

dc\_591\_12

**A komplementrendszer aktiválódásának kezdeti lépései: Moduláris szerin proteázok szerepe a természetes immunválasz beindításában**

**MTA doktori értekezés**



**Gál Péter**

**Magyar Tudományos Akadémia  
Természettudományi Kutatóközpont  
Enzimológiai Intézet**

**2013**

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>4</b>
<b>2. A munka körülményei és előzményei, szakmai hozzájárulások</b>	<b>6</b>
<b>3. Tudományterületi háttér</b>	<b>8</b>
3.1 A komplementrendszer aktiválódási útvonalai	8
3.2 A komplementaktiválódás fiziológiai következményei	14
3.3 A komplementaktiválódás szabályozása	15
3.4 A komplement proteázok	17
3.5 Az iniciációs komplexek szerkezete	21
<b>4. Kérdések és célkitűzések</b>	<b>24</b>
<b>5. Módszertan</b>	<b>26</b>
<b>6. Kutatási eredmények és megbeszélésük</b>	<b>28</b>
6.1 A komplementaktiválás klasszikus útja	28
6.1.1 C1r	28
6.1.1.1 Az egyes domének funkciója a C1r katalitikus fragmentumában	28
6.1.1.2 Új modell a C1r autoaktiválódására a C1 komplexen belül az aktív $\gamma$ B fragmentum térszerkezete alapján	32
6.1.1.3 A CUB2 domén szerepe a C1r aktiválódásában	36
6.2 A komplementaktiválás lektin útja	42
6.2.1 MASP-2	42
6.2.1.1 Az egyes domének funkciója a MASP-2 katalitikus fragmentumában	42
6.2.1.2 A MASP-2 katalitikus fragmentuma két külső kötőhelyen keresztül is kapcsolódik a C4 szubsztráthoz	45
6.2.1.3 A zimogén MASP-2 proteolitikus aktivitása az autokativációs folyamat kulcsa	51
6.2.2 MASP-1	60
6.2.2.1 A MASP-1 széles specificitású proteáz, sok tulajdonságában a trombinra emlékeztet	60

6.2.2.2 *A komplementrendszer új funkciója: A MASP-1 közvetlenül aktiválja az endotél sejteket* 68

6.2.2.3 *A MASP-1 bradykinint szabadít fel kininogén szubsztrátból* 80

6.2.2.4 *A MASP-1 széles szubsztrátspecificitásának szerkezeti háttere* 83

6.2.2.5 *A MASP-1 fontos szerepet játszik a lektin út beindításában* 86

**7. További tervek, perspektívák 97**

**8. Új tudományos eredmények összefoglalása 100**

**9. Köszönetnyilvánítás 106**

**10. Irodalomjegyzék 107**

**10.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények 107**

**10.2 Az értekezés tárgyában megjelent további saját publikációk 108**

**10.3 Felhasznált irodalom 112**

## 1. Bevezetés

Az immunrendszer alapvető funkciója a szervezet integritásának védelme mind a külső kórokozók (pl. baktériumok, vírusok), mind pedig a szervezetre veszélyes megváltozott saját struktúrákkal (pl. rákos sejtek, apoptotikus sejtek) szemben. Az immunrendszer ezt a feladatot sejtek és molekulák bonyolult hálózata révén látja el. A rendszer rendkívül összetett, sokféle stimulus hatására aktiválódhat és szabályozása is sokrétű. E dolgozat tárgya a komplementrendszer, amely egy kb. 40 fehérjemolekulából álló proteolitikus kaszkárendszer és lényegében minden, az immunrendszerre jellemző alapfunkcióval rendelkezik: felismeri, megjelöli és semlegesíti, eliminálja a veszélyes struktúrákat. Számomra különösen lenyűgöző, hogy egy pusztán önszerveződő fehérjemolekulából álló rendszer ilyen bonyolult feladatokat legyen képes ellátni. A komplementrendszer működésének (aktiválódásának és szabályozásának) megértése közelebb visz bennünket az egész immunrendszer működésének jobb megértéséhez.

A komplementrendszer az immunrendszer veleszületett ágához sorolható. A veleszületett (vagy természetes) immunrendszerre jellemző, hogy a szervezetbe behatoló kórokozókat azonnal felismeri és azok ellen hatékony válaszlépésekkel reagál, időt biztosítva ezzel a jóval specifikusabb adaptív (vagy szerzett) immunitás felépüléséhez. A természetes immunitás komponenseit születésünkkel készen kapjuk, az azokat kódoló gének a genomban nem változnak életünk során. Ezzel szemben az adaptív immunitás életünk során alakul ki és folyamatosan változik szervezetünket érő külső és belső hatások függvényében. Nem meglepő, hogy a természetes immunitás olyan struktúrákat, mintázatok ismert, amelyek az evolúció során nem változnak és immunrendszerünk számára veszjelzésként szolgálnak. Ilyenek pl. a baktériumok sejt falán található szénhidrát mintázatok, bakteriális endotoxinok, DNS, RNS, stb. Az evolúciós értelemben sokkal változékonyságú fehérje antigének ellen (pl. vírus burokfehérjék) csak a szintén rendkívüli változékonysággal rendelkező adaptív immunitás képes hatékony választ generálni. Rendkívül fontos hangsúlyozni azonban, hogy a kétféle rendszer egymásra épül és kiegészíti egymást: hatékony természetes immunválasz nélkül nem tud az adaptív immunitás felépülni, a természetes immunitás önmagában azonban egy idő után már nem képes féken tartani a kórokozókat. A komplementrendszer egyik funkciója éppen az, hogy hidat képez a természetes és az adaptív immunválasz között: a komplementrendszer aktiválódása elősegíti az adaptív immunválasz kialakulását, az adaptív immunválasz során képződő antitestek viszont az antigénjükhöz kapcsolódva aktiválják a komplementrendszert.

A komplementrendszer aktiválódásának első lépésében mintázatfelismerő molekulák (receptorok) kapcsolódnak az aktivátor struktúrához. A veszélyt jelző szignálok felismerését végző molekulák szerin proteáz zimogénekkal alkotnak komplexet, amelyek a mintázatfelismerő molekulák által detektált veszélyt enzimatisz jelle konvertálják és egy kaszkádfolyamat keretében nagymértékben felerősítik. A vérben több, a komplementrendszerhez hasonló, proteolitikus kaszkád található, amelyek közös jellemzője, hogy aktiválódásuk során tripszinszerű szerin proteázok aktiválódnak. Ezek a proteázok

## dc\_591\_12

szinte kivétel nélkül több doménből álló moduláris fehérjék és szubsztrátjaikat limitált proteolízis során rendkívül specifikusan hasítják. Dolgozatomban a komplementrendszer klasszikus és lektin útjának beindításában szerepet játszó szerin proteázokkal kapcsolatos eredményeimet szeretném bemutatni. Munkám során elsősorban arra kerestem a választ, hogy mi a szerkezeti alapja a komplement proteázok rendkívül szűk szubsztrátspecificitásának, mi az egyes domének szerepe a proteázok működésében, mi a komplementrendszer aktiválódásának mechanizmusa és milyen élettani következményekkel jár a rendszer aktiválódása különös tekintettel a gyulladás kialakulására.

## 2. A munka körülményei és előzményei, szakmai hozzájárulások

Jelen értekezés alapjául szolgáló publikációkat a komplementrendszer aktiválódásának témakörében az elmúlt évtized során megjelent cikkeimből válogattam (összesen 13 publikáció). Ezekre az értekezésben kék színnel hivatkozom. Ezeknek a publikációknak a létrejöttében kivétel nélkül meghatározó szerepet játszottam, elsősorban a problémafelvetés, a tudományos koncepció kidolgozása, a kísérletek tervezése, az adatok értelmezése, a következtetések levonása és a cikkek megírása terén, de bizonyos esetekben a kísérleti munkában is részt vettem. Négy publikációban szerepelek első szerzőként (1., 3., 4., 5.), (ezek közül három (1., 3., 4) megosztott szerzőségű), öt publikációban vagyok utolsó szerző (6., 8., 9., 10., 12.), három publikációban pedig utolsó előtti senior szerző vagyok (2., 11., 13.), amelyek közül az egyiknek (11.) levelező szerzője voltam. Két publikációban, amelyekben túlnyomórészt külföldi szerzők szerepelnek (2., 7.) Robert B. Sim (MRC, Immunochemistry Unit, Oxford, UK) laboratóriumából, olyan kísérleti eredmények kerülnek bemutatásra, amelyek egy részét az általunk előállított rekombináns fehérjék segítségével Budapesten végeztek vendégkutatók (Krishnan Hajela és Anders Krarup) az irányításom alatt. A 13. publikációban ismertetésre kerülő MASP-2-C4 komplex kristályosításának az ötlete tőlem származik, az ehhez szükséges MASP-2 mutáns laboratóriumunkban készült, résztvettem az eredmények értelmezésében és a cikk megírásában. Az irodalomjegyzékben feltüntetek még 30 olyan publikációt, amelyek anyagát részletesen nem tárgyalom, de kapcsolódnak a témához. Ezek túlnyomó többsége, 27 publikáció, a Ph.D. fokozat megszerzése (1996) után jelent meg. Ezek közül hatban első (egy megosztott szerzőségű), háromban pedig utolsó szerző vagyok.

Engem mindenekelőtt a komplementrendszer aktiválódási mechanizmusának a megismerése érdekel, és ezt igyekszem minél több oldalról megközelíteni. Ezért sok olyan metodikát is használtunk, amelyek laboratóriumunkban nem álltak a rendelkezésünkre. Munkásságom jelentős részét képezi együttműködések kialakítása más kutatócsoportokkal és a közös munka koordinálása. Jelen dolgozat szempontjából négy hazai és két külföldi munkacsoportot kell első sorban megemlítenem. Egyes biofizikai technikák bevezetésében és használatában Kardos József (ELTE, Biokémiai Tanszék) együttműködése nélkülözhetetlen volt. Én magam nem vagyok krisztallográfus és a csoportunkban sincs ilyen képzettségű ember, ezért a kristályszerkezeteket (egy kivételével), a laboratóriumunkban készült fehérjekristályok felhasználásával, Harmat Veronika (ELTE, Kémiai Intézet) oldotta meg. A szerkezetek értelmezésében természetesen döntő szerepem volt. Az emberi primer endotél sejteken végzett mérések a SOTE III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában készültek Cervenak László és munkatársai közreműködésével. A szelektív proteáz inhibitorok előállítása fág bemutatás segítségével Pál Gábor (ELTE, Biokémiai Tanszék) laboratóriumában történt, aki a módszert meghonosította Magyarországon. A külföldi együttműködőim közül meg kell említenem Gregers Andersen (Aarhusi Egyetem, Dánia) krisztallográfust és Robert B. Sim professzort (Oxford, UK), aki munkásságomat a kezdetektől fogva figyelemmel kísérte és támogatta.

Végezetül fontos kiemelnem, hogy ez a munka nem születhetett volna meg, ha nem támaszkodhatom a Závodszy Péter professzor által alapított és működtetett kutatócsoportra az MTA TTK (korábban SZBK) Enzimológiai Intézetében. Závodszy professzor a komplement kutatás egyik fellegréből, a Nóbél díjas Rodney Porter oxfordi laboratóriumából hazatérve, megalapította az egyik első komplementkutató laboratóriumot Magyarországon. Laboratóriumában dolgozva ismerkedtem meg a témával és előbb az egyetemi doktori címet, majd a Ph.D. fokozatot is irányításával szereztem meg. Munkámat végig támogatta és egy olyan stabil, nyugodt háttérrel biztosított, ahol semmitől sem zavartatva, a tudományra koncentrálni tudtam dolgozni az elmúlt évek során. Büszke vagyok rá, hogy már negyedik éve csoportvezetőként dolgozhatok mellette az Enzimológiai Intézetben.

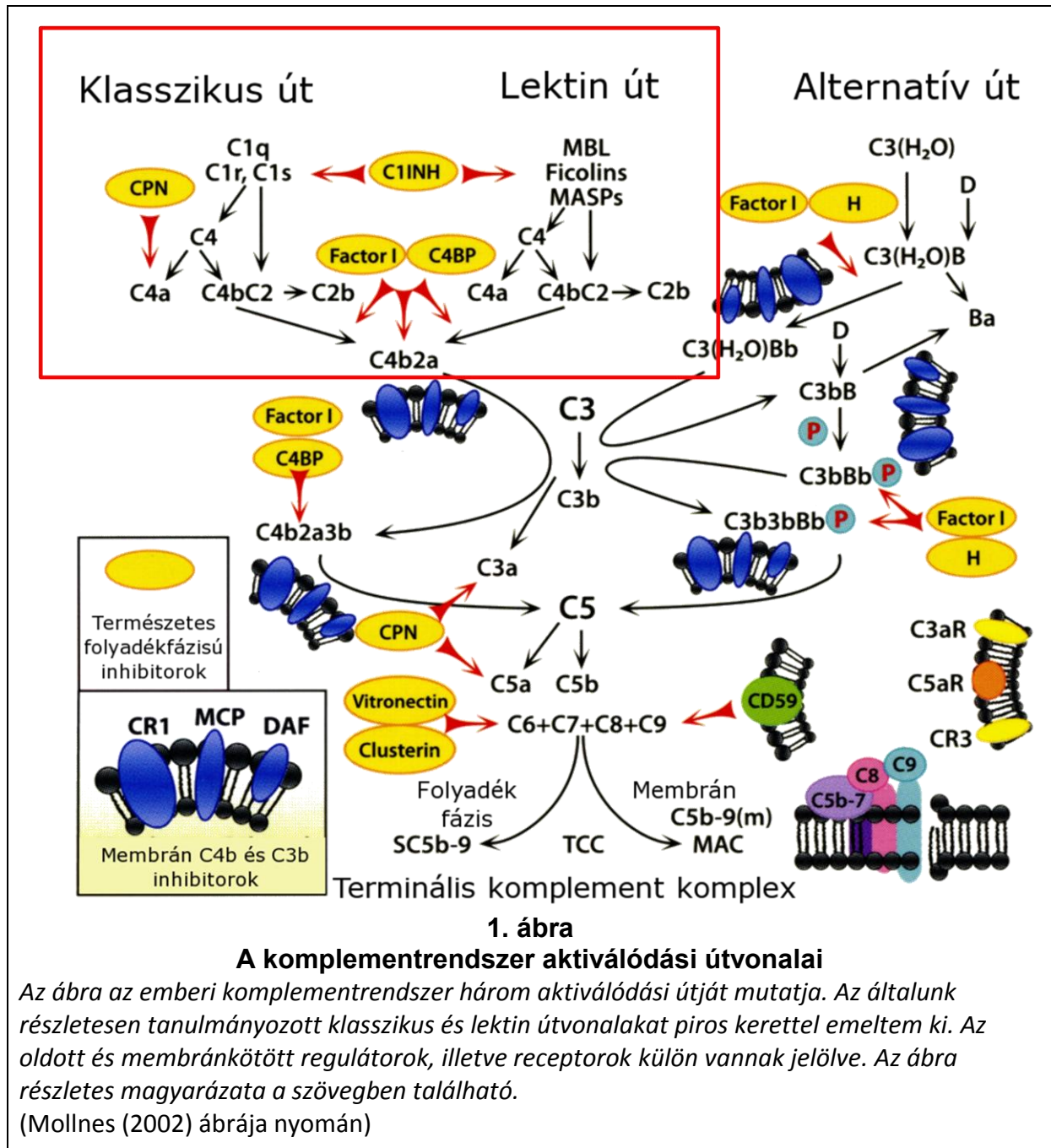
### 3. Tudományterületi háttér

#### 3.1 A komplementrendszer aktiválódási útvonalai

A komplementrendszer felfedezése Fodor József magyar orvosprofesszor nevéhez fűződik, aki 1887-ben Budapesten elsőként írta le a vérsavó baktériumölő hatását (Karasszon és Csaba, 1992). Sajnos a nemzetközi szakirodalom Fodor érdemeiről jórészt megfeledkezve a dicsőséget elsősorban a francia Jules Bordet-nek tulajdonítja, aki kimutatta, hogy a szérumbaktériumölő hatásáért részben egy hőérzékeny faktor, az „alexin” a felelős (Bordet, 1896). A névadónak Paul Ehrlich tekinthető, aki 1899-ben használta elsőként a komplement elnevezést arra a szérumban található hőérzékeny faktorra, ami a baktériumokhoz kötődő hőstabil „amboceptor” (mai nevén antitest) hatását mintegy kiegészítve (komplementálva) előidézi a baktériumsejtek lízisét (Ehrlich és Morgenroth, 1899). Ehrlich korában a komplementet még egyetlen komponensnek vélték, ami a baktériumhoz kötött antitesthez kapcsolódva fejt ki hatását. A huszadik század során a komplementről alkotott kép teljesen megváltozott. Egyrészt kiderült, hogy nem egyetlen komponensről, hanem egy molekuláris hálózatról van szó, másrészt nyilvánvalóvá vált, hogy a rendszer funkciója jóval széleskörűbb és alapvetőbb annál, mintsem csupán az adaptív immunválasz egyfajta „kiegészítő” effektor mechanizmusaként szolgáljon.

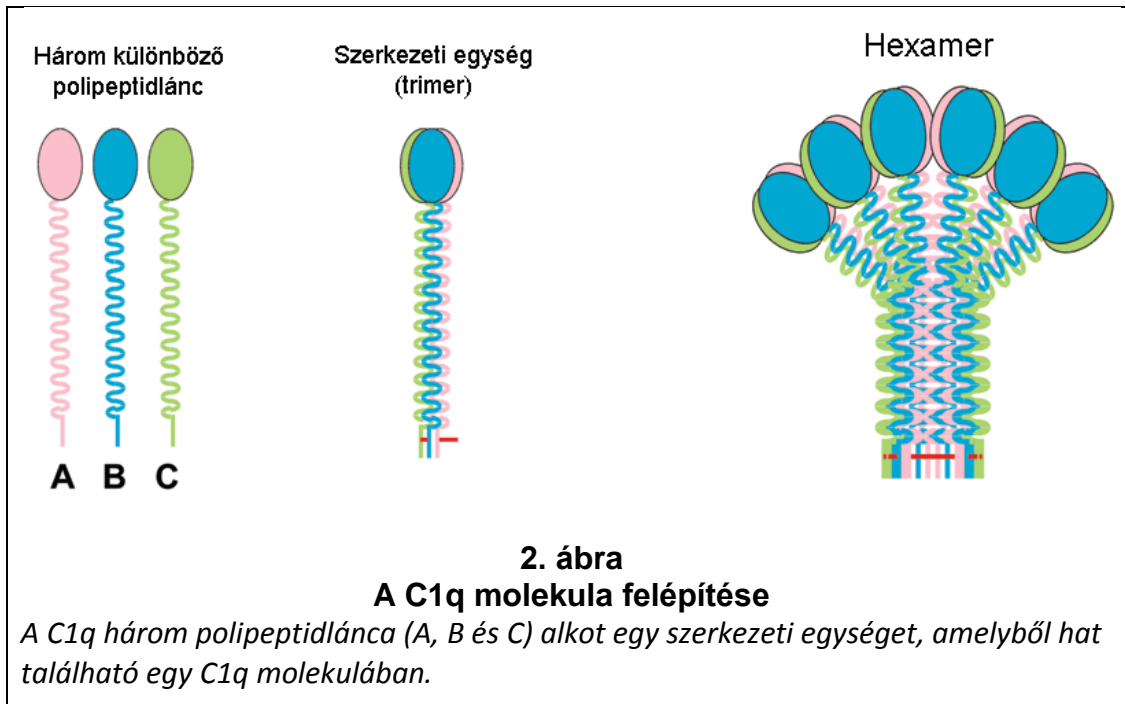
A komplementrendszerhez mai tudásunk szerint kb. 40 fehérjekomponens sorolható (Walport, 2001a; Walport, 2001b, Ricklin és mtsi., 2010). Ezek között találhatóak testnedvekben (elsősorban a vérben) oldott állapotban jelenlévő molekulák, valamint a különböző sejtek felszínén elhelyezkedő receptorok és regulátorok. A komplementrendszer fő komponensei tripszinszerű szerin proteáz enzimek (Sim and Tsiftoglou, 2004), amelyek egymást kaszkádszerűen aktiválják. Szintén alapvető komponensek a tioészter kötést tartalmazó fehérjék (C3, C4) és a velük homológ C5, amelyek ugyancsak a szerin proteázok hatására aktiválódnak. A komplementrendszer komponensei a vérben inaktív állapotban vannak jelen és csak megfelelő stimulus hatására aktiválódnak. Az aktiválódásnak három alapvető útját különíthetjük el: a klasszikus, a lektin és az alternatív utat (1. ábra). A három aktiválódási útvonal a komplementrendszer legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponensének, a C3-nak, a hasításánál találkozik és beindul az egységes terminális útvonal, ami a membránkárosító komplex (membrane attack complex = MAC, vagy más néven: terminal complement complex = TCC) kialakulásához vezet.



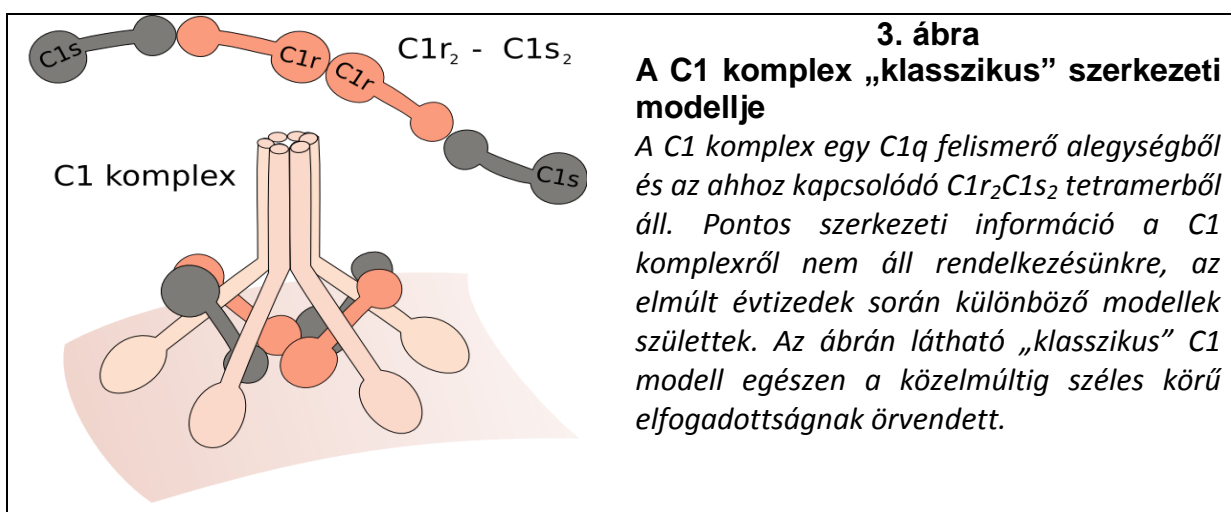


A legrégebb óta tanulmányozott aktiválódási útvonal, a klasszikus út, mintázatfelismerő molekulája a C1q (2. ábra). A C1q heterotrimer alegységekből felépülő hexamer molekula (Reid és Porter, 1976; Kishore és Reid, 2000). Az egyenként kb. 220 aminosav hosszúságú A-, B- és C-polipeptidláncok C-terminális végükön globuláris doméneket alkotnak, míg a három peptidlánc N-terminális fele kollagén hármass hélixet képez. A C-terminális globuláris domének felelősek az aktivátor struktúrákhoz való kötődésért, míg a kollagén szárok a C1r és C1s szerin proteázokat kötik. A klasszikus utat régebben kizárólag antitestfüggő útvonalnak tekintették, mivel a C1q globuláris fejeivel kötődik az immunkomplexben lévő IgG és IgM molekulák Fc részéhez. Ma már tudjuk

azonban, hogy a C1q közvetlenül is képes kötődni bizonyos mikróbákhoz, apoptotikus és nekrotikus sejtekhez.



A pentraxinok csoportjába tartozó C-reaktív proteinhez szintén nagyon erősen kötődik a C1q. A C-reaktív protein koncentrációja jelentősen megnő gyulladások esetén (akut-fázis fehérje) és a kórokozókhoz illetve apoptotikus sejtekhez kapcsolódva a C1q kötés révén beindítja a klasszikus utat (Black és mtsi., 2004). A C1q molekulához kalcium jelenlétében két C1r és C1s multidomén szerin proteázból álló tetramer kapcsolódik (Ziccardi és Cooper, 1977). A C1s-C1r-C1r-C1s szekvenciájú tetramer kalcium ionok hatására spontán módon összeáll, C1q jelenlétében pedig szintén önszervező módon keletkezik a C1 komplex (C1qC1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub>), ami a komplementrendszer klasszikus útja első komponensének tekinthető (3. ábra).



A C1 komplex szerkezetével egy későbbi fejezetben részletesebben fogok foglalkozni. Itt csupán annyit jegyeznek meg, hogy noha a C1 komplex szerkezetét és az aktiválódás mechanizmusát több mint ötven éve kutadják, teljes szerkezeti információval a komplexről ma sem rendelkezünk. A legújabb C1 modellek egyrészt egyes fragmentumok térszerkezetén másrészt mutációs és kötődési kísérletek eredményein alapulnak. A klasszikus út aktiválódásának első lépése a C1q globuláris fejeinek kötődése az aktivátor struktúrához. A C1q hat fejből legalább kettőnek a kötődése szükséges ahhoz, hogy a kollagén szárhoz kapcsolódó szerin proteáz zimogének aktiválódjanak. Az első enzimatis lépés a klasszikus útvonalban a C1r zimogén autoaktiválódása (Dodds és mtsi., 1978). Az autoaktiválódás egy Arg-Ile kötés hasadásával jár a szerin proteáz domén aktivációs peptid (linker) régiójában. Aktiváció után a két részre hasadt polipeptidláncot (A és B lánc) egy diszulfid híd tartja össze. Ebből az aspektusból a C1r és C1s aktiválódása inkább a kimotripszin aktiválására emlékeztet, jóllehet a komplement proteázok tripszinszerű szubsztrátspecifitással rendelkeznek (Lys és Arg után hasítják a peptidláncot). A következő lépésben az aktív C1r hasítja, és ezzel aktiválja a zimogén C1s-t. A C1s a C1 komplex azon enzime, amelyik tovább viszi az enzimaszkádot a C4 és C2 komponensek hasítása révén (Wallis és mtsi., 2010). Először a C4 hasítására kerül sor, aminek az eredményeként a C4-ről leválik egy kisebb fragmentum (C4a), a nagyobb C4b fragmentum pedig tioészter kötés révén kovalensen kötődik az aktivátor felszínhez. A C4b nem rendelkezik enzimatis aktivitással, viszont megköti a zimogén formában jelenlévő C2 szerin proteázt, amelyet a C1s limitált proteolízissel aktivál. Megjegyzendő, hogy a C2 aktiválódási mechanizmusa különbözik a C1r és C1s aktiválódásától, mivel a C2 esetében a limitált proteolízis a szerin proteáz doméntől távoli régióban, a „von Willebrand faktor A” (VWFA) domén N-terminálisán történik és hasítás után a kisebb C2b (más nomenklatura szerint C2a) fragmentum távozik (Forneris és mtsi., 2012). Az így keletkező C4b2a enzimkomplex a klasszikus út C3-konvertáza, amely a C3 molekulát két fragmentumra: a kisebb C3a-ra és a nagyobb C3b-re hasítja. A C3b fragmentum tioészter csoportja révén kötődik a felszínhez. Egy aktív C1 komplex több C3-konvertáz komplexet generál, amelyek még több C3 komponenset hasítanak, vagyis a kaszkádszerű proteolízis a kezdeti jel felerősödéséhez vezet.

A komplementaktiválás lektin útját a múlt század nyolcvanas éveiben fedezték fel (Ikeda és mtsi., 1987), de még a kétezres években is találtak új komponenseket (Degen és mtsi., 2009). A lektin út első közelítésben nagyon hasonlít a klasszikus útra, ez a hasonlóság azonban többnyire felszínes, a valóságban a lektin út sokkal összetettebb a klasszikus útnál és még több a megválaszolatlan kérdés. A klasszikus út egyetlen felismerő molekulájával szemben a lektin út esetén legalább öt különböző felismerő molekula ismert és a lista valószínűleg bővülni fog a jövőben. A legkorábban felfedezett MBL (mannóz kötő lektin), C-típusú lektin és elsősorban mannóz és N-acetil-glükózamin részeket ismer fel a baktériumsejtek felszínén (Thiel, 2007). A háromféle fikolin (M, L és H fikolin/alternatív nomenklatura: fikolin-1,-2 és -3) fibrinogénszerű globuláris doménjeivel acetilált vegyületekhez kötődik (Endo és mtsi., 2011). Mivel acetil csoportok leginkább a baktériumok sejtfelszíni szénhidrátjain találhatóak, a fikolinok is gyakorlatilag lektinszerű molekuláknak

tekinthetők. Nemrég fedezték fel a kollektin-11 molekulát (CL11 vagy CL-K1), ami szintén a lektin út felismerő molekulája (Hansen, és mtsi. 2010). Ezek a molekulák annyiban hasonlítanak a C1q-ra, hogy C-terminális globuláris fejkéből (lektin domének) és N-terminális kollagén szárákból állnak (innen a gyűjtőnév: kollektinek). Lényeges különbség azonban, hogy csak egyféle polipeptidláncból épülnek fel, és a homotrimer alapegységekből többféle oligomerizációs fokú felismerő molekulák állhatnak össze a dimertől a hexamerig. Valószínűleg a tetramer forma a leggyakoribb, de erre nézve nincsenek igazán megbízható adatok. Ha tekintetbe vesszük, hogy az ötféle felismerő molekula legalább ötféle oligomer formában létezhet, a lehetséges variációk száma több mint huszonöt, azaz több mint huszonöt különböző felismerő molekula van a rendszerben. Nem kevésbé változatos a kép, ha a felismerő molekulákhoz kapcsolódó proteázokat (MASP= MBL-hez kötött szerin proteáz (mannose-binding lectin-associated serine protease)) vesszük számba. Kezdetben csak a legnagyobb mennyiségben jelenlévő MASP-ot izolálták és annak tulajdonították a C3-konvertáz keletkezéséhez szükséges C4 és C2 hasítást (Matsushita és Fujita, 1992). Később kiderült, hogy ezért nem a nagymennyiségű MASP-1, hanem a preparátumokban sokkal kisebb mennyiségben jelenlévő rokon enzim, a MASP-2 a felelős (Thiel és mtsi., 1997). Kiderült, hogy a MASP-2 képes autoaktiválódni és C4-et valamint C2-t hasítani, vagyis, mint ezt *in vitro* kísérletekben bizonyították, egyedül képes beindítani a komplement kaskádját. A szérumban több mint hússzoros koncentrációban (11 µg/ml vs. 0.4 µg/ml) jelenlévő MASP-1 rendkívül könnyen autoaktiválódik és képes C2 hasítására, azonban a C4 nem szubsztrátja (Rossi és mtsi., 2001). Következésképpen a MASP-1 önállóan nem képes beindítani a lektin utat. A MASP-1 tényleges funkciója, fiziológiai szerepe, az utóbbi évek egyik legizgalmasabb és sokat vitatott kérdése, amellyel én is behatóan foglalkoztam munkám során. A MASP-1 szerepének részletes tárgyalására ezért az eredmények fejezetben térek ki bővebben. A későbbiek során felfedeztek egy harmadik proteáz is: a MASP-3-at (Dahl és mtsi., 2001). A MASP-3 N-terminális része teljesen megegyezik a MASP-1 N-terminális régiójával, a két enzim közti különbség csak a C-terminális szerin proteáz doménben van. A MASP-3 funkciója még rejtélyesebb: viszonylag nagy mennyiségben van jelen a vérben (5 µg/ml), de nem sikerült kimutatni, hogy bármilyen komplement komponenst hasítana. Mivel képes a felismerő molekulákhoz kötődni az az elmélet született, hogy kompetitív inhibitorként leszorítja az aktív MASP-1-et és MASP-2-t a komplexekről és így csökkenti a lektin út hatékonyságát. Elég nehéz azonban elképzelni, hogy egy ilyen inhibitornak miért kellene egy aktív szerin proteáz doménnel rendelkeznie. Annál izgalmasabb az a felfedezés, hogy egy bizonyos örökletes fejlődési rendellenesség (3MC szindróma) hátterében a MASP-3 szerin proteáz doménjében található mutációk állnak (Sirmaci és mtsi., 2010; Rooryck és mtsi., 2011). Ez a felismerés arra is rávilágít, hogy a komplementrendszernek az immunológiai szerepén kívül egyéb más fiziológiai funkciói is lehetnek, például az egyedfejlődésben. Az elmúlt években még két másik fehérjét is felfedeztek, amelyek kapcsolódnak a felismerő molekulákhoz: a MAp19 (más néven sMAP) (Stover és mtsi., 1999; Takahashi és mtsi., 1999) és a MAp44 (más néven MAP-1) (Degn és mtsi., 2009; Skjoedt és mtsi., 2010). Ezekről a fehérjékről kiderült, hogy tulajdonképpen a MASP-ok N-terminális fragmentumai. A MAp19 a

MASP-2 első két doménjét (CUB-EGF) tartalmazza, míg a MAp44 a MASP-1 első négy doménjéből áll (CUB-EGF-CUB-CCP), leszámítva mindkét esetben egy néhány aminosavas C-terminális régiót, ami csak ezekre a fehérjékre jellemző. Génszinten vizsgálva a dolgot kiderült, hogy a MASP-2 és a MAp19 a *MASP-2* gén alternatív „splicing” termékei, míg a MASP-1, MASP-3 és MAp44 fehérjék ugyanilyen mechanizmussal keletkeznek a *MASP-1* génről. A MAp19 és MAp44 fiziológiás szerepe szintén ismeretlen, jobb híján ezen fehérjék esetében is az inhibitor funkciót javasolják. Ha figyelembe vesszük, hogy ötféle felismerő molekulához, amelyek önmagukban is különböző oligomer formákban létezhetnek, öt különböző fehérje kapcsolódhat különböző kombinációkban, a lehetséges iniciációs komplex variációk száma akár több száz is lehet. Valószínűleg az összes lehetséges variáció nem fordul elő a vérplazmában, de valójában nagyon kevés információval rendelkezünk a komplexek összetételéről és mennyiségi megoszlásáról. Annyi bizonyos azonban, hogy a lektin út aktiválódása ugyanannak a C3-konvertáznak a keletkezéséhez vezet, mint a klasszikus út esetében. Ettől a lépéstől kezdve a két aktiválódási út ugyanazon mechanizmus szerint halad tovább.

A komplementrendszer harmadik aktiválódási útja az alternatív út. Sokáig úgy gondolták, hogy ennek az útnak az esetében nincs felismerő molekula, a saját és nem-saját felszín megkülönböztetése más mechanizmus alapján történik. Az utóbbi években azonban számos olyan publikáció jelent meg, amely a properdin nevű fehérjemolekulának mintázatfelismerő szerepet tulajdonít (Kemper és Hourcade, 2008). A properdinről már régebben is tudták, hogy stabilizálja az alternatív út C3-konvertázát a baktériumsejtek felszínén, azonban azt gondolták, hogy csak a konvertáz kialakulása után kötődik hozzá. Lehetséges azonban, hogy a properdin bizonyos esetekben előbb megkötődik a baktériumok felszínén, elősegítve ezzel a C3-konvertáz kialakulását. Az alternatív út kulcsfehérjéje a C3. A C3 tartalmaz egy reaktív tioészter csoportot a molekula belsejében, ami C3-konvertáz általi hasítás révén kerül a molekula felszínre és reagál amino vagy hidroxil csoportokkal. Kis valószínűséggel azonban, a fehérjemolekula konformációs fluktuációinak következtében, a tioészter kötés spontán módon is a felszínre kerülhet, ami a hidrolíziséhez vezet (Holers, 2008). A hidrolizált C3 molekula C3(H<sub>2</sub>O) konformációja megváltozik és köti a B-faktor szerin proteáz zimogént. A B-faktor a C2-höz hasonló szerin proteáz és C3-hoz kötött formáját a D-faktor nevű szerin proteáz hasítja. A D-faktor hasított, de inaktív formában van jelen a szérumban, a B-faktorhoz kapcsolódva azonban aktív formába kerül, és azt elhasítja (Volanakis és Narayana, 1996). A keletkező C3(H<sub>2</sub>O)Bb komplex egy C3-konvertáz, ami több C3 molekulát elhasít C3a és C3b fragmentumokká. Ha a C3 hasadás sejtfelszínhez közel történik, a C3b tioészter kötése révén oda lerakódik. A lerakódott C3b B-faktor zimogént köt meg és azt a D-faktor elhasítja kialakítva az alternatív út C3-konvertázát (C3bBb), amely újabb C3 molekulákat hasít. Minden újabb elhasított C3 molekula potenciális C3-konvertáz forrás, vagyis pozitív visszacsatolás révén az alternatív út nagyon gyorsan felpörög, sokszorosára erősítve ezzel a kezdeti komplement aktivációt. A saját sejtek felszínén az alternatív út nem tud ilyen módon beindulni, mert a C3 spontán hidrolízise (tick over) révén keletkező C3-konvertázt különböző sejtfelszíni inhibitorok szétszerelik, illetve lebontják. A

kórokozókon azonban általában nincs ilyen védelem, ezért a pozitív visszacsatolási mechanizmus révén felszínük C3b-vel telítődik. A keletkező C3-konvertázokat pedig a korábban említett properdin stabilizálja, féléletidejüket növeli. A „tick over” mechanizmus ily módon folyamatosan „teszteli” a különböző felszíneket és ahol le tud rakódni a C3-konvertáz, ott beindul a komplementaktiváció. Természetesen alternatív út C3-konvertáz nem csak a „tick over” mechanizmus révén keletkezhet, hanem a klasszikus és a lektin út által elhasított C3b molekulákból is. Az alternatív út pozitív visszacsatolási mechanizmusa a C3 hasítása után a klasszikus és a lektin út által elindított aktivációs folyamatot nagymértékben felerősíti. Egyes becslések szerint az alternatív út által kiváltott erősítő hatás felelős az összes komplement aktiváció 80-90%-áért normál humán szérumban, akkor is, ha a kezdeti aktiváció a másik két útvonal valamelyikén indult be (Harboe and Mollnes, 2008). Az alternatív út tehát, nevével ellentétben, a komplementaktiválódás központi útja, nélküle nincs hatékony immunválasz.

Ahogy a felszínre lerakódott C3b koncentrációja növekszik, a C3-konvertázok (C4b2a és C3bBb) fokozatosan C3b-t kötnek és átalakulnak C5-konvertázokká (C4b2a3b és C3bBb3b). Ekkor beindul a terminális útvonal. A C5-konvertáz kétfelé hasítja a C5 molekulát: egy kisebb fragmentumra (C5a), amely nagyon erős anafilatoxikus hatással rendelkezik, valamint a nagyobb C5b fragmentumra (Lambiris és mtsi., 1998). A C5 hasítása az utolsó enzimatis lépés a komplement kaszkádban, az ezt követő lépések pusztán a fehérjék önszerveződő képességén alapulnak. A C5b először C6 majd C7 komponenst köt és az így kialakult amfipatis C5b-7 komplex képes integrálódni a sejtmembránba (DiScipio és mtsi., 1988). A membránba beépült C5b-7 egy molekula C8-at és több molekula (tipikusan 10-15) C9-et köt (Tschopp és mtsi., 1982). A kialakuló C5b-9<sub>n</sub> az úgynevezett membránkárosító komplex (membrane attack complex = MAC, vagy más néven: terminal complement complex = TCC), amely egy kb. 100 nm átmérőjű pórust képez a sejtmembránban megszüntetve ezzel a sejt integritását (Bhakdi és mtsi., 1980; Tschopp, 1984). Mérések szerint már egyetlen membránkárosító komplex jelenléte elegendő lehet egy sejt líziséhez (Rapp és Borsos, 1970). Megjegyzendő, hogy nem minden az aktiváció során keletkező C5b-7 integrálódik sejtmembránba. Folyadék fázisban a C5b-7 vitronektint és apolipoprotein J-t (clusterin) köthet, ami megakadályozza a hidrofób közegbe való beépülését. Az ezután kialakuló C5b-9 (sC5b-9) komplex végig oldatfázisban marad, és mennyisége a szérumban jó indikátora a komplementaktivációnak (Tedesco és mtsi., 1997).

### 3.2 A komplementaktiválódás fiziológiai következményei

A komplementrendszer aktiválódása következtében a megtámadott sejten membránkárosító komplex alakul ki, ami a sejt halálát okozhatja. Meglepő módon azonban ez a mechanizmus valószínűleg csak kis mértékben járul hozzá a patogén mikroorganizmusok elpusztításához. A vastag sejtfallal rendelkező Gram-pozitív baktériumok eleve védve vannak a komplement indukált lízis ellen. A Gram-negatív baktériumok közül is elsősorban a *Neisseria* fajoknál

mutatták ki a membránkárosító komplexszel szembeni nagyfokú érzékenységet (Petersen és mtsi., 1979).

A sokkal fontosabb effektor mechanizmus az opszonizáció, vagyis a fagocitózis fokozása, ami már a komplementaktiválás korábbi fázisaiban is beindul. A megtámadott sejtek felszínére komplement komponensek rakódnak le, amelyeket speciális receptorok révén a leukociták érzékelnek és fagocitózis által eltávolítják a keringésből. A mintázatfelismerő molekulák (C1q, MBL, fikolinok) amellet, hogy beindítják a komplement kaskádát, opszoninként is szolgálnak (Ogden és mtsi., 2001). A legfontosabb opszonin azonban a C3b, illetve az abból további proteolízissel keletkező iC3b, amelyet a leukocitákon (neutrofilek, monociták, makrofágok) lévő komplement receptorok (CR1, CR3 és CR4) ismernek fel (Fearon, 1981; Birmingham és Hebert, 2001). Bizonyos szöveti makrofágokon kifejeződik az immunglobulin szerű komplement receptor (CRlg) is, ami a C3b és iC3b mellett egy további C3 fragmentumot, a C3c-t, is képes felismerni (Helmy és mtsi., 2006; He és mtsi., 2008).

A leukocitáknak a fertőzés helyére való irányításában illetve aktiválásában fontos szerepet játszanak a komplementaktiválódás során felszabaduló anafilatoxinok. A két legjelentősebb anafilatoxin a C5a és a C3a (Haas és van Strijp, 2007). Az anafilatoxinok egyrészt kemotaktikus hatást fejtenek ki a sejtekre, másrészt aktiválják azokat a G-fehérjekapcsolt C3aR és C5aR receptorokhoz kötődve. Ily módon az anafilatoxinok elősegítik a hatékony opszonizációt és gyulladást közvetítő anyagok felszabadulását a leukocitákból (van Lookeren Campagne és mtsi., 2007).

A komplementaktiváció összekapcsolja a természetes immunitást az adaptív immunitással. A komplementaktiválódási termékek hatással vannak mind a B mind pedig a T limfocitákra. A C3d-vel opszonizált antigén egyszerre képes kötődni a B sejt felszínén található immunglobulin molekulához és a CR2 receptorhoz. Ez a keresztkötés aktiválja a B sejteket stimulálva az ellenanyag termelést (Dempsey, és mtsi., 1996). A komplementaktiváció T sejtekre való hatását mutatja, hogy C3 deficiens egérben számos T sejt funkció nem teljeseedik ki az immunválasz során (Kopf és mtsi., 2002). Bizonyos autoimmun betegségekben is kisebb a T sejtek aktivitása, ha nincs jelen C3 (Kaya és mtsi., 2001; Marsh és mtsi., 2001). Mindezek a mechanizmusok hozzájárulnak a komplementaktiváció gyulladáskeltő (proinflammatorikus) hatásának kiteljesítéséhez. A gyulladáskeltés a komplementaktiváció egyik legfontosabb következménye, amit a rendszer több párhuzamos úton egyszerre vált ki. Kutatómunkám során sikerült felfedeznünk a komplementaktiváció egy eddig ismeretlen proinflammatorikus mechanizmusát: az endotél sejtek közvetlen aktivációját a MASP-1 proteáz által.

### **3.3 A komplementaktiválódás szabályozása**

A komplementrendszer kiegyensúlyozott működése rendkívül fontos az immunhomeosztázis fenntartása szempontjából. A lokálisan és szabályozottan keltett gyulladás megvédi a szervezetet a kórokozók elterjedésétől. Az apoptotikus sejtek és az

immunkomplexek szabályozott eltávolítása biztosítja, hogy nem alakul ki ellenük autoimmun reakció. Ha azonban a komplementrendszer aktivációja megfelelő szabályzás hiányában túlpörög, vagy lokális helyett szisztémás jellegűvé válik, súlyos, sokszor életveszélyes állapot alakulhat ki. A komplementkaszkádban rejlő többszörös és rendkívül hatékony erősítő (amplifikációs) hatás ellensúlyozására többféle regulációs mechanizmus is kialakult az evolúció során. A lokális hatást elsősorban az biztosítja, hogy az aktivált komplement komponensek és enzimatis komplexek viszonylag rövid féléletidejűek. Az aktív tioszter kötést tartalmazó C3b és C4b féléletideje kb. 100  $\mu$ s. Ha a reaktív tioszter kötés nem tud azonnal, képződése helyén, sejtfelszíni nukleofil csoporttal (-NH<sub>2</sub>, -OH) transzacilezési reakcióba lépni, gyorsan elhidrolizál, így nem tud távolabbi helyekre lerakódni. A szupramolekuláris komplexek (C1, MBL-MASP, C3-konvertázok), ugyancsak instabilak, disszociációjuk az aktivitás elvesztéséhez vezet. A komplexek disszociációját és lebontását számos inhibitor katalizálja, míg a már korábban említett properdinnek stabilizáló hatása van.

A korai komplement proteázoknak (C1r, C1s, MASP-1, MASP-2) közös inhibitora a szerpinek családjába tartozó C1-inhibitor (Davis és mtsi., 2008; 2010). A C1-inhibitor viszonylag nagy koncentrációban (200  $\mu$ g/ml) van jelen a szérumban. A szerpinekre jellemző módon kovalens acil-enzim komplexet képez az aktív proteázzal, ami ezután több szubsztrát hasítására már nem képes (Gettins, és mtsi, 2002). A proteáz-C1-inhibitor komplex ezután disszociál a felismerő molekuláról és eliminálódik a keringésből. A C1-inhibitor a komplementrendszeren kívül még inhibitora a kallikrein-kinin (kontakt aktiválódás) rendszernek is, aminek szintén fontos gyulladáskeltő funkciója van. A plazma kallireinen kívül a C1-inhibitor még egyéb proteázokat is gátol a véralvadási illetve a fibrinolitikus rendszerben, azonban ezen gátlások *in vivo* jelentősége még nem ismert. A C1-inhibitor különlegessége, hogy a szerpín doménon kívül tartalmaz egy 100 aminosav hosszúságú, erősen glikozilált N-terminális domént. Ennek a doménnek a szerpín doméntől független gyulladáscsökkentő hatása van. Képes például E- és P szelektinhez kötődni, akadályozva ezzel a leukocita-endotél sejt adhéziót és a leukocita sejtek gördülését (rolling) (Cai és Davis, 2003). A C1-inhibitor csökkent aktivitása a szérumban ritka, de súlyos betegség, az örökletes angioödéma (hereditary angioedema= HAE) kialakulásához vezet (Cicardi és Johnston, 2012). Ez a kórkép azonban elsősorban nem a komplementrendszerrel, hanem az elszabadult kallikrein-kinin rendszerrel kapcsolatos. A kontrolálatlan plazma kallikrein nagy mennyiségben szabadítja fel a vazoaktív bradykinin peptidet a nagy molekulású kininogén molekulából, ami súlyos, akár életveszélyes ödéma kialakulását eredményezheti. A vérplazma proteolitikus kaszkádrendszerei kölcsönhatásban állnak egymással, mint ezt a C1-inhibitor példája is mutatja. A különböző kaszkádokhoz tartozó proteázok azonban keresztaktivációban is részt vehetnek. Egyes irodalmi adatok szerint például a trombin képes C5-konvertázként működni (Huber-Lang és mtsi., 2006). Munkám során kimutattam, hogy a MASP-1 is képes bradykinin felszabadítására, ami hozzájárulhat a lokális gyulladás kialakulásához.

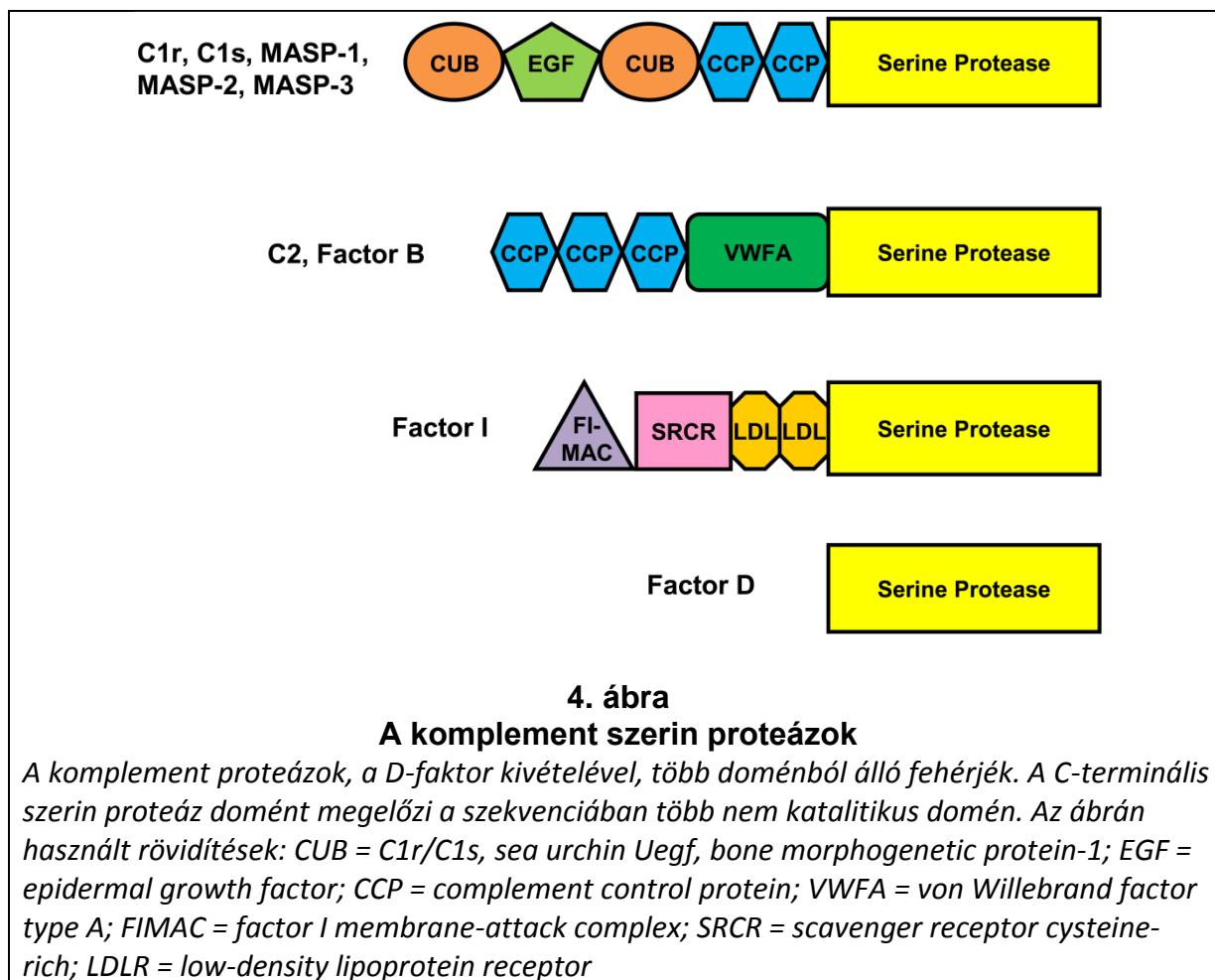


A konvertáz komplexekben található szerin proteázoknak (C2, B-faktor) nincs sem kanonikus sem pedig szérpin típusú inhibitoruk. A konvertáz komplexek disszociációját membrán kötött regulátor fehérjék katalizálják: komplement receptor 1 (CR1; CD35), membrán kofaktor protein (MCP; CD46), lebomlást gyorsító faktor (DAF; CD55) (Kim és Song, 2006). A lerakódott C3b és C4b degradációját a komplementrendszer szabályzó szerin proteáza, az I-faktor végzi (Nilsson és mtsi., 2011). Az I-faktor azonban csak kofaktorok jelenlétében képes hasításra. A legfontosabb kofaktorok a H-faktor és a C4b-kötő-fehérje (C4BP), valamint a már említett CR1 és MCP. A H-faktor az alternatív út legfontosabb regulátora, míg a C4BP a klasszikus és a lektin út során képződött C3-konvertáz lebontását segíti (Zipfel és Skerka, 2009). A kofaktorok közös szerkezeti jellemvonása, hogy szinte kizárólagosan csak egyféle doménből, a komplement kontrol protein (CCP, más néven szusi vagy SCR) doménből épülnek fel (Soares és Barlow, 2005). A CR1 leggyakoribb allotípusa például 30 CCP modult, míg az MCP és a DAF négy CCP modult tartalmaz. A kb. 60 aminosavból álló CCP domének sokféle fehérje-fehérje kölcsönhatásban vesznek részt az önszerveződő struktúrák kialakulása során.

A szabályzó molekulák közé tartozik még az anafilatoxinokat (C3a, C5a) inaktíváló karboxipeptidáz N (CPN) (Huey és mtsi, 1983), valamint a korábban már említett vitronektin (Jenne és Stanley, 1985) és clusterin (SP-40) (Rosenberg és Silkensen, 1995) is. A CD59 egy membrán fehérje, ami megakadályozza, hogy a membránba integrálódott C5b-8 komplex C9 molekulákat kössön és így gátolja a MAC kialakulását (Rollins és Sims, 1990).

### 3.4 A komplement proteázok

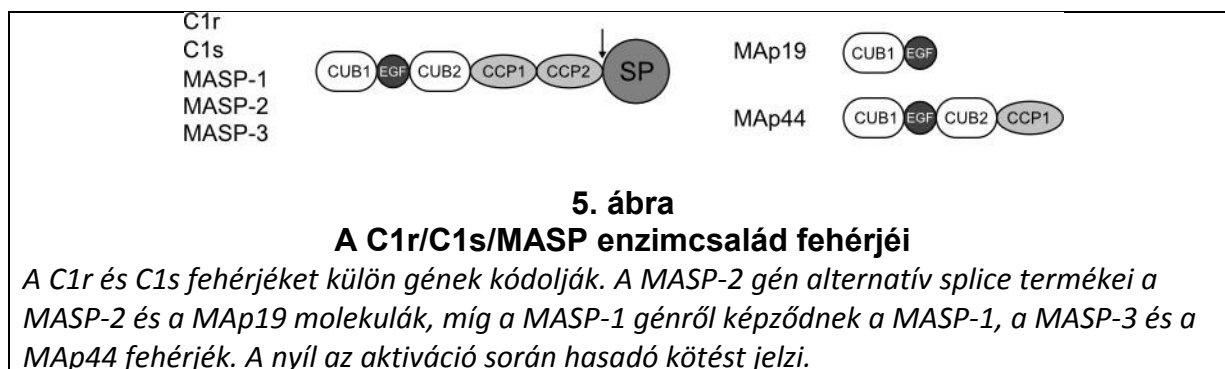
A komplementrendszer összesen kilenc szerin proteáz enzimet tartalmaz (4. ábra). Ezek közül hat a kaszkád beindításában (C1r, C1s, MASP-1, MASP-2, MASP-3, D-faktor), kettő a felerősítésében (C2, B-faktor), egy pedig a regulációjában (I-faktor) vesz részt. A komplement szerin proteázok a D-faktor kivételével valamennyien mozaik fehérjék, vagyis több doménből állnak (Forneris és mtsi., 2012). A C-terminális szerin proteáz domént megelőzi több (4-5) nemkatalitikus domén. A kimotripszin folddal és tripszin-szerű szubsztrátspecifitással rendelkező proteázok (family S1, clan PA) evolúciós értelemben rendkívül sikeres fehérjéknek tekinthetők: a vérplazma összes kaszkádrendszerét ilyen enzimek alkotják és más élettani folyamatokban is kulcsszerepet játszanak (Page és Di Cera, 2008). A vérben tulajdonképpen a tripszinszerű szerin proteázok egy bonyolult hálózatot alkotnak, amelynek felosztása diszkrét kaszkád rendszerekre mesterséges jellegű. Ezt az bizonyítja a legjobban, hogy számos kölcsönhatás mutatható ki a kaszkádrendszerek között mind aktiválás, mind pedig gátlás (szabályzás) terén.



A komplement szerin proteázokra általánosságban jellemző, hogy hatásukat nem egyedül, hanem egy nagyobb enzimkomplex részeként fejtik ki. Bizonyos enzimeknek izoláltan is van proteolitikus aktivitásuk (pl. C1s, MASP-2), azonban ennek az aktivitásnak csak akkor van fiziológias következménye, ha a felismerő molekula a megfelelő helyre rögzíti az aktív enzimet. Más proteázoknak (pl. C2, B-faktor) önmagukban nincs is mérhető aktivitásuk, aktív konformációjukat csak a multimolekuláris komplexekben veszik fel. További közös jellemzőjük ezeknek a proteázoknak a rendkívül szűk szubsztrátspecificitás és a viszonylag kicsi (tripszinhez, kimotripszinhez viszonyítva) aktivitás. A komplement proteázok néhány szubsztrát rendkívül specifikus limitált proteolízisét katalizálják. Kézenfekvőnek látszik, hogy a szűk szubsztrátspecificitás kialakításában a nemkatalitikus doméneknek is fontos szerepe van. Erre vonatkozóan az utóbbi időben egyre több információ – főleg szerkezeti jellegű – lát napvilágot. Az eredmények részben fogom ismertetni a C1r és a MASP-2 molekulák nemkatalitikus doménjeinek szerepével kapcsolatos felismeréseinket.

A komplement proteázok doménszerkezetük alapján enzimcsaládokba sorolhatók. A legnépesebb családot a C1r, C1s, MASP-1, MASP-2 és MASP-3 enzimek alkotják (Gál és mtsi., 2009). Ezeknél az enzimeknél a szerin proteáz domént öt nemkatalitikus modul előzi meg. Az N-terminális CUB1 domént egy EGF domén követi, majd egy újabb CUB domén (CUB2) következik. A CUB domének nevüket onnan kapták, hogy kezdetben csak a C1r/C1s

proteázokban, a tengeri sün **Uegf** fehérjében és a csont (**Bone**) morphogenetic protein-1-ben találták meg. Ezek a kb. 110 aminosav hosszúságú domének kalciumot kötnek, és döntő szerepet játszanak a proteázok dimerizációjában és a felismerő molekulához való kötődésben (Gaboriaud és mtsi., 2011). A kisebb méretű (40-50 aminosav) EGF domének szintén kötnek kalciumot és a két CUB doménnel együtt viszonylag kompakt egységet alkotnak ( $\alpha$ -fragmentum) (Bersch és mtsi., 1998). A CUB2 és a szerin proteáz (SP) domén között két CCP modul helyezkedik el. A CCP modulok döntő módon hozzájárulnak a szubsztrátspecificitás kialakításához. C1r és C1s esetében bizonyítást nyert, hogy a CCP1-CCP2-SP fragmentum ( $\gamma$ B fragmentum) enzimológiai tulajdonságait illetően egyenértékű a teljes hosszúságú molekulával és nagy valószínűséggel ugyanez igaz a MASP-okra is (Villiers és mtsi., 1985; Lacroix és mtsi., 1989). Ez azt jelenti, hogy a CCP1-CCP2-SP fragmentum tartalmazza az összes olyan kötőhelyet, ami a szubsztrát molekulákkal való specifikus kölcsönhatáshoz szükséges. Az SP domén N-terminális részén található az aktivációs peptid, amelynek hasadásával válik a zimogén teljes aktivitású proteázzá. Az aktiválódás mechanizmusa megegyezik a tripsinnél leírtakkal: Az Arg-Ile kötés hasadásával keletkező új N-terminális beköt egy árokba („aktivációs árok”), amelynek az alján található aszparaginsavval (Asp<sup>194</sup>/tripszin számozás) az amino csoport sóhidat képez, stabilizálva ezzel az aktív konformációt (Bode és mtsi., 1978). Ugyanez a mechanizmus már csak részben érvényes az „atipikus” komplement proteázokra, ahol a hasított formának is csak akkor van mérhető proteolitikus aktivitása, ha a proteáz szubsztrátot és kofaktort köt egy komplexen belül. Aktiváció után a két lánc (A-lánc= CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2; és B-lánc= SP domén) csak redukáló körülmények között esik szét, mert egy diszulfid híd található közöttük. A MASP-1 és MASP-3, amelyek alternatív „splicing”-gal keletkeznek ugyanarról a génről (MASP-1), csupán szerin proteáz doménjükben különböznek, az A-láncuk teljesen megegyezik. A C1r/C1s/MASP családnak tartoznak még a katalitikus aktivitással nem rendelkező alternatív „splice” formák: a MAp19 és a MAp44. A MAp19 a MASP-2 CUB1-EGF fragmentuma, míg a MAp44 a MASP-1 CUB1-EGF-CUB2-CCP1 fragmentuma, mindkét fehérje esetén egy rövid egyedi C-terminális szakasszal (5. ábra).



