length protease. *FEBS Letters* **584**, 4565–4569
 - 65) Zhang, J., Koh, J., Lu, J., Thiel, S., Leong, B. S. H., Sethi, S., He, C. Y. X., Ho, B., and Ding, J. L. (2009) Local Inflammation Induces Complement Crosstalk Which Amplifies the Antimicrobial Response. *PLoS Pathogens* **5**, e1000282
 - 66) Bally, I., Rossi, V., Lunardi, T., Thielens, N. M., Gaboriaud, C., and Arlaud, G. J. (2009) Identification of the C1q-binding Sites of Human C1r and C1s: a Refined Three-Dimensional Model of The C1 Complex of Complement. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 19340–19348

IX. Ábrajegyzék

Ábra sorszáma	Ábraalírás	Oldalszám
1.	A komplementrendszer felépítése.	7.
2.	A komplementrendszer „második része”, a közös effektor szakasza.	9.
3.	A C1 komplex részleges modellje a C1q-val, C1r- és C1s CUB1-EGF-CUB2 fragmentumokkal (Phillips <i>et al.</i>).	14.
4.	A Gaboriaud és munkatársai által készített C1 komplex modellje és a komplex aktiválódásának a mechanizmusa.	14.
5.	A C1r szerin proteáz doménszerkezete és a C1r ₂ S ₂ tetramer struktúrája.	15.
6.	A C3 molekula tioészter kötésének hasadása és degradációjának folyamata.	16.
7.	A komplementrendszer alternatív útvonalának működése.	17.
8.	A H faktor tizenhatodik CCP doménjének szerkezete és a C1r CCP1-CCP2 szerkezete.	21.
9.	A C1s CUB1 doménjének a szerkezete és a domén Ca ²⁺ kötő részének nagytámasztása.	24.
10.	A fehérje fragmentumok SDS-PAGE-en analizálva redukáló körülmények között.	39.
11.	A C1r bemutatott fragmentumainak DSC-vel felvett hődenaturációs görbéi.	40.
12.	A C1r CUB2 domén származtatott CD görbéi Ca ²⁺ kötött és Ca ²⁺ nélküli állapotában.	44.
13.	A C1r CUB2 domén titrálása Ca ²⁺ -al ITC készülékkel mérve és a C1r CUB2 Ca ²⁺ telítési görbéje.	45.
14.	C1r CUB2-CCP1 H-D kicserélődésének kinetikája Ca ²⁺ jelenlétében és anélkül.	47.

15.	A C1r CCP1-CCP2 fragmentum amid csoportok kémiai eltolódásainak eltérése a szimpla domének megfelelő amid csoportjainak a kémiai eltolódás értékeihez viszonyítva.	51.
16.	A C1r CCP1 és C1r CCP2 domének keresztitrlása során felfedezett kölcsönható felületek.	52.
17.	A C1r γ B fragmentumok lehetséges dimer állapotai.	54.
18.	Az álltalunk leírt újszerű C1r dimer elhelyezkedése a C1r ₂ tetramer részletben.	54.
19.	A zimogén C1r fogyását bemutató immunoblott a különböző Ca ²⁺ koncentrációk jelenlétében.	57.
20.	A denzitomerálással meghatározott zimogén frakciók aránya a normálást követően az idő függvényében.	58.
21.	A zimogén C1r autoaktiválódásának a sebessége a Ca ²⁺ koncentráció függvényében.	59.
22.	A zimogén C1r szerin proteáz CUB2 doménjének Ca ²⁺ -al való telítési görbéje a fémion koncentráció függvényében.	60.

X. Publikációk

A disszertáció alapját képező közlemények:

- 1) Major, B., Kardos, J., Kékesi, K. A., Lőrincz, Zs., Závodszy, P. and Gál, P. (2010)

Calcium-dependent conformational flexibility of a CUB domain controls activation of the complement serine protease C1r

J. Biol. Chem. **285**, 11863-11869

- 2) Láng, A., Szilágyi, K., Major, B., Gál, P., Závodszy, P. and Perczel, A. (2010)
Intermodule cooperativity in the structure and dynamics of consecutive complement control modules in human C1r

FEBS Journal **277**, 3986-3998

- 3) Láng, A., Major, B., Szilágyi, K., Gáspári, Z., Gál, P., Závodszy, P. and Perczel, A. (2010)

Interaction between separated consecutive complement control modules of human C1r: Implications for dimerization of the full-length protease

FEBS Letters **584**, 4565-4569

Egyéb közlemények:

- 4) Dobó, J., Major, B., Kékesi, K. A., Szabó, I., Megyeri, M., Hajela, K., Juhász, G., Závodszy, P. and Gál, P. (2011)

Cleavage of Kininogen and Subsequent Bradykinin Release by the Complement Component: Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1