A C2 és a B-faktor doménszerkezete megegyezik és aminosav szekvenciájuk 40%-os azonosságot mutat (Mole és mtsi., 1984; Bentley, 1986). Az N-terminális három CCP domént egy von Willebrand faktor A (VWFA) domén követi a C-terminális SP domén előtt. Ezek a

prozeázok a C3- és C5-konvertázok enzimatisz komponensei. *In vitro* felcserélhetők a konvertázokban, vagyis C2 köthet C3b-hez és B-faktor köthet C4b-hez, de valószínűleg ennek nincs fiziológiás jelentősége (Laich és Sim, 2001). A C2 zimogént az aktív C1s oldatfázisban is elhasítja, azonban aktív C1s csak a klasszikus út aktiválódása során keletkezik, és csak a C4b-hez kötött C2a képes C3-at hasítani. A zimogén B-faktort azonban a szérumban mindig aktivált (hasított) formában jelenlévő D-faktor csak akkor képes hasítani, ha az C3b-hez kötődött.

A D-faktor az egyetlen olyan komplement proteáz, ami csak egy magányos szerin proteáz doménből áll (Volanakis és Narayana, 1996). A D-faktor aktivált (hasított) állapotban van jelen a szérumban. Az még nem ismert, hogy mi aktiválja a proenzim D-faktort. Az utóbbi időben ellentmondásos eredmények láttak napvilágot arra nézve, hogy a MASP-1 és/vagy a MASP-3 lehet az aktivátor (Takahashi és mtsi., 2010; Iwaki és mtsi., 2011). Ennek a kérdésnek a tisztázására még további kísérletek szükségesek. Az aktivált D-faktor szerkezetéből kiderült, hogy a propetid lehasadása még nem eredményez aktív szerkezetet (Narayana és mtsi., 1994). Az üres D-faktor katalitikus centruma torzult és teljesen aktív konformációját csak a szusztráttal (C3bB) való érintkezés során veszi fel (szusztrát indukált katalízis). Ez a mechanizmus gátolja meg, hogy a szérumban aktivált formában jelenlévő D-faktor az oldatfázisban lévő B-faktort elhasítsa.

Az I-faktor a komplementrendszer szabályozásában vesz részt a konvertáz komplexek lebontása révén. Érdekes, hogy a C2 és B-faktor proteázoknak nincs közvetlen inhibitora (sem szerpin sem pedig kanonikus), hanem aktivitásukat egy harmadik szerin proteáz szabályozza kofaktoruk lebontása révén. Az I-faktor szerin proteáz doménjét négy nemkatalitikus domén előzi meg a szekvenciában (Nilsson és mtsi., 2011). Az N-terminális FIMAC (Factor I membrane-attack complex) domént egy SRCR (scavenger receptor cysteine-rich) domén, majd két LDLR (low-density lipoprotein receptor) domén követi. Az I-faktor is aktivált állapotban van jelen a szérumban, feltehetőleg szekréció közben aktiválódik, ami egy pozitívan töltött tetrapeptid (RRKR) kihatásával jár. Az I-faktor csak kofaktorok (H-faktor, C4B-kötő fehérje, CR1, MCP) jelenlétében képes kifejteni proteolitikus aktivitását. Az I-faktor közelmúltban publikált szerkezete azt sugallja, hogy a nemkatalitikus domének alkotta A-lánc allosztérikus módon gátolja a szerin proteáz domén aktivitását (Roversi és mtsi., 2011). Ez a gátlás akkor szűnik meg, amikor kialakul az I-faktor-kofaktor-szusztrát komplex, miáltal a szerin proteáz domén felveszi az aktív konformációját.

A komplement proteázok közül csak a klasszikus és a lektin út iniciációs enzimeinek (C1r, C1s, MASP-1, MASP-2) van közvetlen inhibitoruk (C1-inhibitor). Érdekes módon az ugyanebbe az enzimesaládba tartozó és eddig még ismeretlen funkciójú MASP-3 aktivitását ez a szerpin nem gátolja. A többi komplement proteáz regulációja, mint azt korábban láttuk, közvetett módon történik. Saját kutatásaim alapján, a lektin úttal kapcsolatban, felmerült két másik inhibitor – az  $\alpha_2$ -makroglobulin és az antitrombin – esetleges szabályzó szerepe is.

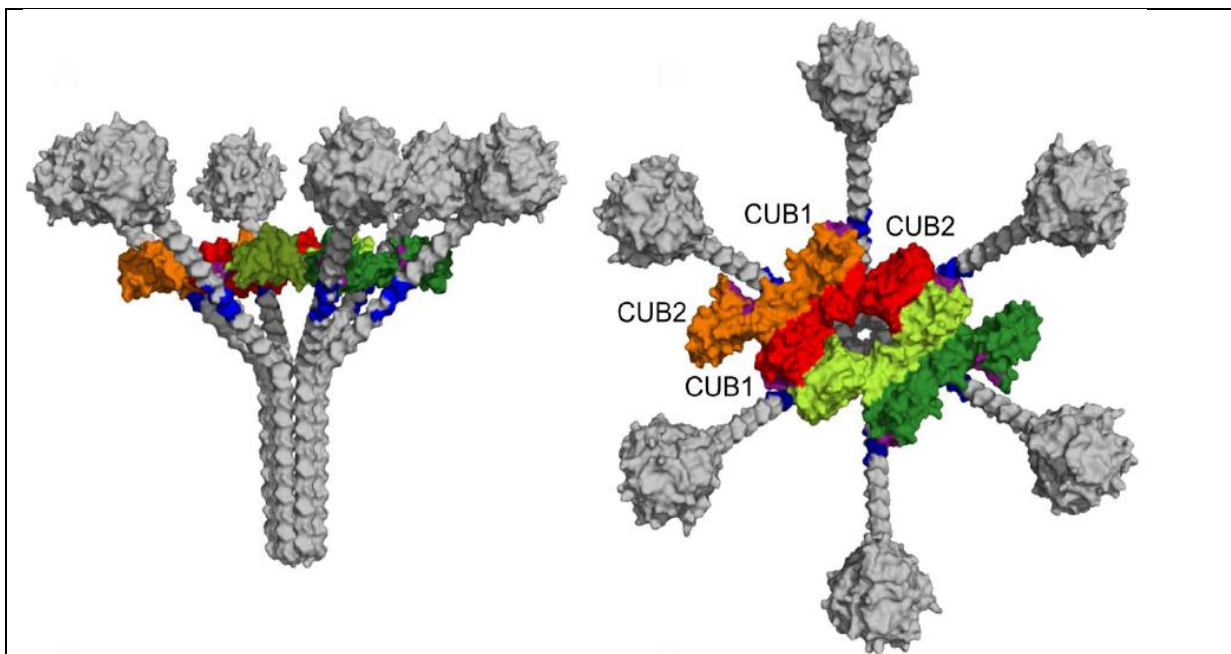
### 3.5 Az iniciációs komplexek szerkezete

A C1 komplexet több mint 50 évvel ezelőtt fedezték fel és azóta próbálják megfejteni szerkezetét és aktiválódási mechanizmusát (Ratnoff és Lepow, 1957). A nagyméretű (790 kDa) és flexibilis C1 komplex komoly kihívást jelent a szerkezeti kutatások számára. Nem meglepő ezért, hogy mind a mai napig csupán különböző modellek léteznek, amelyek elsősorban elektronmikroszkópos felvételeken, bizonyos fragmentumok röntgendiffrakciós szerkezetén és kötési illetve mutációs adatokon alapulnak. Nemcsak hogy a teljes C1 komplexről nem rendelkezünk nagyfelbontású szerkezettel, hanem egyetlen komponensről sincs teljes szerkezeti információ. Ismerjük a C1q globuláris doménjeinek térszerkezetét (Gaboriaud és mtsi., 2003), a C1r és C1s katalitikus régiójának térszerkezetét (Gaboriaud és mtsi., 2000; Budayova-Spano és mtsi., 2002a; 2002b), a C1r EGF doménjének oldatszerkezetét (Bersch és mtsi., 1998), valamint a C1s N-terminális CUB1-EGF doménpárjának szerkezetét (Gregory és mtsi., 2003). Ez körülbelül kétharmada a teljes komplexnek, azonban ez csupán statikus információ: nem sokat mond önmagában az aktiválódás mechanizmusáról, minek során minden valószínűség szerint nagy konformáció változások következnek be. Egy funkcionális C1 modellnek a következő kérdésekre kell választ adnia: 1.) Hogyan jön létre a C1 komplex spontán módon a C1q, C1r és C1s szubkomponensekből? 2.) Hogyan továbbítódik az aktivációs szignál a C1q molekuláról a C1r zimogén felé? 3.) Hogyan autoaktiválódik a C1r miután megkapta az aktivációs szignált? (Mi akadályozza a spontán autoaktivációt?) 4.) Hogyan aktiválja a C1r a C1s-t a komplexen belül? 5.) Hogyan képes a C1 komplexben lévő C1s hasítani a C4 és C2 komponenseket a C1 komplexen kívüli térben? 6.) Hogyan fér hozzá a C1-inhibitor molekula a C1 komplexben lévő aktív C1r és C1s molekulákhoz? A mai napig nem létezik olyan modell, amelyik mindezen kérdésekre kielégítő választ tudna adni.

A klasszikus C1 modellek szerint (Schumaker és mtsi., 1987; Gaboriaud és mtsi., 2004; 2007) a C1s-C1r-C1r-C1s tetramer fel van csavarodva a C1q szárai köré (3. ábra). A C1r kalcium hiányában is dimert képez a katalitikus  $\gamma$ B fragmentumon (CCP1-CCP2-SP) keresztül. Kalcium ionok jelenlétében a C1r molekulák szabad N-terminálisához kapcsolódik a C1s molekulák N-terminálisa. Ebben a kölcsönhatásban a CUB1-EGF domének vesznek részt, mind a C1r, mind pedig a C1s részéről. A hat tulipánból álló virágcsokorra emlékeztető alakú C1q molekula nem csupán a klasszikus út mintázatfelismerő molekulája, hanem egyben a C1 komplex szerkezeti váza is. A hat alegységből álló C1q molekula kollagén hélicei egy köteggé állnak össze a molekula N-terminálisán és a hélix szekvencia kb. harmadánál, az ún. „kink” régiónál, ágaznak szét különálló szálakká. A „kink” régiónál a kollagén hélixre jellemző Gly-X-Y ismétlődés megszakad, ami az elágazáson kívül valószínűleg flexibilitást is kölcsönöz a molekulának. A C1q szárai ily módon egy kúpot alkotnak, ahol azonban az egyes szálak által bezárt szögek változhatnak. A modell szerint a C1r molekula katalitikus régiója a kúp belsejében helyezkedik el, míg a C1r N-terminális doménjei és a teljes C1s molekula a kúp külsején helyezkedik el, megengedve azonban, hogy a C1s molekula C-terminális katalitikus doménje a szarak között visszahajoljon a kúp belsejébe, biztosítva ezzel a kontaktust a C1r

szerin proteáz doménjével. A modell különböző változatai szerint a C1r<sub>2</sub>S<sub>2</sub> tetramer kettő vagy négy C1q szárral érintkezik. A C1q és a tetramer közötti kötést a C1r CUB1-EGF/ C1s CUB1-EGF régió biztosítja. Aktiválódás során a C1q fejek kötődnek az aktivációs felszínre, minek következtében a karok által bezárt szögek megváltoznak. Ez a konformációs változás mechanikai stresszt jelent a tetramer számára, ami a tulajdonképpeni aktivációs szignál. A mechanikai stressz lehetővé teszi, hogy a C1r szerin proteáz domének olyan közel kerüljenek egymáshoz, hogy elhasítsák egymást. Az aktív C1r molekulák ezután a kúp belsejében aktiválják a C1s molekulákat, amelyek katalitikus doménjei az oldat fázis felé fordulva ott hasítják a C4 és C2 komponenseket. Ez a modell tehát egy relaxált→feszült konformáció változással magyarázza az aktiválódás mechanizmusát.

A legújabb modellek ezzel ellentétben inkább egy feszült→relaxált mechanizmust sejtetnek (6. ábra). Ezek a modellek főleg a C1q molekula és különböző proteáz mutánsok (Bally és mtsi., 2009), illetve fragmentumok (Phillips és mtsi., 2009) közötti kölcsönhatások SPR technikával történő tanulmányozása révén születtek.



**6. ábra**

**A C1 komplex Phillips-féle modellje**

*Az ábra oldalnézetből és felülnézetből mutatja a C1q molekula és a C1r (narancs és sötétzöld) és C1s (vörös és halványzöld) molekulák CUB1-EGF-CUB2 fragmentumai által képzett komplexet. A C1r molekula mindkét CUB doménjén, valamint a C1s molekula CUB1 doménjén található kötőhelyeken (bíbor) keresztül kapcsolódik a tetramer a C1q szárrakon lévő kötőhelyekhez (kék).*

E modellek szerint a C1q-tetramer kölcsönhatásokért a proteázokban a CUB domének a felelősek. A C1r mindkét CUB doménje részt vesz a C1q-hoz való kötésben, míg a C1s részéről csak a CUB1 domén. Minden CUB domén külön kötőhelyet képez, vagyis egy tetramer egyszerre mind a hat C1q kollagén szárhoz képes kapcsolódni. Ez azonban csak úgy

képzelt el, ha az egész tetramer a C1q szárai által alkotott kúp belsejében helyezkedik el. Ehhez azonban olyan mértékben össze kell hajtogatni az elektronmikroszkópos képek tanúsága szerint többé-kevésbé lineáris tetramert, hogy az feszültségeket gerjeszt a molekulákban. Aktiválódás során, amikor a C1q fejek lekötnek, és a karok elmozdulnak, az összehajtogatott tetramer felszabadul a feszültség alól, a C1r szubkomponens autoaktiválódik és felaktiválja a C1s-t, aminek fejei (SP domének) ezután kipattannak a C1q belsejéből és aktiválják a C4-et és C2-t. E modell kétségtelen előnye a korábbi modellekhez képest, hogy nem igényel külső mechanikai energiát az aktiválódáshoz, és mivel mind a hat C1q szár részt vesz a kötésben, egyszerre bármely két C1q fej lekötése beindíthatja az aktivációt. A korábbi modelleknél volt kettő vagy négy szabad C1q szár, ami nem volt közvetlen kapcsolatban a proteázokkal. Egyik modell sem ad azonban választ arra az alapvető kérdésre, hogy milyen molekuláris mechanizmussal történik a C1r autoaktiválódása. Hogyan találják meg egymást a C1r monomerek katalitikus doménjei és milyen az aktivációs komplex szerkezete? Egy valamiben azonban az összes aktiválódási modell megegyezik: rendkívül nagyfokú flexibilitást tételeznek fel a tetramer és ezen belül a C1r részéről. Ennek a flexibilitásnak a forrása eddig jórészt ismeretlen volt. Munkám során sikerült azonosítanom a C1r egy régióját, ami a flexibilitás forrása lehet.

A lektin út iniciációs komplexeiről, az MBL-MASP, fikolin-MASP, komplexeiről szintén nem rendelkezünk részletes szerkezeti információkkal. Valószínű azonban, hogy hasonlóak lehetnek a C1 komplexhez (Wallis és mtsi., 2010). Erre abból lehet következtetni, hogy a „kereszt” komplexek (MBL-C1r<sub>2</sub>S<sub>2</sub> és C1q-MASP) *in vitro* könnyen előállíthatók és a felismerő molekulák kötődése után a proteáz zimogének aktiválódnak. Nem meglepő ebből a szempontból, hogy a hexamer MBL képes a C1r<sub>2</sub>S<sub>2</sub> tetramert leghatékonyabban aktiválni, jóllehet a tetramer az MBL leggyakoribb formája. A hexamer MBL képes megfelelően nagy helyet biztosítani a tetramer számára. A MASP-ok homodimereket alkotnak az N-terminális CUB1-EGF domének közreműködésével és ezek a dimerek kötnek az MBL-hez és fikolinokhoz (Teillet és mtsi., 2008). Egyes modellek szerint egy MBL csak egy proteáz dimert köt, más elképzelések szerint több dimer is lehet egy felismerő molekulán (Mayilyan és mtsi., 2006; Petersen és mtsi., 2001). Tovább bonyolítja a helyzetet az MBL-hez kötődő, de proteolitikus aktivitással nem rendelkező fragmentumok (MAp19 és MAp44) jelenléte. Elképzelhető, hogy egy, a C1 komplexnél egyszerűbb felépítésű, egy tetramer MBL-ből és egy dimer proteázból álló MBL-MASP komplexről könnyebb lesz pontosabb szerkezeti információkat nyerni. Tekintettel a nagyfokú hasonlóságra, valószínű, hogy az így nyert információk felhasználhatók lesznek a C1 komplex modellezésénél is.

#### 4. Kérdések és célkitűzések

A komplementrendszer, mint láthattuk, egy rendkívül összetett, finoman szabályozott kaszkárendszer, amely a természetes immunitás egyik legfontosabb komponense. Engem a kezdetektől fogva lenyűgözött, hogy egy pusztán önszerveződő fehérjemolekulákból álló hálózat ilyen hatékony védelmi rendszerként működjön, amely képes az idegen és a veszélyes saját struktúrákat felismerni és különböző mechanizmusok révén biztosítja azok hatékony eltávolítását. Pályafutásom kezdetén a még csak a klasszikus és az alternatív aktiválódási út volt ismert, azonban az aktiválódási mechanizmus részletei, az egyes komponensek közötti kölcsönhatások molekulaszervezeti háttere még nem volt ismert. A lektin út felfedezésével a komplement kutatás új lendületet kapott és az aktiválódási mechanizmussal kapcsolatos újabb alapvető kérdések vártak megválaszolásra. Elmondhatom, hogy szerencsés időben kapcsolódtam be a komplementrendszer kutatásába, akkor, amikor a rekombináns DNS technika fejlődésével lehetővé vált a „protein engineering” megközelítés alkalmazása a komplementfehérjék kutatásában és a különféle szerkezetmeghatározó módszerek, elsősorban a röntgendiffrakció, egyre szélesebb körben váltak hozzáférhetővé.

A komplementrendszerben, és tulajdonképpen bármilyen proteolitikus kaszkárendszerben, a kezdeti lépések a legérdekesebbek, hiszen később már „csak” a jel erősítése történik aktív proteázok által, míg a kaszkád elején a nyugalmi állapotból kell, valamilyen nagyon precízen szabályozott mechanizmus által, aktív jelet generálni. Érdeklődésem ezért fordult a klasszikus és a lektin út kezdeti lépései felé, különös tekintettel a szerin proteázok szerepére. Munkám során három autoaktiválódásra képes enzimrel, a C1r-rel, a MASP-2-vel és a MASP-1-gyel foglalkoztam részletesebben és igyekeztem a kaszkárendszer aktiválódására illetve a természetes immunválaszra vonatkozó általános érvényű következtetéseket is levonni.

A C1r a klasszikus aktiválódási út kulcsenzime, amelynek autoaktiválódása a C1 komplexen belül a klasszikus út első enzimatis lépése. A C1r működésével kapcsolatban a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A C1r CCP1-CCP2-SP ( $\gamma$ B) fragmentuma enzimatis tulajdonságaiban egyenértékű a teljes hosszúságú (hatdoménes) proteázzal. Fiziológias körülmények között kalcium-független dimert képez, képes autoaktiválódni és C1s-t hasítani. Mi lehet a három domén hozzájárulása ezekhez a tulajdonságokhoz? Mely domének vesznek részt a dimerizációban? Szükség van-e a CCP modulokra az autoaktiválódáshoz és a C1s hasításához? A dimerizáció előfeltétele-e az autoaktiválódásnak?
- A zimogén C1r szerkezete miben különbözik az aktivált C1r szerkezetétől? A legújabb szerkezeti és funkcionális eredmények fényében hogyan módosítható a C1 komplex funkcionális modellje? Hogyan megy végbe a C1r autoaktiválódása a C1 komplexen belül?



- Minden C1 aktiválódási modell közös eleme, hogy a C1<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub> tetramer nagyfokú flexibilitását tételezi fel a folyamat során. Nem ismert azonban, hogy a C1r molekula melyik szerkezeti egysége a forrása ennek a flexibilitásnak. Korábbi hipotézis szerint a CCP1-CCP2 domének közötti linker régió lehet ilyen flexibilis. Az újabb eredmények fényében ez azonban kevésbé tűnik valószínűnek. Megvizsgáltuk, hogy a C1r molekula proteolízisre érzékeny CUB2-CCP1 régiója rendelkezik-e akkora flexibilitással, ami az autoaktivációs folyamathoz szükséges.

A MASP-2 képes autokativálódni és C3-konvertázt generálni C4 és C2 komponensek hasítása által. Úgy tűnik, hogy a MASP-2 önmagában képes azokat a funkciókat ellátni, amit a klasszikus út során a C1r és C1s proteázok együttesen látnak el. A MASP-2 esetében a következő kérdéseket vizsgáltuk:

- Mi az egyes domének szerepe a MASP-2 katalitikus fragmentumában? Hogyan járulnak hozzá az egyes domének az autoaktiválódáshoz és a C4 illetve a C2 szubsztrát hasításához?
- Mi a MASP-2 szűk szubsztrátspecificitásának szerkezeti háttere? Hogyan köti meg a MASP-2 enzim a C4 szubsztrátot? Milyen szerkezeti elemek alkotják a külső kötőhelyeket (exosite) a CCP doménekben? A külső kötőhelyek szempontjából mennyire hasonlít egymásra a MASP-2 és a C1s? Milyen mechanizmus biztosítja azt, hogy ugyanaz a MASP-2 (illetve C1s) molekula képes elhasítani a C4 és a C2 molekulákat a C3-konvertáz képződés során?
- Mi az autoaktiválódás mechanizmusa? Lehetséges-e, hogy a MASP-2 egyláncú, zimogén formájának proteolitikus aktivitása legyen? Milyen konformációváltozások mennek végbe a MASP-2 katalitikus fragmentumában az autoaktivációs folyamat során?

A MASP-1 a lektin út legelsőként felfedezett, legnagyobb mennyiségben jelenlévő proteáza, azonban funkciójával kapcsolatban felfedezése óta ádáz viták dúlnak. A kutatást sokáig hátráltatta, hogy nem sikerült tiszta, MASP-2 szennyezéstől mentes MASP-1 preparátumot előállítani. Tiszta, rekombináns MASP-1 birtokában a következő kérdéseket tettük fel:

- Mi a MASP-1 szubsztrátspecificitása? Működhet-e a MASP-1 önmagában C3-konvertázként? Milyen hatékonysággal hasítja a MASP-1 a C2 és C4 szubsztrátokat? Vannak-e a MASP-1-nek a komplementrendszeren kívüli szubsztrátjai?
- Milyen inhibitorok szabályozzák a MASP-1 aktivitását?
- Képes-e a MASP-1, a trombinhoz hasonlóan, közvetlenül aktiválni sejteket? Milyen sejtfelszíni receptorok vesznek részt ebben az aktiválási folyamatban? Milyen proinflammatorikus mechanizmusokat aktivál a MASP-1?
- Mi a MASP-1 viszonylag széles szubsztrátspecificitásának szerkezeti háttere?
- Mennyiben járul hozzá a MASP-1 a lektin út beindításához? Jelentős-e a MASP-1 hozzájárulása az iniciációs folyamathoz, vagy pedig, mint ezt az általános vélekedés sugallja, a MASP-1 csupán kiegészítő funkciót lát el a MASP-2 mellett?

## 5. Módszertan

Az alábbiakban a munka során alkalmazott legfontosabb módszereket lényegét ismertetem röviden. Az egyes módszerek részletes leírása a publikációkban található meg.

### *Rekombináns fehérjék előállítása*

A kísérletekben használt komplement proteázok nagy részét rekombináns fehérje expresszióval állítottuk elő. Laboratóriumunkban rutinszerűen használunk *E. coli*, *Pichia* és bakulovírus-rovarsejt alapú expressziós rendszereket. A katalitikus fragmentumok előállítására az *E. coli* pET (protein expression by T7 polymerase) rendszer (Novagen) vált be a legjobban. A fragmentumoknak megfelelő cDNS szakaszokat polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk a teljes hosszúságú cDNS-ből és expressziós vektorba (pl. pET-17b) ligáltuk. A pontmutáns konstrukciók előállításához a QuickChange mutagenézis kitet (Stratagene) használtuk. A rekombináns plazmidokat *E. coli* BL-21(DE3)pLysS gazdasejtekbe transzformáltuk és IPTG-vel (izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktózid) indukáltuk az expressziót. A rekombináns fehérjék oldhatatlan inklúziós testeket képeztek a baktériumsejtek belsejében, ami bizonyos esetekben kifejezetten előnyös volt, mivel az aktív proteázok (pl. MASP-1) elpusztíthatják a gazdasejteket. A sejtek feltárása után az inklúziós testeket centrifugálással választottuk el az oldható komponensektől és többszöri mosást követően feltáró oldatban (6M GuHCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM DTT) inkubáltuk legalább 3 órán keresztül. A szolubilizátumot ezután meghígítottuk (tipikusan több százszorosára) és renaturációs pufferben inkubáltuk alacsony hőmérsékleten (15 °C - 4 °C) több napon keresztül. A renaturációs puffer összetételétől függ a renaturációs folyamat hatásfoka. A megfelelő renaturációs puffer összetételét minden egyes rekombináns fehérje esetében külön előkísérletekkel ki kell dolgozni. A tipikus renaturációs puffer tartalmaz valamilyen redox rendszert és valamilyen adalék anyagot (pl. GuHCl, arginin, Ca<sup>2+</sup>). A renaturáció hatásfoka még optimális esetben is meglehetősen alacsony (~10%), azonban ez nem probléma, mivel az inklúziós testeket nagy mennyiségben elő tudjuk állítani. A renaturált fehérjéket ioncserélő kromatográfiával (FPLC) homogenitásig tisztítottuk.

A mérésekhez használt többi komplement komponenst (C2, C3, C4, I-factor, H-factor, C1-inhibitor) és egyéb szérum fehérjéket (antitrombin,  $\alpha$ -2-makroglobulin) normál humán plazmából tisztítottuk az irodalomban leírt módszerek alapján.

### *Fehérjék kristályosítása, adatgyűjtés, szerkezetmeghatározás*

A komplement proteázok szerkezetét röntgenkrisztallográfia segítségével határoztuk meg. A különböző fehérjék kristályosítása függő csepp módszerrel történt tipikusan 20 °C-on. A kristályosítási körülmények előzetes szűrésére a Hampton cég által forgalmazott kiteket használtuk és a pozitív találatok körülményeit tovább finomítottuk. A röntgendiffrakciós adatkészleteket, együttműködő partnerünk segítségével, szinkrotron sugárforrásnál gyűjtöttük. A szerkezetmegoldást együttműködő partnereink végezték.

### *Kalorimetria*

A fehérjék konformációs stabilitását DSC-vel (differential scanning calorimetry), míg a ligandum ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kötését ITC-vel (isothermal titration calorimetry) vizsgáltuk. A DSC méréseket VP-DSC (MicroCal) készüléken végeztük. A denaturációs görbéket 10 és 90 °C között vettük fel 1 °C/perc fűtési sebességet alkalmazva.

Az ITC méréseket VP-ITC (MicroCal) készüléken végeztük 30 °C-on.

### *Enzimaktivitások mérése*

A különböző vad típusú és mutáns proteázok enzimaktivitását szintetikus és fehérje szubsztrátokon teszteltük. A szintetikus (többnyire tioészter) szubsztrátok hasítását spektrofotométeren (Jasco V550), illetve a fluoreszcensen jelölt szubsztrátok esetében Wallac 1420 (Perkin Elmer) mikroplate leolvasón követtük nyomon. Az adatokat különböző szoftverek segítségével (pl. GraFit, Origin 5.0) értékeltük ki.

Fehérjeszubsztrátok esetében (pl. C2, C3, C4) a proteolízis előrehaladását SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével követtük nyomon az intakt komponens fogyásának, vagy a proteolitikus fragmentumok keletkezésének detektálásával. A Coomassie Brilliant Blue festékekkel megfestett géleket denzitometrálunk (GEL DOC 100 készülék), és az így kapott adatokat a Molecular Analyst (Bio-Rad) szoftverrel értékeltük ki.

### *Komplementaktiválódás mérése*

A komplementaktiválódás három különböző útját a Wieslab (Euro-Diagnostica) kittel követtük nyomon. Az egyes aktiválási utakat speciális aktivátorokkal (IgG, mannán, LPS) indítjuk be és a terminális útvonal végén keletkező MAC mennyiségét mérjük a C9 neoantigén detektálásával.

A korábbi komponensek (C3, C4) aktiválódását az aktív fragmentumok (C3b, C4b) depozíciójának mérésével követtük nyomon. A lektin utat mannánnal borított felszínen indítottuk. A C3 esetén a szérum mintából közvetlenül lerakódó C3b komponenst detektáltuk ELISA módszerrel, míg a C4 esetében a közvetlen depozíció mellett tisztított C4 előzetesen aktivált MBL-MASP komplexek általi hasítását is mértük.

### *Endotél (HUVEC) sejtek aktiválódásnak detektálása*

A sejtek aktiválódását elsősorban az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jel mérésével követtük nyomon. A sejteket Fluo-4-AM fluoreszcens festékekkel töltöttük fel és a  $\text{Ca}^{2+}$  szint változását Olympus IX-81 fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk. Az adatok kiértékelését anaySIS 3.2 szoftver segítségével végeztük.

Az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációt előzetesen fixált sejteken NF- $\kappa$ B p65 ellen nyúlban termeltetett antitesttel detektáltuk. A sejtmagot duplaszálú DNS-hez kötődő festékekkel jelöltük meg és a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

A p38 MAPK foszforilációt Western blotton mutattuk ki p38 MAPK és foszfo-p38 MAPK elleni antitestek segítségével.

## 6. Kutatási eredmények és megbeszélésük

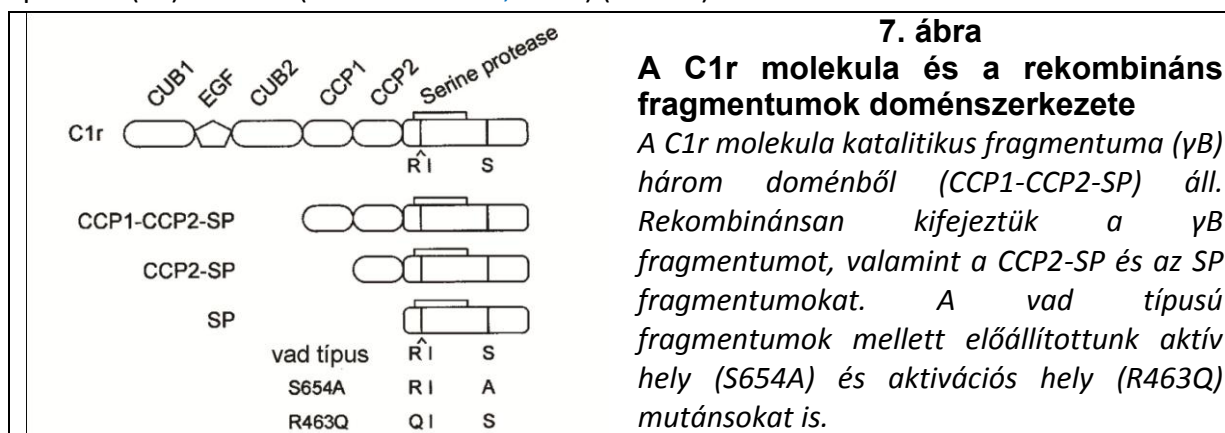
### 6.1 A komplementaktiválás klasszikus útja

#### 6.1.1 C1r

##### 6.1.1.1 Az egyes domének funkciója a C1r katalitikus fragmentumában

Laboratóriumunkban a világon elsőként kezdtük el a komplement szerin proteázok szerkezetének és funkciójának vizsgálatát „protein engineering” technikával. Legelőször a C1r proteázzal kezdtünk el foglalkozni, mivel ennek az enzimnek az autoaktiválódása indítja be a klasszikus utat, tehát a komplementrendszerben betöltött kulcsszerepe nyilvánvaló. Előttünk senkinek nem volt tapasztalata a komplement proteázok rekombináns expressziójában. Laboratóriumunk azóta a világ egyik vezető műhelyévé vált a korai komplement proteázokkal kapcsolatos kutatások szempontjából. Az általunk kidolgozott rekombináns fehérje expressziós eljárásokat más laboratóriumok is átvették és folyamatosan kapunk megkereséseket külföldi munkacsoportoktól. Ezekben a munkákban a kezdetektől fogva meghatározó szerepet töltöttem be. Az alábbiakban a Ph.D. fokozat megszerzése óta elért legfontosabb eredményeimet ismertetem részletesebben.

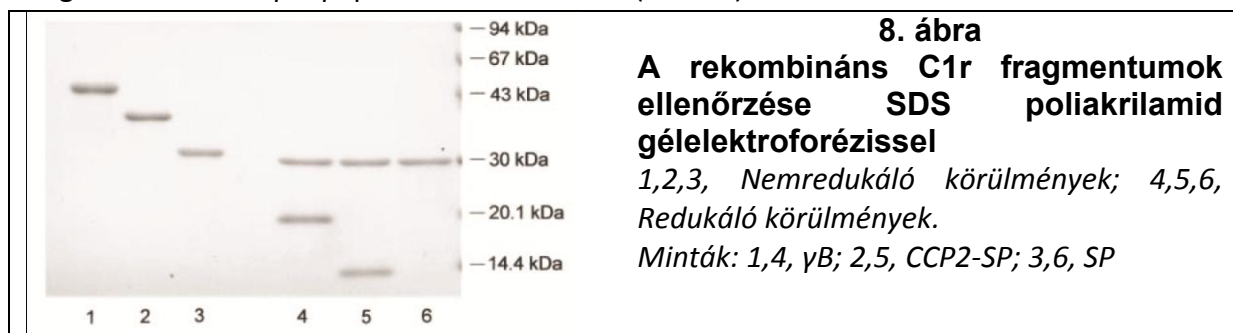
Elsőként a teljes humán C1r molekulát fejeztük ki bakulovírus-rovarsejt expressziós rendszerben (Gál és mtsi., 1989). A rekombináns C1r funkcionálisan aktívnak bizonyult, azonban a kitermelés alacsony volt ahhoz, hogy szerkezeti vizsgálatok céljára elegendő mennyiségű rekombináns fehérjét állítsunk elő. Választásunk ezek után az *Escherichia coli* alapú pET expressziós rendszerre esett, amely nagy mennyiségben termeli a rekombináns fehérjét. Az *E. coli* által termelt humán fehérjék azonban általában inaktív formában, oldhatatlan inklúziós testek alakjában vannak jelen a baktériumsejt belsejében. Az inklúziós testekben lévő fehérjék renaturálásával általában vissza lehet állítani a fehérjék natív konformációját, azonban az optimális renaturációs eljárást minden fehérje esetére külön ki kell dolgozni. *E. coli* sejtekben kifejeztük a C1r molekula katalitikus régióját reprezentáló fragmentumokat: a három doménből álló  $\gamma$ B fragmentumot (CCP1-CCP2-SP); a két doménből álló CCP2-SP fragmentumot; és az aktivációs peptidet is magában foglaló magányos szerin proteáz (SP) domént (Kardos és mtsi., 2001) (7. ábra).



Az inklúziós testekben lévő rekombináns fehérjéket 6M guanidin-hidroklorid oldatban szolubilizáltuk és különböző összetételű renaturációs elegyekben inkubáltuk. A renaturációs

elegyek a redox rendszeren (redukált/oxidált glutation) és a pufferen kívül általában tartalmaznak valamilyen adalék anyagot is (2M GuHCl a  $\gamma$ B fragmentum és 0,5M arginin a CCP-SP és SP fragmentumok esetében). A renaturált fehérjéket ioncserélő és gélszűrési kromatográfiával homogenitásig tisztítottuk.

Renaturált fehérjék esetén elsődleges fontosságú annak az igazolása, hogy a polipeptidlánc visszanyerte a natív állapotra jellemző térszerkezetet. Egy enzim esetén kézenfekvő megvizsgálni, hogy el tudja-e látni katalitikus funkcióját, hiszen ennek előfeltétele a natív szerkezet megléte. A C1r esetében, mivel ez egy autoaktiválódó proteáz, legegyszerűbb azt ellenőrizni, hogy a renaturált fehérjék hány polipeptidlánccból állnak. A baktériumokban termeltetett rekombináns C1r fragmentumok az inklúziós testekben, denaturált formában, egyláncú alakban vannak jelen, míg a renaturált és enzimatis aktivitással rendelkező fehérje autolízis által elhasad az Arg<sup>463</sup>-Ile<sup>464</sup> kötés mentén. A renaturált fehérjék poliakrilamid gélelektroforézissel történő analízise igazolta az autolízis lejátszódását. Nemredukáló körülmények között mindhárom fragmentum egy éles csíkot ad a gélen a megfelelő molekulatömegnél, míg redukáló körülmények között a hasított fragmentumok két polipeptidlánccra esnek szét (8. ábra).



A hasítás helyét (Arg<sup>463</sup>-Ile<sup>464</sup>) fehérje szekvenálással is ellenőriztük. Bebizonyosodott tehát, hogy módszerünkkel enzimatisan aktív, natív térszerkezettel rendelkező C1r fragmentumokat állítottunk elő. A vad típusú fragmentumok mellett előállítottunk olyan mutáns módosulatokat is, amelyek tartósan megőrzik zimogén formájukat. Ezt kétféle módon értük el. Egyrészt az Arg<sup>463</sup> aminosavat glutaminra változtattuk. Az R463Q mutánsok nem képesek autoaktiválódni, mivel a tripszinszerű szubsztrátspecifitással rendelkező szerin proteázok csak bázikus aminosavak után (Arg, Lys) képesek hasítani, glutamin után nem. Az R463Q mutánsok ezért renaturálás után is tartósan egyláncú, zimogén formában maradnak. A Gln<sup>463</sup>-Ile<sup>464</sup> kötést azonban más proteáz, például termolizin (bakteriális eredetű metallo proteáz), bizonyos körülmények között, képes specifikusan elhasítani. A termolizinnel hasított R463Q mutáns a vad típushoz hasonló proteolitikus aktivitással rendelkezik, ami bizonyítja a natív térszerkezet meglétét a mutáns fehérjénél is. Egy másik megközelítés szerint a katalitikus centrumban lévő Ser<sup>654</sup> aminosavat változtattuk alaninra. Az S654A mutánsok vad típusú C1r-rel elhasíthatók az Arg<sup>463</sup>-Ile<sup>464</sup> kötés mentén, azonban a hasadt enzim hiába stabilizálódik az aktív térszerkezetben, aktív szerin hiányában a szerin proteázokra jellemző katalitikus triád nem képes ellátni funkcióját.

Jóllehet a vad típusú fragmentumok esetén az autolitikus aktiválódás egyértelműen bizonyítja proteolitikus aktivitás meglétét, ellenőriztük a renaturált fehérjék enzimaktivitását szintetikus szubsztrátokon (tioészter szubsztrátok) is. Az C1r fragmentumok a szintetikus szubsztrátokat (Z-Lys-S-Bzl, Z-Gly-Arg-S-Bzl) egyforma hatékonysággal hasították (1. táblázat).

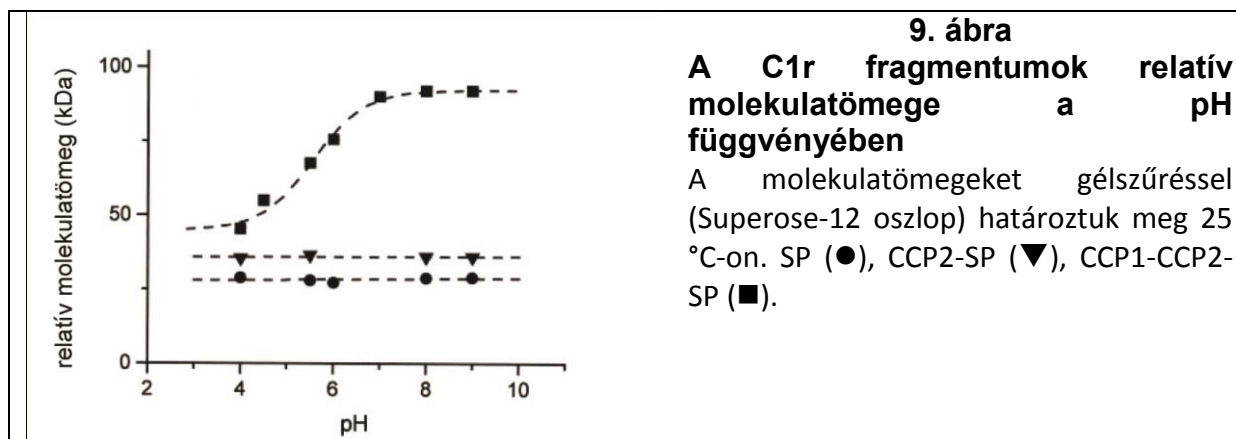
	SP	CCP2-SP	CCP1-CCP2-SP
Z-Lys-S-Bzl	1600	1900	1300
Z-Gly-Arg-S-Bzl	164000	210000	174000

### 1. táblázat

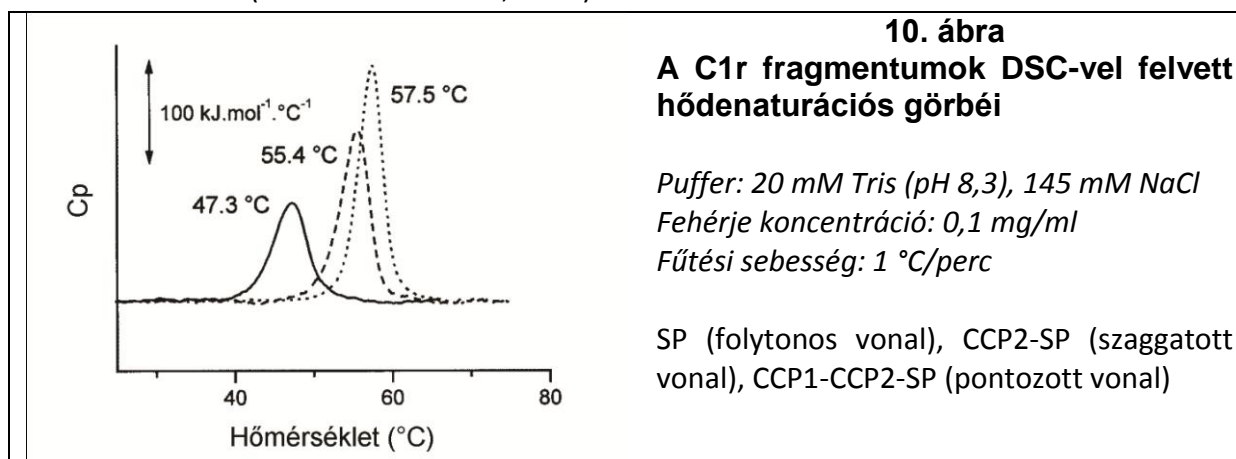
**A rekombináns C1r fragmentumok katalitikus hatékonysága ( $k_{cat}/K_M$  ( $s^{-1}M^{-1}$ )) szintetikus szubsztrátokon**

Ezekkel az eredményeinkkel két fontos, korábban nyitott kérdésre sikerült válaszolnunk. Először is bebizonyosodott, hogy az autoaktiválódás a szerin proteáz domén inherens tulajdonsága, ahhoz nincs szükség a CCP domének jelenlétére. Korábban, a limitált proteolízissel nyert  $\gamma B$  fragmentumot használva nem volt nyilvánvaló, hogy mi a C1r autoaktiválódásra képes legkisebb egysége. Az sem volt világos, hogy a dimerizáció előfeltétele-e az autoaktiválódásnak. Kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy a szerin proteáz domén önmagában tartalmazza mindazokat a kontaktfelszíneket és katalitikus aparátust, ami az autolitikus hasításhoz szükséges. Ezzel összhangban van az az eredmény, hogy a CCP modulok jelenléte nincs közvetlen hatással az enzim aktív centrumára. A kisméretű szintetikus szubsztrátok (egy nagyméretű fehérje szubsztráttal szemben) csak az aktív centrummal és annak közvetlen környezetével lépnek kölcsönhatásba. Az a tény, hogy a CCP1-CCP2-SP, CCP2-SP, és az SP fragmentumok a szintetikus szubsztrátokat egyforma hatékonysággal hasítják, arra utal, hogy az aktív katalitikus centrum kialakításához nincs szükség a CCP doménekre.

A három C1r fragmentum molekulatömegét gélszűrőssel határoztuk meg különböző pH-jú oldatokban (9. ábra). Azt találtuk, hogy míg az SP és CCP2-SP fragmentumok monomerként viselkednek széles pH tartományban, addig a CCP1-CCP2-SP fragmentum pH-tól függő módon monomerként vagy dimerként fordul elő. A CCP1-CCP2-SP fragmentum semleges és lúgos körülmények között  $\sim 90$  kDa molekulatömegnél eluálódik az oszlopról, azonban pH 5 alatt egyértelműen a monomer forma (44-47 kDa) dominál. A CCP1-CCP2-SP fragmentum ebben a tekintetben teljesen úgy viselkedik, mint a teljes hosszúságú C1r molekula (Arlaud és mtsi., 1980). Bebizonyítottuk tehát, hogy a C1r molekula legkisebb, dimerizációra képes egysége a  $\gamma B$  fragmentum és a CCP1 modulnak kulcsszerepe van a dimer kialakításában. Ezt az eredményünket a későbbi kristályszerkezetek teljes mértékben megerősítették.



Differenciális pásztázó kalorimetriával vizsgáltuk a C1r fragmentumok konformációs stabilitását (10. ábra). Bebizonyosodott, hogy a CCP2 domén jelentősen stabilizálja az SP domén szerkezetét. A magányos szerin proteáz domén 47,3 °C-on olvad (denaturálódik), míg a CCP2-SP fragmentum ennél jóval stabilabb, a hődenaturációs átmenet csúcsa 55,4 °C-nál van. A CCP1 domén ehhez képest már csak kicsivel növeli a stabilitást, az átmeneti hőmérséklet 57,5 °C. A későbbi kristályszerkezetek ezt az eredményünket is igazolták, megmutatván, hogy a CCP2 és SP domének határfelületén (~700 Å<sup>2</sup>) prolinban és tirozinban gazdag régiók intenzív kölcsönhatást biztosítanak a két domén között. Ez az erős kölcsönhatás a szomszédos CCP2 és SP domének között jellemző a C1r/C1s/MASP enzimes család többi tagjára is, mint azt már korábban szekvencia összehasonlítások alapján is valószínűsítették (Gaboriaud és mtsi., 1998).



Míg a C1r katalitikus fragmentumok kismolekulás tioészter szubsztrátokat egyforma hatékonysággal hasítanak, fehérje szubsztrátok esetében már gyökeresen más a helyzet. Vizsgáltuk a proteolitikus aktivitás hatékonyságát az autolitikus hasítás és a C1s hasítás esetében. Az autoaktiváció tesztelésére az S654A mutánst használtuk szubsztrátként, amit a vad típusú C1r képes elhasítani, de a hasadt mutáns nem mutat proteolitikus aktivitást. Mindkét fehérje szubsztrát esetében azt találtuk, hogy a CCP2 modul jelenléte rendkívül megnöveli a katalitikus hatékonyságot (2. táblázat).

	C1s hasítás	Autoaktiváció
SP	28000	71000
CCP2-SP	208000	130000
CCP1-CCP2-SP	58000	6200

## 2. táblázat

**A C1r fragmentumok proteolitikus hatékonysága ( $k_{cat}/K_M$  ( $s^{-1}M^{-1}$ )) C1s hasításánál és autoaktivációnál (S654A mutáns hasítása)**

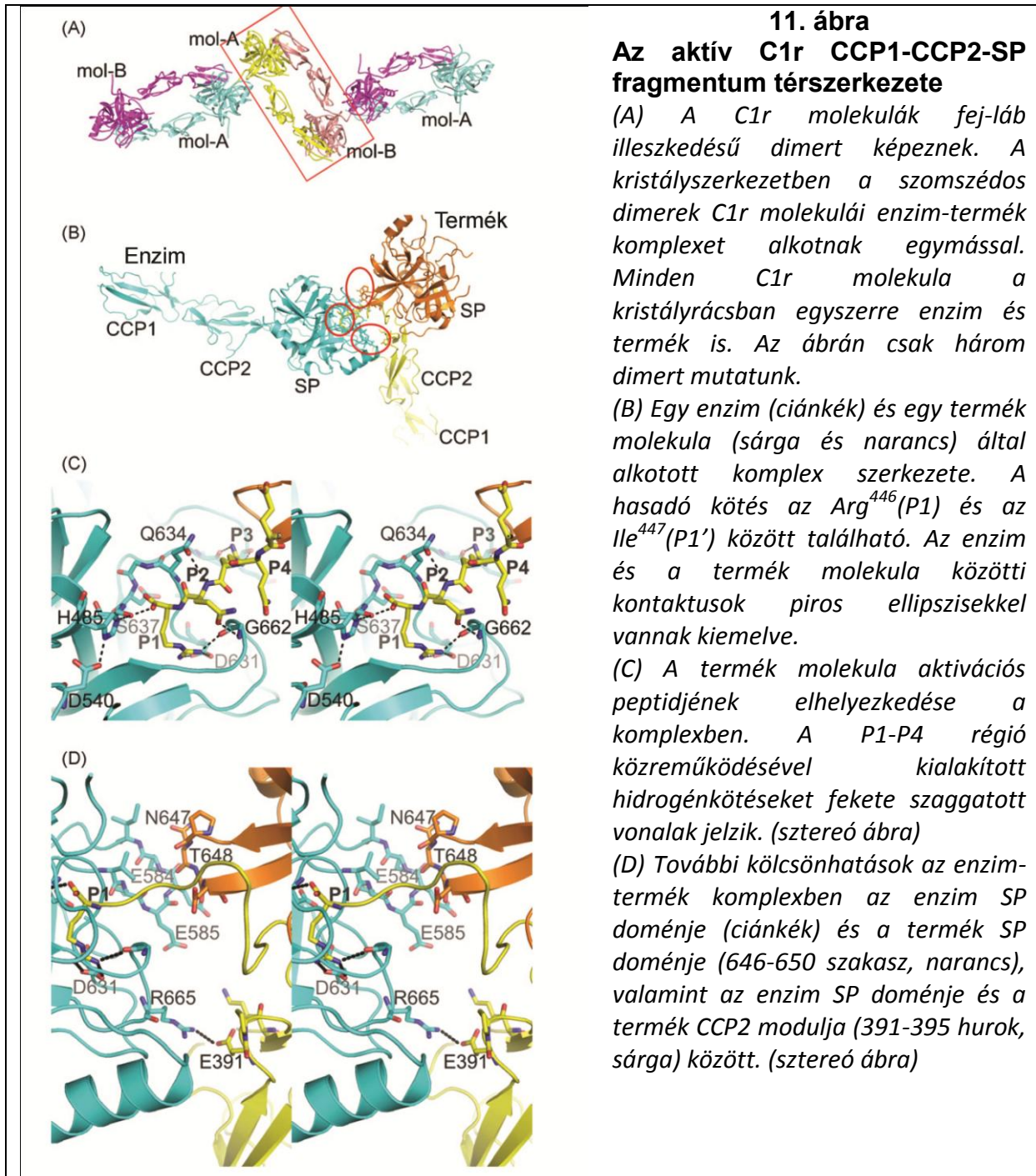
A CCP2-SP fragmentum mind C1s hasításban, mind pedig autoaktivációban jelentősen felülmúlja a magányos SP domént. A fehérje szubsztrátokkal az enzimek nagyobb felületen alakítanak ki kölcsönhatást, mint a kisméretű szintetikus szubsztrátok esetében. A CCP modulok a komplement kontroll fehérjék és receptorok esetén sokféle fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakításáért felelősek. Ezek alapján feltételeztük, hogy a proteázoknál is hasonló funkciót töltenek be: extra kötőhelyeket (exosite) biztosítanak a nagyméretű fehérje szubsztrátok számára. A későbbi kristályszerkezetek ezt az elképzelésünket teljességgel igazolták. Egyrészt a CCP modulok relatív helyzete olyan az SP doménekhez képest, hogy az SP domének meghosszabbításaként, mintegy „nyélként” szolgálnak, térbelileg lehetővé téve ezzel fehérjemolekulák rögzítését az SP domén közvetlen környezetében, másrészt a MASP-2 molekulák esetében a kristályszerkezetben ki tudunk mutatni kölcsönhatást a protein szubsztrát és a CCP2 domén között. A CCP1-CCP2-SP fragmentumok esetén a proteolitikus reakciók hatékonysága visszaesik a CCP2-SP fragmentumokéhoz képest. Figyelembe kell azonban vennünk, hogy a CCP1-CCP2-SP fragmentumok dimerképzése miatt a konformációs flexibilitás csökken és az egyes kötőhelyek hozzáférhetősége korlátozottá válhat. Mint azt később látni fogjuk, a C1r autoaktiválódása a C1 komplexen belül nem mehet végbe dimer formában, előtte a dimernek fel kell bomlania.

### 6.1.1.2 Új modell a C1r autoaktiválódására a C1 komplexen belül az aktív $\gamma B$ fragmentum térszerkezte alapján

Az *E. coli*ban kifejezett és renaturált rekombináns humán C1r CCP1-CCP2-SP fragmentumot sikerült kristályosítani és a térszerkezetét meghatározni röntgendiffrakció segítségével 2,6 Å felbontásban (PDB kód: 2QY0) (Kardos és mtsi., 2008). A vad típusú, aktivált (kétláncú) állapotú CCP1-CCP2-SP fragmentum térszerkezte nagyban hasonlít a zimogén forma korábban, egy francia kutatócsoport által meghatározott, térszerkezetéhez (PDB kód: 1GPZ) (Budayova-Spano és mtsi., 2002a), azonban néhány fontos különbség is észrevehető. A két CCP1-CCP2-SP monomer fej-láb orientációjú dimert képez oly módon, hogy az egyik monomer CCP1 modulja a másik monomer SP doménjéhez kapcsolódik (11. ábra A). Az így létrejövő dimer legfeltűnőbb sajátága a közepén található nagyméretű (30 X 13 Å) nyílás. Az is az első látásra nyilvánvaló, hogy ez a szerkezet nem alkalmas a C1 komplexen belüli autoaktiválódásra, mivel az egyik monomer aktív centruma a másik monomer hasítandó Arg-Ile kötésétől ~92 Å távolságra helyezkedik el. Aktivációhoz ennek a dimer szerkezetnek fel kell bomlania és az SP doméneknek megfelelő közelségbe és orientációba kell kerülniük



egymáshoz. Az egyik fontos különbség a zimogén és az aktivált dimer formák között az, hogy az utóbbit erősebb kölcsönhatás stabilizálja a CCP1/SP kontaktfelületen. Az eltemetett felszín 15%-kal nagyobb, mint a zimogén esetében és több a hidrogén kötések és egyéb kontaktusok száma is. Elmondhatjuk tehát, hogy az aktivált C1r dimerek nehezebben bonthatók monomerekre, mint a zimogén dimerek.



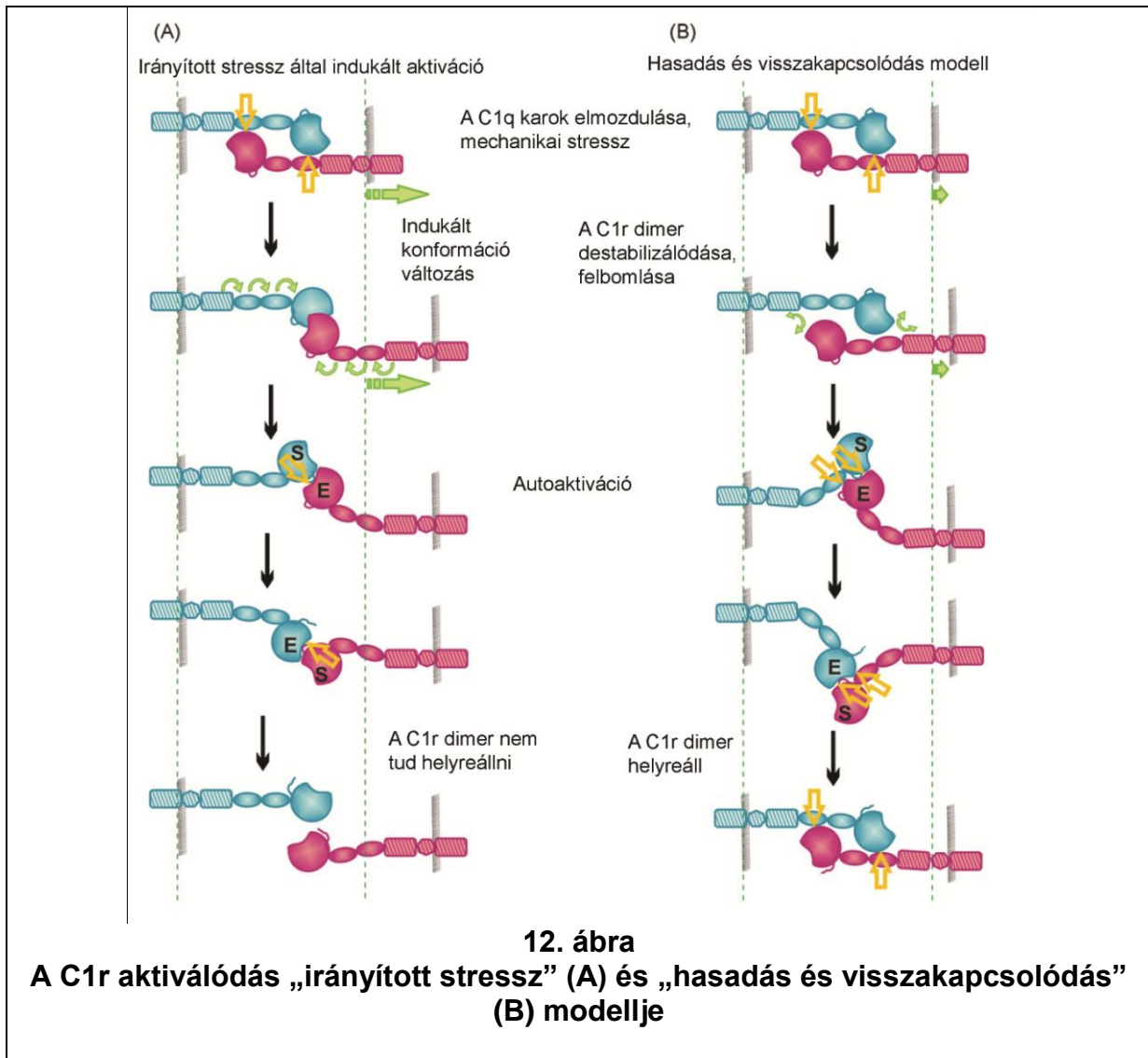
A másik fontos jellemzője a szerkezetnek az, hogy a kristályban két szomszédos dimer C1r molekulái enzim-termék komplexet alkotnak (11. ábra B, C, D). A tripszinszerű proteázokra jellemző S1-P1 (Schechter és Berger (1967) féle nomenklatura) kölcsönhatás detektálható az enzim szubsztrátkötő zsebének (S1) alján elhelyezkedő Asp<sup>631</sup> és a termék aktivációs

peptidjén lévő Arg<sup>446</sup> (P1) aminosavak között, amelyek sóhidat létesítenek. Ráadásul kölcsönhatás detektálható a termék molekula CCP2 modulja és az enzim SP doménje között is (11. ábra D). Egy intermolekuláris sóhíd detektálható az (enzim SP) Arg<sup>665</sup> és a (termék CCP2) Glu<sup>391</sup> oldalláncok között, és további víz közvetített hidrogénkötés alakul ki a Ser<sup>627</sup> és a Glu<sup>391</sup> oldalláncok közreműködésével. Feltételezhetjük, hogy hasonló enzim-termék komplex alakul ki autoaktiválódás során, ezért kristályszerkezetünk alapján modellezhetjük a C1r autoaktiválódását a C1 komplexen belül.