PLoS ONE **6**, e20036

Konklúzió

A komplementrendszer klasszikus útvonalának első tagját, a C1 komplexet elsősorban immunkomplexek aktiválják. A C1 komplex aktiválódása során az első lépés a C1r molekula autoaktivációja, ezt követően az aktív C1r alegységek hasítják a C1s szerin proteáz alegységeket. Az autoaktivációhoz, majd a C1s aktiválásához a C1r szerin proteáz doménjének nagy elmozdulására van szüksége. Az általunk elvégzett kísérletek eredményei szerint a C1r CUB2 domén a legflexibilisebb részlet a proteázon belül, ami lehetővé teszi ezeket a mozgásokat. Kísérleteink eredményeit értelmezve azt a megállapítást tettük, hogy a Ca^{2+} koncentrációjának a C1r autoaktiváció sebességére komoly befolyásoló hatása van. E jelenség hatására a gyulladós területeken kimutatott Ca^{2+} koncentráció csökkenés nagymértékben elősegítheti a C1 komplex gyorsabb aktiválódását.

A DSC-s és ITC-s mérések eredménye alapján megállapítottam, hogy a C1r CUB2 domén egy Ca^{2+} -t köt. Csak a fémiont kötvé alakul ki a domén rendezett szerkezete de ez a szerkezet az átlagos fehérje doménekhez viszonyítva kis termikus stabilitással rendelkezik. A 41,5 °C-os hődenaturációs maximum azt mutatja, hogy a domén a 36 °C körüli testhőmérsékleten marginális stabilitással rendelkezik. A domén hődenaturációjának érdekessége, hogy a folyamat reverzibilis. A Ca^{2+} által szabályzott denaturációs-renaturációs folyamat felfogható egy „flexibilis kapcsoló” egység működésének a C1r CUB2 doménen belül.

Vérből preparált teljes hosszúságú zimogén C1r szerin proteázon ellenőriztük a Ca^{2+} autoaktivációra kifejtett hatását. A zimogén C1r autoaktivációjának a sebességéből megállapítottuk a C1r CUB2 domén Ca^{2+} kötésének az állandóját ($475 \pm 54 \mu\text{M}$). Ez az érték közel volt a renaturált fragmentum CUB2 doménjén meghatározott kötődési állandóhoz ($430 \pm 20 \mu\text{M}$). Megállapítottuk, hogy a C1r CUB2 domén marginális stabilitása és a Ca^{2+} kilépéssel kialakuló flexibilitása esszenciális a C1r dimer és a $\text{C1r}_2\text{S}_2$ tetramer működéséhez.

Minden létező C1 komplex modell közös eleme annak feltételezése, hogy a C1r autoaktivációjához és a C1s aktiválásához nagy domén-domén elmozdulásokra van szükség. Ezekhez az elmozdulásokhoz egy nagymértékben flexibilis molekula részletnek kell lenni a komplexen belül. Megtaláltuk és jellemeztük ezt a részletet, a C1r CUB2 domént, valamint leírtuk a működésének a menetét. A C1r CUB2 doménjének Ca^{2+} által fiziológias körülmények között modulált flexibilitása, szerkezeti magyarázatot ad a flexibilitás helyére és természetére. Ezen felismerésünkkel jelentősen hozzájárultunk egy, a jelen tudásunk minden elemével konzisztens és szerkezeti alapon nyugvó funkcionális modell megalkotásához.

Conclusion

The major achievement of my PhD thesis is the refined structural and functional model of the first component of complement (C1); the identification of the Ca^{2+} binding domain (CUB2) and the concept of “flexibility switch” upon Ca^{2+} binding and activation.

The successful preparation of non-catalytic domains and domain pairs from the C1r, using techniques of recombinant protein expression and limited proteolysis opened the way to all of my novel experiments.

This study provides the first direct evidence that the CUB2 domain of C1r binds calcium. It was demonstrated by DSC and ITC measurements. We managed, for the first time, to prove the calcium-binding ability of C1r CUB2 and quantitatively measured its affinity by means of ITC. Ca^{2+} ion induces the folding of C1r CUB2 domain and stabilizes its structure. The C1r CUB2 domain has significantly lower thermal stability than average protein domains (41.5 °C). We revealed that at physiological temperature (37 °C), in the presence of Ca^{2+} , the CUB2 domain is at its border of stability. It is important to note that the melting transition of CUB2 is reversible. The Ca^{2+} ion can serve as a switch between the folded and disordered forms of the C1r CUB2 domain.

We investigated the effect of Ca^{2+} on the autoactivation of the full-length zymogen C1r isolated from blood. The measured K_D value ($475 \pm 54 \mu\text{M}$) estimated from the autoactivation of the full-length zymogen C1r is comparable with the K_D of the renatured CUB2 Ca^{2+} binding ($430 \pm 20 \mu\text{M}$) determined by ITC. We can conclude that the C1r CUB2 domain operates at the margin of its stability providing flexibility for the C1r dimer and probably for the entire C1r₂S₂ tetramer in the blood.

A consensus element of all existing models is that significant flexibility of the C1r₂S₂ tetramer is needed for the autoactivation of C1r and the subsequent activation of C1s in the C1 complex. The C1r CUB2 domain is the source of this flexibility. Based on our experimental results we refined the existing C1 model to give a mechanistic explanation for the activation of C1.