Az aktiválódás során a következő folyamatoknak kell végbemenni: 1.) A dimernek fel kell bomlani. 2.) A katalitikus doméneknek megfelelő közelségbe és orientációba kell kerülni ahhoz, hogy a hasítás megtörténhessen. 3.) Az aktivált C1r molekuláknak vissza kell térnie a dimer szerkezetbe. A korábbi Arlaud féle aktivációs modell mechanikai stresszt tételezett fel, ami abból ered, hogy a C1q molekula kollagén szárai által alkotott kúp szétnyílik, amikor a C1q fejei lekötődnek az aktiváló felszínre (12. ábra A). Az egymással ellentétes irányba elmozduló C1q szárok mintegy magukkal rántják a hozzájuk kötött proteázokat, minek következtében a C1s-C1r-C1r-C1s tetramerben olyan feszültség gerjed, hogy a C1r molekulák közötti kölcsönhatás felbomlik és a tetramerből két C1s-C1r dimer lesz. Az egyik fő probléma ezzel a modellel az, hogy feltételezi, hogy a kollagén szárok megfelelő irányba és mértékben mozdulnak el (Budayova-Spano és mtsi., 2002a). Figyelembe véve a C1q szárainak hosszát (70 Å) és a katalitikus dimer méretét (120 Å), valamint azt, hogy a tetramer a C1q szárok közepéhez köt (Gaboriaud és mtsi., 2004), a 92 Å-ös távolság áthidalása az egyik SP aktív helye és a másik SP aktivációs peptidje között legfeljebb csak akkor képzelhető el, ha a C1q szárok teljesen szétterülnek a síkon. Semmi sem garantálja azonban, hogy minden esetben ilyen extrém konformációváltozás megy végbe, sőt elvileg azt sem zárhatjuk ki, hogy bizonyos aktivációs felszíneken rövidülnek a C1q szárok közötti távolságok. A másik probléma a korábbi modellel az, hogy nem tudja megmagyarázni, hogy autoaktiváció után hogyan áll helyre a C1r dimer (tetramer) szerkezet. Ha ugyanis a C1q szárai stabilan lekötődtek és szétrántották a tetramert, nincs rá mód, hogy a C1r-C1r kapcsolódási felszínt alkotó CCP1 és SP domének újra közel kerüljenek egymáshoz. A C1s-C1r dimerek monovalens módon pedig nem, vagy csak nagyon gyengén kötnek a C1q szárokhoz, ami a C1 komplex felbomlásához vezet (Busby és Ingham, 1990). Ezen kívül ez a modell egyáltalán nem tételez fel kölcsönhatásokat az SP és a CCP2 domének között, holott a kísérleti eredmények erre utalnak.

Az általunk kidolgozott „hasadás és visszakapcsolódás” (split and reassembly) modell ugyan tartalmaz hipotetikus elemeket is, de jobban összhangban van a kísérleti tényekkel és az általunk meghatározott kristályszerkezettel, mint a korábbi modellek (12. ábra B). Saját korábbi eredményeink és mások megfigyelései is arra utalnak, hogy a C1r dimerek spontán módon képesek felbomlani, jóllehet az egyensúly a dimer irányába van erősen eltolódva (Dobó és mtsi., 1999). Oldat fázisban a C1r dimerek között kimutatható a monomerek cseréje. A C1 komplex oldat fázisban, nagyon lassan, spontán módon is aktiválódik, anélkül, hogy a C1q szárok bármihez is hozzákötődne (Ziccardi, 1982). Ez pedig csak úgy lehetséges, ha a C1r dimerek spontán módon felbomlanak a C1 komplexen belül. Hipotézisünk szerint a

C1q karok relatív helyzetének megváltozása az aktivációs felszínhez való kötődés után felgyorsítja a C1r spontán disszociációját.



Ebben a tekintetben aktivációs modellünk inkább az újabb feszült→relaxált (stressed-to-relaxed) modellhez hasonlít. Disszociáció után a C1r SP domének olyan térbeli helyzetet vesznek fel, ami lehetővé teszi az autoaktivációt, vagyis az egyik SP domén hasítását a másik SP domén által. Ahhoz, hogy erre a nagyfokú térbeli átrendeződésre a C1 molekula illetve az egész tetramer képes legyen, rendkívül nagyfokú konformációs flexibilitásra van szükség. Ez a flexibilitás egyébként az összes C1 aktiválódási modell alapeleme. Figyelembe kell vennünk azt is, hogy a C1 komplexen belül sokkal nagyobb a C1r relatív koncentrációja, mint oldatban, így feltételezhető, hogy disszociáció után az SP domének könnyebben megtalálják egymást a megfelelő térbeli elrendeződésben. A kristályszerkezetben detektált CCP2/SP intermolekuláris kölcsönhatás átmenetileg stabilizálhatja a kialakuló aktivációs komplexet. Aktiváció után a dimer szerkezet könnyen helyreállhat, hiszen a C1q karok nem mozdultak el olyan mértékben, hogy ezt meggátolnák. A helyreállt aktív dimer viszont már nem fog könnyen újra felbomlani, hiszen mint azt a kristályszerkezet mutatja, több kölcsönhatás

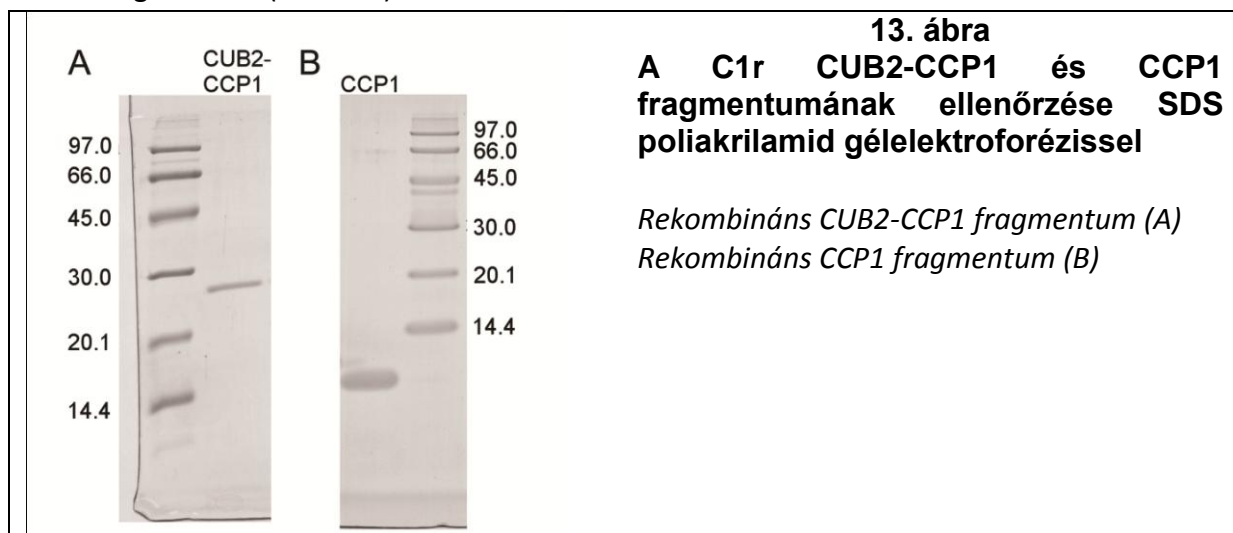
stabilizálja, mint a zimogén dimert. A C1s aktiválódása elvileg megtörténhet még akkor, amikor a C1r dimerek disszociált állapotban vannak, de akkor is, hogyha helyreállt a dimer. A dimerben ugyanis az SP domének aktív helyei kifelé mutatnak, így külső szubsztrát számára hozzáférhetőek. Disszociált formában elképzelhető, hogy nagyobb hatékonysággal képes a C1r hasítani a C1s-t (mint ezt az oldatfázisbeli kísérletek is mutatják), ha viszont helyreállt a dimer, akkor nem áll fenn az a veszély, hogy a C1 komplex szétesik. Ezt a kérdést a jelenleg rendelkezésünkre álló információk alapján nem lehet eldönteni. A komplement aktiválódás következő fázisában az aktív C1s molekulának ki kell „pattannia” a C1 komplex belsejéből, ahol azt a C1r aktiválta, és a C1 komplexen kívül elhelyezkedő szubsztrátokat (C4 és C2) kell hasítani. Az aktív C1r molekulák által képzett dimer szilárd vázat biztosít a C1s molekuláknak ahhoz, hogy a C1 komplexből kinyúlva elláthassák feladatukat a komplement kaszkád felerősítésében.

#### *6.1.1.3 A CUB2 domén szerepe a C1r aktiválódásában*

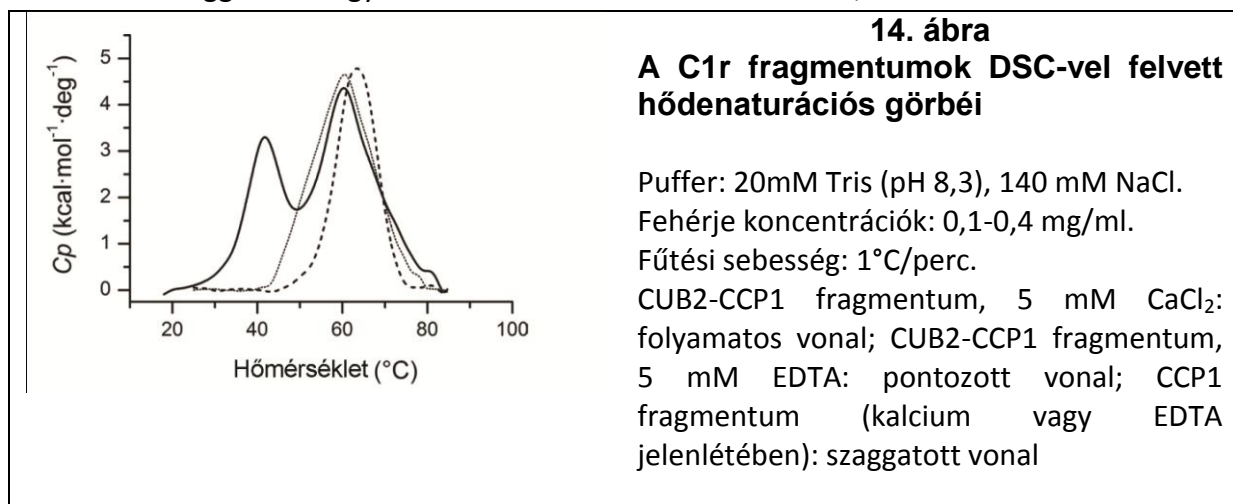
Az összes eddig publikált C1 aktiválódási modell alapfeltételezése, hogy a tetramernek rendkívül nagy konformációs flexibilitással kell rendelkeznie a C1 komplexen belül. De vajon mi lehet ennek a flexibilitásnak a forrása? Hol keresendők a molekulákon belül azok a szerkezeti elemek, amelyek ezt a rendkívüli flexibilitást biztosítják? A C1r, C1s, MASP-1 és MASP-2 molekulák katalitikus fragmentumairól készült kristályszerkezetek azt mutatják, hogy a CCP2 és SP domének határfelülete korlátozott flexibilitással rendelkezik (Gál és mtsi., 2009). Amellett, hogy a CCP2 és SP domének viszonylag nagy határfelületen érintkeznek, és mint azt a C1r esetében láttuk, ez a stabilizálja az SP domén szerkezetét, a különböző szerkezetekben a CCP2 és SP domének relatív helyzete némileg különböző. Az SP domén a CCP2 doménhez képest kissé el tud mozdulni. Ennek a relatív flexibilitásnak szerepe lehet abban, hogy az SP domén a legkedvezőbb kölcsönhatást alakítsa ki a fehérje szubsztráttal a proteolízis során, azonban a C1r autoaktiválódásához szükséges nagyfokú konformációváltozáshoz nem elegendő. Korábban az is felmerült, hogy a CCP1 és CCP2 doméneket összekötő peptidszakasz lenne a felelős a szükséges flexibilitásért (Arlaud és mtsi., 2002). A rendelkezésünkre álló röntgenszerkezetekből azonban az látszik, hogy a CCP1-CCP2 határfelület konzervált stabilizáló kölcsönhatásokat tartalmaz és a különböző szerkezetekben hasonló konformációval rendelkezik. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a CCP1-CCP2 határfelületen inkább merev domén-domén kölcsönhatás alakul ki. Kristályszerkezetekből azt is tudjuk, hogy a CUB1-EGF doménpár felelős a C1r-C1s kölcsönhatás kialakításáért, és ezek a domének intenzív inter és intramolekuláris kölcsönhatásokat alakítanak ki egymással a tetrameren belül (Gregory és mtsi., 2003; Feinberg és mtsi., 2003; Teillet és mtsi., 2008). Nem valószínű tehát, hogy ez a régió nagyon flexibilis lenne.

A C1r molekula CUB2-CCP1 régiójának tulajdonságait előttünk még nem vizsgálta senki. Figyelemre méltó, hogy limitált proteolízissel a C1r molekula két fragmentumra, az  $\alpha$  és  $\gamma$ B fragmentumra bontható (Arlaud és mtsi., 1986). Az  $\alpha$  fragmentum tartalmazza a CUB1 és EGF doméneket, valamint a CUB2 domén N-terminális harmadát. Mivel a  $\gamma$ B fragmentum

tartalmazza az intakt CCP1-CCP2-SP doméneket, a limitált proteolízis során a CUB2 domén és a CUB2-CCP1 határfelület peptidkötései hasadnak el. A proteolízisre való érzékenység azt jelzi, hogy a molekulának ez a része lazább, flexibilisebb szerkezetű. Elhatároztuk, hogy rekombináns formában előállítjuk a CUB2-CCP1 fragmentumot és jellemezzük tulajdonságait (Major és mtsi., 2010). *E. coli* expressziós rendszerben csak a CUB2-CCP1 fragmentumot tudtuk kifejezni és az inklúziós testekben lévő fehérjét renaturálni. Az önálló CCP1 modul azonban elő tudtuk állítani úgy, hogy a CUB2-CCP1 fragmentumot limitált proteolízisnek vetettük alá. A CUB2-CCP1 fargmentumban a termolizin, hasonlóan a teljes C1r molekulához, a CUB2 domént hasította el, míg a CCP1 modult érintetlenül hagyta. Ioncserélő és gélszűrő oszlopon való tisztítás után tehát a vizsgálatokhoz rendelkezésünkre állt a CUB2-CCP1 és a CCP1 fragmentum (13. ábra).

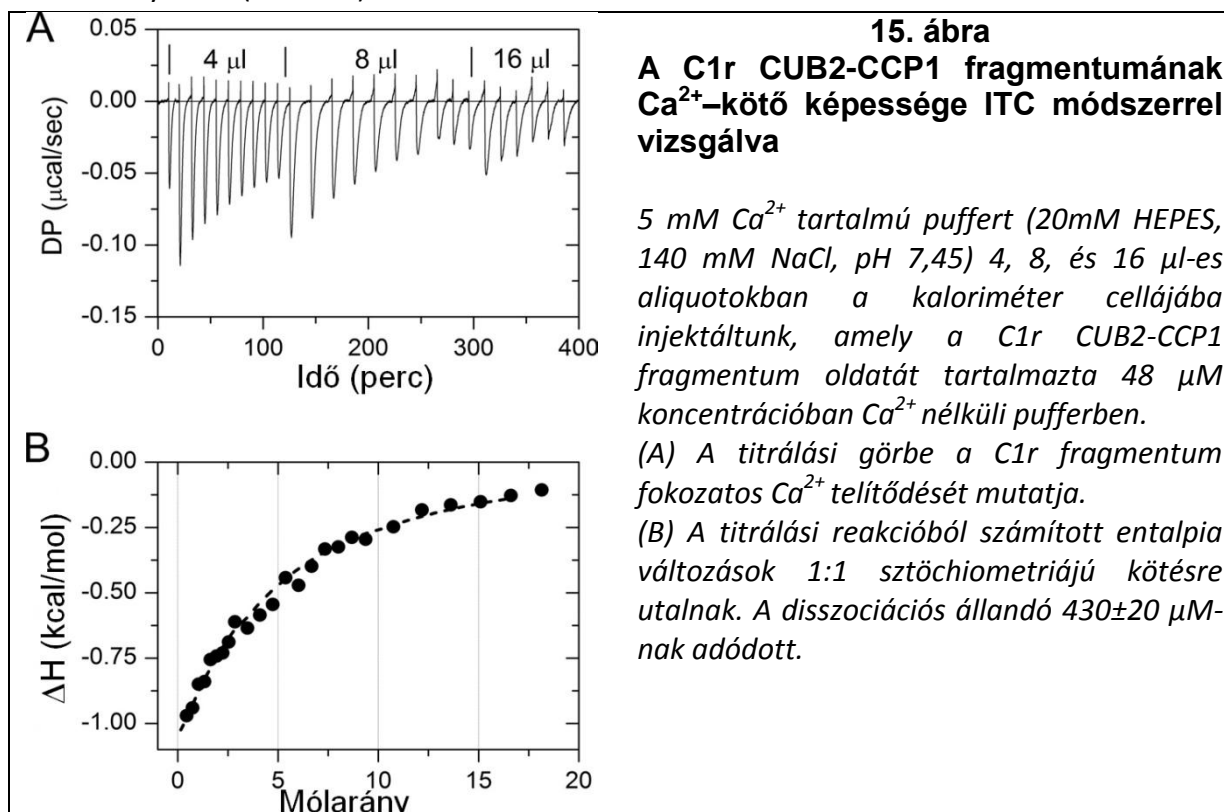


A fragmentumok szerkezeti stabilitását differenciális pásztázó kalorimetriával tanulmányoztuk (14. ábra). Azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy míg kalcium ionok (5mM) jelenlétében a CUB2-CCP1 fragmentum hődenaturációs görbéjén két, egymástól jól elkülönülő csúcs található 41,5 és 60,4 °C-nál, addig kalcium hiányában (EDTA jelenlétében) csak a magasabb hőmérsékletű csúcs jelenik meg. A CCP1 domén a pufferoldat  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmától függetlenül egy hődenaturációs csúcst mutatott 63,4 °C-nál.



Ebből arra következtethetünk, hogy a CUB2-CCP1 fragmentum esetében megjelenő, kalciumtól független, magasabb hőmérsékletű csúcs a CCP1 domén oladásának felel meg, míg az alacsonyabb hőmérsékletű, csak kalcium ionok jelenlétében mutatkozó csúcs a CUB2 domén hődenaturációjának a következménye. Azt a rendkívül érdekes következtetést is levonhatjuk, hogy a CUB2 doménnek, csak  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében van rendezett térszerkezete. Kalcium ionok hiányában a szerkezet összeomlik, viszont  $\text{Ca}^{2+}$  hozzáadására a szerkezet helyreáll. Ráadásul a CUB2 hődenaturációja reverzibilis jellegű: a 41,5 °C-os csúcspot újra megkaphatjuk, ha a felfűtést csak 48 °C-ig folytatjuk és utána visszahűtjük a mintát. A szabad CCP1 domén kissé magasabb hőmérsékleten olvad, mint a CUB2-CCP1 fragmentumban lévő. Ennek nyilvánvalóan az az oka, hogy a CUB2-CCP1 fragmentumban a denaturálódott CUB2 domén némileg csökkenti a hozzá kapcsolódó CCP1 modul stabilitását. A CUB2 modul szerkezetének kalcium függését más kísérleti módszerekkel is sikerült bizonyítani. Mind a CD spektroszkópia, mind pedig a hidrogén-deutérium kicserélődési mérések azt mutatták, hogy a CUB2-CCP1 fragmentumnak 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében jóval kompaktabb szerkezete van, mint  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában. A szabad CCP1 modul szerkezetét viszont egyáltalán nem befolyásolta a kalcium.

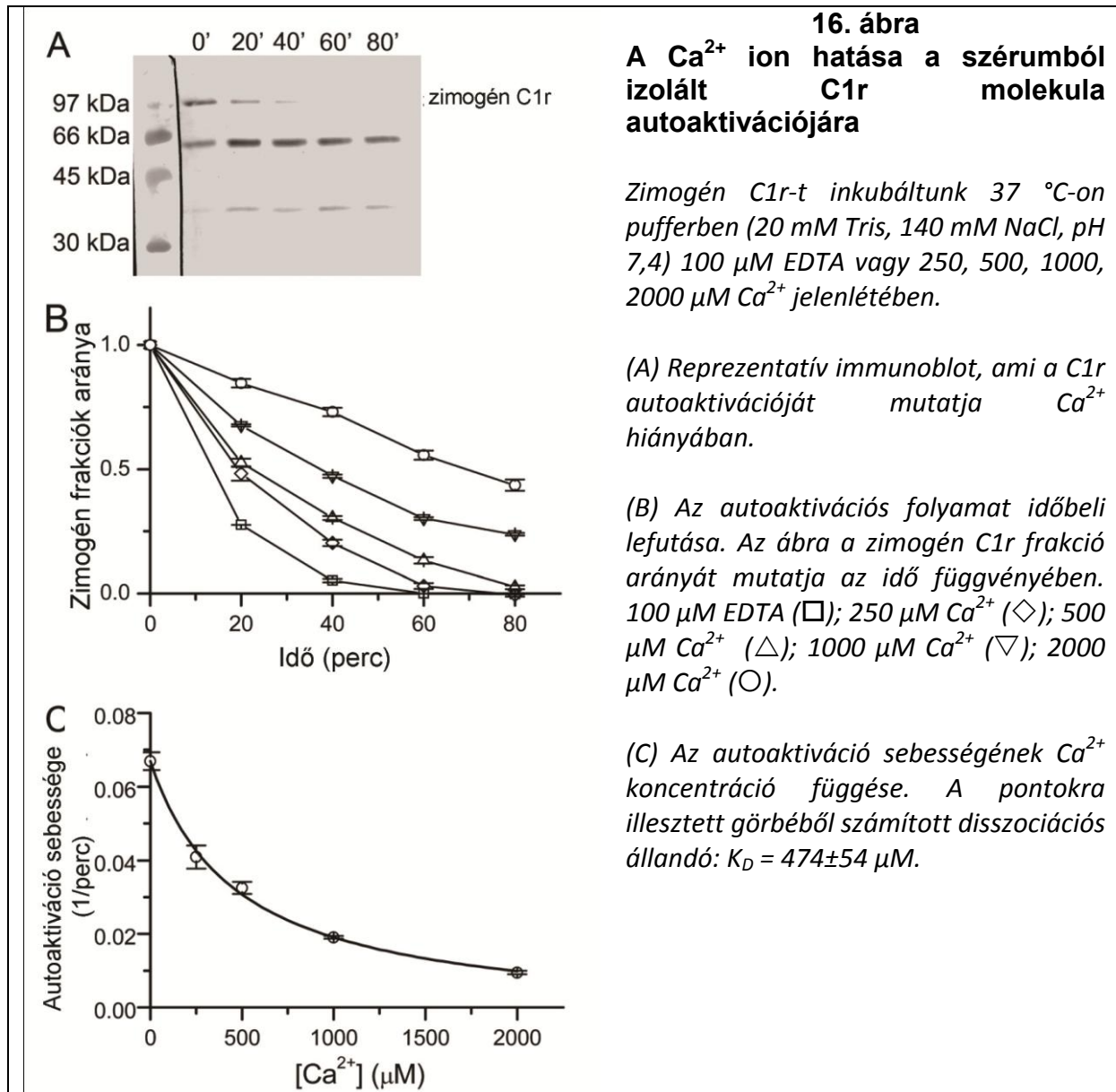
A CUB2-CCP1 fragmentum  $\text{Ca}^{2+}$  kötését izotermális titrációs kalorimetriával is tanulmányoztuk (15. ábra).



Megállapítottuk, hogy egy CUB2-CCP1 molekula egy kalcium iont köt  $430 \pm 20 \mu\text{M}$  disszociációs állandóval. Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy egy CUB domén egy kalcium ion kötőhellyel rendelkezik. Korábban a C1s CUB1-EGF fragmentum

kristályszerkezeténél mutatták ki először, hogy a CUB (ebben az esetben a C1s CUB1) domén képes kalciumot kötni (Gregory és mtsi., 2003). Szekvencia összehasonlítás alapján feltételezték, hogy a C1r/C1s/MASP enzimes család minden tagjának CUB1 és CUB2 doménjei egyenként egy kalcium iont képesek megkötni, azonban mi voltunk az elsők, akik ezt a C1r CUB2 domén esetében, kísérletesen is igazoltuk. Később a MASP-1 CUB2 doménjének  $\text{Ca}^{2+}$  kötését vizsgálták ITC-vel és a mi eredményünkhöz hasonló disszociációs állandót kaptak ( $K_d = 500 \mu\text{M}$ ) (Gingras és mtsi., 2011). A MASP-1 CUB2 doménje tehát nagyon hasonlóan viselkedik a C1r CUB2 doménjéhez, és ennek jelentősége lehet a MASP-1 autoaktiválódása során. A CUB1 domént tartalmazó C1r  $\alpha$ -fragmentum jóval erősebben, egy nagyságrenddel kisebb  $K_D$ -vel ( $32\mu\text{M}$ ), köti a kalcium iont (Thielens és mtsi., 1990). A C1r CUB2 gyengébb kalcium kötése a Glu226Asp mutáció következménye lehet, ami megváltoztatja a CUB doménekre jellemző kalciumkötő konszenzus szekvenciát (Glu-Asp-Asp) (Bally és mtsi., 2009). Ha figyelembe vesszük, hogy az emberi vérben a szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja  $1,2 \text{ mM}$  (Moore, 1970), a mért disszociációs állandóval számolva azt az eredményt kapjuk, hogy a C1r molekulákban lévő CUB2 doméneknek csak 74%-a van kalciummal telítve, azaz csak ennyinek van rendezett térszerkezete. A kalciumot éppen nem kötő CUB2 doméneknek (a CUB2 domének több mint egy negyede) rendezetlen, flexibilis szerkezete van, ami kellő mozgékonyt biztosíthat az egész molekulának az autoaktiváció során.

Annak bizonyítására, hogy a kalcium ion a CUB2 doménon keresztül tényleg szabályozza a C1r autoaktiválódását, megvizsgáltuk a szérumból preparált teljes hosszúságú zimogén C1r molekula autoaktivációs sebességének kalcium koncentráció függését (16. ábra). Annyit már régebben is lehetett tudni, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  stabilizálja a C1r és a tetramer zimogén formáját (Thielens és mtsi., 1994), azonban pontos koncentrációfüggést előttünk még nem mért ki senki. Az autoaktiváció előrehaladását SDS poliakrilamid gélelektroforézissel és immunoblottal követtük nyomon. A  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációkat a vérben szabadon lévő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt ( $1,2 \text{ mM}$ ) figyelembe véve választottuk meg. Kalcium hiányában, illetve alacsony kalcium koncentráció mellett ( $250 \mu\text{M}$ ) az autoaktiválás gyorsan végbemegy. Növekvő kalcium koncentráció hatására ( $500, 1000, 2000 \mu\text{M}$ ) a reakciósebesség fokozatosan csökken, a zimogén C1r lassabban hasad szét A és B láncra. Az autoaktivációs sebesség  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció függéséből számolható  $K_D$  érték ( $474 \pm 54 \mu\text{M}$ ) jó egyezést mutat az ITC mérésből számolt  $K_D$  értékkel ( $430 \pm 20 \mu\text{M}$ ). Mivel a C1r  $\alpha$ -fragmentumán található kalciumkötő helyek jóval nagyobb affinitásúak, az  $\alpha$ -fragmentum már a legalacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció ( $250 \mu\text{M}$ ) mellett is teljesen telített. Ráadásul a CUB1 domén szerkezete nem változik kalciumkötés hatására (Thielens és mtsi., 1999). Az autoaktiválódási sebesség kalcium ion koncentráció függése tehát a CUB2 domén kalcium kötésének köszönhető.



Eredményeink szerint a CUB2 modul a C1r molekula legflexibilisebb része és ennek a flexibilitásnak kulcsszerepe lehet a C1 komplex aktiválódása során. A „hasadás és visszakapcsolódás” (split and reassembly) modell feltételezi, hogy a két C1r molekula CCP1-CCP2-SP régiójának hossz tengelye mintegy  $90^\circ$  szöget zár be egymással a C1 komplexen belül az aktiválódás során. A CUB2 domén kalcium nélküli, rendezetlen formája biztosíthatja, hogy a merev CUB1-EGF és CCP1-CCP2-SP régiók megfelelő mértékben elmozdulhassanak egymáshoz képest. Az egész folyamatot a  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció szabályozza. A szérumban szabad  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentrációja mellett a CUB2 domén a stabilitásának határán van és biztosítja az aktiválódási folyamathoz szükséges flexibilitást. Ebből a szempontból érdekes az a megfigyelés, hogy fertőzés indukálta gyulladás esetén a lokális  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció lecsökken a szérumban (Zhang és mtsi., 2009). Ebben az esetben a CUB2 domének nagyobb százaléka lesz rendezetlen állapotban, nagyobb lesz a flexibilitás, felgyorsul az aktivációs folyamat. Az újabb C1 szerkezeti modellek szerint a C1r CUB2 modulja hozzájárul a tetramer



C1q-hoz való kötődéséhez (Bally és mtsi., 2009; Phillips és mtsi., 2009). A tetramer hat C1q kötő helyéből kettőt a C1r CUB1 domének, kettőt a C1s CUB1 domének, kettőt pedig a C1r CUB2 domének szolgáltatnak. Konkrét szerkezeti információval csak a rokon MASP-1 proteáz CUB2 doménjének egy kollagén peptiddel képzett komplexéről rendelkezünk (Gingras és mtsi., 2011). Ebben az esetben a kollagén peptid egy lizin oldallánca közvetlen kapcsolatot létesít a  $\text{Ca}^{2+}$  ion kötésében résztvevő savas oldalláncokkal. Ha hasonló kötést tételezünk fel a C1q kollagén szára és a C1r CUB2 doménje között is, akkor a  $\text{Ca}^{2+}$  ion disszociációjának következtében gyengül a C1q-tetramer kölcsönhatás. Ezt a  $\text{Ca}^{2+}$  kötőhely mutációjával is bizonyították (Bally és mtsi., 2009). Ezek alapján elképzelhető, hogy aktiválódás közben, különösen, ha csökken a kalcium koncentráció, a tetramer és a C1q közötti kölcsönhatás fellazul és a tetramer képes változtatni helyét („ugrálni”) a C1q karok között. Ily módon a tetramer képes felvenni a számára legoptimálisabb pozíciót a C1 komplexen belül, ami az aktiválódáshoz illetve C1s általi C4 és C2 aktiváláshoz szükséges.

Fehérjeszerkezeti szempontból érdekes, hogy a C1r CUB2 domén reverzibilis kalcium kapcsolóként működik. Kalcium nélkül rendezetlen a szerkezete, a kalcium ionok viszont indukálják a rendezett konformáció kialakulását. Ligandum, illetve fémionok által indukált konformációváltozásra egyéb példák is vannak az irodalomban (Házy és Tompa, 2009; Chenal és mtsi., 2009; Yamniuk és mtsi., 2007). A rendezetlen fehérjékre (intrinsically unstructured proteins= IUP) jellemző, hogy jól definiált térszerkezetet csak megfelelő partnerrel való kölcsönhatás során alakítanak ki. A C1r CUB2 szekvenciáját elemeztük abból a szempontból, hogy mutat-e az IUP-kra jellemző tulajdonságokat. Mind az IUPred (Dosztányi és mtsi., 2005), mind pedig a PONDR program (Romero és mtsi., 2001) azt valószínűsítette, hogy a CUB2 domén nem tartozik a rendezetlen fehérjék csoportjába, szekvenciája alapján inkább a globuláris fehérjék osztályába sorolható. Ennek alapján elmondhatjuk, hogy a C1r CUB2 doménje és a hozzá hasonló domének a globuláris fehérjék különleges csoportját képezik. Jellemző rájuk, hogy stabilitásuk határán működnek, flexibilitásuk fontos lehet nagyobb fehérjék vagy fehérje komplexek működése szempontjából, proteolízisre érzékenyek, rendezett térszerkezetük kialakulását ligandum kötése indukálhatja. Ezek a szekvenciájuk alapján globuláris fehérjék sok tulajdonságukban mégis a rendezetlen fehérjékre (IUP-kra) hasonlítanak. Ezek az általunk „flexibilitás doméneknek” (flexibility domain) elnevezett fehérjék azt példázzák, hogy hasonló funkciókat elláthatnak különböző evolúciós hátterű fehérjék.

## 6.2 A komplementaktiválás lektin útja

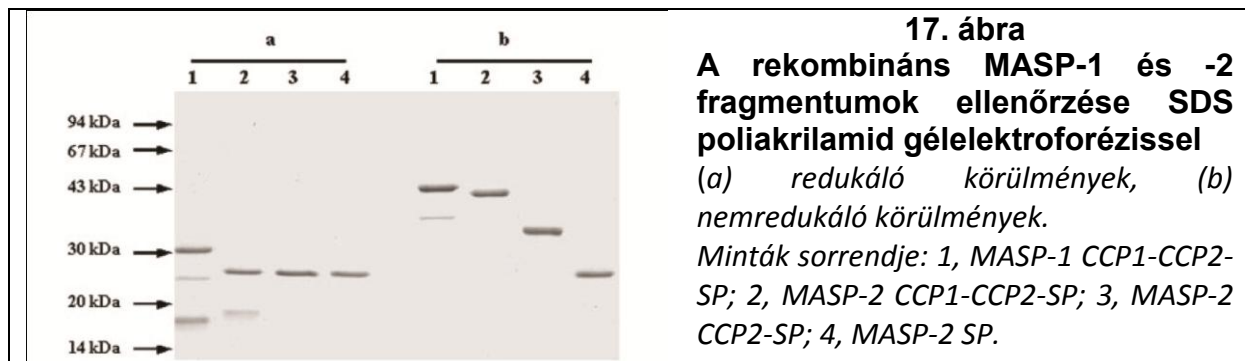
### 6.2.1 MASP-2

#### 6.2.1.1 Az egyes domének funkciója a MASP-2 katalitikus fragmentumában

A komplementaktiválódás lektin útjának a proteázaival, a MASP-okkal, a 2000-es évek elején kezdtünk el foglalkozni. Csak a kilencvenes évek végén fedezték fel, hogy az MBL molekulához nem egy, hanem két szerin proteáz is kapcsolódik, és a jóval kisebb mennyiségben jelenlévő MASP-2 molekula az, amely a C3 konvertáz képződéséhez szükséges C4b és C2a fragmentumokat előállítja. A MASP-2 felfedezését leíró 1997-es Nature cikk (Thiel és mtsi., 1997) megjelenése óta az egyik legtöbbet kutatott probléma az, hogy mi lehet a MASP-1 funkciója. A MASP-1 pontos szérumkoncentrációjának meghatározására alkalmas ELISA rendszert csak nemrégiben sikerült, egy dán kutatócsoporttal együttműködve, beállítanunk (Thiel és mtsi., 2012). A mérési eredmények azt mutatják, hogy a MASP-1 koncentrációja még a vártnál is magasabb. Egy régebbi cikk alapján a MASP-1 átlagos szérumkoncentrációját  $\sim 6 \mu\text{g/ml}$ -re becsülték (Terai és mtsi., 1997), kiderült azonban, hogy az valójában  $\sim 11 \mu\text{g/ml}$ . Ehhez képest a MASP-2 koncentrációja valóban elég alacsony ( $0,4 \mu\text{g/ml}$ ), azaz körülbelül 30-ada a MASP-1 koncentrációjának. Időközben az is kiderült, hogy van egy harmadik MASP is (MASP-3), aminek a koncentrációja,  $\sim 5 \mu\text{g/ml}$ , szintén jóval felülmúlja a kulcsfontosságúnak tulajdonított MASP-2-ét. Ha ehhez még hozzávesszük a felismerő molekulákhoz kapcsolódó nemkatalitikus fragmentumokat (MAp44,  $C \sim 1,7 \mu\text{g/ml}$ ; MAp19,  $C \sim 0,4 \mu\text{g/ml}$ ), könnyen megérthetjük a MASP-ok szerepét leíró korai cikkek miért tartalmaztak olyan sok ellentmondást. Mivel ezek a molekulák sok tulajdonságukban (pl. molekulatömeg, felületi töltés, hidrofobicitás) hasonlítanak egymáshoz, szinte lehetetlen szérumból vagy plazmából tiszta MASP-1 vagy MASP-2 preparátumot előállítani. A kezdeti zavart az okozta, hogy az egymással keresztszennyezett, és így nem jól definiált MASP preparátumok eltérő módon viselkedtek különböző laboratóriumok különböző méréseiben. A zavart tovább fokozta, hogy gyakran megelégedtek pusztán a proteolízis tényének demonstrálásával, de pontos enzimkinetikai paramétereket ( $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$ ) nem határoztak meg. Így olyan proteolitikus reakciókat is specifikusnak minősítettek, amit csak irreálisan nagy enzimfelesleg hozzáadására és/vagy hosszú inkubálási idő után lehetett detektálni.

A MASP-1 és MASP-2 jellemzésének problémáira a rekombináns fehérje expresszió jelentette az egyik megoldást. Sikerült tiszta formában MASP-1 és MASP-2 preparátumokat előállítanunk olyan mennyiségben, hogy az nem csak funkcionális mérésekhez, hanem szerkezetvizsgálathoz is elegendőnek bizonyult. A MASP-1 és MASP-2 katalitikus fragmentumait (CCP1-CCP2-SP) a C1r molekula expressziójánál alkalmazott módszer alapján termeltettük (Ambrus és mtsi., 2003). A katalitikus fragmentumoknak megfelelő humán cDNS szakaszokat pET-17b expressziós vektorba szubklónoztuk és a fehérje expressziót *E. coli* BL21(DE3)pLysS sejtekben végeztük. Az inklúziós testek renaturálására szolgáló optimális procedúrát minden egyes fehérje fragmentum esetére külön ki kellett dolgoznunk. A

renaturált fehérjéket ioncserélő kromatográfia (Q-Sepharose Fast Flow, Mono-S) segítségével homogenitásig tisztítottuk. Végül is sikerült tiszta formában előállítanunk a MASP-1 CCP1-CCP2-SP (a C1r/s analógiájára nevezhetjük  $\gamma$ B fragmentumnak is), a MASP-2 CCP1-CCP2-SP, CCP2-SP és SP fragmentumait (17. ábra).



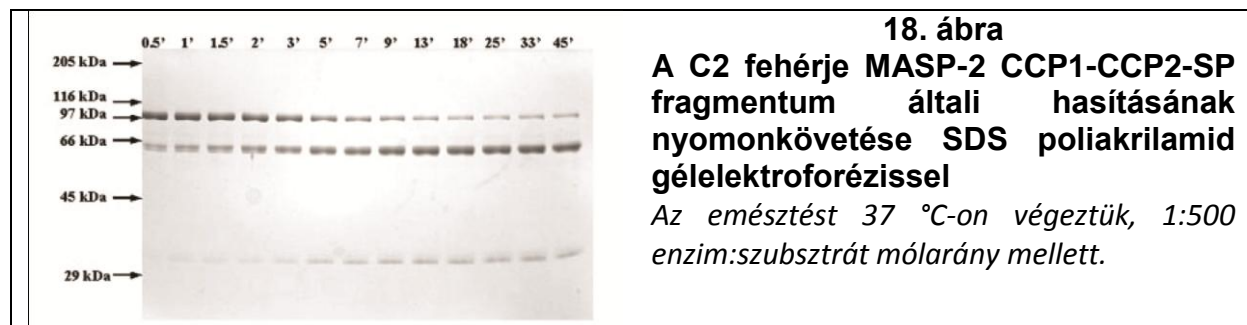
A renaturált fehérjék nemredukáló SDS poliakrilamid gélen egy sávot adnak az elektroforézis során, míg redukáló körülmények között két láncre szakadnak szét. Ezzel sikerült bebizonyítanunk, hogy fehérjék enzimatiszusan aktívak, és mind a MASP-1, mind pedig a MASP-2 képes autoaktiválódni. Ez meglepőnek tűnt első látásra, mivel a C1r és C1s analógiájára az tűnt valószínűbbnek, hogy csak az egyik proteáz fog autoaktiválódni, ami aztán aktiválja a másikat. A MASP-1 rendkívül gyorsan autoaktiválódott: az inklúziós testekben még egyláncú forma teljes mennyisége elhasadt a renaturálás során az Arg<sup>448</sup>-Ile<sup>449</sup> kötés mentén. A MASP-2 fragmentumok szintén autoaktiválódtak (az Arg<sup>444</sup>-Ile<sup>445</sup> kötés mentén), azonban csak az ioncserélő kromatográfia során, ahol a fehérje koncentrációja az oszlopon megnövekszik (elérheti az 1-2 mg/ml-t). A körülmények megfelelő megválasztásával, mint azt később látni fogjuk, lehetséges vad típusú MASP-2 zimogént tisztítani, míg MASP-1 esetében ez csak mutánsokkal lehetséges. A MASP-2 SP fragmentumának autoaktiválódási képessége ebben az esetben is, úgy, mint a C1r esetében azt bizonyítja, hogy az autoaktiválódás a szerin proteáz domén sajátja, ahhoz a többi domén jelenléte nem szükséges. A többi domén jelenléte legfeljebb gyorsíthatja ezt a reakciót, de nem esszenciális. Korábban egy francia kutatócsoport előállította bakulovírus-rovarsejt rendszerben a MASP-2 CCP1-CCP2-SP és CCP2-SP fragmentumait és csak a háromdoménos fragmentum rendelkezett autoaktiválódási képességgel (Rossi és mtsi., 2001). Ebből levonták azt a következtetést, hogy a CCP1 domén szükséges az autoaktivációhoz. A mi eredményeink cáfolják ezt a megállapítást, és általános érvényűvé emelik azt a nézetet, hogy az autoaktiválódás a szerin proteáz domén inherens tulajdonsága.

A MASP-2 fragmentumok reakciókészségét vizsgálva megállapítottuk, hogy természetes szubsztátjait, a C4 és C2 fehérjéket nagy hatékonysággal hasítja (3. táblázat).

	C2	C4
	$k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})$	$k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})$
<b>MASP-2 CCP1/2-SP</b>	$5 \times 10^5 \pm 9 \times 10^3$	$5,5 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$
<b>MASP-2 CCP2-SP</b>	$1,3 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^6 \pm 5,5 \times 10^5$
<b>MASP-2 SP</b>	$2,5 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^4$

### 3. táblázat A MASP-2 fragmentumok C2 és C4 hasításának kinetikai paraméterei

A szubsztrátok hasadását SDS poliakrilamid gélelektroforézissel követtük nyomon (18. ábra) és denzitometráls segítségével határoztuk meg a kinetikai paramétereiket.



A három fragmentum katalitikus hatékonyságát vizsgálva azt az érdekes megállapítást tettük, hogy a C2 szubsztrátot már az SP domén is igen jól hasította, sőt a CCP modulok jelenléte inkább csökkentette a hatékonyságot. Úgy tűnik tehát, hogy az SP domén önmagában tartalmazza az összes szerkezeti elemet, ami a C2 szubsztrát specifikus megkötéséhez és elhasításához szükséges. Mint azt a DSC méréseink mutatják, a CCP2 modul a MASP-2 esetében is, hasonlóan a C1r-hez, stabilizálja az SP domén szerkezetét (Harmat és mtsi., 2004). A CCP2-SP fragmentum magasabb hőmérsékleten (50,8 °C) élesebb, kooperatívabb olvadásgörbét mutat, mint a magányos SP domén (46,0 °C). Ez a stabilizáló hatás azonban nem szükséges a hatékony enzimaktivitáshoz és minden valószínűség szerint a CCP modulok nem vesznek részt a C2 megkötésében.

A rendkívül nagyméretű (203 kDa) C4 szubsztrát esetében azonban gyökeresen más a helyzet. A magányos SP domén hasítja ugyan a C4-et, azonban a katalitikus hatékonyság drámai módon megnövekszik a CCP2-SP fragmentum esetében (~44-szeres növekedés a  $k_{cat}/K_M$  értékben). A CCP1-CCP2-SP fragmentum szintén sokkal hatékonyabb a C4 hasításánál, mint az SP domén, jóllehet nem éri el a CCP2-SP fragmentum hatékonyságát. A CCP modulok feltételezhetően extra kötőhelyet (exosite) tartalmaznak a C4 szubsztrát részére, ezért tudják ilyen nagymértékben megnövelni a proteolitikus reakció hatékonyságát. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a C1r esetében is, de ebből a szempontból a MASP-2 leginkább a C1s-hez hasonlít. A C1s hasonló fragmentumait bakulovírus-rovarsejt expressziós rendszerben fejezte ki egy francia kutatócsoport (Rossi és mtsi., 1998). A szabad SP domén a C2 szubsztrátot hatékonyan hasította, míg a C4-gyel szemben nem mutatott semmiféle aktivitást. A hatékony C4 aktiváláshoz szükség volt mind a két CCP domén jelenlétére. A C1s és a MASP-2 között tehát sok hasonlóság van: egyrészt közösek a szubsztrátjaik (C4 és C2), másrészt a CCP domének részt vesznek a C4-gyel való kölcsönhatásban. Mindkét enzim

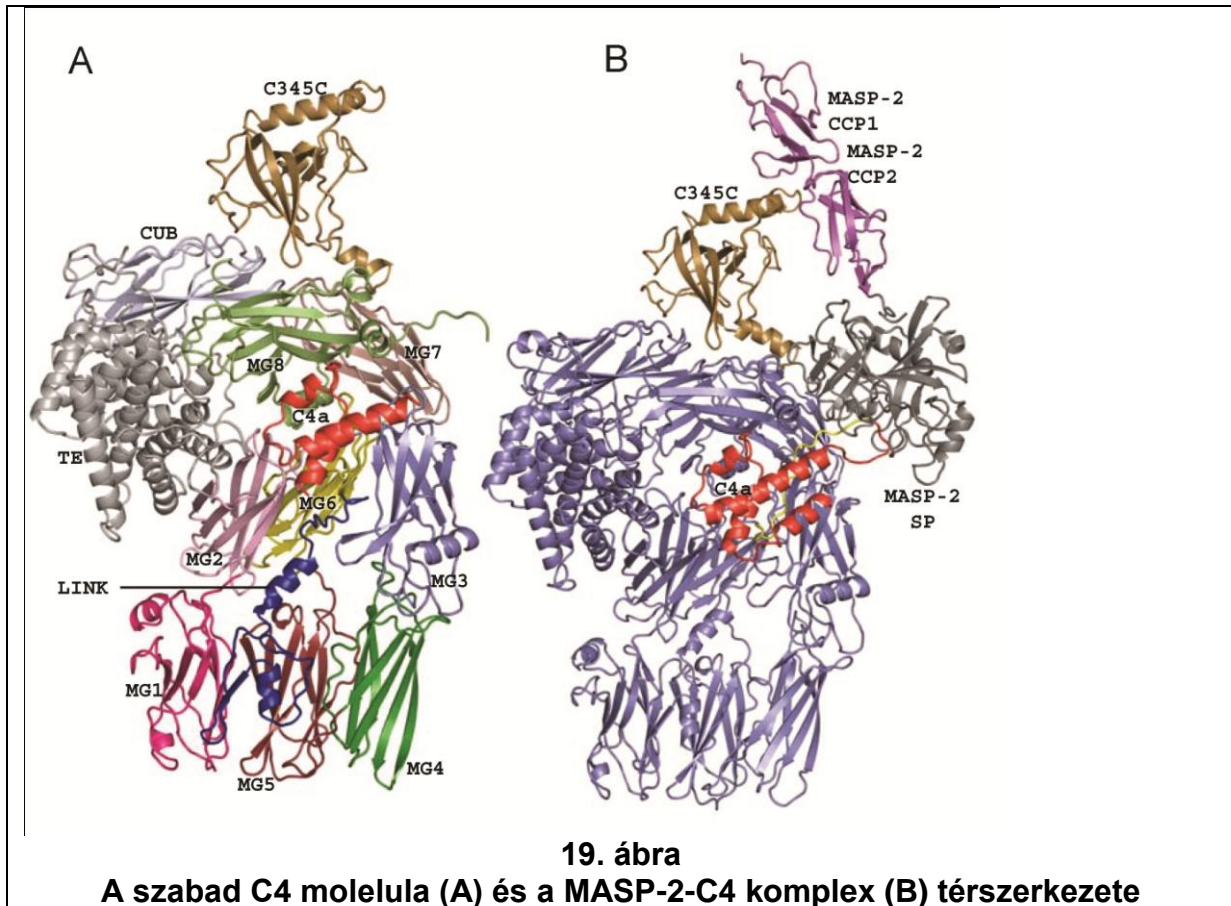
aktivitása hatékonyan gátolható C1-inhibitorral. Az egyetlen nagy különbség az, hogy a MASP-2 képes autoaktiválódni, míg a C1s nem.

### 6.2.1.2 A MASP-2 katalitikus fragmentuma két külső kötőhelyen keresztül is kapcsolódik a C4 szubsztráthoz

Enzimkinetikai méréseink a MASP-2 fragmentumokkal egyértelműen arra utalnak, hogy a CCP modulok kötőhelyeket tartalmaznak a nagyméretű C4 szubsztrát számára. Időközben laboratóriumunkban meghatároztuk az aktív MASP-2 CCP2-SP fragmentum térszerkezetét (PDB kód: 1Q3X) (Harmat és mtsi., 2004), ami azt mutatja, hogy a CCP2 modul flexibilis határfelületen keresztül illeszkedik az SP doménhez. Logikus feltételezni, hogy a CCP2 modul megköti a C4 szubsztrátot és a CCP2/SP határfelület olyan konformációt vesz fel, hogy a hasadó kötés optimális módon illeszkedhessen az SP domén aktív centrumába. Ez azonban csak igen valószínű feltételezés mindaddig, amíg nincs a kezünkben konkrét szerkezeti bizonyíték. A CCP2 modulon lévő kötőhelyet mi is próbáltuk (és más laboratóriumok is próbálták) különböző módszerekkel (pl. mutagenézis, fág bemutatás) azonosítani, azonban nem jártunk sikerrel, és nem állt rendelkezésünkre olyan szerkezet sem, ahol a proteáz aktív centrumát szubsztrát vagy inhibitor molekula foglalta volna el. A remény akkor csillant fel arra nézve, hogy előre tudunk lépni ezen a téren, amikor 2010-ben Dániában, az Aarhusi Egyetemen tartottam kutatásaimról előadást a Dán Immunológiai Társaság meghívására. Ott találkoztam Gregers Andersen kristallográfussal, aki közölte velem, hogy vannak kristályai humán szérumból preparált C4 fehérjéből (ami nagy előrelépés, hiszen ezt a fontos fehérjét régóta próbálta több kutatócsoport is kristályosítani sikertelenül) és kifejezte készségét, hogy együttműködjön kutatócsoportunkkal. Nekem természetesen azonnal az jutott eszembe, hogy együtt kellene kristályosítani a C4 molekulát a MASP-2-vel és a komplex szerkezete választ adhatna az évek óta tanulmányozott kérdésekre. Szerencsénk volt - ugyanis egy fehérje molekula, és főleg egy komplex kristályosításához a szakértelmen és tapasztalaton kívül nagy adag szerencsére is szükség van – a kristályosítás sikerrel járt és meghatároztuk a MASP-2 (CCP1-CCP2-SP)- C4 enzim-szubsztrát komplex térszerkezetét. Előljáróban csak annyit jegyzek meg, hogy a komplex szerkezet minden pontban igazolta előzetes feltételezéseinket.

Ahhoz, hogy létre tudjuk hozni a MASP-2-C4 kristályt aktív MASP-2-re volt szükségünk. Azonban az aktív MASP-2 1:1 molarányban, nagy töménységben, hosszú inkubáció során a C4-et valószínűleg teljesen elemésztette volna. Azonkívül, ha csak egy helyen, az aktiváció során hasadó Arg<sup>756</sup>-Ala<sup>757</sup> kötésnél történik is a hidrolízis, máris enzim-termék komplexszel állunk szemben, ami kevésbé értékes számunkra, mint a hasadás előtti enzim-szubsztrát komplex. Ezért előállítottuk a MASP-2 mutáns formáját, ahol a katalitikus szerint alaninra cseréltük (Ser633Ala). Az aktivációs peptid Arg<sup>444</sup>-Ile<sup>445</sup> kötését MASP-1 proteázzal hasítottuk el, amit azután tisztítás során eltávolítottunk a MASP-2 mellől. Így tehát előállítottunk egy aktív konformációban lévő, de proteolitikusan mégis teljesen inaktív MASP-2 CCP1-CCP2-SP fragmentumot, amelyet együttkristályosítottunk a szérumból izolált

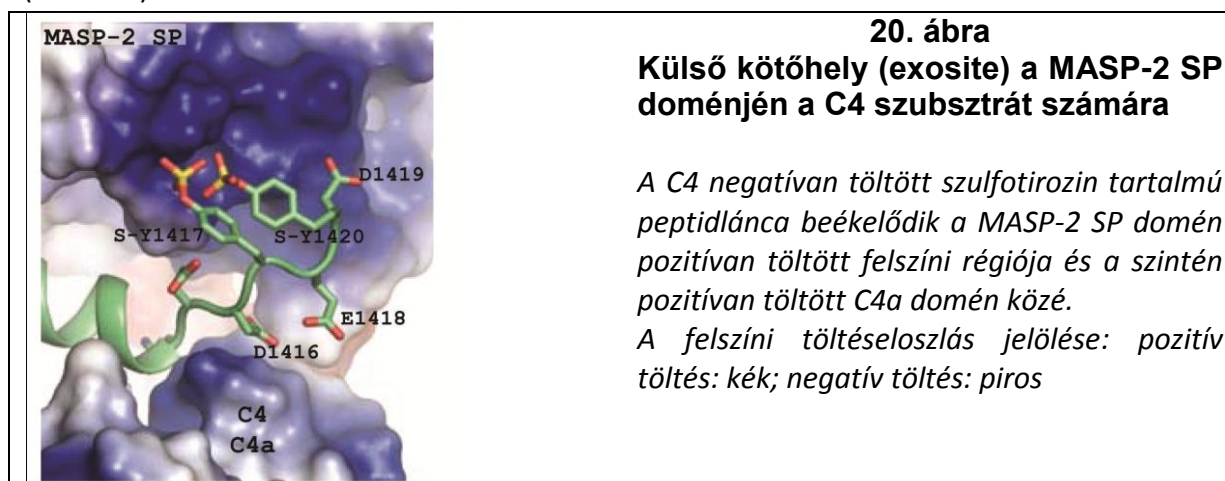
C4 fehérjével. Sikerült meghatározni a komplex térszerkezetét 3,75 Å (PDB kód: 4FXG) és a szabad C4 szerkezetét 3,6 Å felbontásban (PDB kód: 4FXK) (Kidmose és mtsi., 2012) (19. ábra). A szabad C4 szerkezete hasonló a rokon C3 és C5 molekulák korábban már publikált szerkezetéhez. A továbbiakban a MASP-2-C4 komplex szerkezetét tárgyalom részletesebben, mivel elsősorban ezt tekintem saját eredménynek.



A komplex térszerkezete szinte mindenben igazolta előzetes várakozásainkat, sőt még egy váratlan meglepetéssel is szolgált. A MASP-2 CCP1-CCP2-SP fragmentum mindhárom doménje kapcsolódik a C4 fehérjéhez összesen 1800 Å<sup>2</sup> kontaktfelületen keresztül (19. ábra B). A CCP domének a C4 fehérje C-terminális C345C doménjéhez kötnek 500 Å<sup>2</sup> felületen keresztül. A C4 egy felszíni hurokrégiója (Asp748-Ile760, a továbbiakban R-hurok), amely tartalmazza az aktiválódás során hasadó Arg<sup>756</sup>-Ala<sup>757</sup> (P1-P1') kötést, benyúlik a MASP-2 szerin proteáz domén szubsztrátkötő árkába az aktív centrumához. Ezen kívül azonban az SP domén a C4 egyéb részeivel is kölcsönhatásba lép. Legfontosabb ezek közül a C4 szulfotirozin régiója, ami egy „töltés szendvics” szerű kötőhelyen (exosite) keresztül kapcsolódik az SP doménhez. Ennek a nem várt extra kötőhelynek a létezése azt bizonyítja, hogy komplement proteázok rendkívüli specificitását a tripszin szerű proteázokra jellemző kanonikus kötőhelyen kívül egyszerre akár több extra kötőhely is biztosíthatja. Az SP domén ezen kívül még néhány gyengébb kölcsönhatást is létesít a C4 MG8 és C345C doménjével. Minden kötőhelyet figyelembe véve az SP domén és a C4 közötti kontaktfelület ~1300 Å<sup>2</sup> nagyságú. Az SP domén felszíni hurokrégiói közül, amelyek fontos szerepet játszanak a szűk

szubsztrátspecifitásban (Harmat és mtsi., 2004), az A, B, D, E, valamint a 2-es és 3-as vesznek részt a szubsztrát kötésében. (A továbbiakban a hurkok megnevezésére a Perona és Craik (1997) által javasolt nomenklatúrát használok.) A C4 R-hurok egy csavart U betűre hasonlít, amely a MASP-2 2-es hurokrégiójának Met<sup>658</sup> oldalláncával való van der Waals kontaktus következtében a Gly<sup>750</sup>-Gln<sup>751</sup> kötés mentén meghajlik. A P1 Arg oldallánc a MASP-2 szubsztrátkötő zsebébe illeszkedik, ahol a kanonikus S1-P1 (MASP-2 Asp<sup>627</sup>-C4 Arg<sup>756</sup>) kölcsönhatáson kívül, hidrogénkötést képez a MASP-2 Ser<sup>628</sup> és Ser<sup>657</sup> oldalláncával. Az oxianionkötő zseb, amit a vad típusú enzimben a Gly<sup>631</sup> és Ser<sup>633</sup> főlánc amidcsoportjai alkotnak, a Ser633Ala mutáció következtében kissé torzult, azonban így is köti a P1 Arg<sup>756</sup> karbonil oxigénjét. A P1'-P4' szakasz (Ala<sup>757</sup>-Ile<sup>760</sup>) megnyúlt konformációját hidrogénkötések stabilizálják a MASP-2 Thr<sup>467</sup> és a Gly<sup>656</sup> aminosavak közreműködésével.

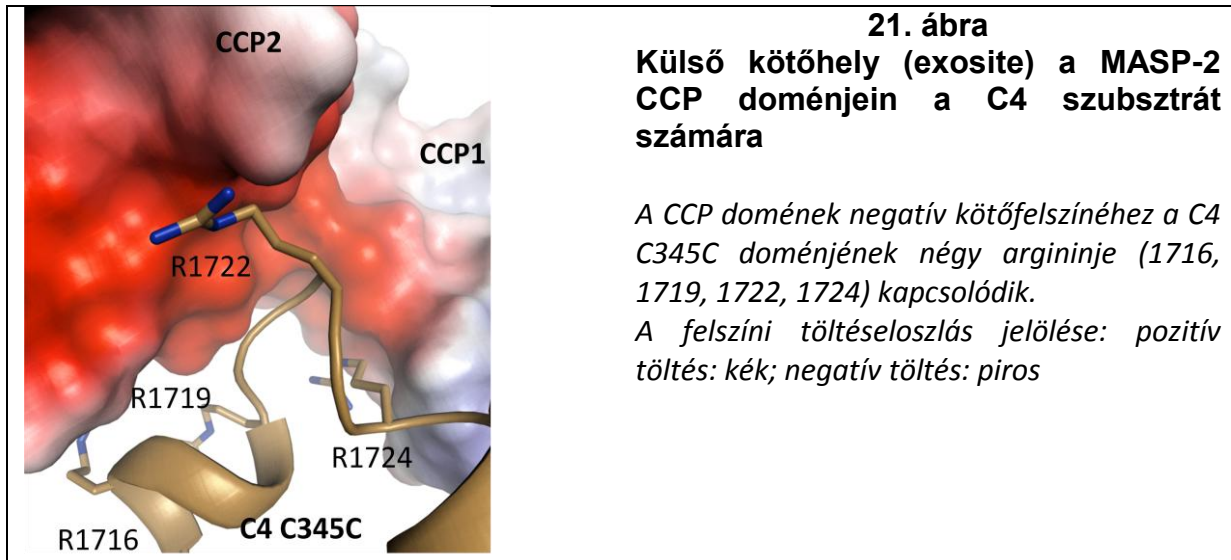
A váratlanul felfedezett szulfotirozin extra kötőhellyel kapcsolatban elmondhatjuk, hogy annak alapját a C4 fehérje egy negatív töltésklasztere képezi. Ebben a negatív töltésű régióban (1405-1427 aminosavak; a C4  $\alpha$ -lánc C-terminális régiója) található három szulfotirozin és összesen hét aszparaginsav/glutaminsav, valamint a C-terminális karboxil csoport. A 1415-1420 aminosavak által alkotott negatív töltésű peptidlánc beilleszkedik a MASP-2 felszínének egy pozitív töltésű régiója és a szintén pozitívan töltött C4a domén közé (20. ábra).



Ebben a „töltés szendvicsben” a negatívan töltött peptidlánc mintegy elektrosztatikus „ragasztóként” tartja össze a pozitívan töltött MASP-2 SP és C4a doméneket. A C4 Tyr<sup>1417</sup> - SO<sub>3</sub><sup>-</sup> csoportja elektrosztatikus kölcsönhatást képez a MASP-2 Lys<sup>503</sup> oldalláncával, míg a C4 Asp<sup>1419</sup> oldallánca a MASP-2 Lys<sup>450</sup>, Arg<sup>578</sup> és Arg<sup>583</sup> oldalláncával lép kölcsönhatásba. A C4 Asp<sup>1416</sup> oldallánca viszont a C4a Lys<sup>744</sup> oldallánca felé irányul. A szulfotirozin kötőhely jelentőségét kiemeli, hogy a C1s SP doménjén is megtalálható az a pozitívan töltött régió, ami a MASP-2-ben részt vesz a kötőhely kialakításában. Bár közvetlen szerkezeti adatok nem állnak rendelkezésünkre, nagyon valószínű, hogy a C1s-C4 enzim-szubsztrát komplexben is létrejön a fent vázolt „töltés szendvics”. Ez megmagyarázhatja azt a kísérleti tényt, hogy miért van szükség tízszeres C1s koncentrációra ahhoz, hogy a nem-szulfonált C4-et ugyanolyan hatékonysággal hasítsa a C1s, mint szulfonáltat (Hortin és mtsi., 1989). Eredményeink publikálásával egyidőben jelent meg egy cikk egy ausztrál kutatócsoporttól,

amelyben tőlünk függetlenül, de a mi „protein engineering” megközelítésünket átvéve, enzimkinetikai mérésekkel bizonyítják a szulfotirozin „exosite” létét a C1s SP doménon (Duncan és mtsi., 2012).

A MASP-2-C4 komplex teljes egészében igazolta a CCP modulok szerepére vonatkozó korábbi feltételezéseinket és megmagyarázza a kísérleti eredményeinket. A szerkezet jól mutatja, hogy mindkét CCP modul részt vesz a C4 kötőhely kialakításában, bár a CCP2 domén több kölcsönhatással járul hozzá (21. ábra).



A kötőhely alapját az a CCP domének által kialakított negatívan töltött felszín képezi, amelyhez a C4 1716-1725 régiójának (a C345C modul C-terminális hélice) négy argininje ( $R^{1716}$ ,  $R^{1719}$ ,  $R^{1722}$ ,  $R^{1724}$ ) köt. A MASP-2 (és a C1s) CCP1 doménjének konzervált Glu<sup>333</sup> oldallánca elektrosztatikus kölcsönhatásba lép a C4 Arg<sup>1724</sup>-gyel. A CCP2 domén Asp<sup>365</sup> aminosavának főlánc komponense a C4 Thr<sup>1421</sup>-gyel létesít kölcsönhatást, míg az Asp<sup>365</sup> oldallánca a C4 Arg<sup>1716</sup>, Arg<sup>1719</sup> és Arg<sup>1724</sup> aminosavak felé irányul. A MASP-2-C4 kölcsönhatásban tehát az SP domén kanonikus kötőhelyein kívül két „exosite”, a CCP modulok és a C345C domén közötti, valamint a szulfotirozin kötő régió játszik fontos szerepet. Ezek a külső kötőhelyek nagymértékben növelik a kölcsönhatás erősségét és specificitását. A C3, bár rokon a C4-gyel, de esetében mégsem jöhet létre a CCP modulokkal előnyös kölcsönhatás, mivel a megfelelő régió (1716-1725) negatív töltése miatt taszító hatás lépne fel (Janssen és mtsi., 2005). A szulfotirozin régió szintén hiányzik a C3-ból. Ez megmagyarázza a MASP-2 és a C1s szelektivitását a C4 irányába. A CCP domének által kialakított kötőhely jelentőségét mutagenézis kísérletekkel is igazoltuk. A CCP1 modul Glu<sup>333</sup> vagy a CCP2 Asp<sup>365</sup> aminosavának megváltoztatása jelentősen csökkentette a C4 hasítás hatásfokát, a kettős mutáns pedig egyáltalán nem emésztette a C4-et. A CCP1 domén Pro<sup>340</sup> és a CCP2 Pro<sup>368</sup> aminosavának mutagenézise hasonló eredménnyel járt, bár a kettős mutáns itt nem lett teljesen inaktív. SPR mérésekkel azt is megmutattuk, hogy rekombináns C4 C345C domén kötődik MASP-2-höz 21 nM-os disszociációs állandóval. Mindezek a kísérleti eredmények összhangban vannak a szerkezettel és megerősítik a CCP domének által kialakított kötőhely fontosságát.



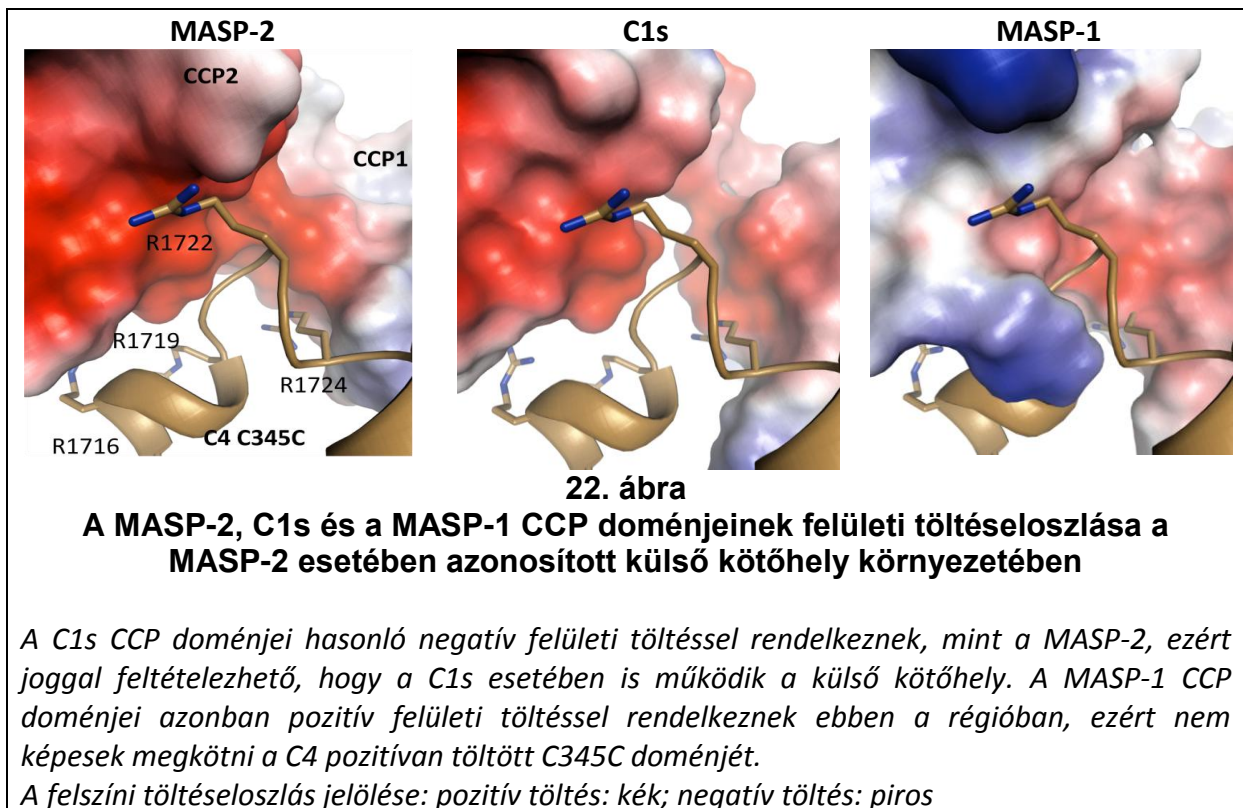
A MASP-2 és a C1s CCP doménjei közötti hasonlóság alapján valószínűsíthető, hogy a C1s is a MASP-2-höz hasonlóan köti a C4-et. A CCP modulok felületi töltéeloszlása nagyon hasonló a C4 kötőhely környezetében a két fehérjében (22. ábra). Ezt az is alátámasztja, hogy feleslegben adott rekombináns C345C doménnel gátolni lehetett a C4 C1s általi hasítását. Az SPR mérések tanúsága szerint a C1s a MASP-2-nél kicsit gyengébben ( $K_D=37\text{nM}$ ) köti a C345C domént. A MASP-2 CCP moduljainak erősebb C4 kötése lehet az oka annak, hogy a MASP-2 hatékonyabban hasítja a C4-et, mint a C1s. Rossi és munkatársai (2005) bakulovírus-rovarsejt expressziós rendszerben kifejezett C1s-MASP-2 kimérák vizsgálatával hasonló következtetésre jutottak.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy mind a MASP-2 mind pedig a C1s ugyanazokkal a külső kötőhelyekkel rendelkezik a C4 szubsztrát számára. A szulfotirozin kötőhely és a CCP modulok C345C kötőhelye mindkét enzim esetében döntő jelentőségű a hatékony proteolízis szempontjából. Igaz ugyan, hogy az SP domén felszíni hurokrégiói eltérőek a két enzim esetén (Harmat és mtsi., 2004), és ennek például a MASP-2 autoaktiválódásában lehet fontos szerepe, viszont a C4 kötésében szerepet játszó külső kötőhelyek („exosite”-ok) hasonlóak. Ahhoz, hogy pontosan meg tudjuk mondani, hogy minként köti a C1s SP doménje a C4 R-hurokrégióját szükség lenne a C1s-C4 enzim-szubsztrát komplex szerkezetére.

A CCP modulokon lévő C4 kötőhelynek más fontos jelentősége is lehet a klasszikus és a lektin út C3-konvertázának (C4b2a) kialakulása, a komplementaktiválás szabályozása szempontjából. Nagyon fontos ugyanis, hogy a MASP-2, illetve a C1s miután elhasította a C4-et, az a tioészter kötése révén az MBL-MASP komplex (illetve a C1 komplex) közelében rakódjon le az aktivációs felszínre, ahol a hozzá kötődő C2 molekulát ugyanaz a MASP-2 vagy C1s el tudja hasítani. Ellenkező esetben a frissen képződött C4b elúszna és jobb esetben elhidrolizálna, rosszabb esetben egy „ártatlan” saját sejt felszínére kötődne le „bystander” lízist indukálva. A C4 hasítása után a bekövetkező konformációváltozás következtében a MASP-2 SP domén-C4 R-hurok kölcsönhatás meggyengül, a „töltés szendvics” pedig megszűnik a C4a távozásával, de a CCP modulok a C4-et továbbra is kötni fogják a C345C doménon keresztül. A hasított C4 (C4b) tehát tranziens jelleggel kötve marad a proteázhoz és nagy valószínűséggel annak közelében fog tioészter csoportja elreagálni egy felszíni nukleofillel. A felszínhez rögzített C4b ezután megköti a C2-t, amit ugyanaz a proteáz el tud hasítani. Ez a mechanizmus biztosíthatja a hatékony és biztonságos C3-konvertáz képződést. Eredményeinkkel összhangban vannak Chen és Wallis (2004) megfigyelései, miszerint a C4b tioészter kötésének reakciója a sejt felszíni nukleofillel körülbelül egy nagyságrenddel gyorsabb folyamat, mint a MASP-2-C4b enzim-termék komplex disszociációja. Szerkezetünk alapján az viszont kevésbé látszik valószínűnek, hogy a MASP-2 úgy el tudná hasítani a C4b-hez kötött C2-t, hogy közben a CCP modulok még kötik a C4b C345C doménjét. Ezeknek a kérdéseknek a tisztázásához szükség lenne a MASP-2-C4b dimer, illetve a MASP-2-C4b-C2 trimer komplexek szerkezetére.

A C4-MASP-2 szerkezet segítségével azt is meg tudjuk magyarázni, hogy a MASP-1 miért nem képes C4-et hasítani, miért nem képes egyedül beindítani a lektin utat. A MASP-2-

vel és a C1s-sel szemben, a MASP-1 CCP doménjeinek (különösen a CCP2-nek) a felületi töltése a potenciális kötőhely környezetében pozitív (22. ábra).



Ezért vonzás helyett taszító hatás lépne fel a MASP-1 CCP moduljai és a C4 C345C doménje között. Másrészt a MASP-1 SP doménjének hosszú B-hurokrégiója akadályozhatja a C4 R-hurokrégióját az aktív helyel való kölcsönhatásban (Dobó és mtsi., 2009). Mivel a MASP-1 C2-t viszont tud hasítani, az is nyilvánvalónak látszik, hogy a C4 esetében kimutatott külső kötőhelyek a C2 megkötésében nem játszanak szerepet.

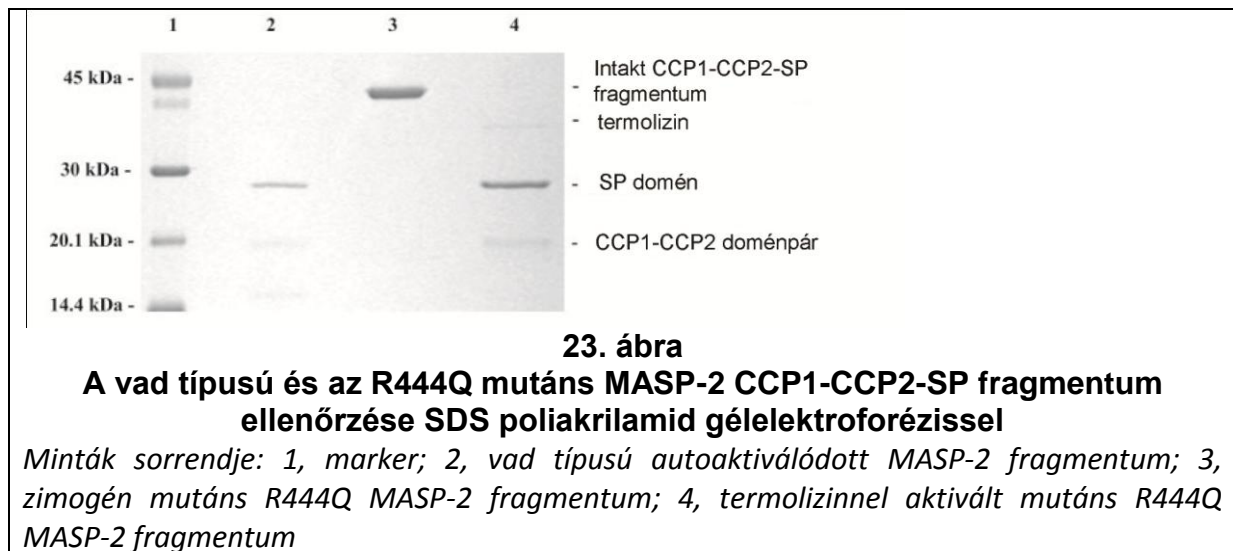
A MASP-2-C4 komplex szerkezete teljes mértékben igazolta a CCP2/SP határfelület flexibilitásának fontosságát. Az üres aktív MASP-2 szerkezettel összevetve a MASP-2-C4 komplexben az SP domén 29 fokos szögben el van fordulva a CCP2 modulhoz képest. A CCP2/SP flexibilis határfelületen történő elfordulás („hinge” mozgás) teszi lehetővé, hogy a MASP-2 enzim egyszerre tudjon kötődni a C4 molekulához a CCP és az SP doméneken lévő kötőhelyeken keresztül. Ez a flexibilitás tehát valóban kulcsfontosságú a proteolízis szempontjából, azonban az autoaktiválódáshoz szükséges nagyfokú flexibilitáshoz valószínűleg nem elegendő. Ebből az aspektusból érdemes megjegyezni, hogy a CCP1-CCP2 doménpár konformációja a komplex szerkezetben teljesen megegyezik a (később részletesebben ismertetésre kerülő) zimogén MASP-2 szerkezetben lévő CCP1-CCP2 doménpár konformációjával. A rigid CCP1-CCP2 határfelület tehát sem az aktiválódás, sem pedig a szubsztrátkötés során nem változik. Ez tovább erősíti azt, a C1r esetében már említett nézetet, hogy a CCP1-CCP2 régió a C1r/C1s/MASP enzimcsalád tagjaiban merevnek

tekinthető, a szükséges flexibilitás forrása máshol keresendő. Bár erre jelenleg semmiféle kísérleti bizonyítékunk nincs, a C1r analógiájára feltételezhetjük, hogy a CUB2 modul a MASP-2 esetében is nagyfokú flexibilitást biztosít a molekulának.

### 6.2.1.3 A zimogén MASP-2 proteolitikus aktivitása az autokativációs folyamat kulcsa

A MASP-2-C4 komplex szerkezetéből sok információt nyertünk arról, hogy miként működik az aktív proteáz. Tudjuk azonban, hogy a komplement proteázok a vérben zimogén formában vannak jelen és csak megfelelő stimulus hatására aktiválódnak. Ez a folyamat a kaszkádrendszer indító lépésénél a legérdekesebb, ahol nem egy másik proteáz aktiválja a proenzimet, hanem saját maga. A komplement proteázok közül a C1r, MASP-1 és MASP-2 rendelkezik autoaktivációs képességgel. Az *E. coli*-ban termeltetett és inklúziós testekből renaturált MASP-2 fragmentumok alacsony koncentrációban (~0,1  $\mu$ M) viszonylag hosszú ideig megőrzik egyláncú, zimogén szerkezetüket. Az autoaktiválódási folyamat akkor gyorsul fel, amikor a zimogén preparátumot betöményítjük. Ez egyértelműen arra utal, hogy az autoaktiválódás bimolekulás folyamat, vagyis két MASP-2 zimogén molekula találkozásakor az egyik képes elhasítani és ezzel aktiválni a másikat. Valószínűleg ez a mechanizmus érvényes a C1r és MASP-1 enzimekre is. Ez utóbbi két proteáz azonban olyan gyorsan autoaktiválódik, hogy rekombináns formában nem tudtuk előállítani a zimogén alakjukat. Az autoaktiválódási folyamat tanulmányozására a MASP-2 ideális objektumnak látszott, mivel már megelőzően is sokat vizsgáltuk és sok szerkezeti és funkcionális információhoz jutottunk. Alapfeltételezésünk az volt, hogy, bizonyos körülmények között, a zimogén forma is rendelkezik jól detektálható proteolitikus aktivitással. Az autoaktiválódás tanulmányozásához tehát a zimogén forma tulajdonságait kell tüzetesebben megvizsgálni.

Ezekhez a vizsgálatokhoz előállítottuk a MASP-2 CCP1-CCP2-SP fragmentumának R444Q mutánsát (Gál és mtsi., 2005). Mivel az aktiválódás során hasadó Arg<sup>444</sup>-Ile<sup>445</sup> kötés így Gln<sup>444</sup>-Ile<sup>445</sup> kötésre változott a P1 glutamin után a tripszin szerű proteázok nem képesek elhasítani a peptidkötést. Ezért a MASP-2 katalitikus fragmentumának ez a formája stabil, egyláncú zimogén, amely sem autoaktivációra nem képes, és más tripszinszerű szérum proteázok sem tudják elhasítani. Fontos, hogy a zimogén mutáns forma nagy koncentrációban, hosszú idejű inkubálás során (pl. kristályosítás) is megőrizze egyláncú szerkezetét. Az R444Q mutáns MASP-2 valóban nagyon stabilnak bizonyult, még 37°C-on történő 24 órás inkubálás során sem hasadt el. Ez egyben azt is bizonyítja, hogy a rekombináns MASP-2 preparátumunk nincs szennyezve egyéb (pl. *E. coli* eredetű) proteázokkal. Fontos volt azonban bebizonyítani, hogy az R444Q mutáción kívül ez a MASP-2 molekula teljesen olyan, mint a vad típusú zimogén. Ezt úgy mutattuk meg, hogy egy bakteriális eredetű metallo proteázzal, a termolizinnel, megfelelő körülmények között, sikerült specifikusan elhasítani a Gln<sup>444</sup>-Ile<sup>445</sup> kötetést. A termolizinnel hasított MASP-2 R444Q mutáns redukáló körülmények között a vad típusú aktív MASP-2-vel azonos sávokat adott a poliakrilamid gélelektroforézis során (23. ábra) és a vad típusú enzimhez hasonló hatékonysággal hasított szintetikus és fehérje (C4) szubsztrátot (4. táblázat).

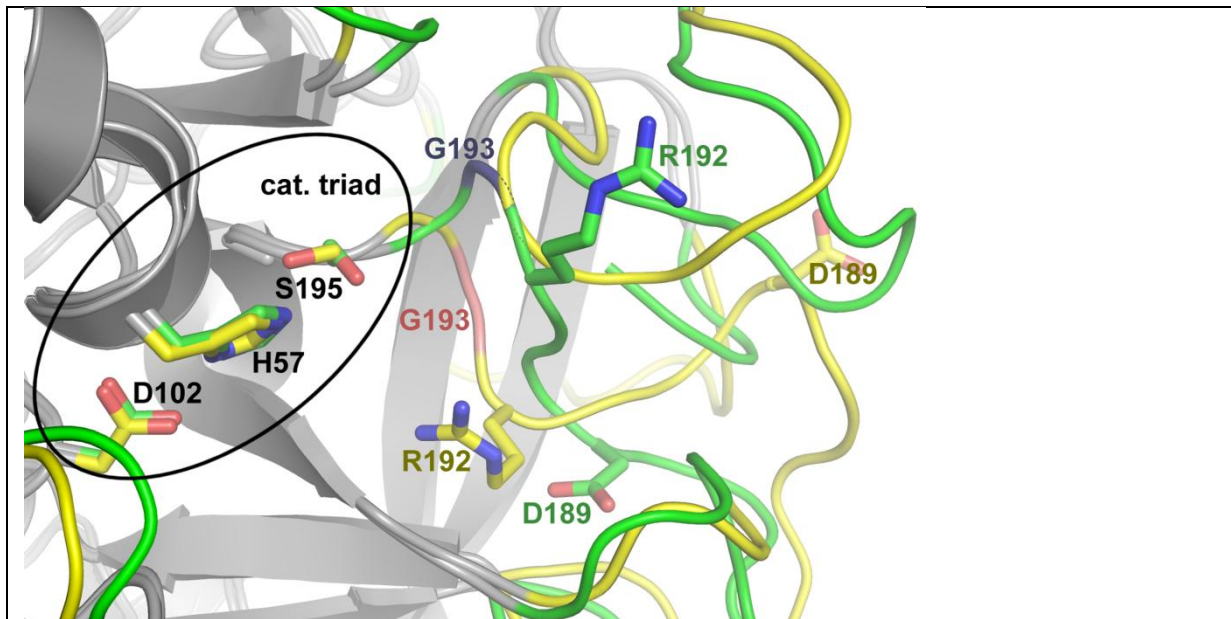


	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
	Z-Gly-Arg-S-Bzl	C4
<b>MASP-2 CCP1-CCP2-SP</b>	$9,40 \times 10^5 \pm 6,2 \times 10^4$	$5,50 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$
<b>MASP-2 CCP1-CCP2-SP R444Q aktivált<sup>a</sup></b>	$1,30 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^3$	$8,50 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^5$
<b>MASP-2 CCP1-CCP2-SP R444Q</b>	– <sup>b</sup>	$7,36 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$

**4. táblázat A vad típusú és R444Q mutáns MASP-2 fragmentumok katalitikus hatékonysága szintetikus és C4 szubsztráton**

<sup>a</sup> termolizines hasítással aktiválva; <sup>b</sup> A detektálási határ alatt

Sikerült a zimogén MASP-2 CCP1-CCP2-SP R444Q mutánst kristályosítani és meghatározni a szerkezetét 2,4 Å felbontásban (PDB kód: 1ZJK) (Gál és mtsi., 2005). A zimogén MASP-2 SP doménje a tripszinszerű szerin proteáz zimogének jellegzetességeit mutatja. A katalitikus triád (His<sup>483</sup>, Asp<sup>532</sup>, Ser<sup>633</sup>) (kimotripszin számozás a továbbiakban: c57, c102, c195) konformációja nagyon hasonlít az aktív enzimben lévő konformációhoz, azonban az oxianionkötő zseb és a szubsztrátkötő zseb erősen torzultak (24. ábra). Az S1 Asp<sup>627</sup> (c189), ami az aktív enzimben a kötőzseb alján helyezkedik el, a zimogén MASP-2 szerkezetben a molekula felszínére fordult ki. Az S1 zseb bejárata egyébként is blokkolva van az Arg<sup>630</sup> (c192) oldallánc által, ami elektrosztatikus kölcsönhatás révén akadályozná egy P1 argininnel vagy lizinnel rendelkező szubsztrát kötését. Térszerkezete alapján tehát a zimogén MASP-2 molekula teljesen alkalmatlan arra, hogy bármilyen szubsztrátot megkössön, és azt elhasítsa.



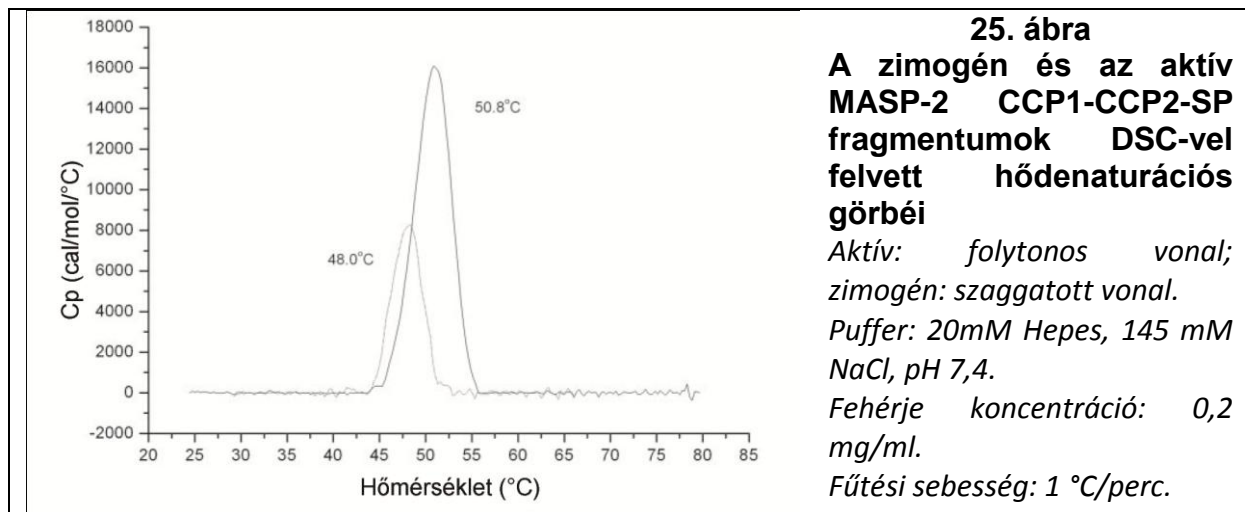
24. ábra

### A zimogén és az aktív MASP-2 szerkezetének összehasonlítása

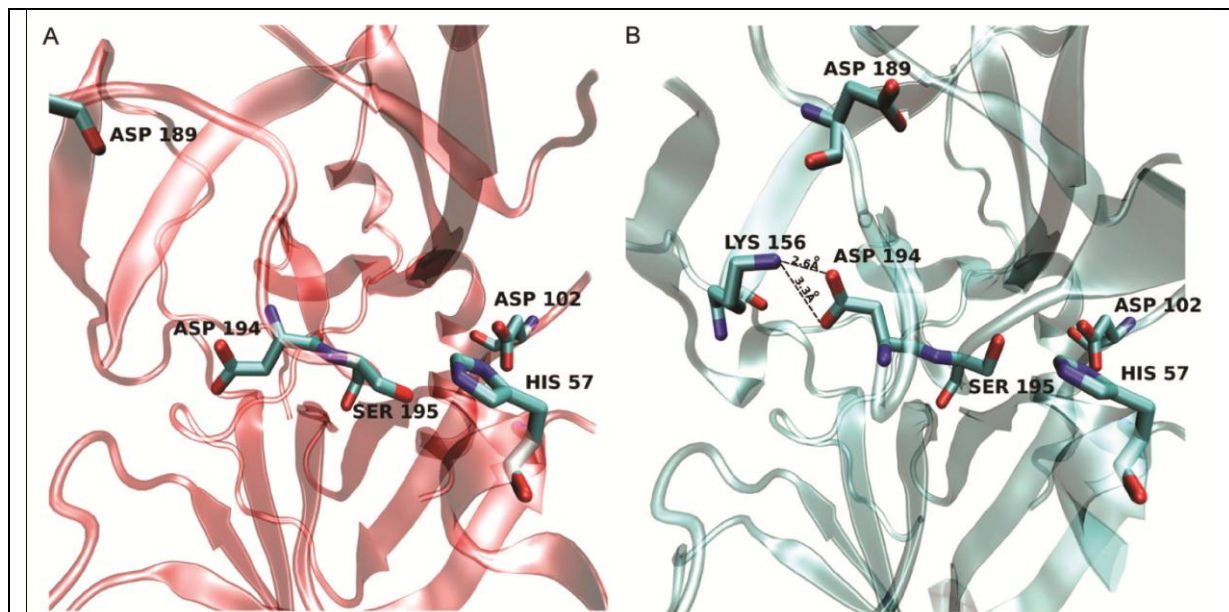
Egymásra illesztettük a zimogén és az aktív MASP-2 szerkezetét az aktív centrum környezetében. A zimogén szerkezetet sárga, míg az aktív szerkezetet zöld színnel jelöltük. A mindkét formában azonos szerkezeti elemek szürke színűek. Az oxianionkötő zseb (Gly<sup>193</sup> környezete) az aktív formánál sötétkék, míg a zimogénnél rózsaszínnel van jelölve. Az ábrán a kimotripszin számozást használom.

Szintén tipikus jellegzetesség az, hogy a zimogén forma szerkezete lazább, flexibilisebb, mint az aktív enzimé. A Huber és Bode (1978) által a tripszinszerű proteázokra definiált aktivációs domén, amely magában foglalja az aktivációs peptidet és három felszíni hurokrégiót (1, 2 és D), a szerkezetben kisebb elektronsűrűséggel és magasabb B-faktorral rendelkezik. A tripszinszerű enzimek zimogén formái metastabil szerkezettel rendelkeznek. Az aktivációs peptid hasadása után az aktivációs domén stabilabb szerkezetbe rendeződik, minek során az új N-terminális bekötődik az aktivációs peptid által a zimogénben fedett árokba és kialakul egy sóhíd az N-terminális Ile protonált aminocsoportja és egy konzervált aszparaginsav (Asp<sup>194</sup> tripszin, Asp<sup>632</sup> MASP-2) között. A zimogén MASP-2 szerkezetet összehasonlítva az aktív enzim szerkezetével további jelentős konformáció változásokra is fény derült: a 3-as hurok és a szubsztrátkötő zseb kialakításához hozzájáruló A, B és C-hurokrégiók helyzete szintén változik aktiváció során. Ezeknek a hurokrégióknak a szerkezete általában változatlan marad a tripszinszerű enzimek aktiválódása során, de a C1r autoaktiválódása során szintén változik. Valószínű, hogy az autoaktivációs képességgel rendelkező szerin proteázok a „normál” szerin proteázokénál flexibilisebb szerkezettel rendelkeznek és ez a flexibilitás döntő fontosságú az autoaktiválódás szempontjából. Az autoaktiválódási folyamat csak úgy képzelhető el, ha az inaktív, egyláncú zimogén forma tranziens jelleggel fel tudja venni az aktív enzimre jellemző konformációt. Ehhez pedig extra flexibilitásra van szükség. A klasszikus aktivációs domént tehát kiegészíthetjük az A, B, C és 3-as hurokrégiókkal és definiálhatjuk az ún. „autoaktivációs domént”. A zimogén forma metastabil állapotát

bizonyítják a DSC mérések is (25. ábra). Az aktív forma olvadáspontja 50,8°C, ami 2,6°C-kal magasabb, mint a zimogéné. A nagyobb kalorimetriás entalpiaváltozás szintén stabilabb szerkezetre utal az aktív enzim esetében.



A zimogén (R444Q) MASP-2 CCP1-CCP2-SP kisméretű szintetikus szubsztráton (Z-Gly-Arg-S-Bzl) nem mutat mérhető proteolitikus aktivitást. Ez teljesen összhangban van a kristályszerkezetével, ami, mint láttuk, egy inaktív térszerkezetet mutat. A nagyméretű C4 fehérjeszubsztráttal szemben a zimogén azonban meglepően aktív enzimeként viselkedik (4. táblázat). A C4 hasítás MASP-2 specifikus voltát az is megerősítette, hogy C1-inhibitor alkalmazásával sikerült azt teljesen meggátolni. Ezzel egyértelműen sikerült igazolni alapfeltételezésünket, vagyis azt, hogy bizonyos körülmények között a MASP-2 zimogén formája aktív enzimeként viselkedhet. A MASP-2 zimogenezitása, vagyis az aktív enzim és a zimogén forma katalitikus hatékonyságának ( $k_{cat}/K_M$ ) a hányadosa (Madison és mtsi., 1993), a C4 szubsztrát esetében igen kicsi ( $\sim 8$ ), míg a szintetikus szubsztráttal mérve gyakorlatilag végtelen nagy. A zimogenezitás definíciója tehát csak akkor egyértelmű, ha azt is megadjuk, hogy milyen szubsztrátra mérjük. A zimogenezitást általában szintetikus szubsztrátra szokták megadni. Tripszin esetében ez az érték igen nagy ( $\sim 10^7$ ), a XIIa faktorra  $\sim 4000$ , míg a szöveti típusú plazminogén aktivátornak (tPA) szintetikus szubsztráttal szemben is meglepően kicsi a zimogenezitása ( $\sim 5-10$ ). A tPA zimogén kristályszerkezete azonban, eltérően a MASP-2 zimogénétől, aktív szerű konformációt mutat (PDB kód: 1BDA) (Renatus és mtsi. 1997). Ez azáltal lehetséges, hogy az enzim egyláncú formájában egy pozitív töltésű aminosav oldallánc (Lys<sup>156</sup>) veszi át a kétláncú formában jelenlévő „új” N-terminális szerepét és sóhidat képez az Asp<sup>194</sup>-gyel (26. ábra), stabilizálva ezzel az aktív enzimekre jellemző konformációt. A MASP-2 zimogén szerkezetében azonban semmi ehhez hasonló jelenséget nem detektáltunk, az alacsony zimogenezitás oka tehát másban keresendő.



26. ábra

### A zimogén MASP-2 (A) és a tPA (B) szerkezetének az összehasonlítása

Az egyláncú tPA proteolitikusan aktív konformációjának a stabilitását a Lys<sup>156</sup> és az Asp<sup>194</sup> között kialakuló belső sóhíd stabilizálja. A MASP-2 esetében nincs ehhez hasonló kölcsönhatás az „üres” enzim szerkezetében. A zimogén MASP-2 aktív konformációja csak a fehérjeszubsztráttal való kölcsönhatás során stabilizálódik.

Kézenfekvőnek látszik az a feltételezés, hogy a MASP-2 zimogén esetében az aktív konformációt a nagyméretű fehérjeszubsztrát stabilizálja. Mint láttuk a zimogén MASP-2 molekulának meglehetősen flexibilis a térszerkezete. A MASP-2 zimogén valószínűleg spontán módon, konformációs fluktuációk révén, fel tudja venni az aktív enzimre jellemző térszerkezetet, azonban az egyensúly igen erősen el van tolva az inaktív forma irányába. Ezért nem tudunk aktivitást detektálni kismolekulás szintetikus szubsztráton. A szintetikus szubsztrát csak az aktív centrum közvetlen környezetével tud kölcsönhatásba lépni, ez pedig nem elég ahhoz, hogy a tranziens jelleggel létrejövő aktív konformációt stabilizálja. Ezzel szemben egy nagy fehérje szubsztrát, mint a C4, nagy kontaktfelületen (1800 Å<sup>2</sup>) keresztül kapcsolódik az aktív formához, ami már elegendő arra, hogy megakadályozza az inaktív formába való visszaalakulást. Ezzel kapcsolatban két nagyon fontos tényre kell figyelembe vennünk: 1.) a CCP domének térszerkezete nem változik az aktiválódás során, és 2.) a CCP domének kötőhelyet tartalmaznak a C4 C345C doménje számára. Ez pedig azt jelenti, hogy már a zimogén forma is képes a C4 kötésére. A MASP-2 zimogén a CCP domének keresztül megköti a C4-et, ezzel megnöveli a szubsztrát lokális koncentrációját az SP domén közelében, ami átmenetileg stabilizálódik az aktív konformációban és elhasítja az R-hurokrégiót. Ezt az elméletet támasztják alá az enzimkinetikai paraméterek is (5. táblázat).

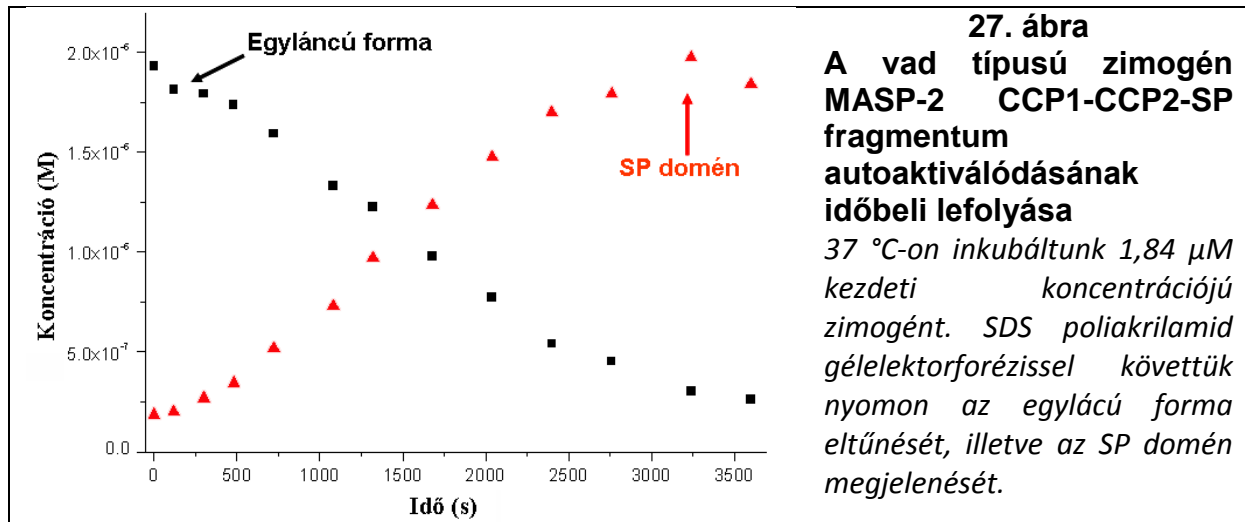
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_M$ (M)	$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
<b>MASP-2 CCP1-CCP2-SP</b>	0,90±0,4	1,60x10 <sup>-6</sup> ±5x10 <sup>-7</sup>	5,50x10 <sup>5</sup> ±5x10 <sup>4</sup>
<b>MASP-2 CCP1-CCP2-SP R444Q</b>	0,026±0,006	3,77x10 <sup>-7</sup> ±1,5x10 <sup>-7</sup>	7,36x10 <sup>4</sup> ±1,0x10 <sup>4</sup>

**5. táblázat Az aktív és a zimogén (R444Q mutáns) MASP-2 katalitikus fragmentum C4 hasításának kinetikai paraméterei**

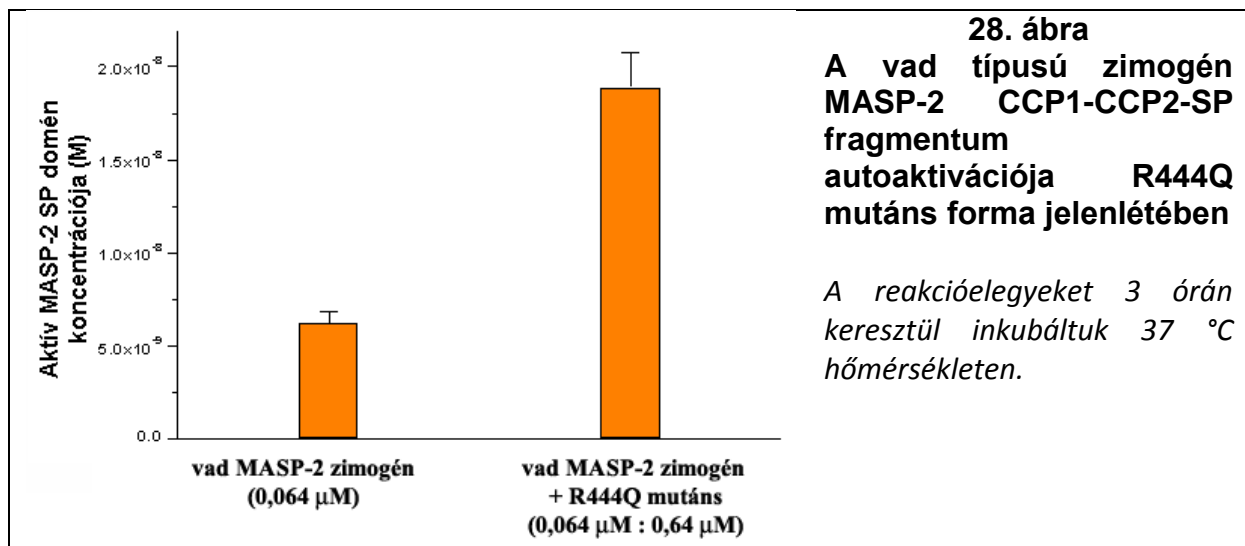
A  $K_M$  a zimogén esetében is rendkívül kis értéket vesz fel, ami erős enzim-szubsztrát kölcsönhatásra utal. A  $k_{\text{cat}}$  viszont csaknem két nagyságrenddel kisebb a zimogén esetében az aktív formához képest és ez az oka az alacsonyabb katalitikus hatékonyságnak. A magányos C4 és a C4-MASP-2 komplex szerkezetének összevetéséből az is kiderül, hogy a C345C megkötése a MASP-2 CCP modulok által olyan konformációváltozást indukál a C4 szerkezetében, ami stabilizálja az R-hurokrégiót, alkalmasabbá téve ezáltal a proteolitikus hasításra (Kidmose és mtsi., 2012). Vagyis a szubsztrát megkötése a külső kötőhelyen keresztül mind az enzim, mind pedig a szubsztrát esetében jelentős konformációváltozást okoz. Patkány eredetű MASP-2 zimogén és a C4 közötti kölcsönhatást analitikai ultracentrifugás kísérlettel is igazolták (Chen és Wallis, 2004). Az MBL-hez kapcsolódó zimogén MASP-2 azonban nem köt C4-et. Az MBL-MASP-2 komplexben tehát a CCP modulok nem férhetők hozzá a C4 számára, azok valószínűleg csak aktiválódáskor kerülnek a komplex felszínére. Ezért nem valószínű, hogy a C4 zimogén MASP-2 általi hasításának bármilyen fiziológiai jelentősége lenne, viszont a jelenség rendkívül szemléletesen példázza a zimogén MASP-2 proteolitikus aktivitását fehérje szubsztráttal szemben.

A zimogén proteolitikus aktivitása teszi lehetővé az autoaktiválódást is. Annak bizonyítására, hogy az R444Q zimogén mutáns képes MASP-2 szubsztrátot is hasítani, tanulmányoztuk a vad típusú MASP-2 autoaktivációját. Közvetlenül renaturáció után a vad típusú MASP-2 CCP1-CCP2-SP fragmentum még egyláncú formában van jelen, csak a tisztítási lépések során aktiválódik. Vad típusú zimogént úgy tudtunk preparálni, hogy a pH-t 5,5-re állítottuk és a kromatográfiás lépéseket 4°C-on végeztük. pH 5,5-ön a katalitikus triád hisztidinje protonálódik, így nem tudja katalitikus funkcióját ellátni. Az így preparált zimogén MASP-2 hosszú ideig stabil marad, viszont gyorsan felaktiválódik, ha a pH-t 7,5-re állítjuk ( $t_{1/2}$ =26 perc). Az aktiválódást gélen, az egyláncú forma eltűnésével, illetve a kétláncú forma megjelenésével követhetjük nyomon. A vad típusú MASP-2 aktivációs görbéje egy tipikus autoaktivációs folyamatot mutat (27. ábra).



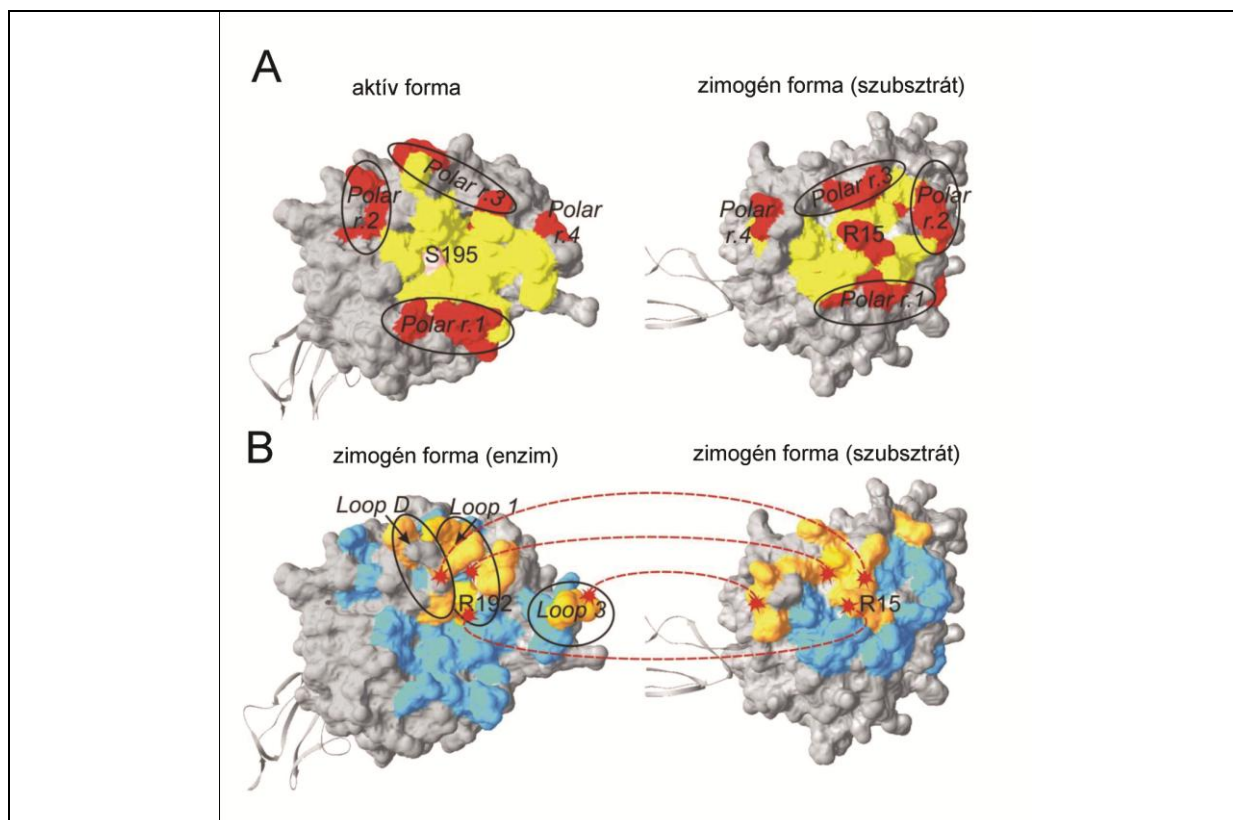


Az autoaktiváció első lépésében zimogén proteáz hasít zimogént. Ez egy lassú, erősen koncentrációfüggő folyamat. Ez megfeleltethető a szigmoid görbe első, alacsony meredekségű részének (lag fázis). A göbe exponenciális részében már az aktív MASP-2 proteázok hasítanak zimogén proteáz molekulákat. Ennek a második lépésnek a hatékonysága sokkal nagyobb, mint az elsőé. A zimogén MASP-2 proteolitikus aktivitásának demonstrálására az autokativálódási folyamat elején 10-szeres moláris feleslegben R444Q mutánst adtunk a rendszerhez. Az alacsony koncentrációban (0,07  $\mu\text{M}$ ) jelen lévő, és önmagában csak lassan autoaktiválódó vad típusú MASP-2 aktiválódási sebessége csaknem megháromszorozódott a zimogén MASP-2 hatására (28. ábra). Ne felejtjük el, hogy az R444Q mutáns hasítani ugyan tud, de önmaga nem hasítható, ezért csak az első lépésben tud részt venni.



A fenti kísérlet egyértelműen bizonyította, hogy a zimogén MASP-2 képes zimogén MASP-2-t hasítani és ez a folyamat az autoaktiválódás kulcsa. A rendelkezésünkre álló zimogén és aktív MASP-2 CCP1-CCP2-SP szerkezeteket felhasználva molekuláris szinten

modelleztük az autoaktiválódási folyamatot. Az aktív MASP-2 szubsztrátkötő régiójába dokkolással beillesztettük a zimogén MASP-2 SP doménjét. A MASP-2/MASP-2 zimogén komplex szerkezeti modell kiterjedt kontaktfelületet (1500-1600 Å<sup>2</sup>) jósol a két molekula között (29. ábra). Az S1-P1 sóhid közvetlen környezetét hidrofób kölcsönhatások stabilizálják, míg a kötő régió határán négy töltött és poláros aminosavakból álló régió elektrosztatikus kölcsönhatásokkal járul hozzá a komplex összetartásához. Ha a modellben az aktív MASP-2 molekulát is zimogénre cseréljük, a kedvező kölcsönhatások nagy része továbbra is fennmarad, de kedvezőtlen, taszító jellegű kölcsönhatások is megjelennek, azoknak a régióknak a részvételével, amelyeknek el kell mozdulniuk az aktív konformáció kialakulásához. Az egyik ilyen taszító kölcsönhatás a szubsztrát P1 argininje és az enzym szubsztrátkötő zsebét leárnyékoló Arg<sup>630</sup> között alakul ki. Lehetséges azonban, hogy éppen ez az a taszító kölcsönhatás, ami indukálja a zimogén enzimben az aktív konformáció kialakulását az 1-es hurokrégió elmozdulása révén hozzájárulva az oxianionkötő zseb és a szubsztrátkötő zseb kialakulásához.



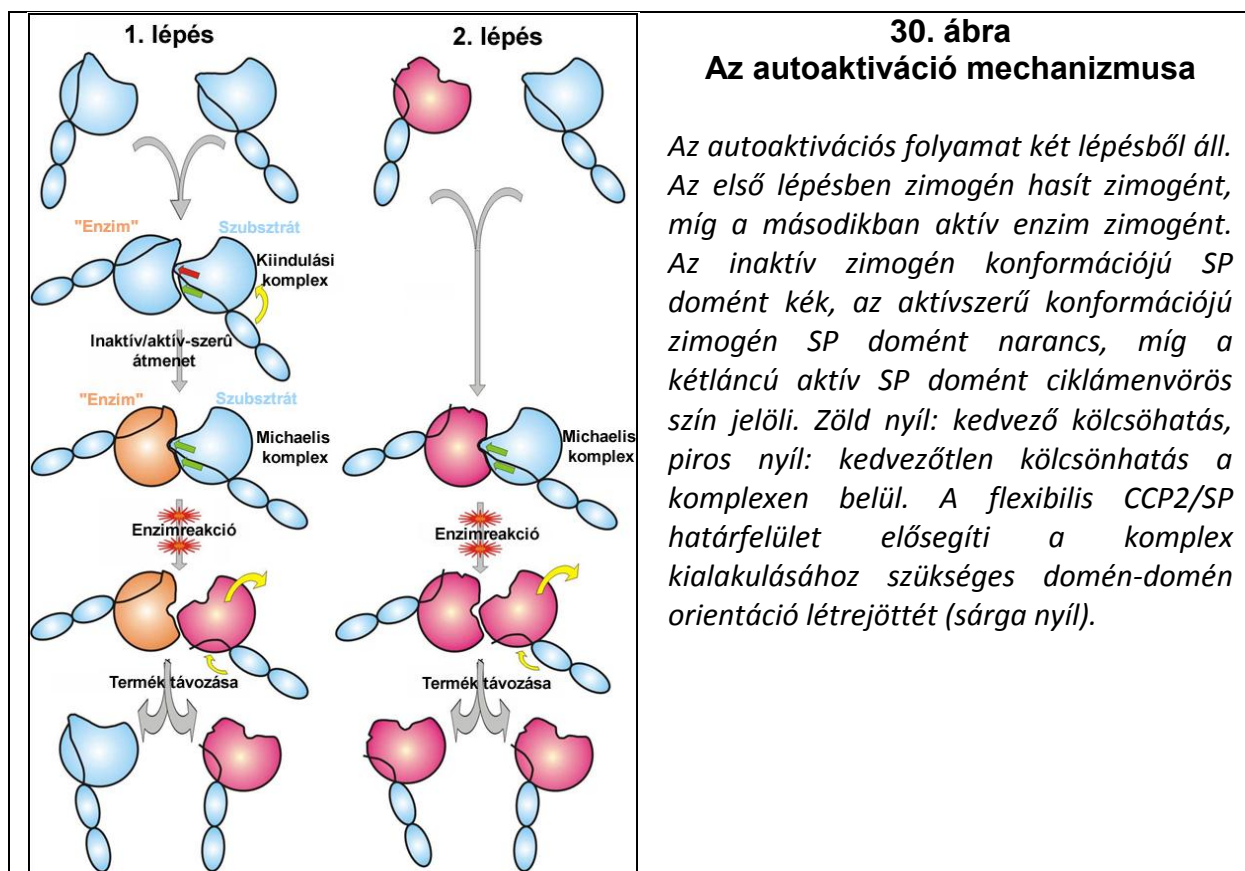
29. ábra

### A MASP-2 enzim-szubsztrát komplexek modellje (az ábrákon szétnyitott komplex látható)

(A) Az aktív proteáz és a zimogén enzim között kialakuló komplex. A hidrofób kölcsönható felületet sárga színnel, míg a polárosokat piros színnel jelöltük.

(B) Két zimogén molekula között kialakuló enzim-szubsztrát komplex. A kedvező kölcsönhatásokat kék színnel, míg a kedvezőtleneket narancsszínnel jelöltük. A piros nyilak az enzim szerepét játszó molekula aktivációs doménjében található hurokrégiókra (loop) ható taszító kölcsönhatásokat reprezentálják.

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy az autoaktiválódás két lépésből áll (30. ábra). Az első lépésben két zimogén molekula találkozik, és az egyik elhasítja a másikat. Az autoaktivációs domén nagyfokú flexibilitása révén az egyik MASP-2 zimogén molekula (az „enzim”) képes felvenni az aktív enzimre jellemző konformációt. Ezt a folyamatot segítik, illetve az aktív szerkezetet stabilizálják azok a kedvező kölcsönhatások, amelyek az „enzim” és a „szubsztrát” zimogén MASP-2 molekulák között alakulnak ki. Az aktivációs peptid elhasadása után a szubsztrát MASP-2 molekula aktív enzimmé válik, és a komplex szétesik. Az autoaktivációs folyamat második, gyors lépésében az előzőekben keletkezett aktív enzim hasít zimogén molekulákat, ami a folyamat nagymértékű felgyorsulásához vezet.



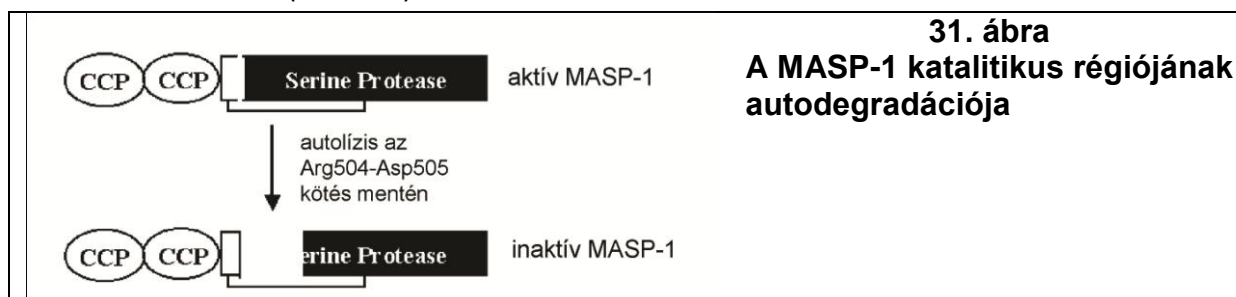
Úgy gondolom, hogy ez a mechanizmus nem csak a MASP-2-re, hanem a többi autoaktivációra képes proteázra (C1r, MASP-1) is érvényes. Az autoaktivációs folyamat első lépésénél nagyon fontos, hogy a zimogén molekulák megfelelő orientációban találkozzanak. A C4 molekula zimogén MASP-2 általi hasításánál láttuk, hogy a nemkatalitikus CCP moduloknak a szubsztrát megkötésében és orientálásában mekkora szerepe van. Ebben a tekintetben mindenképpen figyelembe kell venni, hogy fiziológias körülmények között az autoaktiváció nem oldatfázisban, hanem a felismerő komplexeken belül, esetleg az MBL-MASP komplexek esetében, az aktivációs felszínre lekötött komplexek között megy végbe. A komplexekben a proteázok a felismerő molekulák kollagén szárjaihoz vannak rögzítve, ezért

az SP domének lokális koncentrációja sokkal nagyobb, mint oldatfázisban lenne. A mintázatfelismerő molekulák egyrészt az aktivációs felszínhez kötik a komplexet, másrészt kedvező körülményeket biztosítanak az autoaktiváció számára. A komplexeken belül, a nemkatalitikus domének segítségével, az SP domének könnyebben találkozhatnak megfelelő orientációban az autoaktiválódás során, mint a felismerő molekulák nélkül, oldatfázisban.

## 6.2.2 MASP-1

### 6.2.2.1 A MASP-1 széles specificitású proteáz, sok tulajdonságában a trombinra emlékeztet

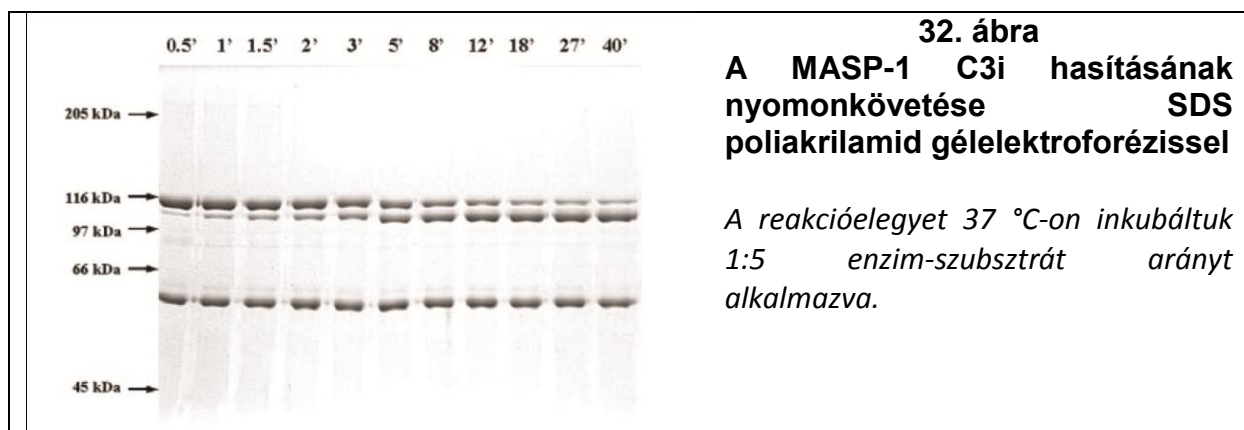
A MASP-1 tanulmányozását rendkívül megnehezítette, hogy szérumból nehezen tisztítható és rekombináns formában való termeltetése is problémás, mert a vad típusú MASP-1 a legtöbb gazdasejtet elpusztítja. Ideális megoldás ezért *E. coliban*, inklúziós testek formájában kifejezni ezt a fehérjét, mivel proteolitikus aktivitása csak a renaturálási procedúra után, *in vitro* körülmények között jelenik meg. Mint azt már korábban említettem, a MASP-1 katalitikus fragmentuma (CCP1-CCP2-SP) renaturáció során autokativálódik, ami az aktivációs peptid Arg<sup>448</sup>-Ile<sup>449</sup> kötésének a hasadásával jár. Huzamosabb inkubálás, hosszabb tárolás során autolitikus folyamat következtében egy újabb kötés, az Arg<sup>504</sup>-Asp<sup>505</sup>, is elhasad az SP doménon belül. Az Ile<sup>449</sup>-Arg<sup>504</sup> fragmentum tartalmazza a katalitikus triád hisztidinjét (His<sup>490</sup>), ezért ennek a peptidszakasznak a disszociációja a proteolitikus aktivitás elvesztéséhez vezet (31. ábra).



Az autolitikus hasítás következményeként jelenik meg az SDS poliakrilamid gélelektroforézis során egy extra csík a MASP-1 preparátumokban (redukáló körülmények között 24 kDa, nemredukáló körülmények között 39 kDa) (17. ábra a/1 és b/1 sávok). A többi korai komplement proteáz (C1r, C1s, MASP-2) nem hajlamos ilyen mértékben az autólízisre. Ez a tény is jelzi, hogy, mint azt később részletesebben is látni fogjuk, a MASP-1 proteolitikus tulajdonságaiban (aktivitás, szubsztrátspecificitás) jelentősen különbözik a rokon enzimektől.

A MASP-2 felfedezése után nyilvánvalóvá vált, hogy a C3-konvertáz (C4b2a) képzési képesség, amit addig a MASP-1-nek tulajdonítottak, a MASP-1 preparátumok MASP-2 szennyezésének volt köszönhető. Mint kiderült, a MASP-1 nem képes C4-et hasítani, ezért egyedül nem tudja beindítani a komplement kaskádját. A MASP-1-et felfedező japán kutató azonban nem nyugodott bele, hogy fehérjéjét „lefokozzák”, és azzal a meglepő, de mint látni fogjuk nem túl megalapozott feltételezéssel állt elő, hogy a MASP-1 közvetlenül is képes C3-t

hasítani (Matsushita és Fujita, 1995; Matsushita és mtsi., 2000). Ezzel rövidre zárta a dolgot, hiszen így nincs szükség C4 és C2 hasításra, a MASP-1 önmagában is egyféle C3-konvertázként működik. Erre a bizonyíték egy SDS PAGE volt, amin MASP-1-gyel inkubált (37°C, 1h), és részben hasadt C3 volt látható. A szóban forgó publikációból nem derül ki a reakcióban használt MASP-1 pontos mennyisége (koncentrációja) és enzimkinetikai paramétereiket sem határoztak meg. A kísérletet más laboratóriumok is megismételték és meglehetősen eltérő eredményeket kaptak. Voltak, akik igen hatékony C3 hasítást detektáltak, míg mások gyakorlatilag egyáltalán nem tudták reprodukálni a japán kutatók eredményeit. A kutatói társadalom két részre szakadt, C3 hasítás hívőkre és ellenzőkre. A hívők szerint a MASP-1, ugyan nem túl nagy, C3 hasítási képessége arra mindenképpen elegendő, hogy annyi C3b keletkezzék, amennyi beindítja az alternatív utat. Az ellenzők szerint viszont a C3 nem fiziológiás szubsztrátja a MASP-1-nek. Mivel laboratóriumunkban rendelkezésünkre állt tiszta, ismert koncentrációjú rekombináns MASP-1 és MASP-2, elhatároztuk, hogy tisztázzuk ezt a fontos kérdést (Ambrus és mtsi., 2003). Ennél a kísérletnél azonban nem csak az enzim, hanem a szubsztrát minősége is rendkívül fontos. Tudjuk, hogy a C3 egy labilis tioészter kötést tartalmaz a molekula belsejében, ami normál esetben csak a C3a fragmentum lehasadásakor kerül a felszínre és reagál nukleofilekkel, azonban nagyon lassan, spontán módon is elhidrolizálhat (tick over). Ezért a kísérleteinknél egyrészt szérumból frissen preparált C3-at használtunk, aminek a minőségét I-faktorral való hasítással, H-kofaktor jelenlétében, ellenőriztük és csak akkor használtuk, ha az ép C3 mennyisége legalább 95% volt. Előállítottuk a C3 tioészter hasított változatát is, ahol nukleofilként ammóniát használtunk. A C3 preparátumot 90 percig inkubáltuk 0,2 M ammónium-hidrogén-karbonát oldatban 37°C-on (pH=8,0). Ilyen körülmények között a tioészter kötések teljesen elreagálnak az ammóniával és C3(NH<sub>3</sub>) keletkezik. Méréseink szerint a C3 tioészter hasított formáját (C3(NH<sub>3</sub>)) a MASP-1 lassan, de jól mérhetően hasítja ( $k_{cat}/K_M = 6100 \pm 600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (32. ábra), míg az intakt C3-mal szemben egy nagyságrenddel kisebb az aktivitása ( $k_{cat}/K_M = 300 \pm 30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).



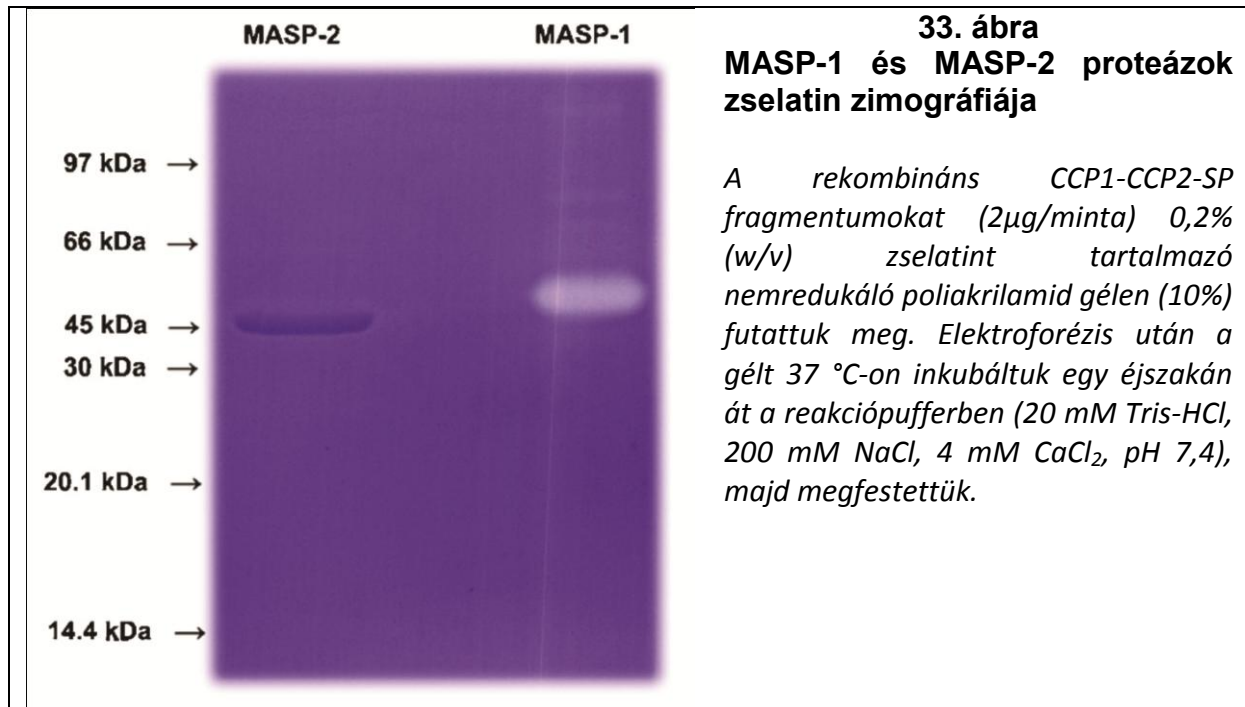
Különösen kicsiknek tűnik ez az aktivitás, ha egy valódi C3-konvertáz, a C3bBb katalitikus hatékonyságával vetjük össze ( $k_{cat}/K_M = 310000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A specificitási konstansok közötti három nagyságrendbeli különbség jól mutatja, hogy a MASP-1 nem működik hatékony C3-

konvertázként. Az intakt C3-mal szemben mutatott kis aktivitás valószínűleg annak a következménye, hogy a C3 lassan hidrolizál és mi tulajdonképpen a hidrolízis sebességét mérjük, vagyis a MASP-1 az intakt C3 molekulát egyáltalán nem képes hasítani, tehát a mért reakciónak nincs fiziológias következménye. Hogy a reakció mennyire nem MASP-1 specifikus az is mutatja, hogy hasonló hatékonysággal, és valószínűleg hasonló mechanizmussal, a MASP-2 is képes C3 komponenst hasítani ( $k_{cat}/K_M = 350 \pm 20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Nyilvánvalóvá vált tehát, hogy az eltéréseket a különböző laboratóriumok mérési eredményei között az okozta, hogy a MASP-1 preparátumok és főleg a szubsztrátként használt C3 preparátumok minősége eltérő volt. Egy régebben készített (esetleg vásárolt) és hosszabb ideig tárolt C3 mintában jóval több C3(H<sub>2</sub>O) van, mint egy frissen preparáltban. Akik ilyen szubsztrátot használtak, azok jóval nagyobb hasadást detektáltak, mint akik frissen preparáltak C3 fehérjét szérumból. Ezek alapján kimondhatjuk, hogy a C3 nem fiziológias szubsztrátja a MASP-1-nek. Ugyan kísérletünk bizonyító erejű volt, a C3 hasítás hívei még sokáig próbálták védelmezni elméletüket. Következtetésünk helyességét évekkal később a MASP-2 knock-out egerek szérumával végzett kísérletek is teljes mértékben alátámasztották. Ezekben az egerekben ugyanis nem detektálható lektin út aktivitás, holott szérumuk ugyanolyan mennyiségben tartalmaz MASP-1-et, mint a vad típusú egéré (Schwaeble és mtsi., 2011). Ha a MASP-1 önálló C3-konvertázként működne, akkor a MASP-2 knock-out egerek szérumában is működnie kellene a lektin útnak.

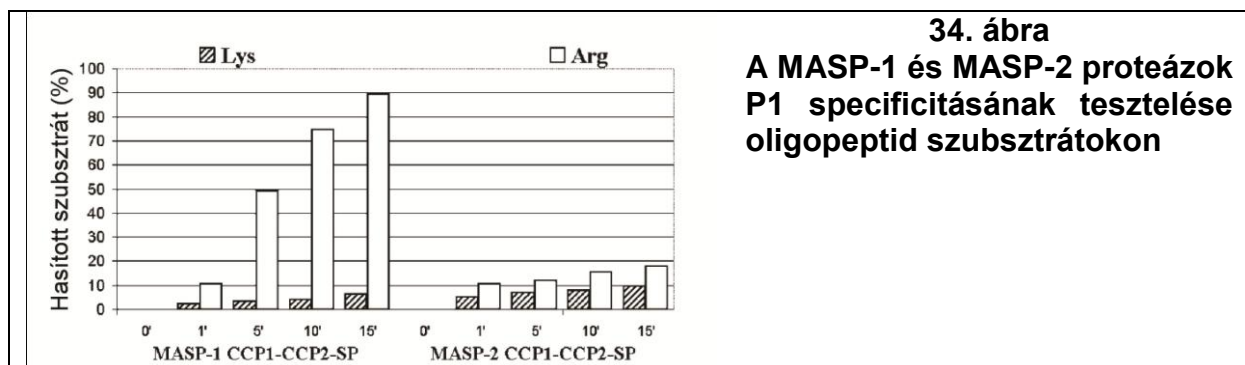
Rekombináns MASP-1 fragmentumunkkal végzett kísérleteink azt is megerősítették, hogy a MASP-1 nem képes számottevő mértékben C4-et hasítani ( $k_{cat}/K_M = 690 \pm 400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A mért kis proteolitikus aktivitás ebben az esetben is - hasonlóan a C3-hoz - valószínűleg a hidrolizált C4 hasításának a következménye. A C2 az egyetlen komplement komponens, amivel a MASP-1 viszonylag hatékonyan reagál ( $k_{cat}/K_M = 30000 \pm 12000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A C2-t ugyan a MASP-2 CCP1-CCP2-SP fragmentum sokkal jobban hasítja ( $k_{cat}/K_M = 500000 \pm 9000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), ha azonban figyelembe vesszük, hogy a MASP-1 koncentrációja a vérben csaknem harmincszorosa a MASP-2 koncentrációjának, akkor valószínűsíthető, hogy a C2 MASP-1 általi hasításának fiziológiai jelentősége lehet. A lektin út aktiválódása során csak a MASP-2 képes számottevő mértékben C4-et hasítani. Azonban a C3-konvertáz másik komponensét, a C2-t már mindkét proteáz hasítja, ezért ez a folyamat nagyon hatékonyan mehet végbe (Chen és Wallis, 2004; Moller-Kristensen és mtsi., 2007). Ez lehet az oka annak, hogy míg a lektin út aktiválódása során a felszínre lerakódó minden C4b molekula C3-konvertáz része lesz, addig a klasszikus út esetén csak minden negyedik (Rawal és mtsi., 2008). A MASP-1 általi C2 hasítást C1-inhibitorral és  $\alpha_2$ -makroglobulinnal is gátolni lehetett.

A MASP-1 és a többi rokon szerin proteáz (C1r, C1s, MASP-2) enzimatis aktivitása között az egyik legfeltűnőbb különbség az, hogy a MASP-1 szubsztrátspecifitása nem annyira szűk, mint általában a komplement proteázoké. Ennek egyik leglátványosabb bizonyítéka az, hogy a MASP-1 aktivitása detektálható zselatin zimográfiával (33. ábra), míg a MASP-2, C1r és C1s nem mutat ilyen aktivitás (Gál és mtsi., 2007). A zselatin zimográfia a tripszinszerű szerin proteázok kimutatásának egy nagyon érzékeny módszere, komplement proteázokra azonban általában nem működik azok szűk specificitása miatt. A MASP-1 lazább

szubsztrátspecifitását, mint azt a későbbiekben látni fogjuk, a kristályszerkezete is alátámasztotta, valamint az a tény, hogy az idők folyamán számos potenciális szubsztrátját azonosítottuk.

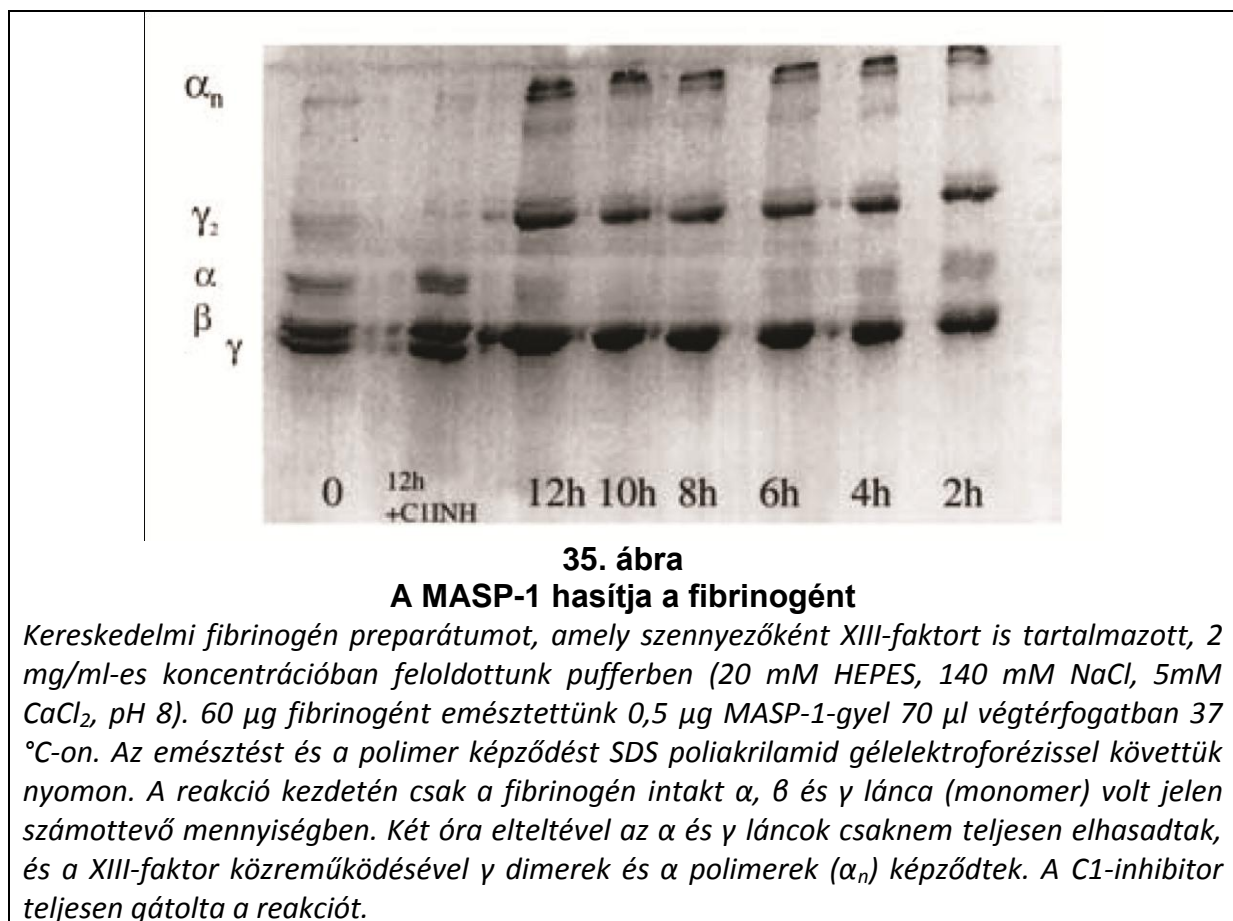


A MASP-1 és MASP-2 szubsztrátspecifitását oligopeptid szubsztrát könyvtár segítségével is vizsgáltuk (Ambrus és mtsi., 2003). A szubsztrát könyvtár 7 különböző, egyenként 13 tagú, oligopeptid keverékét tartalmazta (Antal és mtsi., 2001). Az oligopeptidok szekvenciája mindössze a P1 helyen különbözött: His-Ala-Ala-Pro-Xxx-Ser-Ala-Asp-Ile-Gln-Ile-Asp-Ile, ahol az Xxx aminosav Lys, Arg, Tyr, Leu, Phe, Trp, vagy prolin volt. Ebben a kísérletben tehát a proteázok P1 specifitását teszteltük. Az enzimeket az oligopeptid szubsztrátok keverékéhez adtuk, tehát a reakció során a proteázok kiválaszhatták a számukra legkedvezőbb szubsztrátokat. Nem meglepő módon a rekombináns MASP-1 és MASP-2 CCP1-CCP2-SP fragmentumok csak a P1 helyen lizint vagy arginint tartalmazó oligopeptideket hasították el (34. ábra).



Ebben nem különböznek a többitripszin szerű proteáztól. Feltűnő különbség van azonban a MASP-1 és MASP-2 között abban a tekintetben, hogy a MASP-1 erős preferenciát mutat a P1 helyen arginint tartalmazó szubsztrát iránt. 15 perc alatt a MASP-1 a szubsztrátkeveréből a P1 Arg szubsztrát 90%-át elhasítja, míg ugyanezen idő alatt a P1 Lys szubsztrátnak csak a 20%-át emészt. Hasonlóan extrém arginin szelektivitást ebben a rendszerben a trombin esetében mutattak ki korábban. A MASP-2 is P1 Arg preferenciát mutat, de korántsem olyan erőset, mint a MASP-1. A MASP-2 P1 Arg/Lys preferencia tekintetében inkább a tripszinhez hasonlítható.

A MASP-1 proteolitikus aktivitását teszteltük néhány szérumból tisztított enzim képes hasítani a trombin két fontos szubsztrátját: a fibrinogént és a XIII-faktort (plazma transzglutamináz). Ily módon a MASP-1 képes térhálós fibrinpolimer kialakítására (35. ábra).



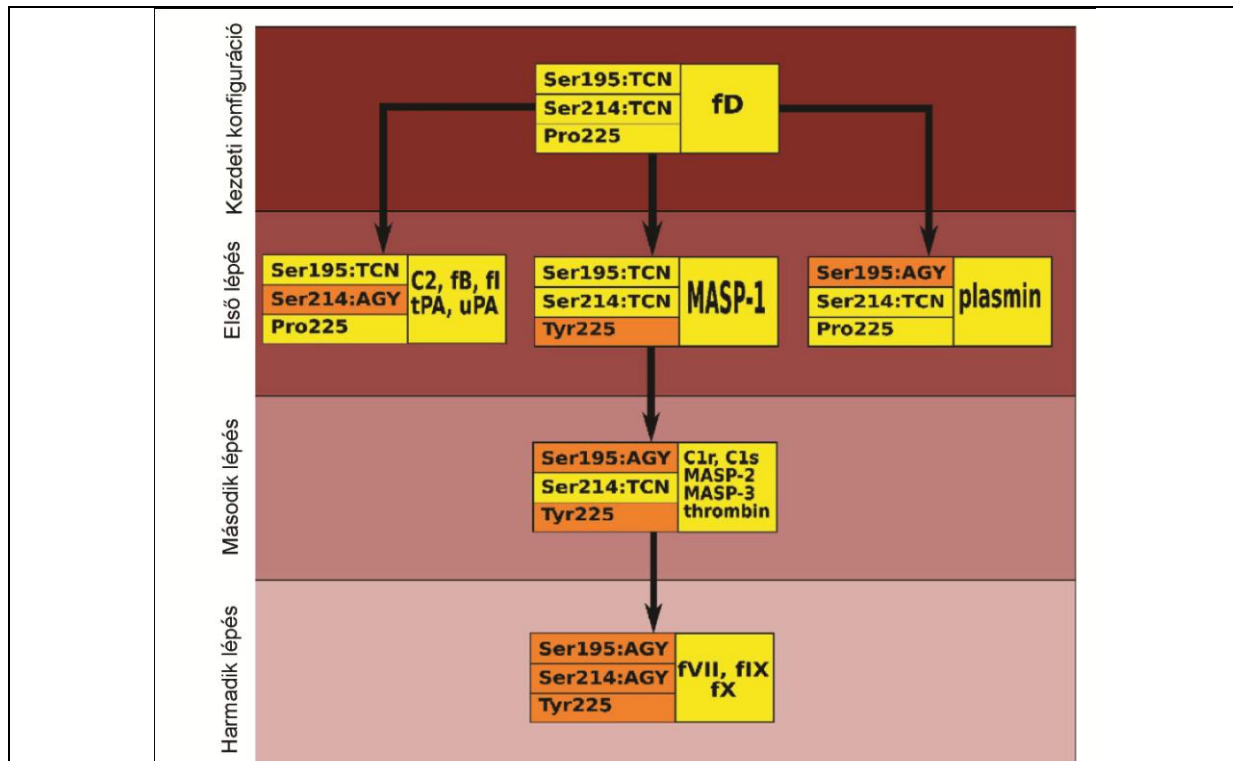
Ez összhangban van az oligopeptid szubsztrátkeverék emésztéséből levont következtetéssel, miszerint a MASP-1 egy trombinszerű specificitással rendelkező enzim. Specificitási konstanst a reakciókra nem határoztunk meg, de a MASP-1 lényegesen gyengébben emészt ezeket a szubsztrátokat, mint a trombin. Becslésünk szerint a MASP-1 aktivitása (turnover rate) ~650-ed része a trombinénak. A MASP-1 a fibrinogén emésztése során felszabadítja a proinflammatorikus tulajdonsággal rendelkező fibrinopeptid B-t. A véralvadás és a



komplementrendszer között sok kapcsolatot tártak fel. A két rendszer kölcsönösen képes aktiválni egymást. Egy publikáció szerint a C3 knock out egerekben is elhasad a C5, és ez közvetlenül vagy közvetve a trombin aktivitásának köszönhető (Huber-Lang és mtsi., 2006). A MASP-2-ről pedig azt mutattuk ki, hogy képes aktiválni a protrombint és ezzel lokális koagulációt indukálni a baktériumsejt felszínén (Krarup és mtsi., 2007). Ha tehát a komplementrendszer lektin útja aktiválódik, akkor az a véralvadási kaszkádra is hatással van. Ezzel kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy a lokális koaguláció a természetes immunitás egyik ősi mechanizmusa (Delvaeye és Conway, 2009; Zhu és mtsi., 2005). A fertőző mikroorganizmusok szervezetben belül való elterjedését megakadályozza, hogyha körülötte térhálós polimer képződik. Ez a mechanizmus jól ismert az atlanti tőrfarkú rák (*Limulus polyphemus*) esetében, ahol a fertőző mikroorganizmus behatolása a hemolimfába a fibrinnel homológ koagulogén polimerizációját váltja ki. A folyamatban résztvevő C-faktor és G-faktor a gerinces komplement és véralvadási proteázokhoz hasonló multidomén enzimek (Gaboriaud és mtsi., 1998; Muta és mtsi., 1991). A tőrfarkú rák szintjén a véralvadási és az immunológia funkciók szétválaszthatatlanok. Valószínű, hogy a modern véralvadási és komplementrendszer egy ősi kaszkádrendszerből fejlődött ki. A MASP-1 egy összekötő kapocs a két rendszer között és lehetséges, hogy a koagulációs folyamatokra is hatással van. Erre vonatkozóan az utóbbi időben egyre több publikáció lát napvilágot (Gulla és mtsi., 2009; Takahashi és mtsi., 2011; La Bonte és mtsi., 2012; Hess és mtsi., 2012). Ha evolúciós szempontból vizsgáljuk a komplement proteázokat, kiderül, hogy a MASP-1 egy ősi állapotot képvisel, mint a rokon C1r, C1s, MASP-2 és MASP-3.

Krem és Di Cera (2001; 2002) három markert javasolnak a tripszinszerű szerin proteázok evolúciós státuszának jellemzésére. A marker konfigurációk alapján rekonstruálhatjuk a proteázok valószínű evolúciós kronológiáját és jobban megérthetjük a különböző kaszkádrendszerek kialakulását és a köztük lévő kapcsolatokat. Mindhárom marker a katalitikus apparátus kialakításában résztvevő konzervatív aminosav, amelyeknek két állapota, egy ősi és egy modern, lehet. Az egyik ilyen marker a katalitikus szerin (Ser<sup>195</sup>), a másik pedig a szintén nagyon konzervatív Ser<sup>214</sup>. Ez utóbbi a katalitikus triád Asp<sup>102</sup> aminosavának helyzetét stabilizálja. A markerek ősi változatában a szerint TCN (N = bármilyen bázis) triplet kódolja a DNS-ben, a modern változatban viszont AGY (Y = C vagy T) a kódon. A harmadik marker a 225-ös pozícióban található, és az ősi változatban prolin, a modernben pedig tirozin. A Tyr<sup>225</sup> tartalmú szerin proteázok Na<sup>+</sup> ionnal allosztérikusan aktiválhatók, míg a Pro<sup>225</sup> markerrel rendelkező proteázok nem kötnek nátriumot. A legősibb marker konfiguráció tehát a Ser<sup>195</sup> (TCN)/ Ser<sup>214</sup> (TCN)/ Pro<sup>225</sup>; a legmodernebb pedig a Ser<sup>195</sup> (AGY)/ Ser<sup>214</sup> (AGY)/ Tyr<sup>225</sup>. A szerin proteázok ezen markerek alapján elméletileg nyolc kategóriába sorolhatók. A kaszkádrendszerek proteázainak ilyen besorolása, és még néhány egyéb megfontolás alapján Krem és Di Cera arra a következtetésre jutottak, hogy a korai evolúciós állapotot egyetlen ősi kaszkádrendszer jellemezte, amely, mint azt a tőrfarkú rák példáján is láttuk, elsősorban immunológiai funkciót látott el. A törzsfajlás során később jobban szétváltak a különböző kaszkádrendszerek, és a modern véralvadási kaszkád a természetes immunitás egyfajta „melléktermékének” tekinthető. Ha a Di Cera féle

osztályozást alkalmazzuk a komplement proenzimekre és összehasonlítjuk őket a véralvadás és a fibrinolízis enzimeivel, kiderül, hogy a MASP-1 az egyik legősibb komplement proteáz (Gál és mtsi., 2007) (36. ábra).



36. ábra

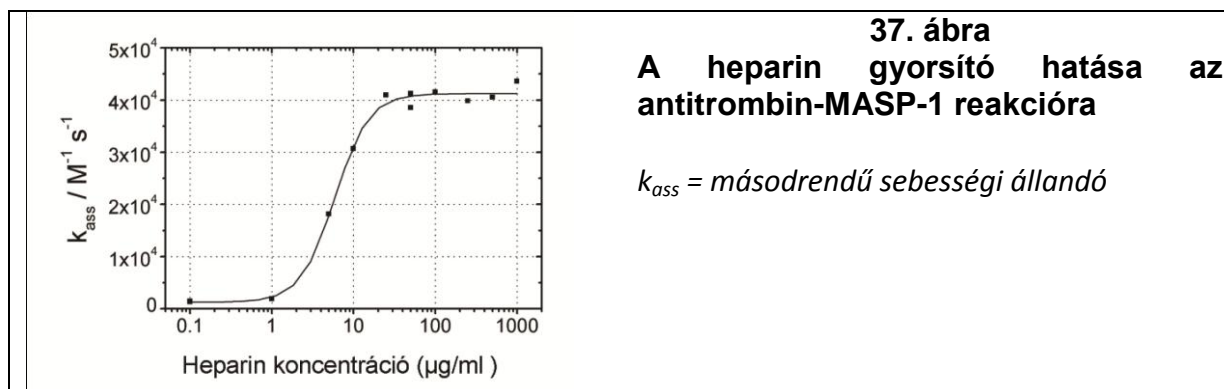
**A komplement, a véralvadási és a fibrinolitikus kaszkád proteázainak evolúciós státusza a Krem és Di Cera által javasolt markerek alapján**

*fX = X-faktor (pl. fD = D-faktor), tPA = szöveti típusú plazminogén aktivátor, uPA = urokináz típusú plazminogén aktivátor*

A legősibb marker konfigurációval az egydoménes D-faktor rendelkezik. A MASP-1 marker konfigurációja csak egy ponton (Tyr<sup>225</sup>) különbözik a legősibbtől, ezért viszonylag korán jelenhetett meg az evolúció során. A MASP-1 az egyedüli komplement proteáz, amely a Ser<sup>195</sup> (TCN)/ Ser<sup>214</sup> (TCN)/ Tyr<sup>225</sup> evolúciós vonalba tartozik. Ugyanezen az evolúciós szinten (egy marker különbség a D-faktortól) található ugyanakkor a C2, B-faktor, I-faktor, tPA, uPA (Ser<sup>195</sup> (TCN)/ Ser<sup>214</sup> (AGY)/ Pro<sup>225</sup>), valamint a plazmin (Ser<sup>195</sup> (AGY)/ Ser<sup>214</sup> (TCN)/ Pro<sup>225</sup>). Ez a besorolás azt sugallja, hogy a fibrinolitikus kaszkád enzimeit előbb - a MASP-1-gyel egy időben - jelentek meg az evolúció során, mint a modern véralvadási proteázok. Elképzelhető tehát, hogy egy, a MASP-1-hez hasonló enzim valóban elsősorban koagulációs funkcióval rendelkezett és ezért volt szükség a fibrinolitikus rendszer jelenlétére is. A következő evolúciós szinten (két marker különbség a D-faktortól) az összes enzim egy markerkonfigurációval rendelkezik (Ser<sup>195</sup> (AGY)/ Ser<sup>214</sup> (TCN)/ Tyr<sup>225</sup>). Ide sorolható a C1r, C1s, MASP-2, MASP-3 és a trombin. A D-faktor és a B-faktor ősbibb markerkonfigurációja jelzi, hogy az alternatív út előbb jelent meg a klasszikusnál. Az elmélet szerint az evolúció során legkésőbb megjelenő, Ser<sup>195</sup> (AGY)/ Ser<sup>214</sup> (AGY)/ Tyr<sup>225</sup> vonalba tartoznak a VII-faktor, IX-

faktor és a X-faktor véralvadási proteázok. A MASP-1-nek a C1r/C1s/MASP enzimes család többi tagjához képest evolúciósan ősbibb mivoltára más jelek is utalnak. A MASP-1 SP doménjében több diszulfid híd van, mint az enzimes család többi tagjában. Az evolúció során csökken a diszulfid hidak száma a tripszinszerű proteázokban (Kénesi és mtsi., 2003). A humán tripszin 1-ben még öt diszulfid híd található, míg a C1r/C1s-ben csak kettő. A MASP-1-ben azonban még jelen van a tripszinekre jellemző Cys<sup>42</sup>-Cys<sup>58</sup> diszulfid híd, az ún. hisztidin hurok. Ugyancsak a MASP-1 különleges státuszát jelzi a C1r/C1s/MASP enzimes család tagjai között, hogy SP doménjét hat exon kódolja a genomban (Endo és mtsi., 1998), míg a többi proteázét csak egy. Mindezek a tények megerősítik azt a feltételezést, hogy a MASP-1, noha bizonyos tulajdonságai (MBL-hez köt, C2-t hasít, C1-inhibitor gátolja) alapján egyértelműen a komplementrendszerhez sorolható, összekötő kapcsolatot jelenthet más kaskádrendszerek felé és szubsztrátjait nem csak a komplement fehérjék között érdemes keresni.

A MASP-1 különböző proteáz inhibitorokkal szembeni viselkedése is eltér a többi korai komplement proteáztól. Méréseink szerint a MASP-1 aktivitása gátolható C1-inhibitorral ( $k_{ass}=6,2\pm 1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Dobó és mtsi., 2009), bár nem annyira hatékonyan, mint a MASP-2 aktivitása ( $k_{ass}=3,5\pm 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A heparin, ami általában megnöveli a proteáz-szerpin gátlás hatékonyságát, a MASP-1/C1-inhibitor reakcióra nincs számottevő hatással, míg a MASP-2 esetében egy nagyságrenddel növeli a sebességi állandót ( $k_{ass}=2,8\pm 0,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Egy másik szerpin, az antitrombin, szintén gátolja a MASP-1 proteolitikus aktivitását, azonban a gátlás hatékonyságát ebben az esetben a heparin jelentősen (~30-szorosára) megnöveli. Heparin nélkül a sebességi állandó  $1.4 \pm 0.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , míg 50 µg/ml heparin jelenlétében  $4.0 \pm 0.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Ezek alapján azt a meglepő megállapítást tehetjük, hogy a MASP-1 eddig ismert leghatékonyabb inhibitora nem a komplement proteázokat gátló C1-inhibitor, hanem a véralvadást (trombint) gátló antitrombin. Ez a MASP-1-nek egy újabb trombinszerű jellegzetessége. A heparin hatásának koncentrációfüggésében azonban eltér a két proteáz. A trombin esetében az ún. „bridging” mechanizmus az érvényes, ami azt jelenti, hogy a heparin egyszerre köt a trombinhoz és az antitrombinhoz, mintegy hidat képezve a proteáz és a szerpin között. Mint azt a MASP-1 később ismertetésre kerülő térszerkezet mutatja, a MASP-1 SP doménjén nem található olyan pozitívan töltött régió, amely alkalmas lenne heparin kötésre (Dobó és mtsi., 2009). Valószínűnek tűnik ezért, hogy a heparin nem kötődik a MASP-1-hez, hanem aktiváló hatását az antitrombinon fejt ki allosztérikus módon. Az allosztérikus mechanizmusra utal a heparin MASP-1/antitrombin reakciót gyorsító hatásának koncentrációfüggése (37. ábra), ami egy szigmoid görbe, szemben a „bridging” mechanizmus alapján várható haranggörbével.

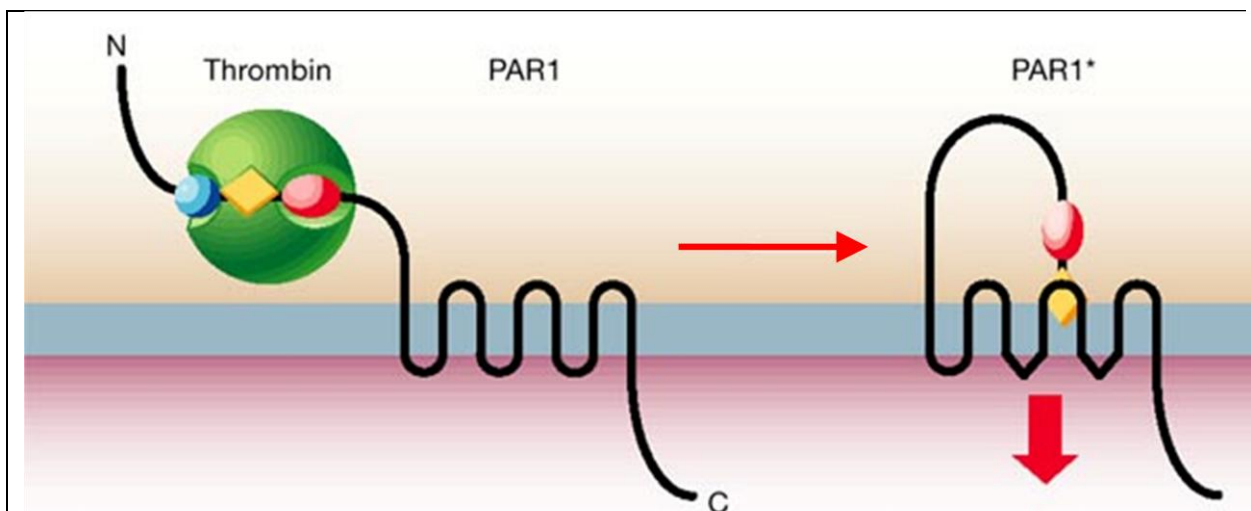


A vérben magas koncentrációban (1-2 mg/ml) jelenlévő széles specificitású proteáz inhibitor, az  $\alpha_2$ -makroglobulin, szintén gátolja a MASP-1 aktivitását (Ambrus és mtsi., 2003). 1-3-szoros moláris feleslegben teljesen gátolja a protein szubsztrátok emésztését, és gélelektroforézissel a MASP-1/ $\alpha_2$ -makroglobulin komplex kialakulása is detektálható. Ugyanakkor a MASP-2 aktivitását csak magas relatív koncentrációban (40-szeres moláris felesleg) képes gátolni az  $\alpha_2$ -makroglobulin. Funkcionális esszéken (C3-, C4-depozíció) alapuló legújabb méréseink az antitrombin lektin út gátló hatását teljes mértékben megerősítették, míg az  $\alpha_2$ -makroglobulin fiziológiás hatásával szemben erős kétségeket támasztottak.

#### 6.2.2.2 A komplementrendszer új funkciója: A MASP-1 közvetlenül aktiválja az endotél sejteket

A komplementrendszer egyik legfontosabb funkciója a gyulladáskeltés. A kaszkád aktivációja során felszabaduló proteolitikus hasítási termékek, az anafialtoxinok kemotaktikus hatást fejtenek ki a leukocitákra és G-fehérje kapcsolt receptorok révén aktiválják az immunsejteket és az endotél sejteket. Hasonló aktivitást más rokon kaszkádrendszereknél is leírtak. A kallikrein-kinin rendszer aktiválódása során a kininogénből felszabaduló bradykinin erősen vazóaktív hatású peptid, míg például a koagulációs kaszkád aktiválódásának következtében a trombin által a fibrinogénről lehasított fibrinopeptidek szintén rendelkeznek proinflammatorikus tulajdonságokkal. A megtámadott sejtek felszínére lerakódó komplement komponensek szintén hatnak az immunsejtekre különböző receptorokon keresztül. A proteolitikus termékeken keresztüli sejtaktiváció azonban nem az egyetlen módja annak, ahogy a proteáz kaszkádok gyulladáskeltő hatásukat kifejtik. Csaknem húsz éve fedezték fel, hogy bizonyos, elsősorban szerin, proteázok közvetlenül is képesek aktiválni sejteket egy addig nem ismert mechanizmus szerint (Vu és mtsi., 1991). Ezen proteázok legismertebb képviselője a trombin, amely az úgynevezett proteáz aktivált receptorokon (PAR) keresztül közvetlenül is képes aktiválni endotél sejteket és vérlemezkéket (Coughlin, 2000; 2005). A proteáz aktivált receptorok olyan G-fehérje kapcsolt receptorok, amelyeket nem oldott ligandumok aktiválnak, hanem ligandumukat magukon hordozzák. Ez a ligandum azonban rejtve marad mindaddig, amíg egy proteáz a receptor N-terminális régióját egy meghatározott helyen el nem hasítja. Az ekkor napvilágra kerülő új N-terminális szekvencia

hordozza a „kipányvázott” (tethered) ligandumot, amely a hét transzmembrán domént tartalmazó receptor második extracelluláris hurokrégiójához kapcsolódva beindítja az aktivációt (38. ábra). Ez az addig ismeretlen mechanizmus teljesen új megvilágításba helyezte a proteázokat. Ebben az esetben a proteázok tulajdonképpen a receptorok agonistáiként működnek, és hatásukat közvetlenül a receptorok limitált proteolízisével fejtik ki. Mai tudásunk szerint négy PAR-t ismerünk, amelyek közül a trombin képes a PAR1, PAR3 és PAR4 hasítására (Adams és mtsi., 2011). A PAR2 legismertebb agonistája a tripszin, bár ennek élettani jelentősége még vitatott. A P1 pozíció mind a négy PAR esetében bázikus aminosav (PAR1/2/4 Arg; PAR3 Lys), jelezvén, hogy a PAR-ok agonistái túlnyomórészt (bár nem kizárólag) tripszinszerű szerin proteázok lehetnek.



38. ábra

### A proteáz aktivált receptorok működése

Az ábrán a trombin (zöld gömb) hasítja a PAR1 receptor N-terminális régióját. A hasítás következtében felszabadul a „kipányvázott” ligandum (sárga rombusz), amely a receptorhoz kötődve annak aktivációját váltja ki. A PAR1 szekvenciája tartalmaz egy hirudinszerű kötőhelyet (piros ellipszis) is a trombin számára, amely megnöveli a hasítás hatékonyságát. (Coughlin, 2000)

A proteolitikus hasításkor felszínre kerülő új N-terminális szekvencia első néhány (tipikusan hat) aminosavát reprezentáló peptidek képesek proteolízis nélkül is receptor aktivációt kiváltani. A PAR-ok tehát tulajdonképpen olyan peptid receptorok, amelyek peptid ligandumukat „maszkírozva” magukon hordják, ami azonban csak limitált proteolízis révén válik hozzáférhetővé a receptor kötőhelye számára. Kézenfekvőnek látszik az analógia a tripszinszerű proteáz zimogének aktiválódásával, ahol szintén egy limitált proteolízis révén felszabaduló új N-terminális meghatározott pozícióban való kötődése stabilizálja az aktív konformációt. Az új N-terminális imitáló peptidekkel (pl. Arg-Ile dipeptid) ebben az esetben is kiváltható aktiváció (Bode és Huber, 1976, Bode, 1979). A trombin általi PAR1 és PAR4 hasítás számos fiziológias következménnyel jár: a vérlemezkék aggregálódnak; az endotél sejtek alakja, ennek következtében pedig az érfal permeabilitása megváltozik, adhézión

molekulákat (szelektinek) és gyulladáskeltő citokineket (interleukinek) expresszálnak elősegítve a leukociták toborzását, adhézióját és gördülését („rolling”-jét). A leukocitákon és endotél sejteken jelenlévő PAR2 hasításának szintén proinflammatorikus következménye van, bár ez esetben az agonista mibenléte nem olyan egyértelmű. A tripszin ugyan hasítja a PAR2-t, de aktív tripszin jelenléte például a vérplazmában, normál esetben, szinte kizárt. *In vitro* kísérletekben a Xa-faktor és a VIIa-faktor aktiválta a PAR2-t. A közelmúltban számos proteázról kimutatták, hogy, legalábbis *in vitro*, hasítják és aktiválják valamelyik PAR-t (6. táblázat).

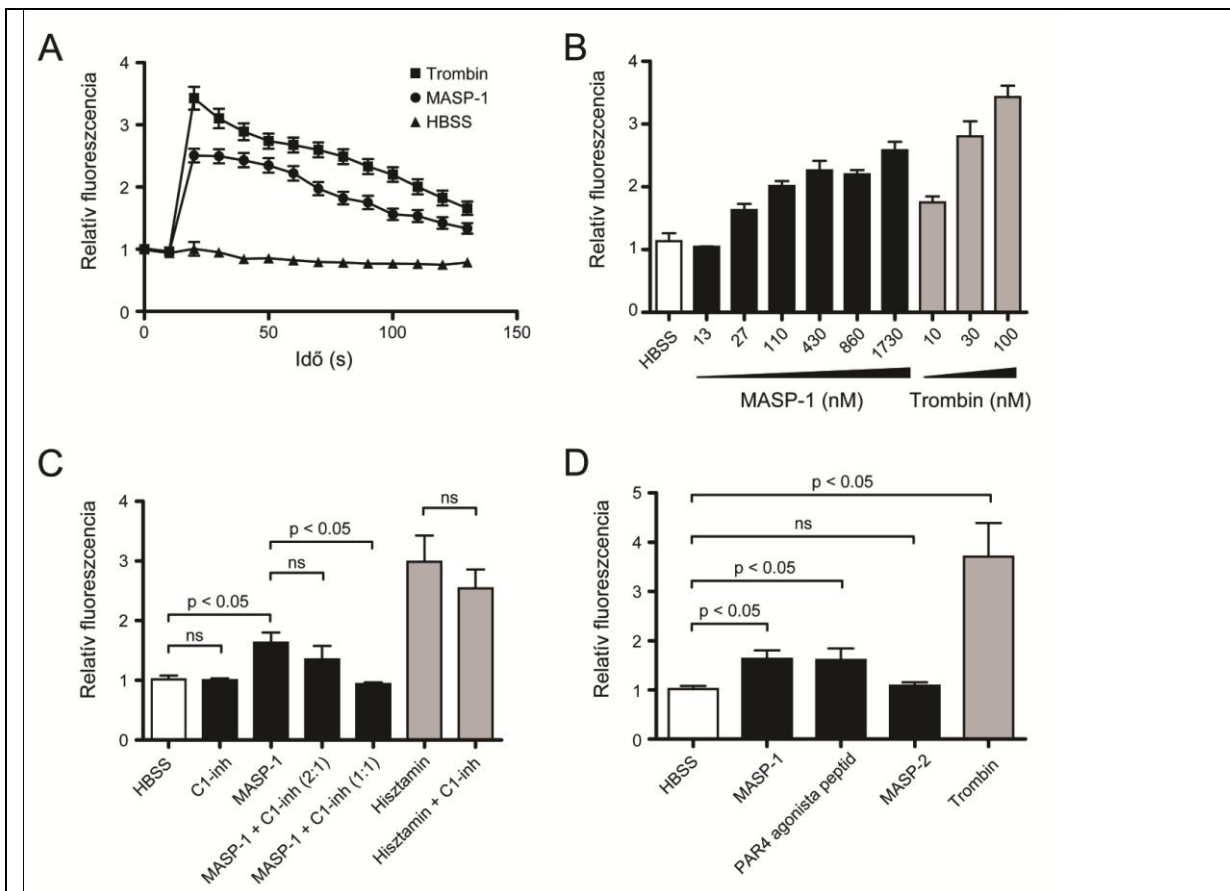
proteáz	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
<b>trombin</b>	+		+	+
<b>tripszin</b>		+		+
<b>granzyme A</b>	+	+		
<b>katepszin G</b>	+			+
<b>plazmin</b>	+			+
<b>Xa-faktor</b>	+			+
<b>kallikreinek</b>	+	+		+
<b>MMP-1</b>	+			
<b>triptáz</b>		+		
<b>akrozin</b>		+		
<b>matriptáz</b>		+		
<b>gingipainok</b>		+		+
<b>tripszin IV</b>	+	+		+
<b>Der P1, P2, P3</b>		+		
<b>Pen C13</b>	+	+		

#### 6. táblázat A proteáz aktivált receptorok agonistái

Érdekes azonban, hogy ezek között egyetlen komplement proteáz sem volt, viszont más rokon kaszkárendszeréből (pl. véralvadás) több szerin proteáz is képviseltette magát. Számomra logikusnak tűnt, hogy egy olyan proteolitikus kaszkárendszer, amelynek egyik fő funkciója a gyulladáskeltés, és amely a természetes immunitás egyik első védvonalát képezi, kihasználja a sejtaktivációnak PAR-ok által közvetített módját. Ha sikerülne PAR agonista komplement proteázt találni, akkor a komplementrendszer egy új funkcióját fedeznénk fel. Úgy éreztem, csupán idő kérdése, hogy mikor igazolja egy kutatócsoport ezt a mechanizmust, (később bebizonyosodott, hogy valóban nagy volt a nemzetközi verseny), és igyekeztem kihasználni a korai komplement proteázok kutatása során felhalmozott tapasztalatainkat. A PAR agonista komplement proteáz keresése során figyelmem a MASP-1-re irányult, mivel: 1.) A vérben viszonylag nagy mennyiségben van jelen és többféle felismerő molekulához is kapcsolódik; 2.) Szubsztrátspecificitása lazább a rokon proteázokénál, ezért komplementrendszeren kívüli szubsztrátja is lehet; 3.) Mint előzőekben láttuk, sokban

hasonlít a PAR agonisták prototípusához, a trombinhoz, ezért elsősorban PAR1 és/vagy PAR4 hasítására lehet képes.

Előzetes elképzeléseimet a MASP-1-gyel végzett kísérletek teljes mértékben igazolták. Sikerült a világon elsőként igazolnunk a komplement proteáz általi közvetlen sejtaktivációt (Megyeri és mtsi., 2009). Különböző laboratóriumi sejtvonalakon teszteltük a MASP-1 hatását, azonban áttörést akkor értünk el, amikor primer humán endotél sejtenyészeten, a köldökzsinór vénából preparált HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) sejtvonalon sikerült egyértelműen igazolnunk a MASP-1 hatását. Először az intarcelluláris  $Ca^{2+}$  szint változását tanulmányoztuk Fluo-4-AM festékkel feltöltött HUVEC sejtekben. A rekombináns MASP-1 CCP1-CCP2-SP katalitikus fragmentum jelentősen, a trombinnal összemérhető mértékben, megemelte a sejt belüli  $Ca^{2+}$  koncentrációt (39. ábra).

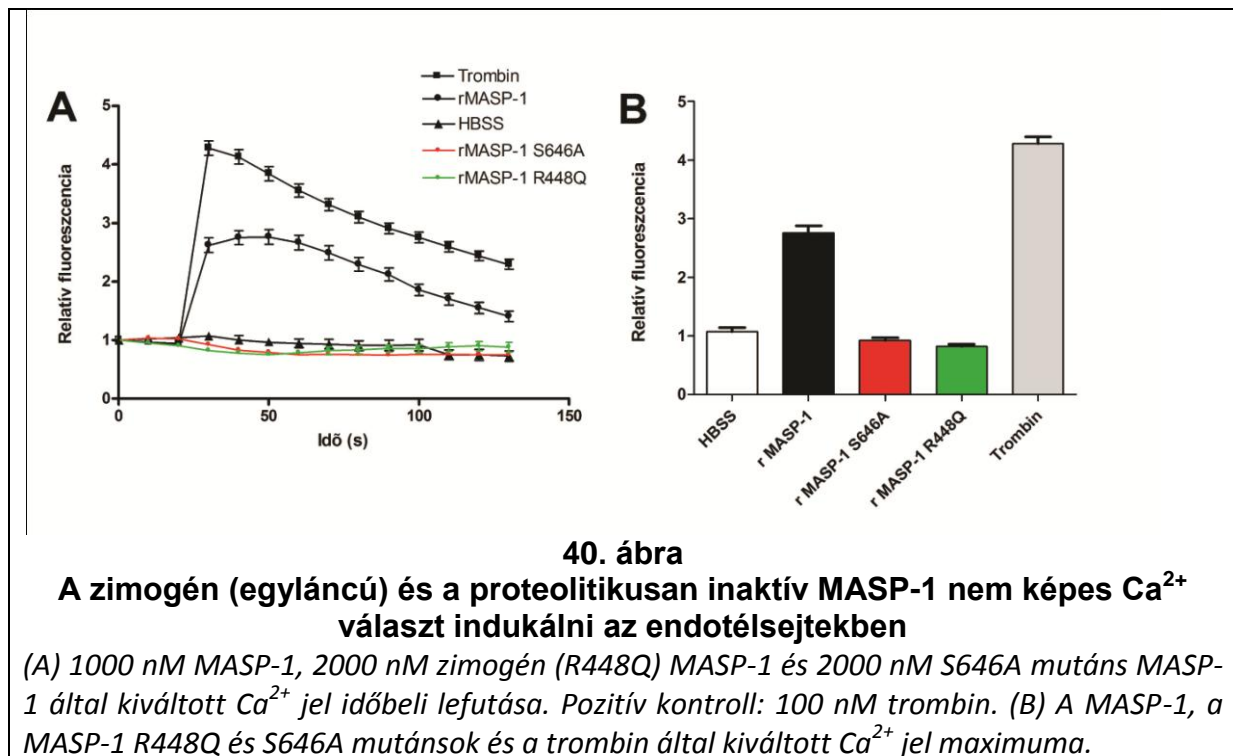


39. ábra

### A MASP-1 kalcium jelet vált ki az endotélsejtekben

Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  jelet fluoreszcens mikroszkópiával mértük Fluo-4 festékkel feltöltött sejtekben. A proteázokat (MASP-1, MASP-2, trombin) a 10. másodpercben adtuk a sejtekhez. (A) 430 nM MASP-1 és 100 nM trombin által előidézett  $Ca^{2+}$  jel időbeli lefutása. (B) A MASP-1 és a trombin által kiváltott  $Ca^{2+}$  jel koncentráció függése. (C) a MASP-1 által kiváltott  $Ca^{2+}$  jel gátlása C1-inhibitorral. A hisztamint pozitív kontrollként használtuk. (D) A PAR4 agonista peptid és a MASP-2 hatása az endotél sejtekre. 500  $\mu$ M PAR4 agonista peptid (AYPGKF-NH<sub>2</sub>), 1050 nM MASP-2, 430 nM MASP-1 és 100 nM trombin (pozitív kontroll) által kiváltott  $Ca^{2+}$  jelet detektáltuk.

Az effektus koncentrációfüggő volt és szignifikáns jelet detektáltunk a MASP-1 fiziológias koncentrációjának (143 nM) megfelelő tartományban. Annak bizonyítására, hogy az észlelt effektus valóban a MASP-1 proteolitikus hatásának a következménye, ekvimoláris mennyiségű C1-inhibítort adtunk a rendszerhez. A C1-inhibitor a  $Ca^{2+}$  jelet a háttér szintjéig szorította le. Ezzel egyértelműen kizártuk, hogy a HUVEC sejteket egy szennyező (pl. *E. coli*) proteáz aktiválta volna. Hasonló sejtaktiválást aktív MASP-2 CCP1-CCP2-SP fragmentummal még igen magas koncentrációban (1050 nM) sem tudtunk kiváltani (39. ábra D). A kontrollkísérleteket később kiegészítettük zimogén mutáns (R448Q), illetve proteolitikusan inaktív mutáns (S646A) MASP-1 preparátumokkal végzett mérésekkel is (40. ábra). Ezek a mérések minden kétséget kizáróan bizonyították, hogy a HUVEC sejteken belüli  $Ca^{2+}$  szint emelkedés egyértelműen a MASP-1 proteolitikus aktivitásának a következménye. Kizárhatjuk tehát azt az eshetőséget, hogy pusztán a MASP-1 kötődése (aktív vagy inaktív formában) egy receptorhoz önmagában bármilyen hatást kiváltana a sejteken. A MASP-1 által kiváltott  $Ca^{2+}$  jel kinetikája hasonlít a trombin által kiváltotthoz, bár lecsengése kevésbé meredek.

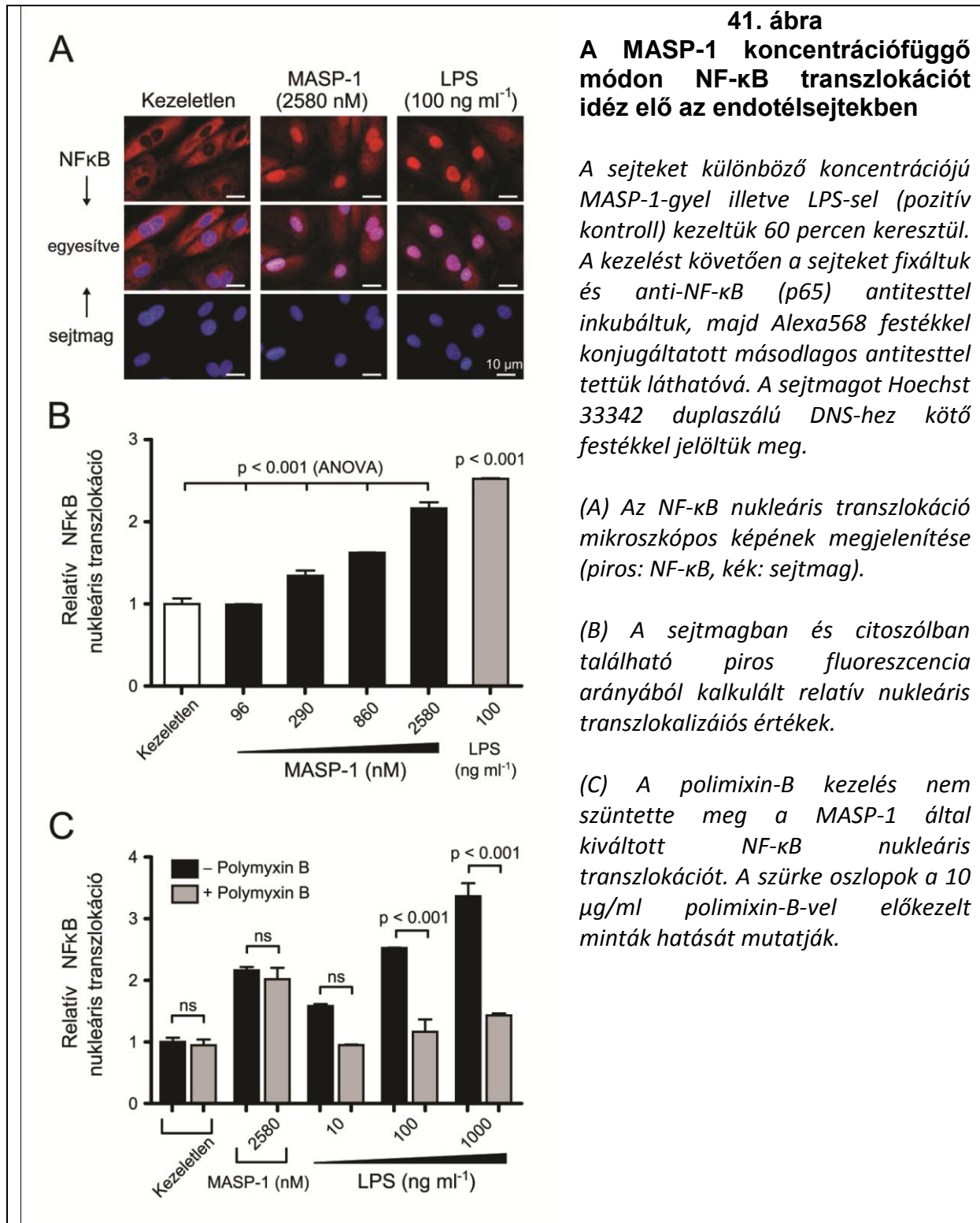


A következő kísérletekben megvizsgáltuk, hogy a MASP-1 kezelés milyen proinflammatorikus útvonalakat aktivál a HUVEC sejtekben. A trombinról leírták, hogy, többek között, a  $Ca^{2+}$  válasz mellett, beindítja a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalat, valamint előidézi az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor nukleáris transzlokációját (Steinhoff és mtsi., 2005). Ezeket az útvonalakat a MASP-1 is képes volt aktiválni. Az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációját sikerült dóziszfüggő módon kiváltanunk a sejtek MASP-1-gyel való, egy órán keresztül tartó inkubálásával, bár a mért effektus nem éri el a bakteriális

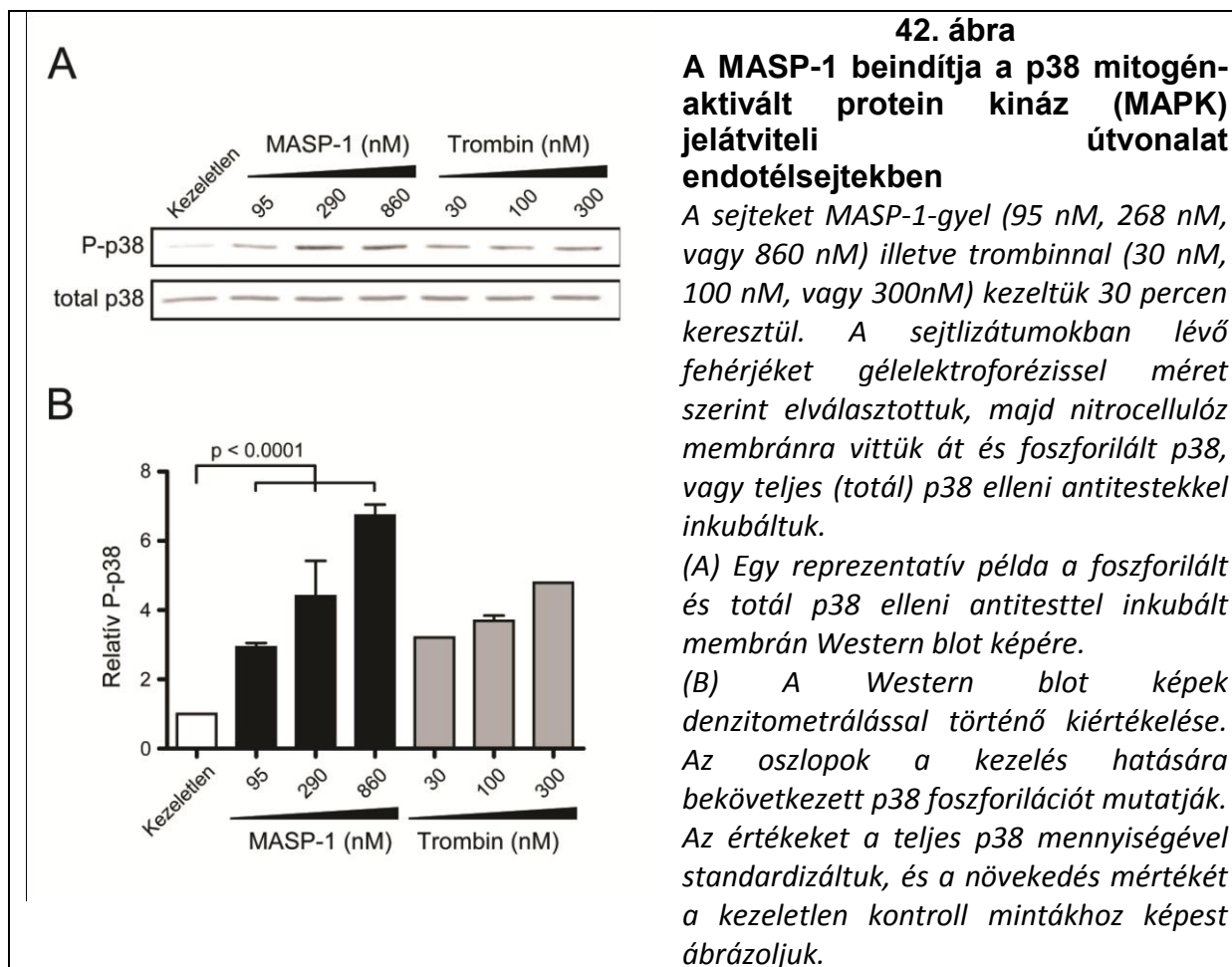


## dc\_591\_12

lipopoliszahariddal (LPS) indukálható szintet (41. ábra). Mivel a rekombináns MASP-1 preparátumunkat bakteriális (Gram-negatív) forrásból izoláltuk, fontos volt kizárni, hogy a mért effektus nem az esetleges LPS szennyeződésből származik. Az LPS által kiváltott hatást a polimixin-B antibiotikummal vissza lehet szorítani. Kísérleteinkben a polimixin-B-vel inkubált MASP-1 ugyanolyan jelet adott, mint a polimixin-B nélküli, míg az LPS kontroll jelét a polimixin-B kezelés az eredeti érték 1%-ára csökkentette. Ezzel egyértelműen igazoltuk, hogy a mért hatás a MASP-1-től származik.



A p38 MAP-kináz útvonal szintén egy fontos proinflammatorikus útvonal az endotél sejtekben, ami ráadásul több ponton is kapcsolódik az NF- $\kappa$ B útvonalhoz (Viemann és mtsi., 2004). Harminc perces MASP-1 kezelés a HUVEC sejtekben erős, dózisfüggő p38 MAP-kináz foszforilációt indukált (42. ábra). A MASP-1 hatására kiváltott jel nagysága összemérhető volt a trombin által generált jel nagyságával.



Miután bebizonyítottuk, hogy a MASP-1 proteolitikus aktivitása révén stimulálja a HUVEC sejteket, a következő lépés annak a receptornak az azonosítása volt, amely a MASP-1 enzimát közvetíti a sejt belseje felé. Természetesen elsősorban a PAR-ok jöhetnek szóba. Az irodalomban sajnos nincs egységes álláspont arról, hogy az endotél sejtek milyen PAR-okat fejtenek ki, eddig a PAR1, PAR2 és PAR4 expresszióját írták le (Coughlin, 2005). A PAR1 és PAR4 trombin receptorok, ezért potenciális MASP-1 szubsztrátok is lehetnek. A PAR2-t ugyan nem hasítja a trombin (a Xa-faktor viszont igen), azonban jól detektálhatóan megjelenik az endotél sejtek felszínén és szerepe lehet a gyulladások kialakulásában. Megvizsgáltuk ezért, hogy a MASP-1 képes-e hasítani ezeknek a receptoroknak az N-terminális szakaszát úgy, hogy felszabadítsa a rejtett peptid ligandumot. Fluoreszcensen jelölt oligopeptid szubsztrátokat szintetizáltunk, amelyek a PAR-ok specifikus hasítóhelyeit hordozták (P5-P1-AMC) és ezek segítségével teszteltük a MASP-1 szubsztrátspecifitását. Kontroll enzimekként trombint és MASP-2-t használtunk. Minden esetben meghatároztuk a kinetikai paramétereiket (7. táblázat).

	$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}^{\text{a}}$	$K_{\text{M}} \text{ (}\mu\text{M)}^{\text{a}}$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}^{\text{b}}$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}^{\text{c}}$
<b>MASP-1</b>				
<b>PAR1</b>	$0.85 \pm 0.05$	$70.7 \pm 7.1$	$1.21 \pm 0.14 \times 10^4$	$1.10 \pm 0.05 \times 10^4$
<b>PAR2</b>	$1.26 \pm 0.39$	$76.5 \pm 36.8$	$1.65 \pm 0.94 \times 10^4$	$1.51 \pm 0.05 \times 10^4$
<b>PAR4</b>	$12.47 \pm 1.79$	$41.6 \pm 11.2$	$3.00 \pm 0.92 \times 10^5$	$1.80 \pm 0.10 \times 10^5$
<b>trombin</b>				
<b>PAR1</b>	$22.13 \pm 1.42$	$15.7 \pm 2.2$	$1.41 \pm 0.22 \times 10^6$	$1.63 \pm 0.30 \times 10^6$
<b>PAR2</b>	– <sup>d</sup>	– <sup>d</sup>	N/A	– <sup>d</sup>
<b>PAR4</b>	$7.78 \pm 0.88$	$22.1 \pm 4.7$	$3.53 \pm 0.85 \times 10^5$	$5.33 \pm 0.50 \times 10^5$

### 7. táblázat A peptid szubsztrátok MASP-1 és trombin általi hasításának kinetikai paramétereit

A mérést HBSS pufferben végeztük 25°C-on.

<sup>a</sup> Michaelis-Menten kinetika alkalmazásával a kezdeti reakciósebességekből számolt értékek

<sup>b</sup> Az egyedi  $k_{\text{cat}}$  és  $K_{\text{M}}$  értékekből számítva

<sup>c</sup> A termékkeletkezési görbékből közvetlenül meghatározva, amennyiben  $[S] \ll K_{\text{M}}$ , a következő egyenlet

$$\text{használatával } [P] = [P]_{\infty} + ([P]_0 - [P]_{\infty}) \times e^{-\frac{k_{\text{cat}}E_0t}{K_{\text{M}}}}$$

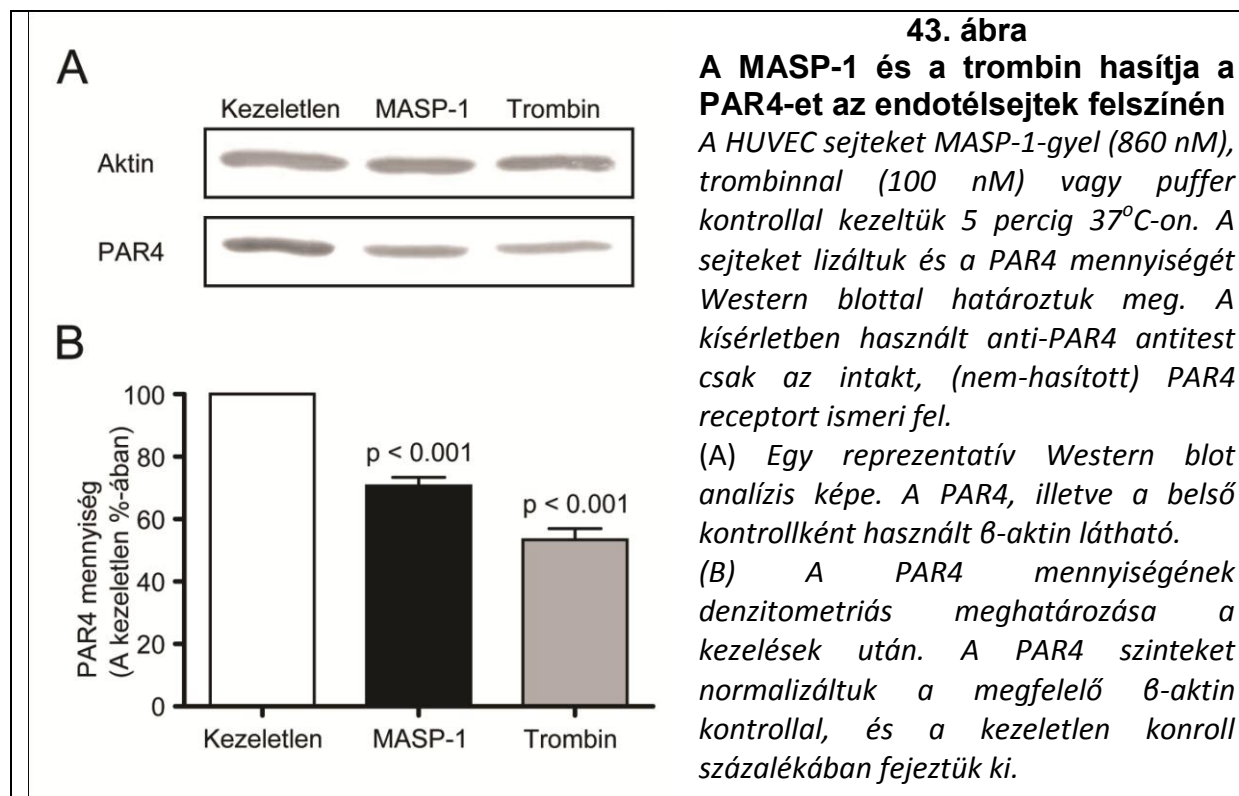
<sup>d</sup> A detektálási határ alatt

A MASP-1 a PAR4 szubsztrátot hasította a legnagyobb hatékonysággal ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,8 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), míg a PAR1 és PAR2 szubsztrátok esetében egy nagyságrenddel alacsonyabb aktivitást mutatott (PAR1  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,1 \pm 0,05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; PAR2  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,5 \pm 0,05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A trombin a PAR4 szubsztrátot a MASP-1 hatékonyságával összemérhető mértékben hasította ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 5,3 \pm 0,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Ez az érték jó egyezést mutat a rekombináns PAR4 exodoménon korábban mért katalitikus hatékonysággal ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), ami egyben validálja is oligopeptid szubsztrátokon alapuló mérési rendszerünket (Nieman és Schmaier, 2007). A PAR1 szubsztrátot a trombin igen hatékonyan hasította ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,6 \pm 0,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), jóllehet ez az érték egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint a rekombináns exodoménon mért érték ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Figyelembe kell azonban venni, hogy a PAR1 exodomén szubsztrát a vesszős helyeken (a P1 csoporttól C-terminális irányba) tartalmaz egy hirudinszerű szekvenciát, amely egy külső kötőhelyen (exosite) keresztül kötődik a trombinhoz (38. ábra). Mivel a MASP-1 nem gátolható hirudinnal, valószínű, hogy ilyen effektussal ennek az enzimnek az esetében nem kell számolnunk, tehát az oligopeptid szubsztrátok megbízható adatokat szolgáltatnak. Ugyancsak az elvárásainkkal volt összhangban az a tény, hogy a trombin a PAR2 szubsztráton nem mutatott mérhető aktivitást. A MASP-2, várakozásainknak megfelelően, szintén teljesen inaktívnak mutatkozott mind a három peptidszubsztráttal szemben. A fenti adatok alapján az tűnik a legvalószínűbbnek, hogy a MASP-1 a PAR4 receptor hasításán keresztül fejt ki sejtaktiváló hatását a HUVEC kultúrában, bár a PAR1 és PAR2 receptorok közreműködését sem vethetjük el teljesen.

A különböző PAR-ok szerepét az endotél sejtek aktiválásában receptor antagonisták alkalmazásával is próbáltuk tesztelni. Egy PAR1 antagonistá (SCH 79797) 10  $\mu$ M koncentrációban erősen gátolta a trombin által kiváltott kalcium jelet, míg a MASP-1 által generált szignálra nem volt hatással. Ennek alapján kizárhatjuk, hogy a PAR1 lenne a felelős a MASP-1 sejtaktiváló hatásáért. A PAR2 antagonistá FSLLRY-NH<sub>2</sub> peptid szintén nem gátolta a MASP-1 hatását, míg a PAR2 agonista peptid (SLIGKV-NH<sub>2</sub>) által kiváltott jel nagyságát csökkentette. Ennek alapján úgy tűnik, hogy a PAR2 receptor sem játszik lényeges szerepet a MASP-1 által indukált szignál transzdukcióban. Az igazán bizonyító erejű kísérlet az lett volna, ha PAR4 antagonistával sikerült volna jelentősen csökkenteni a MASP-1 által generált Ca<sup>2+</sup> szignált. Sajnos azonban, az egyetlen rendelkezésünkre álló PAR4 antagonistá (Tc-YPGKF-NH<sub>2</sub>) a HUVEC sejteken agonistaként viselkedett, - mint ezt korábban más kutatók is észlelték (Hollenberg és mtsi., 2004) - ezért más módszert kellett keresni a PAR4 szerepének a tisztázására.

Az irodalmi adatok ellentmondásosak abban a tekintetben, hogy a HUVEC sejtek expresszálják-e PAR4-et (O'Brien és mtsi., 2000; Fujiwara és mtsi., 2004). Valós idejű polimeráz láncreakció (RT PCR) segítségével vizsgáltuk a PAR4 mRNS jelenlétét a sejtekben. Azt találtuk, hogy a PAR4 ugyan viszonylag alacsony szinten, de kifejeződik a HUVEC sejtekben. Ráadásul IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  kezelés indukálta a PAR4 mRNS szintjét, hasonlóan a koszorúér artéria eredetű endotél sejteknél korábban tapasztaltakkal. Ezek alapján teljes bizonyossággal állíthatjuk, hogy a HUVEC sejtekben megtörténik a PAR4 gén transzkripciója, azonban az aktív receptor jelenlétének az igazolására a sejtek felszínén további kísérletek voltak szükségesek.

Az egyik legnyilvánvalóbb bizonyítéka a PAR4 jelenlétének a HUVEC sejteken az, hogy PAR4 agonista peptid (AYPGKF-NH<sub>2</sub>) a MASP-1-gyel és a trombinnal összemérhető nagyságú Ca<sup>2+</sup> jelet indukált a sejtek belsejében (39. ábra D). A receptor jelenlétét a HUVEC sejteken Western-blot kísérlettel is megerősítettük (43. ábra). A vizsgálathoz olyan antitestet választottunk, ami a PAR4 fehérje intakt, tehát proteáz agonisták által nem hasított N-terminális régióját ismeri fel. A proteázokkal nem kezelt sejtek lizátuma erős jelet adott a Western-bloton, míg a MASP-1 és a trombin kezelésnek alávetett sejteknél a jel halványabb volt. Ezzel igazoltuk, hogy a MASP-1 és a trombin a sejtek felszínén hasítja a PAR-4 N-terminális régióját. A jelek nagysága összhangban van azokkal a korábbi eredményeinkkel, miszerint a trombin hatékonyabban hasítja a PAR4-et, mint a MASP-1.

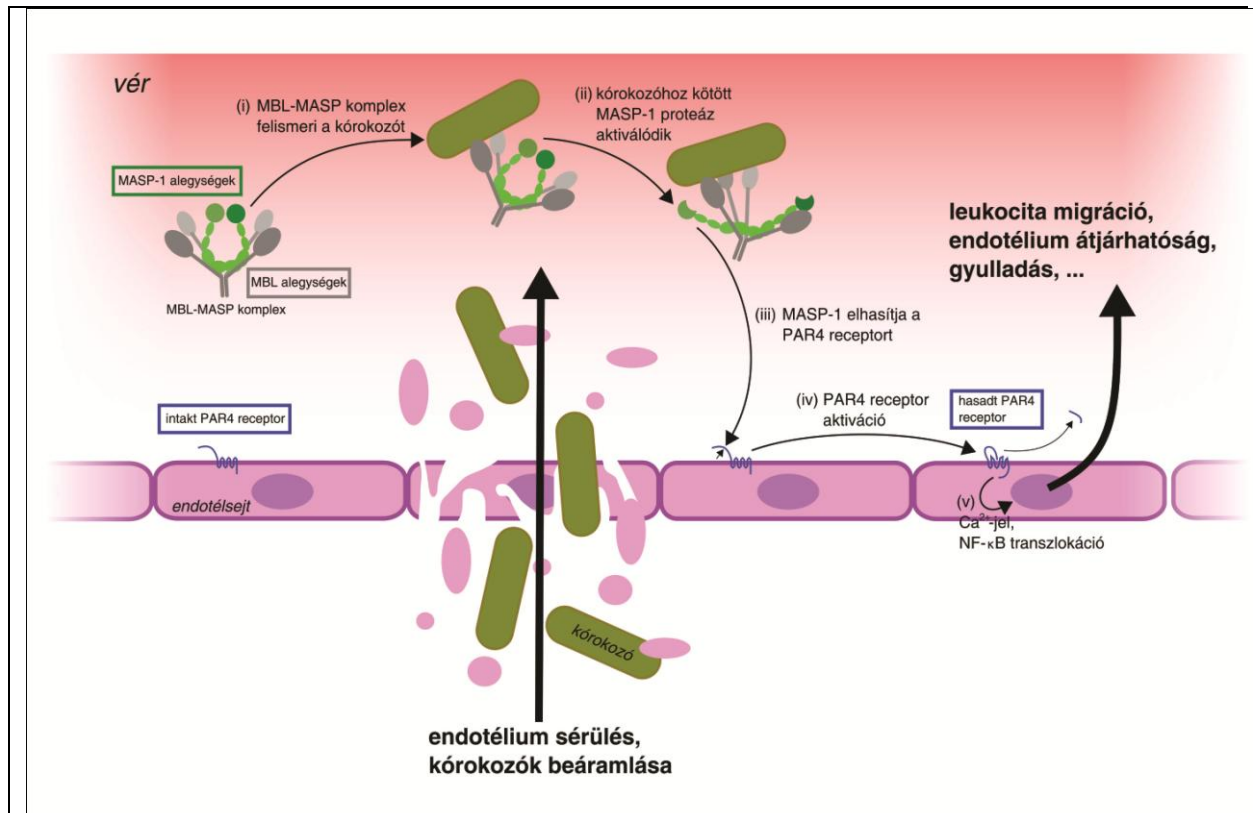


A trombin és a MASP-1 hasonlóan aktiválják a HUVEC sejteket, a trombin által kiváltott jel azonban szinte minden esetben erősebb. Ennek oka talán az lehet, hogy a trombin a PAR1 és PAR4 receptorokon keresztül fejt ki a hatását, míg a MASP-1 csak a PAR4-en keresztül. A trombin olyan fontos proinflammatorikus folyamatok beindításában játszik szerepet, mint a leukociták toborzása, letapadása és gördülése (rolling). Vergnolle és munkatársai (2002) azonban kimutatták, hogy ezek a proinflammatorikus hatások a trombin PAR4 aktiváló képességével vannak kapcsolatban, a PAR1-nek ezekhez nincs hozzájárulása. Elmondhatjuk tehát, hogy a PAR4 nagyon fontos receptor a gyulladáskeltés szempontjából, és egy komplement proteáz, a MASP-1, képes aktiválni ezt a receptort.

A MASP-1 PAR4 aktiváló hatásának további következményei is lehetnek: interleukinek (IL-6, IL-8), citokinek és adhéziós molekulák expressziója, az érfal permeabilitásának megváltozása, stb. Ezeknek a proinflammatorikus jelenségeknek a vizsgálatát együttműködő partnereinkkel jelenleg is folytatjuk, és előzetes eredményeink alátámasztják a MASP-1 szerepével kapcsolatos várakozásainkat. További fontos kérdés, hogy az endotél sejteken kívül a MASP-1 képes-e más, a gyulladásokban szerepet játszó, sejteket is aktiválni. Ezen a területen biztató előkísérleteket végeztünk humán primer monocitákkal. Hipotézisünk szerint, a MASP-1 egyszerre aktiválja az endotél sejteket és a leukocitákat, ami a proinflammatorikus hatás felerősödéséhez vezet.

A fenti proinflammatorikus hatásokat képes mind a trombin, mind pedig a MASP-1 kiváltani. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a két kaszkádrendszer, a komplement és a véralvadás, különböző stimulusok hatására aktiválódik. Elképzelhető ezért olyan fiziológiás vagy patológiás szituáció, ahol csak az egyik proteáz van aktív állapotban. Az

immunrendszerre egyébként is nagyfokú redundancia jellemző, egy adott veszély szignál egyszerre több párhuzamos védekezési útvonalat is mozgósít, ezzel biztosítva a hatékony választ.



44. ábra

#### A MASP-1 által közvetlenül előidézett proinflammatorikus folyamatok fertőzés során

A véráramba behatoló mikroorganizmusokhoz kapcsolódnak a vérben keringő MBL-MASP-1 vagy a fikolin-MASP-1 komplexek és a MASP-1 autoaktiválódik. Az MBL-MASP-1, fikolin-MASP-1 komplexekkel borított mikroorganizmusok közvetlenül érintkeznek az endotél sejtekkel, amit a sejtek felületén lévő MBL receptorok elősegíthetnek. A MASP-1 elhasítja a PAR4-et az endotélsejtek felszínén, ami beindítja a különböző proinflammatorikus folyamatokkal kapcsolatos jelátviteli útvonalakat.

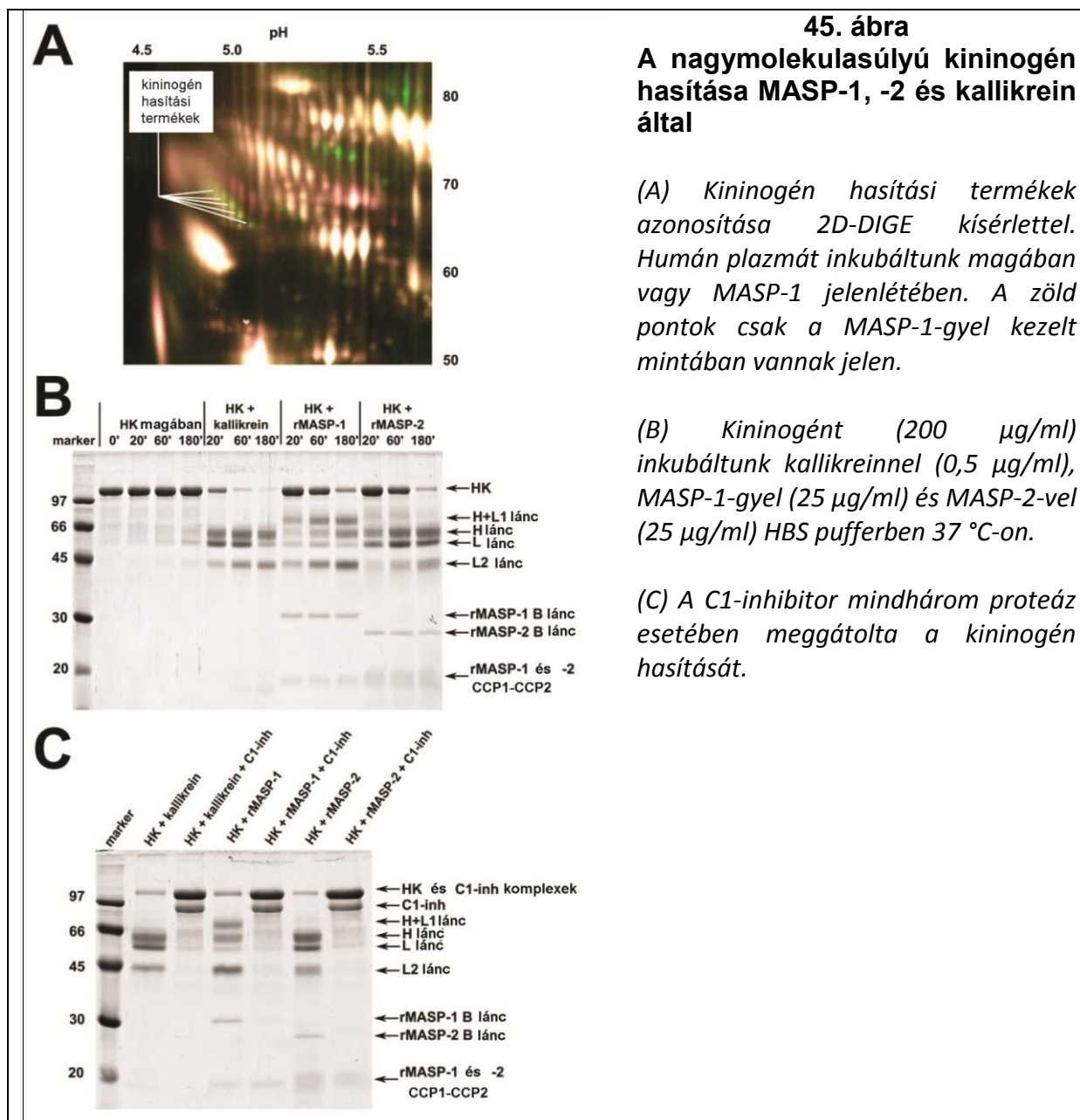
A MASP-1 a vérben, zimogén formában, különböző felismerő molekulákhoz (MBL, fikolinok) kapcsolódva található. Felmerül a kérdés, hogy ilyen körülmények között, hogyan tud az aktív MASP-1 az endotél sejtek és a leukociták felszíne közelébe kerülni, hogy ott a PAR4-et elhasítsa. Sérülés esetén a véráramba behatoló baktériumok felszínére lerakódnak az MBL-MASP, fikolin-MASP komplexek és a MASP-1 autokativálódik. A hajszálerek átmérője összemérhető a baktériumsejtek méretével, ezért ebben az esetben a baktériumsejt felületén lévő aktív MASP-1 molekulák közvetlenül érintkezhetnek az endotél sejtekkel (44. ábra). Azt is leírták, hogy az endotél sejtek kötőhelyeket tartalmaznak az MBL kollagén szára számára (Oroszlán és mtsi., 2007). Egy MBL-MASP komplexekkel borított mikroorganizmus

több ponton is kapcsolódhat az MBL receptorokkal rendelkező endotél sejthez és ezzel a lokális aktív MASP-1 koncentráció megnövekszik a sejtek környezetében. Arra is vannak adatok, hogy bizonyos patológiás helyzetekben, például iszkémia, az endotél sejtek felszínén olyan ligandumok jelennek meg, amelyek kötik az MBL-t a C-terminális lektin doménjein keresztül (Collard és mtsi., 2000, 2001; Montalto és mtsi., 2001). Ebben az esetben tehát az MBL-MASP komplexek az endotél sejtek felszínén fognak aktiválódni és a MASP-1 közvetlenül kifejtheti proinflammatorikus hatását. Ez a mechanizmus szerepet játszhat az iszkémia-reperfúziós sérülés kialakulásában is.

#### *6.2.2.3 A MASP-1 bradykinint szabadít fel kininogén szubsztrátból*

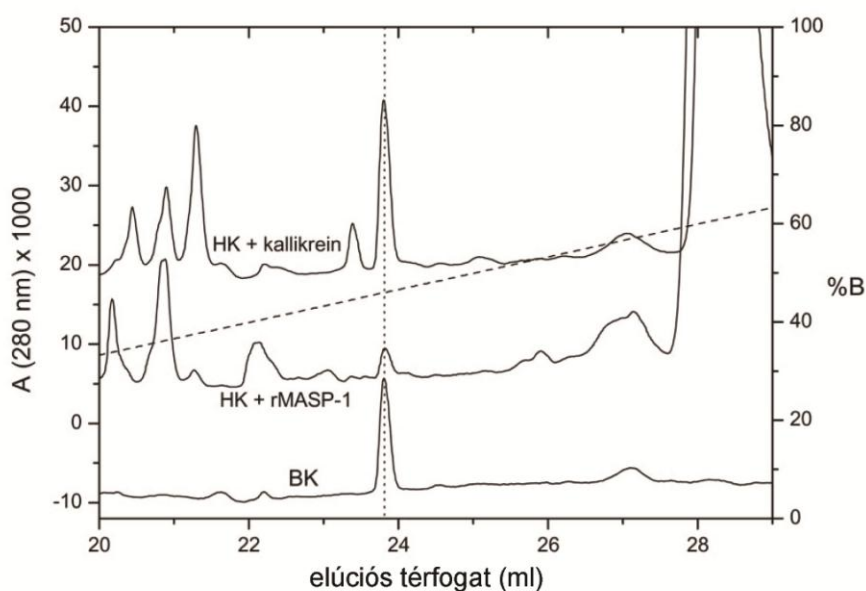
A MASP-1 fiziológiás szerepének további tisztázása céljából újabb potenciális MASP-1 szubsztrátokat kerestünk a vérplazmában. Proteomikai módszert választottunk: a humán plazmát rekombináns MASP-1 CCP1-CCP2-SP fragmentummal inkubáltuk és a változásokat differenciális gélelektroforézissel (DIGE) analizáltuk (Dobó és mtsi., 2011). Az általunk a kísérletekben használt humán plazmából előzetesen eltávolítottak hét nagy mennyiségben jelen lévő komponenst: az albumint, a transferrint, a haptoglobint, az IgA és IgG-t, az antitripsint valamint a fibrinogént. A DIGE kísérlet alapján az egyik legfeltűnőbb különbség a MASP-1 kezelt és a kezeletlen plazma között a kininogén hasítás volt (45. ábra A). Mivel a kontakt rendszer aktiválódása során a nagymolekulasúlyú kininogénből (HK) felszabaduló bradykinin az egyik legfontosabb vazóaktív peptid (Kaplan és mtsi., 2002), részletesebben elemeztük a MASP-1 kinin-hasító képességét. Vizsgáltuk a MASP-1 proteolitikus aktivitását izolált HK preparátumon. Kontrollként rekombináns MASP-2-t és a kininogént fiziológiásan emésztő plazma kallikrein választottunk. Mindhárom proteáz hasította a kininogént, legerősebben a plazma kallikrein, a MASP-1 jóval gyengébben, a MASP-2 pedig a legkisebb hatékonysággal (45. ábra B). A C1-inhibitor, ami mindhárom proteáz specifikus inhibitora, moláris feleslegben alkalmazva teljesen meggátolta a proteolízist mindhárom esetben (45. ábra C).





Ezek után megvizsgáltuk azt is, hogy vajon a MASP-1 képes-e felszabadítani a kininogénből a bradykinint. A reverz fázisú HPLC kromatogramja egyértelműen bizonyította, hogy a MASP-1 nem csak emészt a kininogént, hanem képes a bradykinin kihaladására is (46. ábra). A MASP-1 által felszabadított bradykinin molekulatömegét tömegspektrometriás méréssel is ellenőriztük. A MASP-2 esetében azonban nem tudtunk kimutatni bradykinin felszabadítást, jóllehet a kininogént a MASP-2 is hasította. Úgy tűnik tehát, hogy a bradykinin generálás a MASP-1 specifikus tulajdonsága a lektin út proteázai között. A proteolízis kinetikáját az intakt kininogén fogyásának gélen való követésével vizsgáltuk. A MASP-1 CCP1-CCP2-SP fragmentum kb. 400-szor kisebb hatásfokkal ( $k_{cat}/K_M = 4,0 \pm 0,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) hasította a kininogént, mint a plazma kallikrein ( $k_{cat}/K_M = 1,5 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A MASP-2 még gyengébb proteáznak bizonyult ebben a reakcióban ( $k_{cat}/K_M = 2,7 \pm 0,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A hasítás hatékonyságát teszteltük sérumból preparált keverék MBL-MASP komplexek alkalmazásával

is. Ebben az esetben nem tudtuk pontosan meghatározni a keverék MASP-1 és MASP-2 tartalmát, de abból kiindulva, hogy a MASP-1 kb. harmincszoros koncentrációban van jelen a MASP-2-höz képest a szérumban, feltételezhetjük, hogy preparátumunkban is a MASP-1 a fő proteáz komponens. A becsült  $k_{cat}/K_M$  érték egy nagyságrenddel nagyobb bizonyult a fragmentumokra meghatározott értékeknél ( $k_{cat}/K_M = 1-3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), jelezvén, hogy az MBL-MASP komplexben lévő proteázok hatékonyan hasítják a kininogént. Mivel a plazma kallikrein rendkívül hatékonyan hasítja a kininogént és a kininogén preparátumok tartalmazhatnak prekallikrein szennyezést, (a plazmában a prekallikrein mintegy 85%-a kininogénnel komplexben van jelen), ki kellett zárunk azt a lehetőséget, hogy a MASP-1 esetében észlelt bradykinin felszabadítás közvetett jellegű és a szennyező prekallikrein MASP-1 általi aktiválásának a következménye. Kísérleteink azt mutatták, hogy a MASP-1 a prekallikreint még hosszú (100 perc), 37°C-on történő, inkubálás alatt sem képes aktiválni. Az általunk felfedezett bradykinin képződési mechanizmus tehát teljesen független a kontakt aktiválódási úttól.



**46. ábra**

**Kallikreinnel és MASP-1-gyel emésztett kininogén minták analízise HPLC-vel**

A mintákat Source5 RPC ST 4.6/150 oszlopon futattuk meg. A függőleges pontozott vonal a bradykinin elúciós pozícióját jelzi. A szaggatott vonal az eluens (ecetonitril grádiens) %-os értékét jelzi (%B). Kontrollként szintetikus bradykinint használtunk. A MASP-1 által felszabadított bradykinint tömegspektrometriával is azonosítottuk.

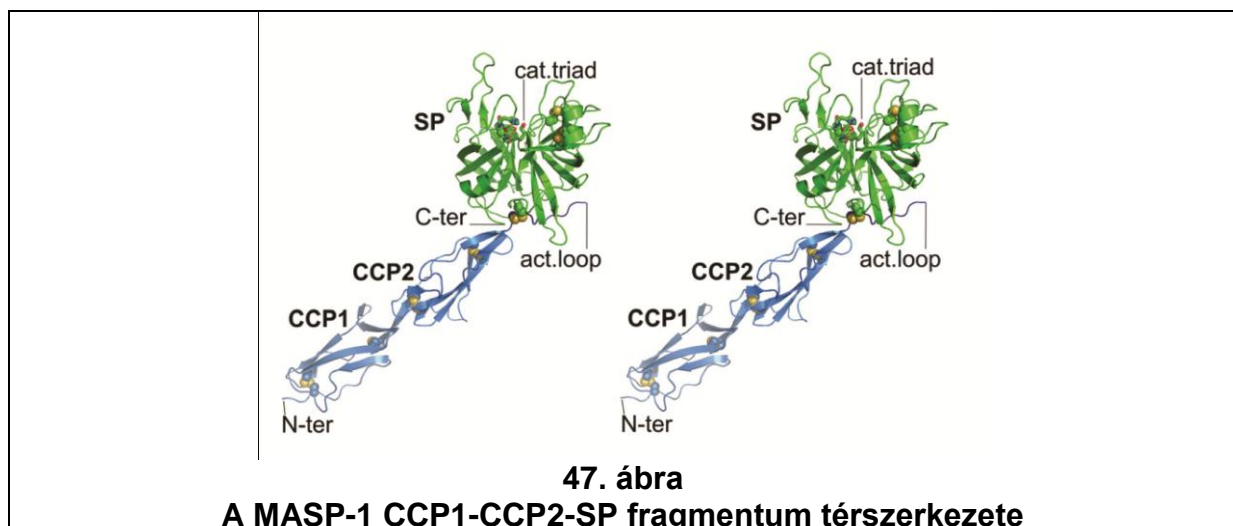
Bebizonyítottuk tehát, hogy a proteomikai módszerrel talált szubsztrátot, a nagymolekulasúlyú kininogént, a MASP-1 specifikusan hasítja és belőle a biológiailag aktív bradykinint szabadítja fel. A jelenség fiziológiás jelentőségét nehéz megbecsülni, mivel a reakció hatékonysága igen alacsony. Elképzelhető azonban, hogy lokálisan, ha a felismerő molekulák kininogén tartalmú felszínre rögzítik az MBL-MASP komplexeket, a MASP-1 általi

bradykinin generálásnak fiziológias vagy patológias jelentősége lehet. Ebből a szempontból érdemes megemlíteni az örökletes angioödémát (HAE), amelyet a C1-inhibitor csökkent működése okoz (Cicardi és Johnston, 2012). Ez a betegség, amennyiben nem ismerik fel és nem kezelik megfelelően, súlyos, akár életveszélyes ödémás rohamokkal járhat. Az aktív C1-inhibitor csökkent mennyisége miatt a plazma kallikrein, ödémás rohamok esetén, kontrolálatlanul hasítja a kininogént és szabadítja fel a bradykinint. A C1-inhibitor azonban a MASP-1-et is gátolja, így elképzelhető, hogy az ödémás rohamok kialakulásához, és/vagy súlyosságához a kallikrein mellett, a vérben lévő MASP-1 is hozzájárul. Ennek a kérdésnek a tisztázásához további vizsgálatok, például az angioödémás betegek vérében lévő MASP-1 szintjének és aktiválódási státuszának meghatározása, lenne szükséges.

#### 6.2.2.4 A MASP-1 széles szubsztrátspecifitásának szerkezeti háttere

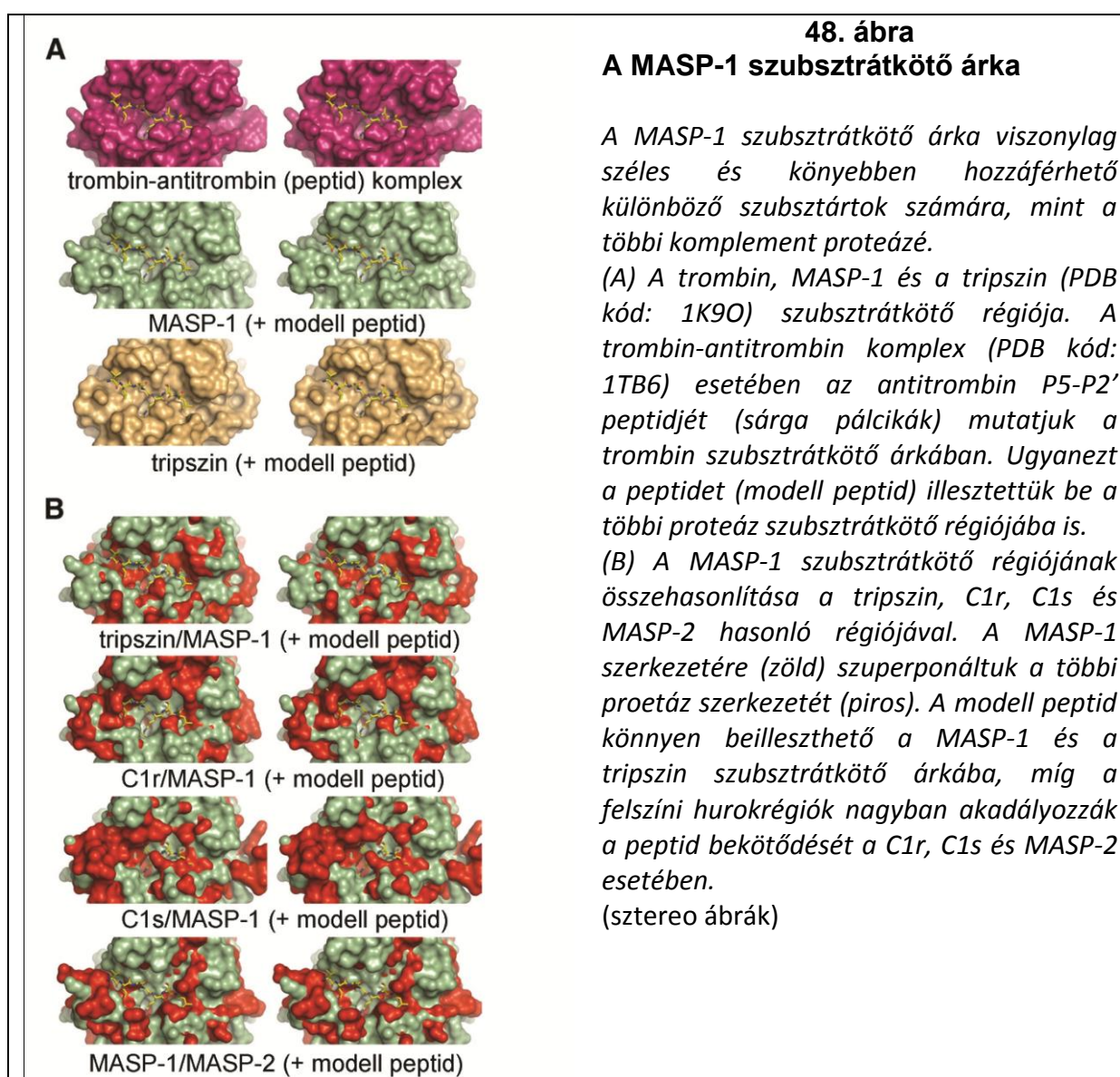
A MASP-1, mint már eddig is láthattuk, sok tulajdonságában eltér a többi rokon komplement proteáztól. Az egyik legfeltűnőbb különbség a MASP-1 széles szubsztrátspecifitása. A C1r, C1s és MASP-2 enzimek esetében a szűk szubsztrátspecifitása oka az, hogy az SP domén felszíni hurokrégiói erősen leárnyékolják a szubsztrátkötő árkot, és csak néhány fehérjeszubsztrát kötődését teszik lehetővé. Érdemes tehát megvizsgálni a MASP-1 térszerkezetét is ebből a szempontból és összehasonlítani a rokon enzimekével.

Sikerült kristályosítani a MASP-1 CCP1-CCP2-SP fragmentumát és megoldani a szerkezetét 2,55 Å felbontásban (PDB kód: 3GOV) (Dobó és mtsi., 2009). Mivel a MASP-1 proteáz autolízisre hajlamos, a kristályosítási elegybe inhibitor (20 mM benzamidin) tettünk, ami azonban a kristályszerkezetben nem jelenik meg. A MASP-1 CCP1-CCP2-SP fragmentum globális szerkezete hasonlít a rokon C1r, C1s és MASP-2 szerkezetéhez (47. ábra).



A két CCP modul mintegy nyélként kapcsolódik az SP doménhez. A CCP2/SP kontaktfelszín csak kissé különbözik a többi proteáznál tapasztalt kontaktfelszíntől. Összehasonlítva a MASP-1, MASP-2, C1r és C1s CCP2/SP kontaktfelszínét találunk néhány konzervált kölcsönhatást. A CCP2 domén Pro<sup>400</sup>-Tyr<sup>401</sup>-Tyr<sup>402</sup> motívuma, az aktivációs peptid Pro<sup>434</sup>-

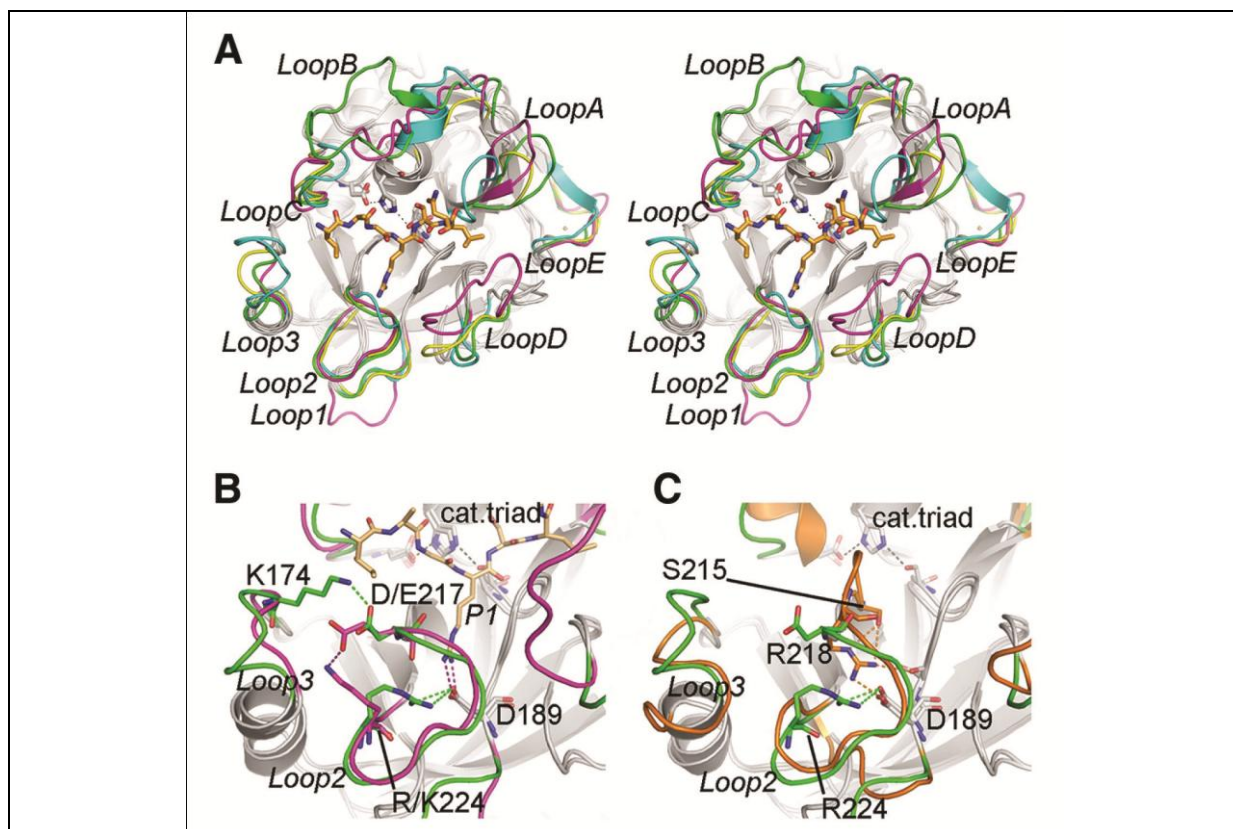
Val<sup>435</sup>-Cys<sup>436</sup> szakasza és az SP domén Pro<sup>570</sup> aminosava részei ennek a konzervált kölcsönhatási struktúrának. Csak a MASP-1 szerkezetre jellemző viszont a C-terminális Asn<sup>699</sup> karboxilcsoportja és a CCP2 modul Lys<sup>403</sup> oldallánca között kialakuló sóhíd. A CCP2/SP szerkezetek hasonlósága alapján feltételezhetjük, hogy a kontaktrégió a MASP-1 esetében is csuklórégióként („hinge point”) működik. A CCP2/SP kontaktfelszín konzerváltsága nem meglepő, ha meggondoljuk, hogy a MASP-1 és a MASP-3 esetében ugyanaz a CCP2 modul kapcsolódik különböző SP doménekhez. Ugyan a MASP-3-ról még nem áll rendelkezésünkre kristályszerkezet, de feltételezhető, hogy a katalitikus fragmentum globális szerkezete hasonló a rokon proteázokéhoz. A CCP1/CCP2 határfelület szintén konzervált az enzimes családon belül, itt azonban főleg főlánc hidrogénkötések és hidrofób kölcsönhatások dominálnak, ami egy meglehetősen merev csatlakozási pontra utal.



Az SP domén a kimotripszin családra jellemző foddal rendelkezik, a katalitikus triád, az oxianionkötő zseb és a szubsztrátkötő régió kanonikus konformációt mutat. A MASP-1

szubsztrátkötő árkát összehasonlítottuk a C1r, C1s, MASP-2, trombin és a tripszin szubsztrátkötő régiójával (48. ábra). A MASP-1 felszíni topológiája inkább hasonlít a széles szubsztrátspecifictással rendelkező tripszinéhez, mint a szűk specificitású komplement proteázokéhoz. A MASP-1 szubsztrátkötő árka széles és viszonylag nyitott. A C1r, C1s és MASP-2 esetén az S1 hely környéke erősen le van árnyékolva a behajló hurokrégiók által, míg a MASP-1 esetében ez a hatás sokkal kisebb. Az S1-S1' kötőhelyek környezetében például a nagyméretű c192-es oldallánc leszűkíti a szubsztrátkötő árkot a többi komplement proteáznál, míg a MASP-1 esetében a hasonló pozícióban lévő Ala<sup>643</sup> sokkal kevésbé van ilyen hatással. A viszonylag nyitott szubsztrátkötő árok összhangban van a MASP-1, a rokon komplement proteázokéhoz képest, szélesebb szubsztrátspecifitásával.

A MASP-1 specificitása szélesebb ugyan, mint a többi komplement proteázé, de a tripszinhez képest a MASP-1 specifikusabb és kevésbé aktív. Van a MASP-1 SP doménjének két olyan jellegzetessége, amely magyarázatot adhat erre. Az egyik jellegzetessége a szerkezetnek a hosszú B-hurok (másnéven 60-as hurok), amely az S1-S3 kötőhelyek környezetében található a szubsztrátkötő régióban (49. ábra A).



49. ábra

**A szubsztrátkötő árkot felépítő hurokrégiók (loop-ok) a MASP-1 és a rokon proteázok szerkezetében**

(A) A MASP-1 (zöld), MASP-2 (világoskék), trombin (magenta) és a tripszin (sárga) szerkezete. Az antitrombin P4-P3' peptidje (narancs) a kötött szubsztrátot reprezentálja. A hasonló konformációjú régiót szürkével jelöljük. (sztereo ábra) (B) A MASP-1 szubsztrátkötő zsebében egy belső ionpár (Asp<sup>640</sup>/Arg<sup>677</sup>, c189/c224) található. (C) A D-faktor (narancs) szerkezetében egy hasonló belső sóhíd (Asp<sup>189</sup>/Arg<sup>218</sup>) található.

Ebben a tekintetben a MASP-1 a trombinhoz hasonlít, ahol ez a hosszú hurokrégió hozzájárul a szubsztrátspecifitáshoz azáltal, hogy egy aromás aminosavakból álló klaszter a szubsztrát P2 oldallánca fölé hajlik. A MASP-1 esetében a B-hurok még a trombinénál is hosszabb és lazán kapcsolódik az enzim felszínéhez. Azt ugyan az „üres” (vagyis szubsztrát nélküli) enzim szerkezetéből nem lehet egyértelműen megállapítani, hogy miként viselkedne ez a hurokrégió szubsztrátkötés közben, a stabilizáló hidrogén kötések eloszlása azonban azt jelzi, hogy a B-hurok képes lehet a szubsztrát P2 csoportja fölé hajolni, és a Leu<sup>496</sup>, Pro<sup>498</sup> és Pro<sup>501</sup> oldalláncok kapcsolatba léphetnek a szubsztrát kisméretű hidrofób P2 oldalláncával.

A másik, és talán legváratlanabb jellegzetessége a MASP-1 SP domén szerkezetének egy belső sóhíd, amit a P1 specifitást megszabó S1 aszparaginsav alakít ki egy arginin oldallánccal (49. ábra B). Az Arg<sup>677</sup> és az Asp<sup>640</sup> oldalláncok között kialakuló sóhíd megakadályozhatja, vagy legalábbis megnehezítheti a szubsztrát P1 oldalláncának bekötését a kötőzseb aljára. Ez a kölcsönhatás mérsékelheti a MASP-1 proteolitikus aktivitását, de alkalmas szubsztrát kötődése esetén nyilván úgy alakul át a szerkezet, hogy a szubsztrát P1 oldallánca kiszorítja a belső arginint a sóhídból. Ehhez hasonló jelenséget egy másik komplement proteáz, a D-faktor, esetében írtak le, ahol az S1 Asp<sup>189</sup> szintén egy belső argininnel (Arg<sup>218</sup>) alkot sóhidat (Narayana és mtsi., 1994) (49. ábra C). A D-faktor, annak ellenére, hogy aktivációs peptidje le van hasítva, proteolitikusan inaktív formában kering a vérben és csak a megfelelő enzim-szubsztrát komplexben (C3bBD) veszi fel aktív konformációját (Jing és mtsi., 1999). Az említett sóhídon kívül a D-faktor szerkezetében még egyéb torzulások is tapasztalhatók az aktív hely és a szubsztrátkötő zseb környékén, amelyek felelősek az inaktív konformáció kialakulásáért. A MASP-1 szerkezetében nem található meg ezek a torzulások, a szubsztrátkötő zseb szabadon hozzáférhető, ami arra utal, hogy a belső sóhíd önmagában nem teszi a proteázt inaktívvá, nem is korlátozza a specifitást, csupán csökkenti aktivitását a tripszinhez képest.

Összefoglalva elmondhatjuk tehát, hogy a MASP-1 szerkezete magyarázatot ad a többi rokon szerin proteázétól eltérő enzimatisma tulajdonságaira. A MASP-1 szubsztrátkötő árka szélesebb, nyitottabb, mint a C1r, C1s és MASP-2 esetében. A specifitást azonban, a trombinhoz hasonlóan, valamelyest korlátozza a hosszú B-hurok, amely kölcsönhatást alakíthat ki a szubsztrát P2 csoportjával. Az enzim aktivitását csökkenti az a belső sóhíd, amely megnehezíti a szubsztrát számára az S1-P1 kölcsönhatás kialakítását.

#### 6.2.2.5 A MASP-1 fontos szerepet játszik a lektin út beindításában

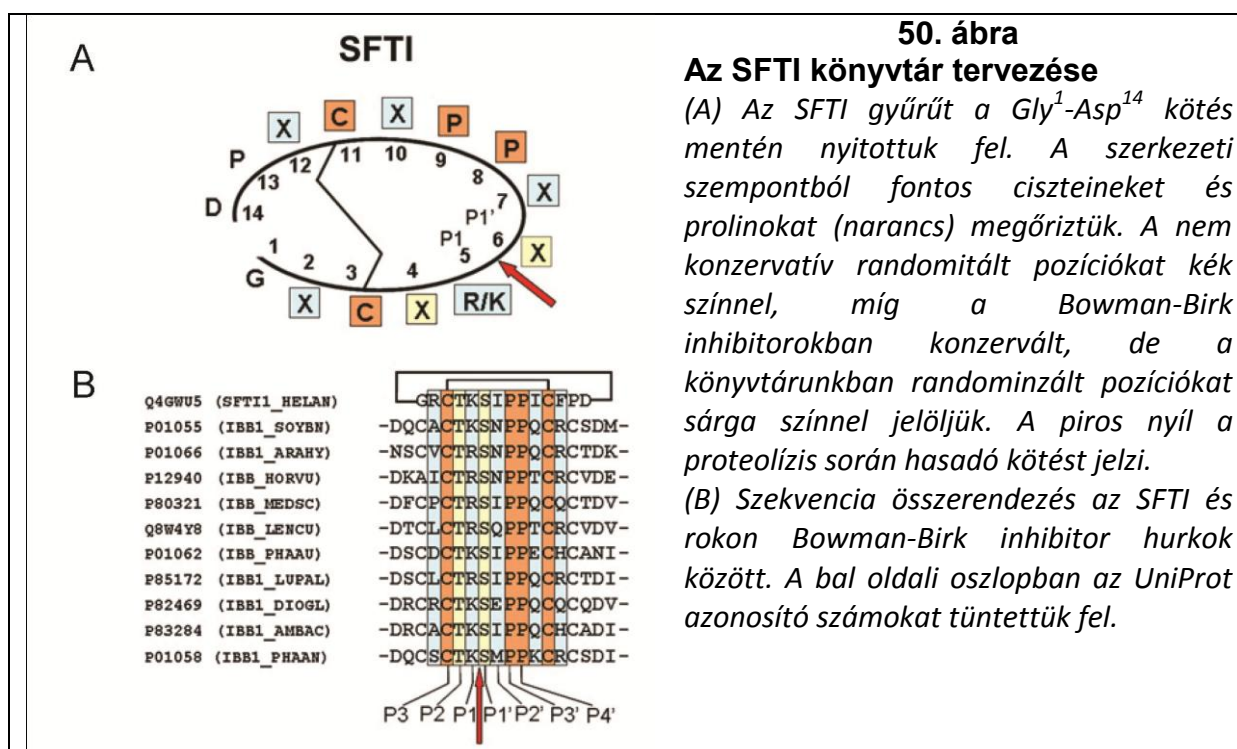
Az eddigi eredmények azt sugallják, hogy a MASP-1 szerepe a komplementrendszer aktiválása szempontjából inkább csak kiegészítő jellegű, mivel önmagában nem képes beindítani a lektin utat, viszont a MASP-2-vel egy időben aktiválódik és trombinszerű, proinflammatorikus aktivitása révén jelentősen hozzájárul egy hatékonyabb immunválasz kialakításához. A MASP-1 lazább szubsztrátspecifitása révén összekötő kapcsolatot képez a komplement és a véralvadási kaszkád, valamint a humorális és a celluláris immunválasz

között. Mennyiségét tekintve a MASP-1 a lektin út fő proteáz komponense, ami azt sugallja, hogy fontos szerepet tölt be. Mint korábban láttuk, a komplement proteázok természetes inhibitorai viszonylag széles specificitású szerpinek. A MASP-1 két legfontosabb inhibitora, a C1-inhibitor és az antitrombin, egyszerre gátol több proteázt a komplement és a koagulációs kaszkádban. A MASP-ok biológiai funkciójának tisztázásában nagy segítséget nyújtana, ha rendelkeznének olyan inhibitorokkal, amelyek szelektíven csak egy enzimet gátolnának. Ilyen inhibitorokat a gyógyszerkutatók már régóta próbálnak fejleszteni, mivel a patológikus komplementaktivációt a szerin proteázok gátlása révén lehetne a legegyszerűbben visszaszorítani (Ricklin és Lambris, 2007). Az eddig talált kismolekulás gátlószereknek azonban éppen az a hiányosságuk, hogy alacsony a specificitásuk (Qu és mtsi., 2009). A vérben keringő különböző tripszinszerű szerin proteázok aktív centruma meglehetősen hasonló, ezért egy kis szerves molekula, ami az egyik proteáz aktív centrumába nagy affinitással be tud kötődni, a rokon enzimek aktív centrumát is nagy valószínűséggel felismeri és kapcsolódik hozzájuk. Jó példa erre a FUT-175 (6-amidino-2-naftil-4-guanidinbenzoát dihidroklorid), ami a komplement proteázok egyik leghatékonyabb szintetikus inhibitora, gátolja azonban a tripszint, a plazmint, a plazma kallikreint és a trombint is (Fujii és Hitomi, 1981). Specifikusabb gátlószerek kifejlesztésére akkor van esély, ha az enzimmel nagyobb kontaktfelületen kölcsönható molekulákat fejlesztünk. Ebből a szempontból érdekes megemlíteni, hogy a vérplazmában szinte kizárólag szerpint típusú inhibitorok találhatók, a proteáz inhibitorok másik fő típusa, az ún. kanonikus inhibitorok, egy kivételtől (TFPI) eltekintve (Adams, 2012), nem fordulnak elő. A kanonikus inhibitorok kisméretű (tipikusan kevesebb, mint 100 aminosav) fehérjék, amelyek szubsztrátszerű módon bekötődnek a proteáz aktív centrumába, azonban ez a kötődés olyan erős, hogy a kanonikus inhibitor hurok elhasítása után sem disszociálnak az enzimmről (Krowarsch és mtsi., 2003). A szerpineknél tapasztalt kovalens proteáz-inhibitor komplex tehát nem alakul ki, de a kötés erőssége olyan nagy lehet ( $K_i \leq 10^{-9}$  M), hogy a proteáz-inhibitor kölcsönhatás gyakorlatilag irreverzibilisnek tekinthető. A kanonikus inhibitorok egy fehérjevázból és az ahhoz kapcsolódó merev inhibitor hurokból állnak. Az inhibitor hurok a proteáz aktív centrumába való kötődése során több ponton alakít ki kölcsönhatást az enzimmel, ami erős és specifikus kapcsolatot eredményez.

A kanonikus inhibitorok tehát elvileg alkalmasak lehetnének arra, hogy nagy specificitással gátoljanak egy komplement szerin proteázt. Mivel természetes forrásból nem izolálhatók ilyen inhibitorok, elhatároztuk, hogy mesterséges evolúciós technikával állítunk elő ilyen molekulákat. A kanonikus inhibitorok, mivel kis fehérjemolekulák, funkcionálisan aktív állapotban megjeleníthetők M13 fág felszínén. Az inhibitorhurok proteázzal kölcsönható aminosav pozíciói (kb. 6-7 pozíció) meglehetősen toleránsak a mutációkkal szemben, így lehetőség nyílik egy nagyméretű ( $\sim 10^{10}$ ) inhibitor-fág könyvtár létrehozására, amiből kötési tesztek alapján kisselektálhatjuk a leghatékonyabb inhibitorokat (Szenhe és mtsi., 2007).

A MASP-1 és a MASP-2 molekulák ellen szelektáltunk fág bemutatási technikával inhibitor molekulákat (Kocsis és mtsi., 2010). Kiindulási molekulaként a napraforgó tripszin

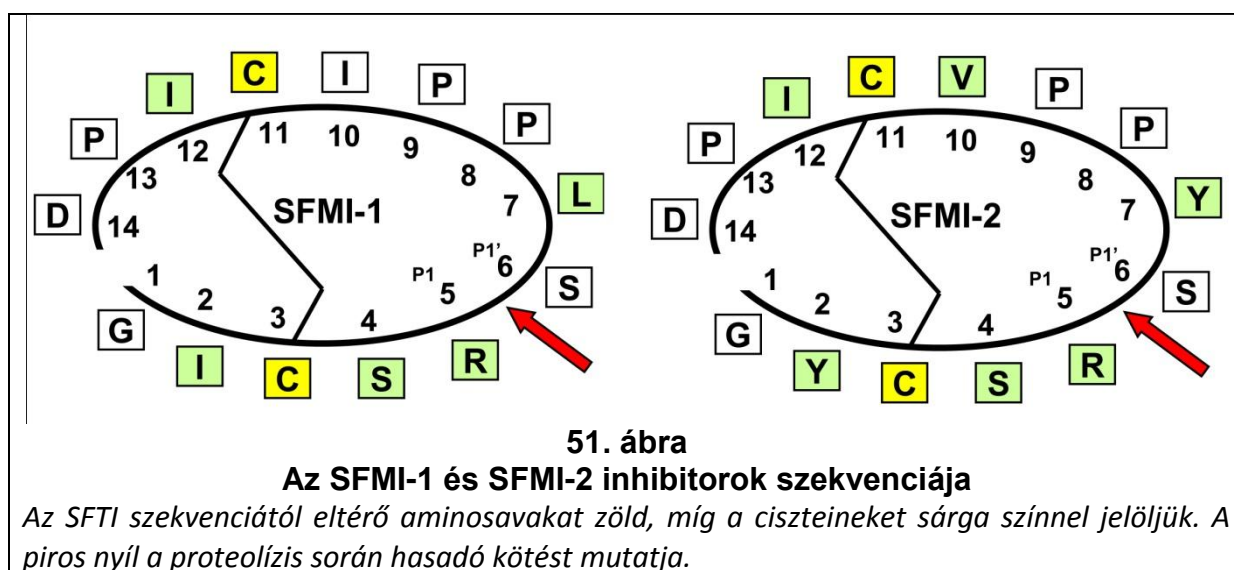
inhibitor (SFTI) választottuk, ami a legkisebb természetes tripszin inhibitor (Luckett és mtsi., 1999). Az SFTI 14 aminosav hosszúságú ciklopeptid, ami egy diszulfid hidat is tartalmaz. A tripszint rendkívül hatékonyan gátolja ( $K_i < 10^{-9}$  M), a MASP-1 és MASP-2 proteolitikus aktivitására azonban nincs hatással. Az SFTI szerkezeti szempontból tulajdonképpen a nagyobb méretű Bowman-Birk kanonikus inhibitoroknak a proteázokkal kölcsönható hurokrégióját képviseli. Az inhibitorfunkció ellátásához szükséges merevséget a diszulfid híd és a szekvenciában egymás mellett elhelyezkedő két prolin adja. Érdekes módon a ciklikusság viszont nem játszik döntő szerepet a funkció szempontjából, az SFTI linearizált (Gly<sup>1</sup> és Asp<sup>14</sup> között) verziója is igen erősen gátolja a tripszint ( $K_i = 0,1$  nM) (Zablotna és mtsi., 2002). A lineáris SFTI kirakható a fágok felszínére a p8 burokfehérjéhez fúzionáltatva, lehetővé téve SFTI könyvtárak szűrését immobilizált MASP-1 és MASP-2 proteolitikus fragmentumokat tartalmazó fág-ELISA rendszerben. A Bowman-Birk inhibitorok szekvencia elemzése alapján határoztuk meg, hogy mely aminosavakat változtatjuk meg az SFTI szekvenciájában (50. ábra).



A szerkezeti szempontból esszenciális két ciszteint és két prolint változatlanul hagytuk. A proteázzal kölcsönhatásba lépő csoportokat teljesen randomizáltuk hat pozícióban (32 különböző kódon), a P1 pozíció esetében, mivel tripszinszerű enzimekről van szó, lizint vagy arginint engedünk meg. A randomizált pozíciók közé tartozott, a Bowman-Birk vázban egyébként konzervált, P2 treonin és P1' szerin. A fág könyvtárunk így elvileg  $32^6 \times 2 = 2,15 \times 10^9$  egyedi klónt tartalmazhatott, amit meg is közelített könyvtárunk valós mérete ( $\sim 2 \times 10^9$ ). Három szelekciós kört végeztünk MASP-1 és MASP-2 enzimeken, aminek eredményeként két, funkcionálisan különböző inhibitor populációt kaptunk. Az egyik inhibitor populáció tagjai mindkét proteázt gátolták és mindkét proteázon való szelekció során megjelentek, míg



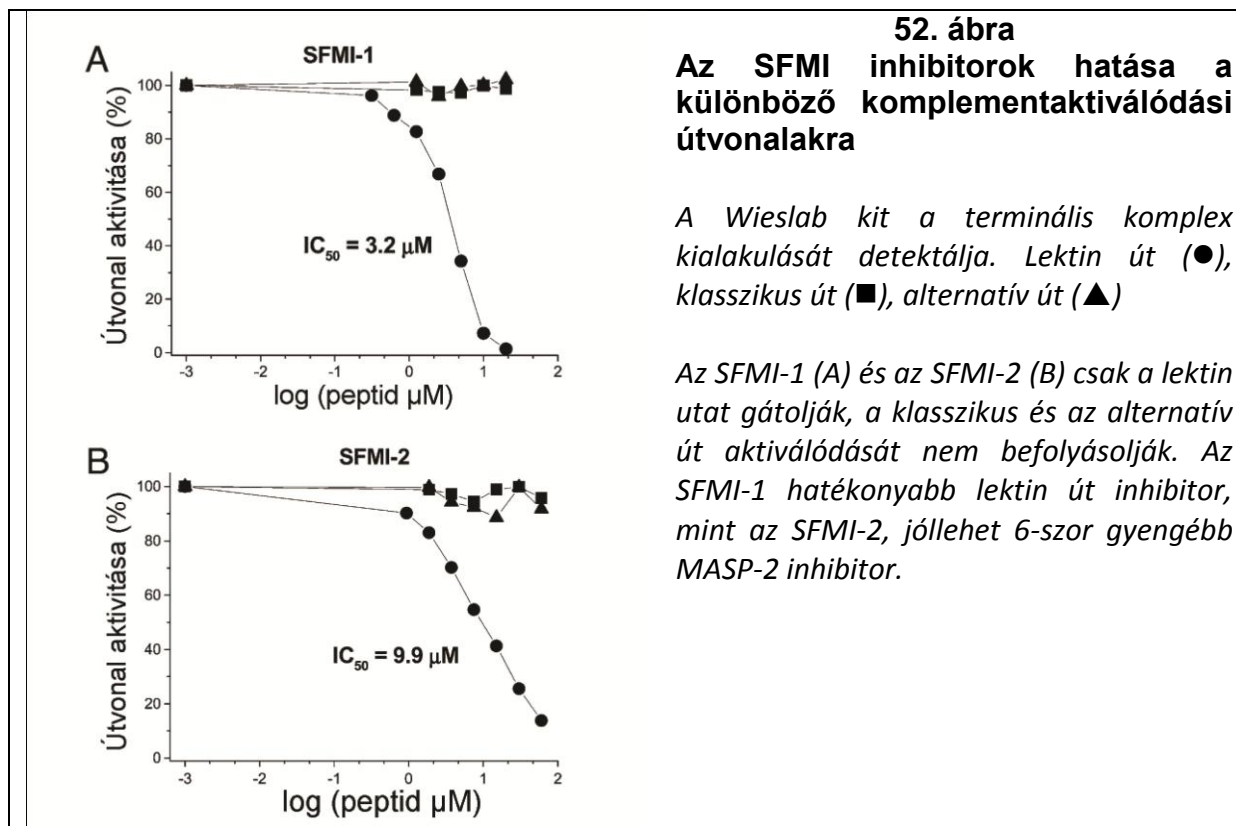
a másik populáció tagjai csak MASP-2-t gátoltak és nyilvánvalóan csak a MASP-2 jelenlétében történt szelekció során jelentek meg. Vagyis MASP-2 szelektív inhibitorokat sikerült nyernünk a MASP-2 elleni szelekció során, viszont a MASP-1 ellen szelektált inhibitorok a MASP-1 mellett a MASP-2-t is gátolták, ugyanakkor ilyen, kevésbé szelektív inhibitorokat MASP-2 elleni szelekció során is kaptunk. Megterveztük és megszintetizáltattuk az inhibitor populációkat reprezentáló konszenzus szekvenciákat és a további kísérleteket ezekkel végeztük (51. ábra). A MASP-1-et is gátló konszenzus szekvencia: SFMI-1 (G<sub>I</sub>CSRS<sub>L</sub>PP<sub>I</sub>CIPD), és a MASP-2 szelektív konszenzus inhibitor szekvencia: SFMI-2 (G<sub>Y</sub>CSRS<sub>Y</sub>PP<sub>Y</sub>CIPD) mindössze három pozícióban tér el egymástól (aláhúzással jelölve).



A két inhibitor hatását először a rekombináns MASP katalitikus fragmentumokon teszteltük. Az SFMI-2 a MASP-2-t hatékonyan gátolta ( $K_i = 180$  nM), a MASP-1-re viszont nem volt hatással. Az SFMI-1 a MASP-1-et erősen gátolta ( $K_i = 65$  nM), míg a MASP-2-t csak jóval gyengébben ( $K_i = 1030$  nM). Elmondhatjuk tehát, hogy az SFMI-1 elsősorban a MASP-1-et gátolja és gyengébb MASP-2 inhibitor, mint az SFMI-2. Az SFMI-2 6-szor erősebben gátolja a MASP-2 aktivitását, mint az SFMI-1. Az SFMI-1 viszont, 16-szor erősebben gátolja a MASP-1-et, mint a MASP-2-t.

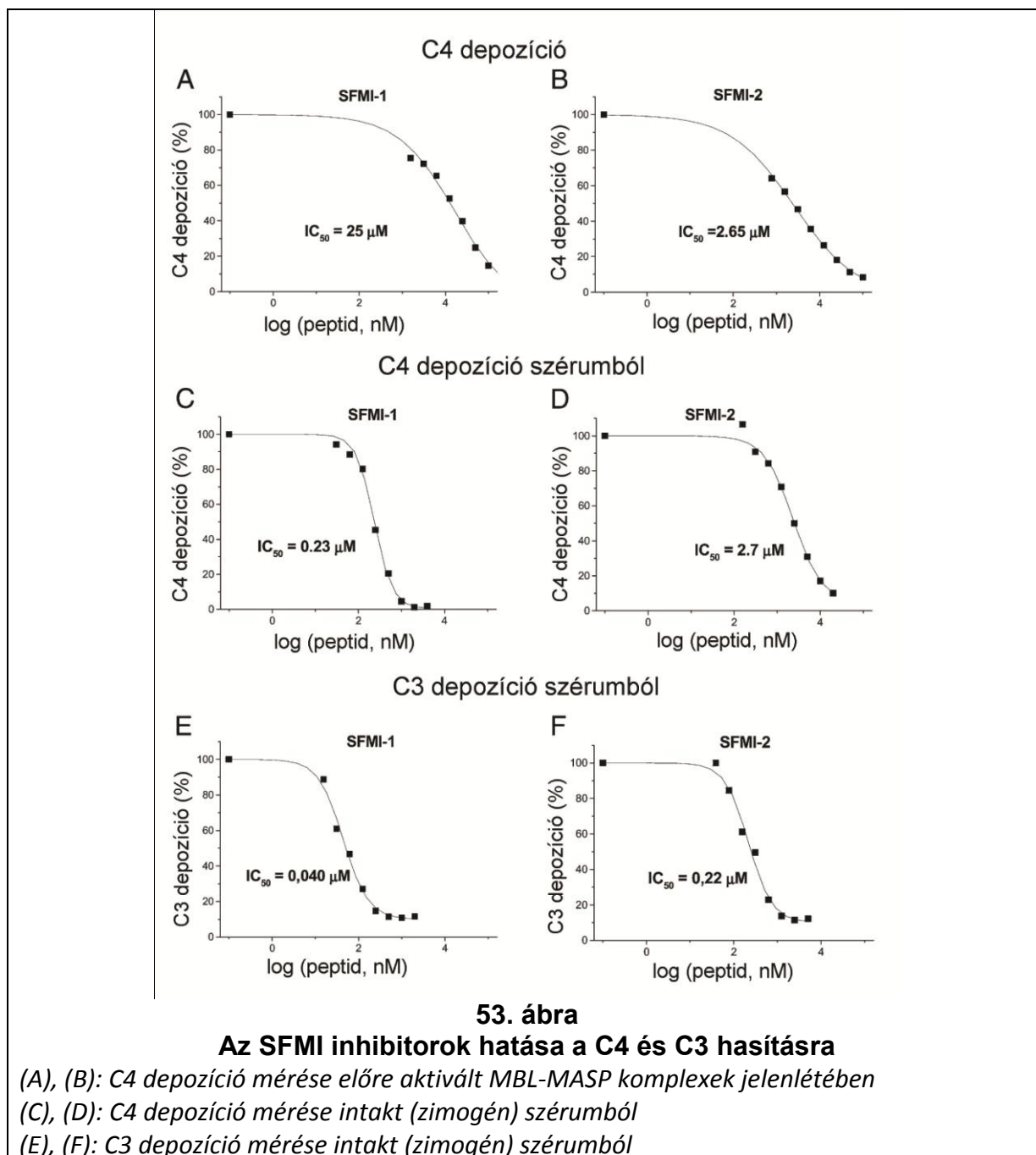
Az SFMI inhibitorok hatását a három komplement aktiválási útra a Wieslab kittel mértük meg. A Wieslab kit külön méri a három aktivációs útvonalat és a membránkárosító komplex kialakulása során keletkező C9 neoantigént detektálja (Seelen és mtsi., 2005). Ez azt jelenti, hogy ezzel a módszerrel a komplementkaszád „teljes hosszában” mérhetjük az inhibitorok hatását. Ha inhibitoraink bármelyik aktiválódási útvonal bármelyik lépését gátolják, annak tükröződnie kell a képződő membránkárosító komplexek mennyiségében. Várakozásainknak megfelelően az SFMI-1 és SFMI-2 inhibitorok csak a lektin utat gátolták, míg a klasszikus és az alternatív útra nem voltak hatással (52. ábra). Levonhatjuk tehát azt a fontos következtetést, hogy az SFMI-1 és az SFMI-2 valóban MASP-specifikus inhibitorok, a többi komplement szerin proteázt (C1r, C1s, C2, B-faktor, D-faktor) nem gátolják.

Figyelemreméltó ugyanakkor, hogy az SFMI-1 háromszor olyan hatékony inhibitornak bizonyult ( $IC_{50} = 3,2 \mu M$ ) a Wieslab esszében, mint az SFMI-2 ( $IC_{50} = 9,9 \mu M$ ).



Figyelembe véve, hogy az SFMI-1 6-szor gyengébben gátolja a MASP-2-t, mint a MASP-2 specifikus SFMI-2, a mérési eredmények a MASP-1, eddig még nem ismert, szerepére utalnak a lektin út aktiválódásában. Ha a lektin út aktiválódásában csak a MASP-2 játszana szerepet, akkor az SFMI-2-nek kellene az erősebb inhibitornak lennie a Wieslab esszében.

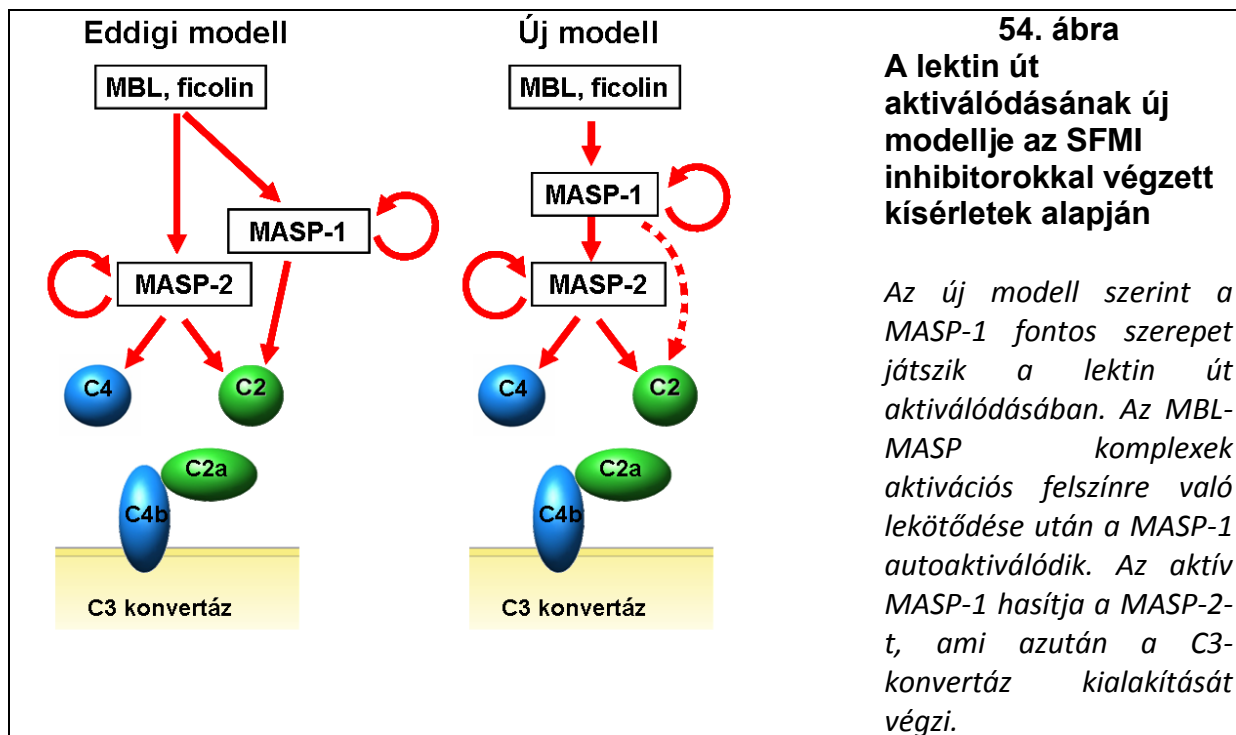
Hasonló tendencia figyelhető meg a C3 depozíciós esszében is, ahol a C3 hasítás hatékonyságát mérjük (53. ábra E,F). Itt azonban már majdnem 6-szoros a különbség az  $IC_{50}$  értékek között az SFMI-1 javára ( $IC_{50}$  SFMI-1 =  $0,04 \mu M$ ;  $IC_{50}$  SFMI-2 =  $0,22 \mu M$ ). Ezek a mérések egyértelműen arra utalnak, hogy a MASP-1 valamilyen módon jelentősen hozzájárul a C3 hasításához. Tudjuk ugyanakkor, hogy a MASP-1 közvetlen C3 hasító képessége elhanyagolhatóan kicsi. A hozzájárulás tehát csak közvetett módon valósulhat meg.



A MASP-1 egyedül nem képes beindítani a komplement kaskádát, mert nem hasít C4-et. A C4 hasítás a C3 konvertáz képzés első lépése és a lektin út során csak a MASP-2 képes rá. Érdekes ezért alaposabban megvizsgálni, hogy inhibitoraink hogyan befolyásolják a komplementaktiválódásnak ezt a lépését. A C4 hasítást kétféle C4 depozíciós esszével vizsgáltuk. Az elsőben előre aktivált MBL-MASP komplexek C4 hasító hatását vizsgáltuk. Ezt úgy valósítottuk meg, hogy mikrotiter lemezek mannánnal borított felszínére, nagy ionerősség mellett, MBL-MASP komplexeket rögzítettünk, majd mostuk a lemezeket, hogy eltávolítsuk a többi szérum komponenst. Nagy ionerősség mellett az MBL-MASP komplexek kötődnek a mannánhoz, de nem történik C4 hasítás. A mosások közben az MBL-hez kötött

MASP-ok felaktiválódnak. Az aktivált MBL-MASP komplexeket tartalmazó lemezünkhöz ezután izolált C4-et adtunk (inhibitorral vagy anélkül) és mértük a C4b depozícióját ELISA típusú esszével. Ebben a kísérletben az SFMI-2 sokkal hatékonyabban gátolta a C4 hasítást ( $IC_{50} = 2,65 \mu M$ ), mint az SFMI-1 ( $IC_{50} = 25 \mu M$ ) (53. ábra A,B). Ez teljesen összhangban van azzal, hogy a  $K_i$  értékek szerint az SFMI-2 erősebb MASP-2 inhibitor, mint az SFMI-1. Egy másik kísérleti összeállításban friss, még nem aktivált („zimogén”) szérumhoz közvetlenül hozzáadtuk az inhibitorokat mielőtt a mannánnal borított lemezre vittük volna. Ez az esszé nagyon hasonló a korábban ismertetett C3 depozíciós méréshez. Ebben a C4 depozíciós kísérletben az SFMI-1 hatékonysága drámai módon megváltozott, míg az SFMI-2 ugyanazt az  $IC_{50}$  értéket adta, mint az aktivált szérum esetén. Az SFMI-1 egy nagyságrenddel erősebb inhibitornak bizonyult ( $IC_{50} = 0,23 \mu M$ ), mint az SFMI-2 ( $IC_{50} = 2,7 \mu M$ ) (53. ábra C,D) és két nagyságrenddel erősebbnek, mint az előző kísérletben. Ez a kísérlet egyértelműen bizonyítja, hogy intakt, nem aktivált szérumban a MASP-1 aktivitásának a gátlása gátolja a C4 MASP-2 általi hasítását. Ez pedig csak azzal magyarázható, hogy a MASP-1 jelentősen hozzájárul a MASP-2 aktiválásához. Ugyan két különböző kísérleti összeállítás esetén óvatosnak kell lennünk az  $IC_{50}$  értékek közvetlen összevetésénél, azonban az a tény, hogy az SFMI-2-re vonatkozó  $IC_{50}$  értékek gyakorlatilag megegyeznek a két kísérletben, arra utal, hogy mindkét esetben az aktív MASP-2 gátlását mérjük. Ez pedig azt sugallja, hogy a zimogén MASP-2 fő aktivátora a MASP-1. Eredményeink összhangban vannak azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy MASP-1 knock out egerek szérumában a lektin út sokkal lassabban indul be és nem olyan hatékony, mint a vad típusú egerek széruma esetén (Takahashi és mtsi., 2008). A MASP-1 knock out egerek szérumából azonban a MASP-1 mellett hiányzik még a MASP-3 és a MAP44 is. Nem lehet ezért biztosan megmondani, hogy a mért effektus melyik komponens hiányának a következménye. Másrészt a MASP-1 mennyiségénél fogva a lektin út fő komponense, ezért eltávolítása a szérumból teljesen megváltoztatja az MBL-MASP komplexek összetételét, a különböző formák eloszlását. A mi kísérleti rendszerünkben az MBL-MASP komplexek összetétele és eloszlása nem változik meg és a kisméretű peptid inhibitor nagy valószínűséggel könnyen hozzáfér a komplexben lévő MASP-hoz és nem disszociáltatja őket az MBL-ről. Kísérleti eredményeink azért különösen értékesek, mivel a normál fiziológiás állapot minimális megzavarásával kaptuk őket, szemben más megközelítésekkel, ahol erősen manipulált szérumokat használtak (Møller-Kristensen és mtsi., 2007). Eredményeink alapján elmondhatjuk tehát, hogy a MASP-1 nem csak kiegészítő szerepet játszik a lektin út aktiválásában, hanem a MASP-2 mellett a másik fontos komponens. Ez alapján egy új modellt javasolhatunk a lektin út aktiválására (54. ábra). Az SFMI inhibitorokkal végzett kísérletek alapján, mivel nincs teljesen MASP-1 specifikus inhibitorunk, nem tudjuk teljes bizonyossággal kizárni, hogy a MASP-2 aktiválásához, valamilyen mértékben, a MASP-2 autoaktivációja is hozzájárul. Legújabb kísérleti eredményeink, amelyeket egy másik inhibitorvázon szelektált, teljesen MASP-1 specifikus inhibitor alkalmazásával kaptunk, teljes egészében megerősítik a MASP-1 központi szerepére vonatkozó elképzeléseinket: a MASP-1 a zimogén MASP-2 kizárólagos aktivátora és a MASP-1 gátlásával a MASP-2 aktiválódását is teljesen gátoljuk (Héja és mtsi., 2012). Ez magyarázza

az SFMI-1 rendkívüli hatékonyságát a „zimogén” szérummal végzett kísérletekben. Egy, az értekezés írása közben megjelent publikáció, amely egy MASP-1 hiányos beteg szérumának tanulmányozásán alapul, szintén az általunk felállított aktivációs modellt igazolja (Degn és mtsi., 2012).



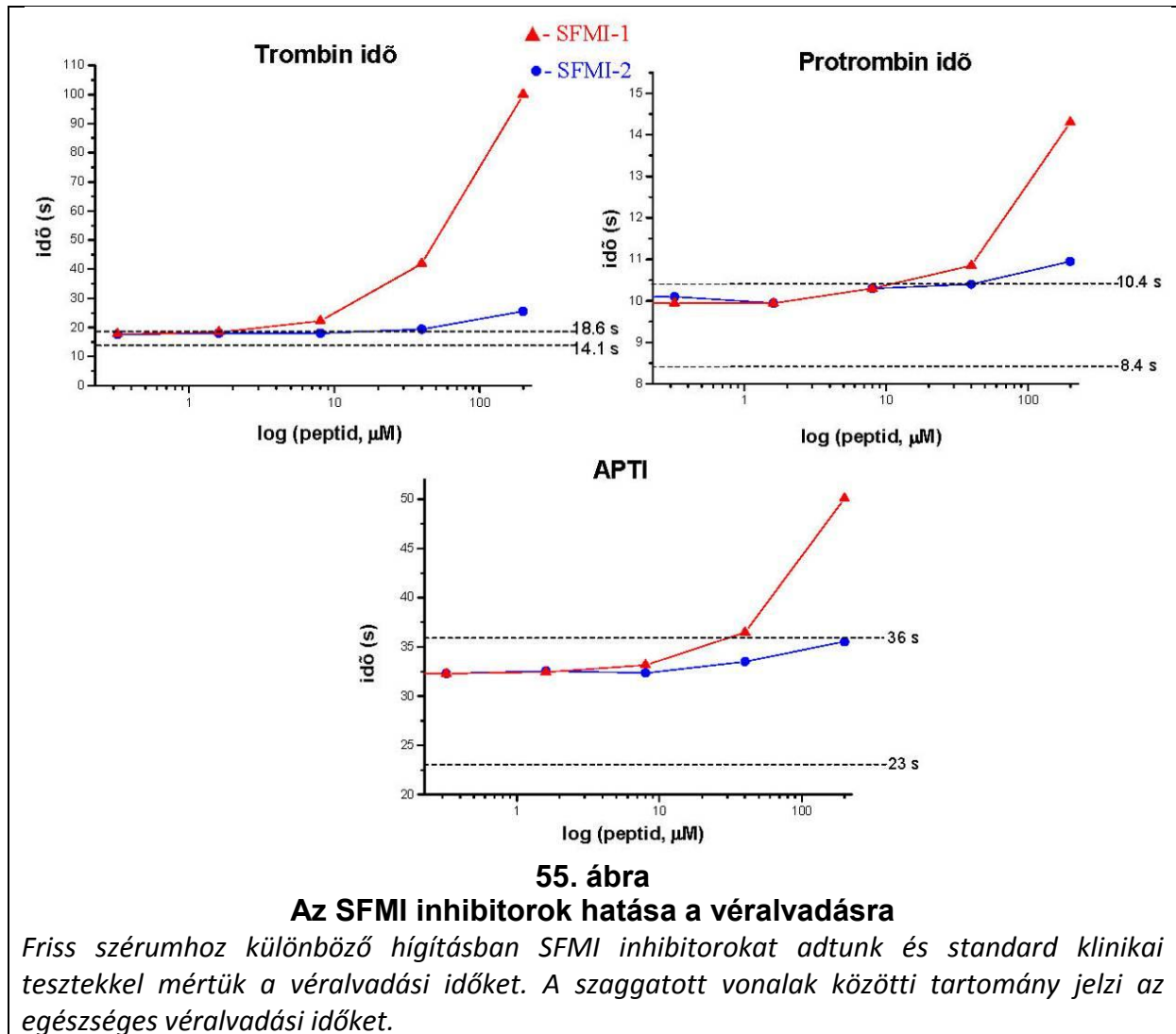
A MASP-1 proteolitikus aktivitásának gátlásával gátoljuk a C2 hasító képességét is. Mint arra MASP-1 depletált humán szérummal végzett kísérletek is utalnak, a MASP-1 C2 hasító képessége révén is hozzájárulhat a C3 konvertáz képződéshez (Møller-Kristensen és mtsi., 2007). Az SFMI-1 tehát egyszerre gátol két fontos folyamatot, a MASP-2 MASP-1 általi aktiválását és a C2 MASP-1 általi hasítását. Ezek közül nyilván a MASP-2 aktiválódásának a gátlása a fontosabb, hiszen aktív MASP-2 nélkül nem keletkezik C4b sem. Mindazonáltal a MASP-1 C2 hasító képességének a gátlása is hozzájárulhat a lektin út gátlásához.

Az a tény, hogy a MASP-2 specifikus SFMI-2 inhibitor nem gátolja a C1s-t, megerősíti azt a kristályszerkezetek alapján korábban levont következtetést, hogy a két szinte azonos szubsztrátspecificitással rendelkező enzim aktív centruma eltérő kölcsönhatásokat létesít a szubsztrátokkal (Harmat és mtsi., 2004). A kanonikus inhibitorok, így az SFMI-2 is, szubsztrátszerű inhibitorok. Kis méreténél fogva az SFMI-2 nyilván nem tud kötődni az exosite-okhoz sem a CCP sem pedig az SP doméneken. A kanonikus inhibitor az aktív centrum közvetlen környezetéhez kötődnek. A kanonikus inhibitorhurok és a proteáz közötti kölcsönhatást tehát nagymértékben megszabják az SP domén felszíni hurokrégiók. Ezek pedig a C1s és a MASP-2 esetén eltérő konformációval rendelkeznek.

A lektin út gátlása rendkívül fontos lehet iszkémia-reperfüziós sérülés esetén. Az átmeneti oxigénhiányos állapot megszűnése után, mikor újra helyreáll a szövet vérellátása a komplementrendszer az iszkémiás sejteket megváltozott sajátjának (damage associated

molecular pattern= DAMP) ismeri fel, és megkezdi eliminálásukat (Zhang és mtsi., 2006). A lektin út gátlásával az iszkémia-reperfúziós sérüléssel járó szövetpusztulás visszaszorítható lenne szívinfarktus, szélütés vagy például szervátültetés alkalmával (Jordan és mtsi., 2001). Mivel eddig a MASP-2-t tekintették egyedül a lektin út beindításáért felelős szerin proteáznak a gyógyszerfejlesztési stratégiák is kizárólag a MASP-2-re koncentráltak (Schwaeble és mtsi., 2011). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy felfedeztünk egy új targetet az iszkémia-reperfúziós szövetpusztulás megakadályozására. További, *in vivo* kísérletek szükségesek annak eldöntésére, hogy melyik proteáz gátlása ad hatékonyabb védelmet. Ebből a szempontból érdemes figyelembe venni a MASP-1 egyéb funkcióit is. A PAR receptorok hasítása szintén hozzájárulhat az iszkémia-reperfúziós sérülés súlyosságához. A PAR4 receptor hasítása révén is aktiválódó p38 MAPK aktivitásának gátlásával például csökkenthető volt az iszkémia-reperfúziós sérülés mértéke patkány szívinfraktus modellben (Gao és mtsi., 2002).

Az *in vitro* evolúciós technikával szelektált MASP inhibitorok megerősítették a MASP-1 trombinszerű jellegéről korábban kialakult képet. A  $K_i$  értékek szerint az SFMI-1 55-ször erősebben gátolja a trombint ( $K_i = 10000$  nM), mint az SFMI-2 ( $K_i = 550000$  nM), aminek hatása a trombinra gyakorlatilag elhanyagolható. Ezzel összhangban vannak azok a mérési eredményeink, amelyek szerint az SFMI-1 gátló hatást mutatott mind a három standard véralvadási tesztben (TT, PT és APTT), míg az SFMI-2 extrém magas koncentráció esetén is alig mutatott detektálható hatást (55. ábra).



A TT (thrombin time) esszé során aktivált trombin adunk a plazmához, tehát végső soron azt mérjük, hogy az inhibitorok gátolják-e a trombin aktivitását a többi plazma protein jelenlétében. A PT (prothrombin time) testben a külső (extrinsic), míg az APTT (activated partial thromboplastin time) testben a belső (intrinsic) véralvadási útvonalat mérjük. A PT időkből következtethetünk arra, hogy az inhibitorok gátolják-e a VIIa-faktort, a Xa-faktort vagy a trombin, míg az APTT adatok a XIIa-faktor, a XIa-faktor, a IXa-faktor vagy a trombin gátlása esetén térnek el a normál értéktől. A megnövekedett alvadási idők nagy valószínűséggel kizárólag a trombin gátlásának köszönhetőek, bár nem zárhatjuk ki teljesen, hogy a kaszkádban a trombin megelőző proteázok valamelyikét is gátoja az SFMI-1. Az a tény, hogy egy MASP-1 ellen szelektált kanonikus inhibitor a trombin is gátolja, arra utal, hogy a két proteáz aktív centruma hasonló. A MASP-1 és a véralvadás közötti kapcsolatra utal az a tény is, hogy a MASP-1 knock out egerekben a faroksebzés utáni véralvadási idő hosszabb, mint a vad típusú egerekben (Takahashi és mtsi., 2011). Hasonló következtetést vonhatunk le abból a megfigyelésből is, hogy a MASP-1 knock out egerekben, eltérően a vad típustól, nem lehetett vas kloriddal ( $\text{FeCl}_3$ ) trombogenezist indukálni (La Bonte és mtsi.,

2011). Ez utóbbi megfigyelés egy újabb kapcsolatot sejtet a MASP-1 aktivitása és az iszkémiareperfüzió (pl. szívinfarktus, stroke) patogenezise között. Érdemes lenne a fenti kísérleteket vad típusú egerekben MASP-1 specifikus inhibitorok jelenlétében is elvégezni. A lektin út szelektív inhibitorainkra nemzetközi szabadalmi bejelentést tettünk, és gyógyszerfejlesztési projektbe kezdtünk. Ennek egyik első lépése az, hogy állatkísérletekben igazoljuk inhibitoraink *in vivo* hatékonyságukat.

Összefoglalva a MASP-1 szerepével kapcsolatban elmondhatjuk, hogy a MASP-1 a legérdekesebb, legsokoldalúbb proteáz a komplementrendszerben. A MASP-1-nek több szubsztrátját is ismerjük a komplementrendszeren belül és kívül (8. táblázat) és legtöbbjét mi azonosítottuk kutatásaink során.

Szubsztrát	Funkció
MASP-1	autoaktiváció
MASP-2	lektin út beindítása
C2	C3-konvertáz képzés
C3(H <sub>2</sub> O)	ismeretlen
C1-inhibitor	kaszádrendszerek gátlása
antitrombin	kaszádrendszerek gátlása
fibrinogén	véralvadás, gyulladáskeltés
XIII-faktor	véralvadás
PAR4	gyulladáskeltés
nagy molekulású kininogén	gyulladáskeltés

#### 8. táblázat A MASP-1 ismert szubsztrátjai

A MASP-1 egyik legfontosabb funkciója a lektin út beindítása a MASP-2 aktiválása révén. A MASP-1, mint azt eredményeink mutatták, sokkal gyorsabban autoaktiválódik, mint a MASP-2 és az aktív MASP-1 hasítja a zimogén MASP-2-t. A MASP-1 C2 hasítása révén szintén hozzájárul a C3-konvertáz komplex kialakulásához. A MASP-1 komplementrendszeren kívüli szubsztrátjai kivétel nélkül proinflammatorikus folyamatokban vesznek részt. Legfontosabb ezek közül talán a PAR4, amelynek hasításával a MASP-1 közvetlenül aktiválja az endotél sejteket. Ez a komplementrendszer egy új, általunk felfedezett funkciója. A bradykinin felszabadításának a nagymolekulású kininogénből szintén lokális proinflammatorikus hatása lehet. A fibrinogén és a XIII-faktor hasítása egy ősi immunvédekezési mechanizmus visszatükröződése az emberben, egyben pedig kapcsolatot teremt a véralvadási és a komplement kaszkádok között. A MASP-1 tehát amellet, hogy központi szerepet játszik a lektin út iniciációjában, proinflammatorikus funkcióival hozzájárul egy hatékonyabb immunválasz kialakulásához. A MASP-1 a többi komplement proteázhoz képest, amelyeknek csak egy-két természetes szubsztrátjuk van, szélesebb specifitású proteáz, ami szerkezetében is jól tükröződik. Ebben a tulajdonságában is hasonlít a trombinra, amelynek szintén több természetes szubsztrátja van (Huntington, 2005). Mindkét enzimre igaz



azonban, hogy egyszerre széles specificitásúak és szelektívek, hiszen a többféle természetes szubsztrát hasítával ugyanabban a folyamatban vesznek részt. A trombin esetében ez a hemosztatikus válasz beindítása, felerősítése és szabályozása molekuláris és sejtes folyamatokon keresztül. A MASP-1 eddig azonosított összes természetes szubsztrátja az immunválasszal kapcsolatos. A MASP-1 szerepe a felismerőmolekulák által közvetített veszély szignálokra adott sokrétű válasz beindításában van.

## 7. További tervek, perspektívák

A komplementrendszer kutatása világszerte reneszánszát éli. Ennek oka elsősorban az, hogy egyre több betegségről, köztük súlyos, sok millió embert érintő népbetegségről, derül ki, hogy patogenezisében szerepet játszik a komplementrendszer kontrolálatlan aktivitása (Wagner és Frank, 2010). Az iszkémia-reperfúziós sérülésről már esett szó, amely a kardiovaszkuláris kórképek következtében a vezető halálok a fejlett társadalmakban és elsősorban a lektin úttal kapcsolatos. Két nagyon súlyos és a társadalomra rendkívüli terheket rakó öregkori betegség az Alzheimer-kór és az időskori makula degeneráció (age related macula degeneration). Az Alzheimer-kórban egyértelműen kimutatták a klasszikus út érintettségét (Bonifati és Kishore, 2007), míg a makula degeneráció az alternatív út fő inhibitorának, a H-faktornak a hibás, elégtelen működésével kapcsolatos (Zipfel és mtsi., 2006). Érthető, hogy a komplementrendszer aktiválódási mechanizmusának felderítésére és gyógyszerként alkalmazható komplement gátlószerek kifejlesztésére nagy erőfeszítéseket tesznek nemzetközi szinten (Ricklin és Lambris, 2007). Ugyanakkor az is világossá kezd válni, hogy a komplementrendszer nem csak szűken vett immunológiai funkciókat lát el. Ebből a szempontból egyik legérdekesebb aspektus az egyedfejlődés, ahol még számos új felfedezés várható a komplementrendszer szerepével kapcsolatban. Nemrégiben mutatták ki, hogy újszülött egerek agyában a fölösleges szinapszisok eliminálásában a klasszikus út fontos szerepet játszik (Stevens és mtsi., 2007). Nyilvánvalónak tűnik a feltételezés, hogy ugyanez a folyamat, ha felnőtt korban kóros módon újra aktiválódik, akkor neurodegeneratív folyamatokat idéz elő. Ugyancsak a komplementrendszer egyedfejlődésben betöltött szerepére utal az a felfedezés, hogy egy súlyos fejlődési rendellenességekkel kapcsolatos tünetcsoport, a 3MC szindróma, hátterében a MASP-3 és a CL-11 génekben bekövetkező mutációk állnak (Sirmaci és mtsi., 2010; Rooryck és mtsi., 2011). Az azonosított MASP-3 mutációk az SP doménen az aktív hely környezetében találhatóak, és olyan aminosav cserékkel járnak, amelyek következtében az enzim nagy valószínűséggel elveszti proteolitikus aktivitását. A komplementrendszer és az egyedfejlődés kapcsolatáról szólva érdemes megemlíteni, hogy a *Drosophila* embrióban egy tripszinszerű szerin proteázokból (gastrulation defective, snake, easter) álló kaszkádrendszer szabályozza a dorzális-ventrális (hát-hasi) polaritás kialakulását (LeMosy és mtsi., 1999). Ez a kaszkádrendszer működési elvében semmiben sem különbözik a komplement vagy a véralvadási kaszkádtól, és a benne résztvevő enzimek több doménből álló szerin proteázok. Egyáltalán nem alaptalan tehát azt

feltételezni, hogy a komplementrendszer is elláthat hasonló funkciókat az egyedfejlődés során.

A legtöbb nyitott kérdés kedvenc kutatási témámmal, a lektin úttal, kapcsolatban merül fel. A második legnagyobb mennyiségben (5 µg/ml) jelenlévő proteáz, a MASP-3, szerepe meglehetősen tisztázatlan. Mint láttuk, a genetikai vizsgálatok kapcsolatba hozták a 3MC szindrómával, azonban szubsztrátspecificitása és aktiválódási mechanizmusa nem ismert és nem rendelkezünk róla kristályszerkezettel sem. Előkísérleteink szerint, a MASP-3 nem képes autoaktiválódni, tehát egy másik proteáznak kell aktiválnia. Az irodalmi adatok szerint, a komplementrendszer aktiválásához a MASP-3 nem járul hozzá, sőt mivel képes a felismerő molekulákról leszorítani a MASP-1-et és MASP-2-t, inkább inhibitorként viselkedik. Magam részéről nehezen hihető elképzelésnek tartom, hogy egy proteolitikusan aktív szerin proteáznak ilyen inhibitor jellegű szerepe lenne. Nem teljesen jól definiált *in vitro* kísérletek alapján az IGFBP-5 (insulin-like growth factor-binding protein-5) szubsztrátja a MASP-3-nak (Cortesio és Jiang, 2006). (Ugyanezt egyébként már évekkel korábban a C1s-ről is kimutatták (Busby és mtsi., 2000).) Ez összhangban lehet a MASP-3 egyedfejlődésben játszott szerepével, azonban ezek az eredmények további megerősítésre szorulnak.

A közelmúltban felmerült a lektin út és az alternatív út kapcsolata. Ugyanabból a laboratóriumból származó egymásnak részben ellentmondó adatok alapján a pro-D-faktor hasításáért a MASP-1 és/vagy a MASP-3 a felelős (Takahashi és mtsi., 2010; Iwaki és mtsi., 2011). A MASP-1 és MASP-3 pro-D-faktor hasítási képességét viszonylag könnyen lehet ellenőrizni, (feltéve, ha a tisztított fehérjék rendelkezésünkre állnak), azt azonban nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy fiziológiásan is releváns folyamatról van-e szó. A D-faktorról tudjuk, hogy mindig, még a komplementrendszer többi tagjának aktiválódása előtt, aktív állapotban van jelen a vérplazmában. A MASP-ok viszont csak megfelelő veszély szignál (PAMP vagy DAMP) jeleléte esetén kerülnek aktivált állapotba. Kérdés tehát, hogy nyugalomban lévő vérplazmában mi hasítja a pro-D-faktort. Ugyancsak felmerült a MASP-3 részvétele az alternatív út C3-konvertázának kialakításában a B-faktor hasításán keresztül. A lektin út és az alternatív út esetleges kölcsönhatásainak tisztázása nagyon fontos, hiszen az alternatív út a komplementrendszer legfontosabb jelerősítő mechanizmusa. Ha a lektin út normális működése valóban előfeltétele az alternatív út aktiválódásának, akkor a komplementrendszerrel eddig kialakult képet alaposan felül kell vizsgálnunk. MASP-3 specifikus, *in vitro* evolúciós technikával előállított, kanonikus inhibitorok segítségével ezt a kérdést egyértelműen meg tudnánk válaszolni.

Ugyancsak évek óta tisztázatlan kérdés az MBL-MASP és fikolin-MASP komplexek összetétele és szerkezete. Különösen érdekes ez a kérdés annak az eredményünknek a fényében, hogy a MASP-1 aktiválja a MASP-2-t. Egy komplexen belül helyezkedik el a kétféle proteáz, nem zárva ki akár a vegyes dimer lehetőségét sem, vagy pedig egy felismerő molekulához csak egyféle proteáz kötődik? Az utóbbi esetben viszont az MBL-MASP komplexeknek egymáshoz megfelelő közelségben kell az aktivációs felszínen elhelyezkedni ahhoz, hogy a két proteáz érintkezessen. További nyitott probléma a nemkatalitikus fragmentumok, a MAp19 és a MAp44 szerepe. Különösen érdekes ebből a szempontból az a

tény, hogy a MAp44 legnagyobb mennyiségben a szívizomban fejeződik ki. Elképzelhető, hogy a MAp44 természetes inhibitoroként védi a szívizmot a lektin út túlzott aktiválódásától, például iszkémia-reperfúziós esetén.

A lektin út specifikus inhibitorok mellett a másik két útvonalra szelektív inhibitorokat is fejlesztünk. A klasszikus utat a C1r vagy C1s gátlásával, míg az alternatív utat a D-faktor gátlásával lehetne szelektíven blokkolni. Az útvonalspecifikus inhibitorok segítségével állatmodellekben vizsgálhatjuk a három aktiválódási út részvételét a különböző betegségek patomechanizmusában. Az útvonalspecifikus inhibitorok gyógyszerfejlesztés szempontjából is ígéretes molekulák, mivel a komplementkaszád elején avatkoznak be a folyamatba és nem okoznak teljes immunszuppressziót. A C3-konvertázok szintjén ható inhibitorok, mint például az *in vitro* evolúciós technikával nemrég fejlesztett Compstatin (Ricklin és Lambris, 2008), egyrészt a teljes komplementrendszer leállítását okozzák, másrészt viszont nem akadályozzák meg a korai komplement proteázok által gerjesztett proinflammatorikus hatásokat.

## 8. Új tudományos eredmények összefoglalása

Kutatómunkám során a komplementrendszer aktiválódásának a klasszikus és a lektin útjával foglalkoztam. Dolgozatomban azokat az eredményeket ismertetem, amelyek a két aktiválódási út beindításában résztvevő szerin proteáz enzimekre vonatkoznak. A C1r, MASP-1 és MASP-2 multidomén szerin proteázok, amelyek képesek autoaktiválódni és szubsztrátjaikat specifikusan, limitált proteolízis révén hasítják. Munkám során sikerült tisztázni a szűk szubsztrátspecifitás molekul szerkezeti hátterét, az autoaktiválódás mechanizmusát, a lektin út aktiválódási mechanizmusának eddig nem ismert részleteit, és felfedeztük a komplementrendszer egy új funkcióját, a proteáz (MASP-1) általi közvetlen sejtaktiválást.

A proteázok tanulmányozását, különös tekintettel a szerkezeti vizsgálatokra, az tette lehetővé, hogy elsőként nekünk sikerült rekombináns úton, tiszta formában, elegendő mennyiségben előállítanunk ezeket, az egyébként szérumból csak nehezen izolálható, fehérjéket.

### A komplementrendszer aktiválódásának klasszikus útja

A komplementrendszer első komponense, a C1 komplex, egy heteropentamer enzimkomplex, ami egy felismerőmolekulából (C1q) és egy C1r és C1s proteázokat tartalmazó, C1s-C1r-C1r-C1s szekvenciájú tetramerből áll. A klasszikus út aktiválódásának első enzimatis lépése a zimogén C1r autoaktiválódása. Az aktív C1r, a C1 komplexen belül, hasítja, és ezzel aktiválja a zimogén C1s-t. Az aktív C1s ezután hasítja az oldatfázisban lévő C4 molekulát, majd az aktivációs felszínre lerakódott C4b komponenshez kötődött C2 proteázt. A C1 komplex szerkezete nem ismert, csupán különböző modellek állnak rendelkezésünkre. Ezek a modellek jórészt statikus információkon (elektronmikroszkópos képek, röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezetek) alapulnak, ezért nem sokat mondanak magáról az aktiváció folyamatáról, minek folyamán nagymértékű konformációváltozásoknak kell végbemenni.

A klasszikus aktiválódási út kulcsenzime a C1r, mivel csak ez képes autokativálódni, a C1s nem. A C1r szerepével, aktiválódási mechanizmusával kapcsolatos legfontosabb új eredményeink a következők:

- Kifejeztük rekombináns formában a C1r katalitikus régióját reprezentáló CCP1-CCP2-SP ( $\gamma$ B), CCP2-SP és SP fragmentumokat. A rekombináns fehérje expressziót *E. coli* sejtekben végzetük, az oldhatatlan inklúziós testek formájában felhalmozódott C1r fragmentumokat renaturáltuk és homogenitásig tisztítottuk. Renaturáció során mindhárom fragmentum autoaktiválódott, vagyis megtörtént a hasadás az aktivációs peptid Arg<sup>463</sup>-Ile<sup>464</sup> kötése mentén. Ezzel bebizonyosodott, hogy **az autoaktiváció a szerin proteáz domén inherens tulajdonsága**, ahhoz a többi domén jelenlétére nincs szükség. A szerin proteáz domén önmagában tartalmazza az összes kötőhelyet és a

katalitikus apparátust, ami az autoaktiválódáshoz szükséges. A CCP domének jelenléte felgyorsíthatja az autokativáció folyamatát, azonban nem nélkülözhetetlenek a folyamathoz. A (CCP1-CCP2-SP)<sub>2</sub> dimer képződése szintén nem előfeltétele az autoaktivációnak.

- A kismolekulás szintetikus szubsztrátokat mindhárom fragmentum egyfoma hatékonysággal hasította. **A CCP modulok jelenléte tehát nem szükséges az aktív katalitikus centrum kialakításához. A CCP domének ugyanakkor stabilizálják a katalitikus fragmentum szerkezetét.** A DSC mérések tanúsága szerint a CCP2 modul stabilizáló hatása nagyobb, mint a CCP1 modulé. Ez pedig intenzív kölcsönhatásra utal a CCP2 és az SP domének között, amit a kristályszerkezetek is igazoltak.
- **A CCP modulok jelenléte fehérjeszubsztrátok esetén megnöveli a katalitikus hatékonyságot.** Ez arra utal, hogy a CCP domének külső kötőhelye(ke)t (exosite) tartalmaznak a nagyméretű fehérjeszubsztrátok számára. Ez nagy valószínűséggel igaz a C1r/C1s/MASP enzimcsalád többi tagjára is.
- **A C1r molekula legkisebb, dimerizációra képes egysége a CCP1-CCP2-SP fragmentum.** Míg az SP és a CCP1-SP fragmentumok széles pH tartományban monomerként viselkednek, addig a CCP1-CCP2-SP fragmentum, a teljes C1r molekulához hasonlóan, pH 5 alatt monomer, míg lúgos körülmények között dimer formában detektálható. Ez egyben azt is bizonyítja, hogy **a CCP1 modul kulcsszerepet játszik a C1r dimerizációjában.** A kristályszerkezetek megmutatták, hogy a két CCP1-CCP2-SP monomer fej-láb orientációjú dimert képez oly módon, hogy az egyik monomer CCP1 modulja a másik monomer SP doménjéhez kapcsolódik.
- Az aktív C1r CCP1-CCP2-SP fragmentum kristályszerkezete hasonlít a zimogén forma térszerkezetéhez, azzal a különbséggel, hogy **az aktív dimert erősebb kölcsönhatás stabilizálja a CCP1/SP kontaktfelületén.** Az aktív dimer tehát nehezebben bomlik monomerekre, mint a zimogén forma. Mivel a dimerben az egyik C1r monomer aktív centruma ~92 Å távolságra helyezkedik el a másik monomer hasítandó Arg-1le kötésétől, **az autoaktivációhoz a dimer szerkezetnek fel kell bomlania.**
- **Az aktív C1r kristályszerkezetében két szomszédos dimer molekulái enzim-termék komplexet alkotnak.** Detektálható a tripszinszerű proteázokra jellemző Asp<sup>631</sup> (S1)-Arg<sup>446</sup> (P1) kölcsönhatás a szubsztrátkötő zseb alján, valamint egy intermolekuláris sóhíd az enzim SP doménje (Arg<sup>665</sup>) és a termék CCP2 (Glu<sup>391</sup>) modulja között.
- Az aktív C1r kristályszerkezete alapján **új modellt dolgoztunk ki a C1r autoaktiválódására a C1 komplexen belül.** Az általunk javasolt „hasadás és visszakapcsolódás” (split and reassembly) modell jobban összhangban van a kísérleti tényekkel, mint a korábbi modellek. A zimogén C1r dimerek képesek spontán módon is felbomlani, azonban aktiváció során, amikor a C1q fejei lekötődnek az aktivációs felszínre, a spontán disszociáció felgyorsul. Disszociáció után a C1r SP domének olyan térbeli helyzetben találkoznak, ami lehetővé teszi az autoaktivációt, vagyis az egyik SP domén hasítását a másik SP domén által. A kristályszerkezetben detektált CCP2/SP intermolekuláris kölcsönhatás hozzájárulhat az átmeneti aktivációs komplex

stabilizálásához. Autoaktiváció után a C1r dimer szerkezet könnyen helyreállhat, hiszen modellünk, más modellekkel ellentétben, nem igényli a C1q karok olyan mértékű elmozdulását, ami ezt meggátolná. A helyreállt aktív dimer viszont már nem fog könnyen újra felbomlani, mivel több kölcsönhatás stabilizálja, mint a zimogén dimert. A zimogén C1s C1r általi aktivációja megtörténhet akár a disszociált akár az újra összekapcsolódott állapotban. Az aktív C1r molekulák által képzett dimer szilárd vázat biztosít a C1s molekuláknak ahhoz, hogy a C1 komplexből kinyúlva a C4 és a C2 molekulákat hasítani tudják. Modellünk, akár csak az összes többi funkcionális C1 modell, a tetramer nagyfokú konformációs flexibilitását tételezi fel az aktiválódás során a C1 komplexen belül.

- Megmutattuk, hogy a **C1r CUB2 doménjének csak  $\text{Ca}^{2+}$  ion jelenlétében van rendezett térszerkezete**,  $\text{Ca}^{2+}$  ion hiányában rendezetlen, flexibilis szerkezettel rendelkezik. Megmértük, hogy a C1r CUB2 doménje egy  $\text{Ca}^{2+}$  iont köt, 430  $\mu\text{M}$  disszociációs állandóval. Ha ezt az értéket összevetjük az emberi vérben lévő szabad  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentrációval (1,2 mM), arra a következtetésre jutunk, hogy a C1r molekulákban lévő CUB2 doméneknek csak kb. háromnegyede van kalciummal telítve, azaz csak ennyinek van rendezett térszerkezete. A kalciumot éppen nem kötő CUB2 doméneknek rendezetlen szerkezete van, ami kellő mozgékonyt biztosíthat az egész molekulának az autoaktiváció során. A  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció szerepét a C1r autoaktiválódásának a szabályozásában szérumból izolált teljes hosszúságú zimogén C1r preparátumon is ellenőriztük. Ezek a mérések megerősítették, hogy **a szérumban a CUB2 domén stabilitásának határán van és biztosítja az aktiválódási folyamathoz szükséges flexibilitást.**

### A komplementrendszer aktiválódásának lektin útja

A komplementrendszer lektin útja sokban hasonlít a klasszikus útra, azonban jóval összetettebb annál, mivel egyszerre legalább öt felismerő molekula (MBL, H-,L-, M-fikolin, CL11), három szerin proteáz (MASP-1/-2/-3) és két proteáz fragmentum (MAp19 és MAp44) alkotja az iniciációs komplexeket jórészt ismeretlen összetételben és sztöchiometriával. A sok nyitott kérdés közül az egyik legtöbbet vitatott terület a proteázok funkciója. Kutatómunkám során a MASP-1 és MASP-2 proteázok működésével kapcsolatban tettem a legtöbb új megállapítást, amelyek némelyike túlmutat a szorosán vett lektin úton, sőt még a komplementkaskádon is.

A MASP-2 képes autokativálódni és a C3-konvertáz komplex képződését katalizálni C4 és C2 komponensek hasítása által. A MASP-2 ideális objektumnak bizonyult az autoaktiválódás illetve a C3-konvertáz képzés mechanizmusának tanulmányozására. Legfontosabb új eredményeink ezen a területen a következők:

- Rekombináns fehérje expresszióval, *E. coli* sejtekben, előállítottuk a MASP-2 katalitikus régióját reprezentáló három fragmentumot: a CCP1-CCP2-SP, CCP2-SP és

SP konstrukciókat. Mindhárom MASP-2 fragmentum, ugyan lassabban, mint a C1r vagy a MASP-1, képes autokaltiválódni. Ezzel megerősítést nyert az a, C1r esetében már levont, következtetés, hogy **az autoaktiválódás a szerin proteáz domén sajátja, ahhoz a többi domén jelenléte nem szükséges.**

- A MASP-2 magányos SP doménje a C2 szubsztrátot nagy hatékonysággal hasította, míg a hatékony C4 hasításhoz szükség van legalább a CCP2 modul jelenlétére. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy **az SP domén tartalmazza mindazon kötőhelyeket és katalitikus apparátust, ami a C2 szubsztrát hasításához szükséges, a nagymértű (203 kDa) C4 szubsztrát számára viszont külső kötőhelyek (exosite) vannak a CCP modulokon.** Ezek a külső kötőhelyek már a zimogén MASP-2 molekulán is megtalálhatók, mivel a CCP domének szerkezete nem változik az aktiváció során.
- A MASP-2-C4 enzim-szubsztrát komplex térszerkezete igazolta a CCP domének szerepével kapcsolatos korábbi következtetéseinket. **A MASP-2 CCP doménjei a C4 fehérje C-terminális C345C doménjéhez kötnek 500 Å<sup>2</sup> felületen keresztül. Egy másik, nem várt, külső kötőhelyet (exosite) is detektáltunk a C4 szulfotirozin régiója és a MASP-2 SP doménje között.** A MASP-2 és a C1s szerkezetének és enzimatisz tulajdonságainak összehasonlítása alapján valószínűsíthető, hogy a két extra kötőhely a C1s molekulán is megtalálható. A CCP doméneken található külső kötőhely, mivel nagy valószínűséggel lassítja a termék (C4b) disszociációját a proteázról, fontos szerepet játszik a C3-konvertáz (C4b2a) kialakulásának mechanizmusában.
- A MASP-2 zimogén térszerkezete proteolitikusan inaktív konformációt mutat: a szubsztrátkötő zseb és az oxianionkötő zseb erősen torzult. Ezzel összhangban van az a tény, hogy a zimogén MASP-2 szintetikus szubsztrátot nem képes hasítani. Ugyanakkor meglepően hatékonyan hasítja a nagyméretű C4 fehérjeszubsztrátot. **A MASP-2 zimogén, egyláncú formája tehát tranziens jelleggel képes felvenni az aktív enzimre jellemző térszerkezetet,** amit a fehérjeszubsztráttal való kölcsönhatás stabilizál. **A zimogén proteolitikus aktivitása az autoaktiválódási folyamat kulcsa,** aminek első lépésében egy zimogén proteáz hasít egy másik zimogén molekulát. Az autoaktivációs képességgel rendelkező szerin proteázok SP doménje flexibilisebb térszerkezettel rendelkezik, mint a nem-autoaktiválódóké.

A MASP-1 a lektin út legérdekesebb, legrejtélyesebb enzime. Mennyisége a szérumban messze felülmúlja a MASP-2 mennyiségét, önmagában azonban nem képes beindítani a lektin utat. A MASP-1 szubsztrátspecifitása, fiziológias szerepe egyike volt a legvitatottabb kérdéseknek az elmúlt évtized során. Munkánk során számos új megállapítást tettünk a MASP-1 szerepével kapcsolatban. Legfontosabb új eredményeink a következők:

- Kifejeztük a MASP-1 CCP1-CCP2-SP fragmentumát *E. coli* sejtekben, az inklúziós testekben lévő fehérjét renaturáltuk és homogenitásig tisztítottuk. Megállapítottuk, hogy **a MASP-1 a MASP-2-nél gyorsabban autoaktiválódik,** és az aktív MASP-1

további autolízisre hajlamos az Arg<sup>504</sup>-Asp<sup>505</sup> kötés mentén. A MASP-1 proteolitikus aktivitása detektálható zselatin zimográfiával, ami egyedülálló a komplement proteázok között és jelzi, hogy **a MASP-1 enzimatis tulajdonságaiban eltér a rokon proteázoktól.**

- **Megcáfoltuk, azt a téves nézetet, miszerint a MASP-1 önmagában C3-konvertázként működne.** A MASP-1 a tioészter kötésében hidrolizált C3 molekulát viszonylag hatékonyan hasítja, azonban az intakt C3 molekulát csak kis sebességgel. Valószínűleg a MASP-1 csak a hidrolizált C3 molekulát képes hasítani és az intakt C3 esetében mért aktivitás a hidrolízis következménye. Az irodalomban korábban közölt ellentmondásos eredmények a mérésekhez használt C3 preparátumok eltérő C3(H<sub>2</sub>O) tartalmának voltak köszönhetőek.
- **A MASP-1 a komplement komponensek közül egyedül a C2-t hasítja számottevő hatékonysággal** ( $k_{cat}/K_M=30000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Ez önmagában nem elegendő a C3-konvertáz (C4b2a) képzéshez, viszont a MASP-2 C3-konvertáz képző hatékonyságát megnövelheti.
- A MASP-1 szubsztrátspecificitását vizsgálva számos jel utal arra, hogy **a MASP-1 hasonlít a trombinra.** A MASP-1 a P1 helyen arginint tartalmazó szubsztrátokat preferálja és hasítja a fibrinogént és a XIII-faktort, térhálós fibrin polimert hozva létre. A lokális koaguláció a természetes immunitás egyik ősi mechanizmusa, ami megakadályozza a fertőző mikroorganizmusok szervezetben belüli elterjedését. **A MASP-1, mint a C1r/C1s/MASP proteáz család legősibb tagja, hidat képez a komplement és a koagulációs kaskád között.** A MASP-1 leghatékonyabb inhibitora az antitrombin heparin jelenlétében.
- **Felfedeztük a komplementrendszer egy új funkcióját, a proteáz általi közvetlen sejtaktiválást.** A MASP-1 proteolitikus aktivitása révén képes endotél sejteket aktiválni. A MASP-1, a trombinhoz hasonlóan, hasítja a PAR4 receptort az endotél sejtek felszínén. A PAR4 hasításának proinflammatorikus következményei vannak: kalcium szignál, NF- $\kappa$ B transzlokáció, p38 MAP-kináz foszforiláció. A PAR4 általi endotél sejtaktiváció elősegítheti a leukociták toborzását, letapadását és gördülését (rolling).
- Proteomikai módszerrel azonosítottuk a MASP-1 egy újabb szubsztrátját: a nagymolekulasúlyú kininogént. **A MASP-1 képes a kininogénből felszabadítani a vazoaktív hatású bradykinin peptidet.** A reakció hatékonysága meglehetősen alacsony, azonban lokálisan hozzájárulhat a komplementaktiválás által gerjesztett gyulladási folyamatokhoz.
- **A MASP-1 CCP1-CCP2-SP katalitikus fragmentumának általunk meghatározott térszerkezete magyarázatot ad a MASP-1 viszonylag széles szubsztrátspecificitására.** A MASP-1 felszíni topológiája inkább hasonlít a széles szubsztrátspecificitással rendelkező tripszinéhez, mint a szűk specificitású komplement proteázokéhoz. A MASP-1 szubsztrátkötő árka széles és viszonylag nyitott. A MASP-1 potenciális proteolitikus aktivitását ugyanakkor csökkenti a hosszú



B-hurok (60-as hurok) és az a belső sóhíd, amit az S1 aszparaginsav (Asp<sup>640</sup>) alakít ki egy belső arginin oldallánccal (Arg<sup>677</sup>). Hasonló sóhíd járul hozzá a D-faktor aktivitásának szabályozásához is.

- ***In vitro* evolúciós technikával (fág bemutatás) lektin út specifikus inhibitorokat fejlesztettünk ki.** A napraforgó tripszin inhibitorból kiindulva olyan kanonikus inhibitorokat szelektáltunk, amelyek csak a MASP-okat gátolják. Az SFMI-2 inhibitor csak a MASP-2-t gátolja ( $K_i=180$  nM), míg az SFMI-1 erősen gátolja a MASP-1-et ( $K_i=65$  nM), a MASP-2-t viszont csak jóval gyengébben ( $K_i=1030$  nM). Mindkét inhibitor szelektíven gátolta a lektin utat, azonban a MASP-1-et is gátló inhibitor a mérésben hatékonyabbnak bizonyult, mint a csak MASP-2-t gátló. Azt is kimutattuk, hogy, zimogén komponensekből kiindulva, a MASP-1 gátlása gátolja a C4 MASP-2 általi hasítását. **Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a MASP-1-nek fontos szerepe van a lektin út beindításában.** A MASP-1 egyedül nem képes beindítani a lektin utat, mivel nem képes C4-et hasítani, azonban normál humán szérumban mégis kulcsszerepet játszik az aktiválódásban, nagy valószínűséggel a zimogén MASP-2 gyors hasításán keresztül. Mindezek alapján a MASP-1 egy új targetnek tekinthető a patológus komplementaktiválás gátlásában.
- Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a MASP-1 a legérdekesebb, legsokoldalúbb proteáz a komplementrendszerben. Egyik legfontosabb funkciója a lektin út beindítása MASP-2 aktiválása és C2 hasítása által, míg a komplementrendszeren kívüli szubsztrátjainak hasítása révén hozzájárul egy hatékonyabb természetes immunválasz felépüléséhez. **A MASP-1, hasonlóan a trombinhoz, egyszerre széles specificitású és szelektív, mivel az összes eddig azonosított természetes szubsztrátja az immunválasszal kapcsolatos. A MASP-1 szerepe a felismerőmolekulák által közvetített veszély szignálokra adott sokrétű válasz beindításában van.**

## 9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Závodszy Péternek, aki bevezetett a komplementrendszer kutatásába és ezzel olyan témát adott, amelyben lehetőségem nyílt önálló kutatói kvalitásaim kibontakoztatására. Pályafutásomat egyetemi éveimtől kezdve mind a mai napig folyamatosan figyelemmel kísérte, és minden lehető eszközzel támogatta. Laboratóriumában olyan stabil, nyugodt háttérrel biztosított, ahol a tudományra koncentrálni tudtam dolgozni az elmúlt évek során. Büszke vagyok rá, hogy már negyedik éve csoportvezetőként dolgozhatok mellette az MTA Enzimológiai Intézetében.

A dolgozatban szereplő eredmények nem születhettek volna meg kollégáim, régi és jelenlegi diákjaim munkája nélkül. Köszönettel tartozom ezért elsősorban Dobó Józsefnek, Kardos Józsefnek, Ambrus Gézának, Kocsis Andreának, Megyeri Mártonnak és Major Balázsnak. Köszönettel tartozom még a csoport többi tagjának is, akik munkájukkal, tanácsaikkal, viták során kifejtett nézeteikkel segítettek kutatásaimat. Külön köszönöm Balczér Jánosnénak a kísérleti munka során nyújtott professzionális technikusai hozzájárulást.

Hazai együttműködőim közül köszönetet kell mondanom Harmat Veronikának (ELTE, Kémiai Intézet), aki a dolgozatban szereplő röntgenszerkezetek nagy részét megoldotta és részt vett azok értelmezésében, valamint tanácsaival segített a fehérjék kristályosításában. Az emberi primer endotél sejteken végzett mérések kivitelezéséért és az eredmények értelmezésében nyújtott segítségért köszönettel tartozom Cervenak Lászlónak (SOTE, III. Sz. Belgyógyászati Klinika) és munkatársainak. Köszönet illeti Pál Gábort (ELTE, Biokémia Tanszék), aki a fág bemutatáson alapuló inhibitor szelekciós módszer hazai meghonosítójaként új lendületet adott kutatásainknak.

A külföldi együttműködőim közül mindenekelőtt Robert B. Simnek (Oxfordi Egyetem) kell köszönetet mondanom, aki munkámat hosszú idő óta támogatólag kísérte figyelemmel. Az oxfordi laboratóriumban eltöltött hosszabb-rövidebb időszakok jelentősen hozzájárultak kutatói fejlődésemmhez és számos közös publikációt eredményeztek. Szintén sokat tanultam Verne Schumaker (UCLA) laboratóriumában. Szeretném megköszönni dán együttműködőim, Gregers Andersen és Steffen Thiel (Aarhusi Egyetem) az utóbbi években nyújtott értékes hozzájárulását.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak, elsősorban szüleimnek, hogy lehetővé tették azt, hogy kutatói pályára lépjek és mindvégig támogattak céljaim elérésében. Külön köszönöm unokahúgaimnak, Zitának, Sárának és Lucának, hogy bizáltak ennek a dolgozatnak a megírására.

## 10. Irodalomjegyzék

### 10.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

\*1.) Kardos, J., **Gál, P.**, Szilágyi, L., Thielens, N. M., Szilágyi, K., Lőrincz, Zs., Kulcsár, P., Gráf, L., Arlaud, G. J. and 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

2.) Hajela, K., Kojima, M., Ambrus, G., Wong, N. K. H., Moffatt, B. E., Ferluga, J., Hajela, S., **Gál, P.** and Sim, R. B. (2002) The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs)  
*Immunobiology* **205**, 467-475

\*3.) Ambrus, G., **Gál, P.**, Kojima, M., Szilágyi, K., Balczer, J., Antal, J., Gráf, L., Laich, A., Moffat, B. E., Schwaeble, W., Sim, R. B. and Závodszy, P. (2003) Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease 1 and 2: A study on recombinant catalytic fragments  
*The Journal of Immunology* **170**, 1374-1382

\*4.) **Gál, P.**, Harmat, V., Kocsis, A., Bián, T., Barna, L., Ambrus, G., Végh, B., Balczer, J., Sim, R.B., Náray-Szabó, G. and Závodszy, P. (2005)  
A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activation  
*J. Biol. Chem.* **280**, 33435-33444

5.) **Gál, P.**, Barna, L., Kocsis, A. and Závodszy P. (2007) Serine proteases of the classical and lectin pathways: Similarities and differences  
*Immunobiol.* **212**, 267-277

6.) Kardos, J., Harmat, V., Palló, A., Barabás, O., Szilágyi K., Gráf, L., Náray-Szabó, G., Goto, Y., Závodszy, P., **Gál, P.** (2008) Revisiting the mechanism of the autoactivation of the complement protease C1r in the C1 complex: Structure of the active catalytic region of C1r  
*Mol. Immunol.* **45**, 1752-1760

7.) Krarup, A., Gulla, K.C., **Gál, P.**, Hajela, K. and Sim, R.B. (2008) The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen  
*Biochim Biophys Acta. (Proteins and proteomics)* **1784**, 1294-300

8.) Dobó, J., Harmat, V., Beinrohr, L., Sebestyén, E., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity

*J. Immunol.* **183**, 1207-1214

9.) Megyeri, M., Makó, V., Beinrohr, L., Doleschall, Z., Prohászka, Z., Cervenak, L., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function

*J. Immunol.* **183**, 3409-3416

10.) Major, B., Kardos, J., Kékesi, K.A., Lőrincz, Z., 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

11.) Kocsis, A., Kékesi, K.A., Szász, R., Végh, B.M., Balczer, J., Dobó, J., Závodszy, P., **Gál, P.** and Pál, G. (2010) Selective Inhibition of the Lectin Pathway of Complement with Phage Display Selected Peptides against Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 and -2: Significant Contribution of MASP-1 to Lectin Pathway Activation.

*J. Immunol.* **185**, 4169-4178

12.) 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(5): e20036. doi:10.1371/journal.pone.0020036

13.) Kidmose, R.T., Laursen, N.S., Dobó, J., Kjaer, T.R., Sirotkina, S., Yatime, L., Sottrup-Jensen, L., Thiel, S., **Gál, P.** and Andersen, G.R. (2012) Structural basis for activation of the complement system by C4 cleavage

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 15425-15430

\*Megosztott első szerzőség

## 10.2 Az értekezés tárgyában megjelent további saját publikációk

1.) **Gál, P.**, Sárvári, M., Szilágyi, K., Závodszy, P. and Schumaker, V. N. (1989) Expression of hemolytically active human complement component C1r in insect cells using a baculovirus vector

*Complement and Inflammation* **6**, 433-441

- 2.) Luo, C., Thielens, N. M., Gagnon, J., **Gál, P.**, Sárvári, M., Tseng, Y., Tosi, M., Závodszy, P., Arlaud, G. J. and Schumaker V. N. (1992) Recombinant human complement subcomponent C1s lacking hydroxyasparagin, sialic acid, and one of its two carbohydrate chains still reassembles with C1q and C1r to form a functional C1 complex  
*Biochemistry* **31**, 4254-4262
- 3.) Cseh, S., **Gál, P.**, Sárvári, M., Dobó, J., Lőrincz, Zs., Schumaker, V. N. and Závodszy, P. (1996) Functional effects of domain deletions in a multidomain serine protease, C1r  
*Molecular Immunology* **33**, 351-359
- 4.) **Gál, P.** and Závodszy, P. (1998) Structure and function of the serine-protease subcomponents of C1: Protein engineering studies  
*Immunobiology* **199**, 317-326
- 5.) Dobó, J., **Gál, P.**, Szilágyi, K., Cseh, S., Lőrincz, Zs., Schumaker, V. N. and Závodszy, P. (1999) One active C1r subunit is sufficient for the activity of the complement C1 complex: Stabilization of C1r in the zymogen form by point mutations  
*The Journal of Immunology* **162**, 1108-1112
- 6.) Lőrincz, Zs., **Gál, P.**, Dobó, J., Cseh, S., Szilágyi, K., Ambrus, G. and 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
- 7.) **Gál, P.** and Ambrus, G. (2001) Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs  
*Current Protein and Peptide Science* **2**, 43-59
- 8.) Lacroix, M., Ebel, C., Kardos, J., Dobó, J., **Gál, P.**, Závodszy, P., Arlaud, G. J. and Thielens, N. M. (2001) Assembly and enzymatic properties of the catalytic domain of human complement protease C1r  
*The Journal of Biological Chemistry* **276**, 36233-36240
- 9.) **Gál, P.**, Ambrus, G. and Závodszy, P. (2002) C1s, the protease messenger of C1. Structure, function and physiological significance  
*Immunobiology* **205**, 383-394
- 10.) Sárvári, M., Vágó, I., Wéber, C. S., Nagy, J., **Gál, P.**, Mák, M., Kósa, J. P., Závodszy, P. and Pázmány, T. (2003) Inhibition of C1q- $\beta$ -amyloid binding protects hippocampal cells against complement mediated toxicity  
*Journal of Neuroimmunology* **137**, 12-18

11.) Presanis, J. S., Hajela, K., Ambrus, G., **Gál, P.** and Sim, R. B. (2004) Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2  
*Mol. Immunol.* **40**, 921-929

\*12.) Harmat, V., **Gál, P.**, Kardos, J., Szilágyi, K., Ambrus, G., Végh, B., Náray-Szabó, G. and Závodszy, P. (2004)  
The structure of MASP-2 reveals that nearly identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions  
*J. Mol. Biol.* **342**, 1533-1546

13.) Beinrohr, L., Harmat, V., Dobó, J., Lőrincz, Zs., **Gál, P.**, and Závodszy, P. (2007) C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease  
*J. Biol. Chem.* **282**, 21100-21109

14.) Krarup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., **Gál, P.** and Sim, R.B. (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2  
*PLoS ONE* 2(7): e623. doi:10.1371/journal.pone.0000623

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

16.) Varga, L., Széplaki, G., Laki, J., Kocsis, A., Kristóf, K., **Gál, P.**, Bajtay, Zs., Wieslander, J., Daha, M.R., Garred, P., Madsen, H., Füst, G., Frakas, H. (2008) Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema  
*Clin. Exp. Immunol.* **153**, 68-74

17.) Dobó, J., Harmat, V., Sebestyén, E., Beinrohr, L., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannose-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region  
*Acta Crystallographica Section F* **64**, 781-784

18.) Beinrohr, L., Dobó, J., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2008) C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation  
*Trends in Molecular Medicine* **14**, 511-521

19.) **Gál, P.**, Dobó, J., Závodszy, P. and Sim, R. B. (2009) Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions

*Mol. Immunol.* 46, 2745-2752

20.) Gulla, K.C., Gupta, K., Krarup, A., **Gál, P.**, Schwaeble, W., Sim, R.B., O'Connor, D.C. and Hajela, K. (2010) Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot

*Immunology* **129**, 482-495

21.) Kocsis, J., Mészáros, T., Madaras, B., Tóth, E.K., Kamondi, S., **Gál, P.**, Varga, L., Prohászka, Z. and Füst, G. (2011) High levels of acute phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer

*Cell Stress Chaperon.* **16**, 49-55

22.) Degn, S.E., Jensen, L., **Gál, P.**, Dobó, J., Holmvad, S.H., Jensenius, J.C. and Thiel, S. (2010) Biological variations of MASP-3 and MASP44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system

*J Immunol Methods.* **361**, 37-50

23.) 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 J.* **277**, 3986-98

24.) 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 Lett.* **584**, 4565-4569

25.) Beinrohr, L., Murray-Rust, T.A., Dyksterhuis, L., Závodszy, P., **Gál, P.**, Pike, R.N. and Wijeyewickrema, L.C. (2011) Serpins and the complement system.

*Methods Enzymol.* **499**, 55-75

26.) Thiel, S., Jensen, L., Degn, S.E., Nielsen, H.J., **Gál, P.**, Dobó, J. and Jensenius J.C. (2012) Normal and acute-phase levels of human MASP-1, an enzyme associated with humoral pattern-recognition molecules

*Clin. Exp. Immunol.* **169**, 38-48

27.) Héja, D., Harmat, V., Fodor, K., Wilmanns, M., Dobó, J., Kékesi, K.A., Závodszy, P., **Gál, P.** and Pál, G. (2012) Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2 are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2

*J. Biol. Chem.* **287**, 20290-20300

28.) Hess, K., Ajjan, R., Phoenix, F., Dobó, J., **Gál, P.** and Schroeder, V. (2012) Effect of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation  
*PLoS ONE* 7(4): e35690

29.) Héja, D., Kocsis, A., Dobó, J., Szilágyi, K., Szász, R., Závodszy, P., Pál, G. and **Gál, P.** (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 10498-10503

30.) **Gál, P.**, Dobó, J., Beinrohr, L., Pál, G. and Závodszy, P. (2013) Inhibition of the serine proteases of the complement system  
*Adv. Exp. Med. Biol.* **734**, 23-40

### 10.3 Felhasznált irodalom

Adams, M. (2012) Tissue factor pathway inhibitor: new insights into an old inhibitor  
*Semin. Thromb. Hemost.* **38**, 129-134

Adams, M.N., Ramachandran, R., Yau, M.K., Suen, J.Y., Fairlie, D.P., Hollenberg, M.D. and Hooper, J.D. (2011) Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors  
*Pharmacol. Ther.* **130**, 248-282

Ambrus, G., Gál, P., Kojima, M., Szilágyi, K., Balczer, J., Antal, J., Gráf, L., Laich, A., Moffat, B. E., Schwaeble, W., Sim, R. B. and Závodszy, P. (2003) Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease 1 and 2: A study on recombinant catalytic fragments  
*The Journal of Immunology* **170**, 1374-1382

Antal, J., Pál, G., Asbóth, B., Buzás, Z., Patthy, A. and Gráf, L. (2001) Specificity assay of serine proteinases by reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of competing oligopeptide substrate library  
*Anal. Biochem.* **288**, 156-167

Arlaud, G.J., Chesne, S., Villiers, C.L. and Colomb, M.G. (1980) A study on the structure and interactions of the C1 sub-components C1r and C1s in the fluid phase  
*Biochim. Biophys. Acta.* **616**, 105-15

Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Garnier, G., Circolo, A., Thielens, N.M., Budayova-Spano, M., Fontecilla-Camps, J.C. and Volanakis, J.E. (2002) Structure, function and molecular genetics of human and murine C1r  
*Immunobiology* **205**, 365-82



Arlaud, G.J., Gagnon, J., Villiers, C.L. and Colomb, M.G. (1986) Molecular characterization of the catalytic domains of human complement serine protease C1r  
*Biochemistry* **25**, 5177-82

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  
*J. Biol. Chem.* **284**, 19340-19348

Bentley, D.R. (1986) Primary structure of human complement component C2: homology to two unrelated protein families  
*Biochem. J.* **239**, 339-345

Bersch, B., Hernandez, J. F., Marion, D., Arlaud, G.J. (1998) Solution structure of the epidermal growth factor-like module of human complement protease C1r, an atypical member of the EGF family  
*Biochemistry* **37**, 1204-1214

Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. and Klump, O. (1980) The terminal membrane C5b-9 complex of human complement. Evidence for the existence of multiple protease-resistant polypeptides that form the trans-membrane complement channel  
*J. Immunol.* **124**, 2451-2457

Birmingham, D.J. and Hebert, L.A. (2001) CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors  
*Immunol. Rev.* **180**, 100-111

Black, S., Kushner, I. and Samols, D. (2004) C-reactive protein  
*J. Biol. Chem.* **279**, 48487-48490

Bonifati, D.M. and Kishore, U. (2007) Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation  
*Mol. Immunol.* **44**, 999-1010

Bordet, J. (1896) Sur le mode d'action des sérums preventives  
*Ann. Inst. Pasteur* **10**, 193-219

Bode, W. (1979) The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. II. The binding of the pancreatic trypsin inhibitor and of isoleucine-valine and of sequentially related peptides to trypsinogen and to p-guanidinobenzoate-trypsinogen  
*J. Mol. Biol.* **127**, 357-374

Bode, W. and Huber, R. (1976) Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the N-terminus of trypsin  
*FEBS Lett.* **68**, 231-236

Bode, W., Schwager, P. and Huber, R. (1978) The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution  
*J. Mol. Biol.* **118**, 99-112

Budayova-Spano, M., Lacroix, M., Thielens, N.M., Arlaud, G.J., Fontecilla-Camps, J.C. and Gaboriaud, C. (2002a) 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  
*EMBO. J.* **21**, 231-239

Budayova-Spano, M., Grabarse, W., Thielens, N.M., Hillen, H., Lacroix, M., Schmidt, M., Fontecilla-Camps, J.C., Arlaud, G.J. and Gaboriaud, C. (2002b) Monomeric structures of the zymogen and active catalytic domain of complement protease C1r: further insights into the C1 activation mechanism  
*Structure* **10**, 1509-1519

Busby, T.F. and Ingham, K.C. (1990) NH<sub>2</sub>-terminal calcium-binding domain of human complement C1s mediates the interaction of C1r with C1q  
*Biochemistry* **29**, 4613-4618

Busby, W.H. Jr, Nam, T.J., Moralez, A., Smith, C., Jennings, M. and Clemmons, D.R. (2000) The complement component C1s is the protease that accounts for cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in fibroblast medium  
*J. Biol. Chem.* **275**, 37638-37644

Cai, S. and Davis III, A.E. (2003) Complement regulatory protein C1 inhibitor binds to selectins and interferes with endothelial-leukocyte adhesion.  
*J. Immunol.* **171**, 4786-4791

Chen, C.B. and Wallis, R. (2004) Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases  
*J. Biol. Chem.* **279**, 26058-26065

Chenal, A., Guijarro, J.I., Raynal, B., Delepierre, M. and Ladant, D. (2009) RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion  
*J. Biol. Chem.* **284**, 1781-1789

Cicardi, M. and Johnston D.T. (2012) Hereditary and acquired complement component 1 esterase inhibitor deficiency: a review for the hematologist  
*Acta Haematol.* **127**, 208-220

Collard, C.D., Montalto, M.C., Reenstra, W.R., Buras, J.A. and Stahl, G.L. (2001) Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1  
*Am. J. Pathol.* **159**, 1045-1054

Collard, C.D., Väkevä, A., Morrissey, M.A., Agah, A., Rollins, S.A., Reenstra, W.R., Buras, J.A., Meri, S. and Stahl, G.L. (2000) Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway

*Am. J. Pathol.* **156**, 1549-1556

Cortesio, C.L. and Jiang, W. (2006) Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5

*Arch. Biochem. Biophys.* **449**, 164-170

Coughlin, S.R. (2000) Trombin signaling and protease-activated receptors

*Nature* **407**, 258-264

Coughlin, S.R. (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology

*J. Thromb. Haemost.* **3**, 1800-1814

Dahl, M.R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A.C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T. and Jensenius, J.C. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway

*Immunity* **15**, 127-135

Davis III, A.E., Lu, F. and Mejia, P. (2010) C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor

*Tromb. Haemost.* **104**, 886-893

Davis III, A.E., Mejia, P. and Lu, F. (2008) Biological activities of C1 inhibitor

*Mol. Immunol.* **45**, 4057-4063.

Degn, S. E., Hansen, A.G., Steffensen, R., Jacobsen, C., Jensenius, J.C. and Thiel, S. (2009) MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation

*J. Immunol.* **183**, 7371-7378

Degn, S.E., Jensen, L., Hansen, A.G., Duman, D., Tekin, M., Jensenius, J.C. and Thiel, S. (2012) Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function

*J. Immunol.* **189**, 3957-3969

Delvaeye, M. and Conway, E.M. (2009) Coagulation and innate immune responses: can we view them separately?

*Blood* **114**, 2367-2374

Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C. and Fearon, D.T. (1996) C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity

*Science* **271**, 348-350

DiScipio, R. G., Chakravarti, D.N., Muller-Eberhard, H.J. and Fey, G.H. (1988) The structure of human complement component C7 and the C5b-7 complex

*J. Biol. Chem.* **263**, 549-560

Dobó, J., Gál, P., Szilágyi, K., Cseh, S., Lőrincz, Zs., Schumaker, V. N. and Závodszy, P. (1999) One active C1r subunit is sufficient for the activity of the complement C1 complex: Stabilization of C1r in the zymogen form by point mutations

*The Journal of Immunology* **162**, 1108-1112

Dobó, J., Harmat, V., Beinrohr, L., Sebestyén, E., Závodszy, P. and Gál, P. (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity

*J. Immunol.* **183**, 1207-1214

Dodds, A.W., Sim, R.B., Porter, R.R. and Kerr, M.A. (1978) Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates

*Biochem. J.* **175**, 383-390

Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content

*Bioinformatics* **21**, 3433-3434

Duncan, R.C., Mohlin, F., Taleski, D., Coetzer, T.H., Huntington, J.A., Payne, R.J., Blom, A.M., Pike, R.N, and Wijeyewickrema, L.C. (2012) Identification of a Catalytic Exosite for Complement Component C4 on the Serine Protease Domain of C1s

*J. Immunol.* **189**, 2365-2373

Ehrlich, P. and Morgenroth, J. (1899) Zur Theorie der Lysenwirkung

*Berlin. Klin. Wschr.* **36**, 6-9

Endo, Y., Matsushita, M. & Fujita, T. (2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity

*Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 705-712

Endo, Y., Takahashi, M., Nakao, M., Saiga, H., Sekine, H., Matsushita, M., Nonaka, M. and Fujita, T. (1998) Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates

*J. Immunol.* **161**, 4924-4930

Fearon, D.T. (1981) Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte and monocyte

*J. Exp. Med.* **152**, 20-30

Feinberg, H., Uitdehaag, C.M., Davies, J.M., Wallis, R., Drickamer, K. and Weis, W.I. (2003) Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 region of mannose-binding protein associated serine protease-2

*EMBO J.* **22**, 2348-2359

Forneris, F., Wu, J. and Gros, P. (2012) The modular serine proteases of the complement cascade  
*Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 333-341

Fujii, S. and Hitomi, Y. (1981) New synthetic inhibitors of C1r, C1s esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin  
*Biochim. Biophys. Acta* **661**, 342-345

Fujiwara, M., Jin, E., Ghazizadeh, M., Kawanami, O. (2004) Differential expression of protease-activated receptors 1, 2, and 4 on human endothelial cells from different vascular sites  
*Pathobiology* **71**, 52-58

Gaboriaud, C., Gregory-Pauron, L., Teillet, F., Thielens, N.M., Bally, I. and Arlaud, G.J. (2011) Structure and properties of the Ca(2+)-binding CUB domain, a widespread ligand-recognition unit involved in major biological functions  
*Biochem. J.* **439**, 185-193

Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J.C. and Arlaud, G.J. (2003) The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties  
*J. Biol. Chem.* **278**, 46974-46982

Gaboriaud, C., Rossi, V., Bally, I., Arlaud, G.J. and Fontecilla-Camps, J.C. (2000) Crystal structure of the catalytic domain of human complement C1s: a serine protease with a handle  
*EMBO. J.* **19**, 1755-1765

Gaboriaud, C., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J.C. and Arlaud, G.J. (1998) Evolutionary conserved rigid module-domain interactions can be detected at the sequence level: the examples of complement and blood coagulation proteases  
*J. Mol. Biol.* **282**, 459-470

Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Gregory, L.A., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J.C. and Arlaud, G.J. (2004) Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle  
*Trends Immunol.* **25**, 368-373

Gaboriaud, C., Teillet, F., Gregory, L.A., Thielens, N.M. and Arlaud, G.J. (2007) Assembly of C1 and the MBL- and ficolin-MASP complexes: structural insights  
*Immunobiology* **212**, 279-288

Gao, F., Yue, T.L., Shi, D.W., Christopher, T.A., Lopez, B.L., Ohlstein, E.H., Barone, F.C. and Ma, X.L. (2002) p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation  
*Cardiovasc Res.* **53**, 414-422

- Gál, P., Barna, L., Kocsis, A. and Závodszy P. (2007) Serine proteases of the classical and lectin pathways: Similarities and differences  
*Immunobiol.* **212**, 267-277
- Gál, P., Dobó, J., Závodszy, P. and Sim, R.B.M. (2009) Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions  
*Mol. Immunol.* **46**, 2745-2752
- Gál, P., Harmat, V., Kocsis, A., Bián, T., Barna, L., Ambrus, G., Végh, B., Balczer, J., Sim, R.B., Náray-Szabó, G. and Závodszy, P. (2005)  
A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activation  
*J. Biol. Chem.* **280**, 33435-33444
- Gál, P., Sárvári, M., Szilágyi, K., Závodszy, P. and Schumaker, V. N. (1989) Expression of hemolytically active human complement component C1r in insect cells using a baculovirus vector  
*Complement and Inflammation* **6**, 433-441
- Gettins, P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function  
*Chem. Rev.* **102**, 4751-4804
- Gingras, A.R., Girija, U.V., Keeble, A.H., Panchal, R., Mitchell, D.A., Moody, P.C. and Wallis, R. (2011) Structural basis of mannan-binding lectin recognition by its associated serine protease MASP-1: implications for complement activation  
*Structure* **19**, 1635-1643
- Gregory, L.A., Thielens, N.M., Arlaud, G.J., Fontecilla-Camps, J.C. and Gaboriaud, C. (2003) X-ray structure of the Ca<sup>2+</sup>-binding interaction domain of C1s. Insights into the assembly of the C1 complex of complement  
*J. Biol. Chem.* **278**, 32157-32164
- Gulla, K.C., Gupta, K., Krarup, A., Gal, P., Schwaeble, W., Sim, R.B., O'Connor, D.C. and Hajela, K. (2009) Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot  
*Immunology* **129**, 482-495
- Haas, P.J. and van Strijp, J. (2007) Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation  
*Immunol. Res.* **37**, 161-175
- Hajela, K., Kojima, M., Ambrus, G., Wong, N. K. H., Moffatt, B. E., Ferluga, J., Hajela, S., Gál, P. and Sim, R. B. (2002) The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs)  
*Immunobiology* **205**, 467-475

- Hansen, S., Selman, L., Palaniyar, N., Ziegler, K., Brandt, J., Kliem, A., Jonasson, M., Skjoedt, M.O., Nielsen, O., Hartshorn, K., Jørgensen, T.J., Skjødt, K. and Holmskov, U. (2010) Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity  
*J. Immunol.* **185**, 6096-6104
- Harboe, M. and Mollnes, T.E. (2008) The alternative complement pathway revisited  
*J. Cell. Mol. Med.* **12**, 1074-1084
- Harmat, V., Gál, P., Kardos, J., Szilágyi, K., Ambrus, G., Végh, B., Náray-Szabó, G. and Závodszy, P. (2004) The structure of MASP-2 reveals that nearly identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions  
*J. Mol. Biol.* **342**, 1533-1546
- Hazy, E. and Tompa, P. (2009) Limitations of induced folding in molecular recognition by intrinsically disordered proteins  
*Chemphyschem.* **10**, 1415-1419
- He, J.Q., Wiesmann, C. and van Lookeren Campagne, M. (2008) A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation  
*Mol. Immunol.* **45**, 4041-4047
- Héja, D., Kocsis, A., Dobó, J., Szilágyi, K., Szász, R., Závodszy, P., Pál, G. and Gál, P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 10498-10503
- Helmy, K.Y., Katschke Jr., K.J., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N. and van Lookeren Campagne, M. (2006) CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens  
*Cell* **124**, 915-927
- Hess, K., Ajjan, R., Phoenix, F., Dobó, J., Gál, P. and Schroeder, V. (2012) Effect of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation  
*PLoS ONE* **7**, e35690
- Holers, V.M. (2008) The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases  
*Immunol. Rev.* **233**, 300-316
- Hollenberg, M.D., Saifeddine, M., Sandhu, S., Houle, S. and Vergnolle, N. (2004) Proteinase-activated receptor-4: evaluation of tethered ligand-derived peptides as probes for receptor function and as inflammatory agonists in vivo  
*Br. J. Pharmacol* **143**, 443-454
- Hortin, G.L., Farries, T.C., Graham, J.P. and Atkinson, J.P. (1989) Sulfation of tyrosine residues increases activity of the fourth component of complement

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1338-1342

Huber, R. and Bode, W. (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin  
*Acc. Chem. Res.* **11**, 114-122

Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., Rittirsch, D., Neff, T.A., McGuire, S.R., Lambris, J.D., Warner, R.L., Flierl, M.A., Hoesel, L.M., Gebhard, F., Younger, J.G., Drouin, S.M., Wetzel, R.A. and Ward, P.A. (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway  
*Nat. Med.* **12**, 682-687

Huey, R., Bloor, C.M., Kawahara, M.S. and Hugli, T.E. (1983) Potentiation of the anaphylatoxins in vivo using an inhibitor of serum carboxypeptidase N (SCPN). I. Lethality and pathologic effects on pulmonary tissue  
*Am. J. Pathol.* **112**, 48-60

Huntington, J.A. (2005) Molecular recognition mechanisms of thrombin  
*J. Thromb. Haemost.* **3**, 1861-1872

Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1987) Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway  
*J. Biol. Chem.* **262**, 7451-7454

Iwaki, D., Kanno, K., Takahashi, M., Endo, Y., Matsushita, M. and Fujita, T. (2011) The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway  
*J. Immunol.* **187**, 3751-3758

Janssen, B.J., Huizinga, E.G., Raaijmakers, H.C., Roos, A., Daha, M.R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B. and Gros, P. (2005) Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity  
*Nature* **437**, 505-11

Jenne, D. and Stanley, K.K. (1985) Molecular cloning of S-protein, a link between complement, coagulation and cell-substrate adhesion  
*EMBO J.* **4**, 3153-3157

Jing, H., Macon, K.J., Moore, D., DeLucas, L.J., Volanakis, J.E. and Narayana, S.V. (1999) Structural basis of profactor D activation: from a highly flexible zymogen to a novel self-inhibited serine protease, complement factor D  
*EMBO J.* **18**, 804-814

Jordan, J.E., Montalto, M.C. and Stahl, G.L. (2001) Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury  
*Circulation* **104**, 1413-1418



Kaplan, A.P., Joseph, K. and Silverberg, M. (2002) Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease

*J. Allergy. Clin. Immunol.* **109**, 195-209

Karasszon Dénes és Csaba Béla (1992) Az immunológia magyar mesterei

Novorg International Kft.

Kardos, J., Gál, P., Szilágyi, L., Thielens, N. M., Szilágyi, K., Lőrincz, Zs., Kulcsár, P., Gráf, L., Arlaud, G. J. and 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

Kardos, J., Harmat, V., Palló, A., Barabás, O., Szilágyi K., Gráf, L., Náray-Szabó, G., Goto, Y., Závodszy, P., Gál, P. (2008) Revisiting the mechanism of the autoactivation of the complement protease C1r in the C1 complex: Structure of the active catalytic region of C1r

*Mol. Immunol.* **45**, 1752-1760

Kaya, Z., Afanasyeva, M., Wang, Y., Dohmen, K.M., Schlichting, J., Tretter, T., Fairweather, D., Holers, V.M. and Rose, N.R. (2001) Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role of complement

*Nat. Immunol.* **2**, 739-745

Kemper C, Hourcade DE (2008) Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance

*Mol. Immunol.* **45**, 4048-4056

Kénesi, E., Katona, G. and Szilágyi, L. (2003) Structural and evolutionary consequences of unpaired cysteines in trypsinogen

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 749-754

Kidmose, R.T., Laursen, N.S., Dobó, J., Kjaer, T.R., Sirotkina, S., Yatime, L., Sottrup-Jensen, L., Thiel, S., Gál, P. and Andersen, G.R. (2012) Structural basis for activation of the complement system by C4 cleavage

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 15425-15430

Kim, D.D. and Song, W.C. (2006) Membrane complement regulatory proteins

*Clin. Immunol.* **118**, 127-136

Kishore, U. and Reid K.B. (2000) C1q: structure, function, and receptors

*Immunopharmacology* **49**, 159-170

Kocsis, A., Kékesi, K.A., Szász, R., Végh, B.M., Balczer, J., Dobó, J., Závodszy, P., Gál, P. and Pál, G. (2010) Selective Inhibition of the Lectin Pathway of Complement with Phage Display Selected Peptides against Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 and -2: Significant Contribution of MASP-1 to Lectin Pathway Activation.

*J. Immunol.* **185**, 4169-4178

Kopf, M., Abel, B., Gallimore, A., Carroll, M. and Bachmann, M.F. (2002) Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection  
*Nat. Med.* **8**, 373-378

Krurup, A., Gulla, K.C., Gál, P., Hajela, K. and Sim, R.B. (2008) The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen  
*Biochim Biophys Acta. (Proteins and proteomics)* **1784**, 1294-300

Krurup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., Gál, P. and Sim, R.B. (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2  
*PLoS ONE* 2(7): e623. doi:10.1371/journal.pone.0000623

Krem, M.M. and Di Cera, E. (2001) Molecular markers of serine protease evolution  
*EMBO. J.* **20**, 3036-3045

Krem, M.M. and Di Cera, E. (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation  
*Trends Biochem. Sci.* **27**, 67-74

Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F. and Otlewski, J. (2003) Canonical protein inhibitors of serine proteases  
*Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2427-2444

La Bonte, L.R., Pavlov, V.I., Tan, Y.S., Takahashi, K., Takahashi, M., Banda, N.K., Zou, C., Fujita, T. and Stahl, G.L. (2012) Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis  
*J. Immunol.* **188**, 885-891

Lacroix, M.B., Aude, C.A., Arlaud, G.J. and Colomb, M.G. (1989) Isolation and functional characterization of the proenzyme form of the catalytic domains of human C1r  
*Biochem. J.* **257**, 885-891

Laich A, Sim RB. (2001) Complement C4bC2 complex formation: an investigation by surface plasmon resonance  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1544**, 96-112

Lambris, J.D., Sahu, A. and Wetsel R.A. (1998) The chemistry and biology of C3, C4 and C5  
In *The human complement system in health and disease*, John E. Volanakis and Michael M. Frank eds., Marcel Dekker, Inc. New York

LeMosy, E.K., Hong, C.C. and Hashimoto, C. (1999) Signal transduction by a protease cascade  
*Trends Cell Biol.* **9**, 102-107

- Luckett, S., Garcia, R.S., Barker, J.J., Konarev, A.V., Shewry, P.R., Clarke, A.R. and Brady, R.L. (1999) High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds  
*J. Mol. Biol.* **290**, 525-533
- Madison, E.L., Kobe, A., Gething, M.J., Sambrook, J.F. and Goldsmith, E.J. (1993) Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: a regulatory triad of Asp-His-Ser  
*Science* **262**, 419-421
- Major, B., Kardos, J., Kékesi, K.A., Lőrincz, Z., 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
- Marsh, J.E., Farmer, C.K., Jurcevic, S., Wang, Y., Carroll, M.C. and Sacks, S.H. (2001) The allogeneic T and B cell response is strongly dependent on complement components C3 and C4  
*Transplantation* **72**, 1310-1318
- Matsushita, M. and Fujita, T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease  
*J. Exp. Med.* **176**, 1497-1502
- Matsushita, M. and Fujita, T. (1995) Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent activation  
*Immunobiol* **194**, 443-448
- Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C., Terai, I. and Fujita, T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease  
*J. Immunol.* **165**, 2637-2642
- Mayilyan, K.R., Presanis, J.S., Arnold, J.N., Hajela, K. and Sim, R.B. (2006) Heterogeneity of MBL-MASP complexes  
*Mol. Immunol.* **43**, 1286-1292
- Megyeri, M., Makó, V., Beinrohr, L., Doleschall, Z., Prohászka, Z., Cervenak, L., Závodszy, P. and Gál, P. (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function  
*J. Immunol.* **183**, 3409-3416
- Mole, J.E., Anderson, J.K., Davison, E.A. and Wood, D.E. (1984) Complete primary structure for the zymogen of human complement factor B  
*J. Biol. Chem.* **259**, 3407-3412
- Møller-Kristensen, M., Thiel, S., Sjöholm, A., Matsushita, M. and Jensenius J. C. (2007) Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway  
*Int. Immunol.* **19**, 141-149

- Mollnes, T.E., Song, W.C. and Lambris, J.D. (2002) Complement in inflammatory tissue damage and disease  
*Trends Immunol.* **23**, 61-4.
- Montalto, M.C., Collard, C.D., Buras, J.A., Reenstra, W.R., McClaine, R., Gies, D.R., Rother, R.P. and Stahl, G.L. (2001) A keratin peptide inhibits mannose-binding lectin  
*J. Immunol.* **166**, 4148-4153
- Moore, E.D. (1970) Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchange electrodes  
*J. Clin. Invest.* **49**, 318-334
- Muta, T., Miyata, T., Misumi, Y., Tokunaga, F., Nakamura, T., Toh, Y., Ikehara, Y. and Iwanaga, S. (1991) Limulus factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains  
*J. Biol. Chem.* **266**, 6554-61
- Narayana, S.V., Carson, M., el-Kabbani, O., Kilpatrick, J.M., Moore, D., Chen, X., Bugg, C.E., Volanakis, J.E. and DeLucas, L.J. (1994) Structure of human factor D. A complement system protein at 2.0 Å resolution  
*J. Mol. Biol.* **235**, 695-708
- Nieman, M.T. and Schmaier, A.H. (2007) Interaction of thrombin with PAR1 and PAR4 at the thrombin cleavage site  
*Biochemistry* **46**, 8603-8610
- Nilsson, S.C., Sim, R.B., Lea, S.M., Fremeaux-Bacchi, V. and Blom, A.M. (2011) Complement factor I in health and disease  
*Mol. Immunol.* **48**, 1611-1620
- O'Brien, P.J., Prevost, N., Molino, M., Hollinger, M.K., Woolkalis, M.J., Woulfe, D.S. and Brass, L.F. (2000) Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1  
*J. Biol. Chem.* **275**, 13502-13509
- Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A. and Henson, P.M. (2001) C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells  
*J. Exp. Med.* **194**, 781-795
- Oroszlán, M., Daha, M.R., Cervenak, L., Prohászka, Z., Füst, G. and Roos, A. (2007) MBL and C1q compete for interaction with human endothelial cells  
*Mol. Immunol.* **44**, 1150-1158
- Page, M.J. and Di Cera, E. (2008) Serine peptidases: Classification, structure and function

*Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1220-1236

Perona, J.J. and Craik, C.S. (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold

*J. Biol. Chem.* **272**, 29987-29990

Petersen, B.H., Lee, T.J., Snyderman, R. and Brooks, G.F. (1979) *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* bacteremia associated with C6, C7, or C8 deficiency

*Ann. Intern. Med.* **90**, 917-920

Petersen, S.V., Thiel, S. and Jensenius, J.C. (2001) The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association

*Mol. Immunol.* **38**, 133-49

Phillips, A.E., Toth, J., Dodds, A.W., Girija, U.V., Furze, C.M., Pala, E., Sim, R.B., Reid, K.B., Schwaeble, W.J., Schmid, R., Keeble, A.H. and Wallis, R. (2009) Analogous interactions in initiating complexes of the classical and lectin pathways of complement

*J. Immunol.* **182**, 7708-7717

Qu, H., Ricklin, D. and Lambris, J.D. (2009) Recent developments in low molecular weight complement inhibitors

*Mol. Immunol.* **47**, 185-195

Rapp, H.J. and Borsos, T. (1970) Molecular basis of complement action

Appleton-Century-Croft, New York

Ratnoff, O. D. and Lepow, I. H. (1957) Some properties of an esterase derived from preparations of the first component of complement

*J. Exp. Med.* **106**, 327-343

Rawal, N., Rajagopalan, R. and Salvi, V. P. (2008) Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement

*J. Biol. Chem.* **283**, 7853-7863

Reid, K.B.M. and Porter, R.R. (1976) Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement

*Biochem. J.* **155**, 19-23

Renatus, M., Engh, R.A., Stubbs, M.T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U. and Bode, W. (1997) Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA

*EMBO. J.* **16**, 4797-4805

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. and Lambris, J.D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis

*Nat. Immunol.* **11**, 785-797

Ricklin, D. and Lambris, J.D. (2007) Complement-targeted therapeutics  
*Nat. Biotechnol.* **25**, 1265-1275

Ricklin, D. and Lambris, J.D. (2008) Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application  
*Adv. Exp. Med. Biol.* **632**, 273-792

Rollins, S.A. and Sims, P.J. (1990) The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9  
*J. Immunol.* **144**, 3478-3483

Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E.C., Brown, C.J. and Dunker, A.K. (2001) Sequence complexity of disordered protein  
*Proteins* **42**, 38-48

Rooryck, C., Diaz-Font, A., Osborn, D.P.S., Chabchoub, E., Hernandez-Hernandez, V., Shamseldin, H., Kenny, J., Waters, A., Jenkins, D., Kaissi, A.A., Leal, G.F., Dallapiccola, B., Carnevale, F., Bitner-Glindzicz, M., Lees, M., Hennekam, R., Stanier, P., Burns, A.J., Peeters, H., Alkuraya, F.S. and Beales, P.L. (2011) Mutations in lectin complement pathway genes *COLEC11* and *MASP1* cause 3MC syndrome  
*Nat. Genet.* **43**, 197-203

Rosenberg, M.E. and Silikensen, J. (1995) Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations  
*Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 633-45.

Rossi, V., Bally, I., Thielens, N.M., Esser, A.F. and Arlaud, G.J. (1998) Baculovirus-mediated expression of truncated modular fragments from the catalytic region of human complement serine protease C1s. Evidence for the involvement of both complement control protein modules in the recognition of the C4 protein substrate  
*J. Biol. Chem.* **273**, 1232-9

Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N.M., Jensenius, J.C. and Arlaud, G.J. (2001) Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2  
*J. Biol. Chem.* **276**, 40880-40887

Rossi, V., Teillet, F., Thielens, N.M., Bally, I. and Arlaud, G.J. (2005) Functional characterization of complement proteases C1s/mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) chimeras reveals the higher C4 recognition efficacy of the MASP-2 complement control protein modules  
*J. Biol. Chem.* **280**, 41811-41818

Roversi, P., Johnson, S., Caesar, J.J., McLean, F., Leath, K.J., Tsiftoglou, S.A., Morgan, B.P., Harris, C.L., Sim, R.B. and Lea, S.M. (2011) Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12839-12844

Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162

Schumaker, V.N., Závodszy, P. and Poon, P.H. (1987) Activation of the first component of complement  
*Annu. Rev. Immunol.* **5**, 21-42

Schwaeble, W.J., Lynch, N.J., Clark, J.E., Marber, M., Samani, N.J., Ali, Y.M., Dudler, T., Parent, B., Lhotta, K., Wallis, R., Farrar, C.A., Sacks, S., Lee, H., Zhang, M., Iwaki, D., Takahashi, M., Fujita, T., Tedford, C.E. and Stover, C.M (2011) Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7523-7528

Seelen, M.A., Roos, A., Wieslander, J., Mollnes, T.E., Sjöholm, A.G., Wurzner, R., Loos, M., Tedesco, F., Sim, R.B., Garred, P., Alexopoulos, E., Turner, M.W. and Daha, M.R. (2005) Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA  
*J. Immunol. Methods.* **296**, 187-198.

Sim, R.B. and Tsiftoglou, S.A. (2004) Proteases of the complement system  
*Biochem. Soc. Trans.* **32**, 21-27

Sirmaci, A., Walsh, T., Akay, H., Spiliopoulos, M., Sakalar, Y.B., Hasanefendioglu-Bayrak, A., Duman, D., Farooq, A., King, M-C. and Tekin, M. (2010) *MASP1* mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels Syndromes  
*Am. J. Hum. Genet.* **87**, 679-686

Skjoedt, M. O., Hummelshoj, T., Palarasah, Y., Honore, C., Koch, C., Skjodt, K. and Garred, P. (2010) A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation  
*J. Biol. Chem.* **285**, 8234-8243

Soares, D.C. and Barlow, P.N. (2005) Complement control protein modules in the regulators of complement activation  
In: Morikis, D., Lambris, J.D. (Eds.), *Structural Biology of the complement system*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 19-62

Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Shpacovitch, V., Rattenholl, A., Moormann, C., Vergnolle, N., Luger, T.A. and Hollenberg, M.D. (2005) Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response  
*Endocr. Rev.* **26**, 1-43

Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W. and Barres, B.A. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination  
*Cell* **131**, 1164-1178

Stover, C.M., Thiel, S., Thelen, M., Lynch, N.J., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J.C. and Schwaebler, W. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene  
*J. Immunol.* **162**, 3481-3490

Szentei, B., Patthy, A., Gáspári, Z., Kékesi, A.K., Gráf, L. and Pál, G. (2007) When the surface tells what lies beneath: combinatorial phage-display mutagenesis reveals complex networks of surface-core interactions in the pacifastin protease inhibitor family  
*J. Mol. Biol.* **370**, 63-79

Takahashi, M., Endo, Y., Fujita, T. and Matsushita, M. (1999) A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease MASP-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway  
*Int. Immunol.* **11**, 859-863

Takahashi, M., Ishida, Y., Iwaki, D., Kanno, K., Suzuki, T., Endo, Y., Homma, Y. and Fujita T. (2010) Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D  
*J. Exp. Med.* **207**, 29-37

Takahashi, M., Iwaki, D., Kanno, K., Ishida, Y., Xiong, J., Matsushita, M., Endo, Y., Miura, S., Ishii, N., Sugamura, K. and Fujita, T. (2008) Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway  
*J. Immunol.* **180**, 6132-6138

Takahashi, K., Chang, W.C., Takahashi, M., Pavlov, V., Ishida, Y., La Bonte, L., Shi, L., Fujita, T., Stahl, G.L. and Van Cott, E.M. (2011) Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation  
*Immunobiology* **216**, 96-102

Tedesco, F., Pausa, M., Nardon, E., Inrona, M., Mantovani, A. and Dobrina, A. (1997) The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity  
*J. Exp. Med.* **185**, 1619-1627

Teillet, F., Gaboriaud, C., Lacroix, M., Martin, L., Arlaud, G.J. and 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  
*J. Biol. Chem.* **283**, 25715-25724



Terai, I., Kobayashi, K., Matsushita, M. and Fujita, T. (1997) Human serum mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1): determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum

*Clin. Exp. Immunol.* **110**, 317-23

Thiel, S. (2007) Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins

*Mol. Immunol.* **44**, 3875-3888

Thiel, S., Jensen, L., Degn, S.E., Nielsen, H.J., Gál, P., Dobó, J. and Jensenius J.C. (2012) Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components

*Clin. Exp. Immunol.* **169**, 38-48

Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwaeble, W., Laursen, S.B., Poulsen, K., Willis, A.C., Eggleton, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K.B.M. and Jensenius, J.C. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement

*Nature* **386**, 506-510

Thielens, N.M., Aude, C.A., Lacroix, M.B., Gagnon, J. and Arlaud, G.J. (1990) Ca<sup>2+</sup> binding properties and Ca<sup>2+</sup>-dependent interactions of the isolated NH<sub>2</sub>-terminal alpha fragments of human complement proteases C1r and C1s

*J. Biol. Chem.* **265**, 14469-14475

Thielens, N.M., Enrie, K., Lacroix, M., Jaquinod, M., Hernandez, J.F., Esser, A.F. and Arlaud, G.J. (1999) The N-terminal CUB-epidermal growth factor module pair of human complement protease C1r binds Ca<sup>2+</sup> with high affinity and mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction with C1s

*J. Biol. Chem.* **274**, 9149-9159

Thielens, N.M., Illy, C., Bally, I.M. and Arlaud, G.J. (1994) Activation of human complement serine-proteinase C1r is down-regulated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent intramolecular control that is released in the C1 complex through a signal transmitted by C1q

*Biochem J.* **301**, 509-516

Tschopp, J. (1984) Ultrastructure of the membrane attack complex of complement. Heterogeneity of the complex caused by different degree of C9 polymerization

*J. Biol. Chem.* **259**, 7857-7863

Tschopp, J., Podack, E.R. and Muller-Eberhard, H.J. (1982) Ultrastructure of the membrane attack complex of complement: detection of the tetramolecular C9-polymerizing complex c5b-8

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7474-7478

- van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C. and Brown, E.J. (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance  
*Cell. Microbiol.* **9**, 2095-2102
- Vergnolle, N., Derian, C.K., D'Andrea, M.R., Steinhoff, M. and Andrade-Gordon, P. (2002) Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4  
*J. Immunol* **169**, 1467-1473
- Viemann, D., Goebeler, M., Schmid, S., Klimmek, K., Sorg, C., Ludwig, S. and Roth, J. (2004) Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells  
*Blood* **103**, 3365-3373
- Villiers, C.L., Arlaud, G.J. and Colomb, M.G. (1985) Domain structure and associated functions of subcomponents C1r and C1s of the first component of human complement  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **82**, 4477-4481
- Volanakis, J.E. and Narayana, S.V. (1996) Complement factor D, a novel serine protease  
*Protein. Sci.* **5**, 553-564
- Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I. and Coughlin, S.R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation  
*Cell* **64**, 1057-1068
- Wagner, E. and Frank, M.M. (2010) Therapeutic potential of complement modulation  
*Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 43-56
- Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J. and Keeble, A.H. (2010) Path reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation  
*Immunobiology* **215**, 1-11
- Walport, M.J. (2001a) Complement. First of two parts  
*N. Eng. J. Med.* **344**, 1058-1066
- Walport, M.J. (2001b) Complement. Second of two parts  
*N. Eng. J. Med.* **344**, 1140-1144
- Yamniuk, A.P., Silver, D.M., Anderson, K.L., Martin, S.R. and Vogel, H.J. (2007) Domain stability and metal-induced folding of calcium- and integrin-binding protein 1  
*Biochemistry* **46**, 7088-7098
- Zabłotna, E., Kaźmierczak, K., Jaśkiewicz, A., Stawikowski, M., Kupryszewski, G. and Rolka, K. (2002) Chemical synthesis and kinetic study of the smallest naturally occurring trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds and its analogues

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 855-859

Zhang, M., Alicot, E.M., Chiu, I., Li, J., Verna, N., Vorup-Jensen, T., Kessler, B., Shimaoka, M., Chan, R., Friend, D., Mahmood, U., Weissleder, R., Moore, F.D. and Carroll, M.C. (2006) Identification of the target self-antigens in reperfusion injury

*J. Exp. Med.* **203**, 141-152

Zhang, J., Koh, J., Lu, J., Thiel, S., Leong, B.S., Sethi, S., He, C.Y., Ho, B. and Ding, J.L. (2009) Local inflammation induces complement crosstalk which amplifies the antimicrobial response

*PLoS Pathog.* **5**, e1000282

Zhu, Y., Thangamani, S., Ho, B. and Ding, J.L. (2005) The ancient origin of the complement system

*EMBO J* **24**, 382-94

Ziccardi, R.J. (1982) Spontaneous activation of the first component of human complement (C1) by an intramolecular autocatalytic mechanism

*J. Immunol.* **128**, 2500-2504

Ziccardi, R.J. and Cooper, N.R. (1977) The subunit composition and sedimentation properties of human C1

*J. Immunol.* **118**, 2047-2052

Zipfel, P.F., Heinen, S., Józsi, M. and Skerka, C. (2006) Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases

*Mol. Immunol.* **43**, 97-106.

Zipfel, P.F. and Skerka, C. (2009) Complement regulators and inhibitory proteins

*Nat. Rev. Immunol.* **9**, 729-740