

XXXII. OTDK Biológia Szekció

TDK DOLGOZAT

Heterodimerek képződése a komplement rendszer lektin útvonalának szerinproteázai között

2013.

Készítette:

Hermann Ágnes

Molekuláris bionika mérnöki BSc

3. évfolyam

Pázmány Péter Katolikus Egyetem, MTA TTK Enzimológiai Intézet

Témavezető:

Dr. Dobó József

MTA TTK Enzimológiai Intézet

Tartalomjegyzék

Rövidítések	3
Bevezető	4
Irodalmi áttekintés	5
A komplement rendszer	5
A lektin út és a MASP-ok	7
A MASP-ok dimerizációja	10
Célkitűzések	11
Anyagok és módszerek	12
Expresszió	12
Renaturáció	13
Tisztítás	13
Natív gélelektroforézis	14
SDS-PAGE	14
Heterodimerizációs kísérlet	14
Kicserélődési kísérlet	15
Kutatási előzmények	16
Eredmények és következtetések	19
MASP-1 3D-CBD előállítása és tisztítása	19
Heterodimerizációs kísérlet	22
Kicserélődési kísérlet	23
Kicserélődés a MASP-1 3D és a MASP-1 3D-CBD között	23
Kicserélődés a MASP-2 3D és a MASP-2 3D-CBD között	25
Kicserélődés a MASP-1 3D és a MASP-2 3D között	26
Natív gélelektroforézis Ca^{2+} -os és Ca^{2+} nélküli közegben	27
Összefoglalás	29
Irodalomjegyzék	31
Tételes szerzői hozzájárulás	34

Rövidítések

BFK: bróm-fenol-kék

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)

IPTG: izopropil- β -tio-galaktozid (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)

MAC: membrán károsító komplex (membrane attack complex)

MAp: MBL-kötő fehérje (MBL-associated protein)

MASP: MBL-kötő szerinproteáz (MBL-associated serine protease)

MASP-1 3D: humán MASP-1 első három doménje

MASP-1 3D-CBD: humán MASP-1 első három doménje + kitin-kötő domén

MASP-2 3D: humán MASP-2 első három doménje

MASP-2 3D-CBD: humán MASP-2 első három doménje + kitin-kötő domén

MBL: mannóz kötő lektin (mannose binding lectin)

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis (polyacrylamide gel electrophoresis)

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenyl methyl sulfonyl fluoride)

SDS: nátrium-dodecil-szulfát (sodium-dodecyl-sulfate)

TBS: tris puffer fiziológiás sóval (tris buffered saline)

TCC: terminális komplement komplex (terminal complement complex)

Bevezető

A minket körülvevő világban számos különböző kórokozó él, melyek bejutása az emberi szervezetbe szinte elkerülhetetlen. Emellett olykor a saját testi sejtjeink jelentenek veszélyt az egészségünkre nézve. A bejutott idegen, valamint az ártalmas saját anyagok hatástalanítása, a veszélyes és veszélytelen anyagok megkülönböztetése az immunrendszer fő feladata. Az immunrendszert két fő részre tagoljuk: veleszületett (natív) és szerzett (adaptív) immunitásra. A natív immunitás születésünktől kezdve véd minket, míg az adaptív forma fokozatosan, a velünk kapcsolatba kerülő anyagok alapján alakul ki.

A komplement (Ricklin et al., 2010) egy olyan ősi kaszkád-rendszer, ami a veleszületett immunitásban játszik fontos szerepet. Első védelmi vonalként részt vesz a bekerült idegen anyagok lehető leggyorsabb eltávolításában. Feladatai közé tartozik az opszonizáció, a patogének lízise, a gyulladások keltése és az immunkomplexek feloldása és eliminációja a veszély megszűnése után. Emellett az adaptív immunitásban résztvevő B-sejtekre is hatással van.

Aktiválódása alapján három útvonalat különböztetünk meg: a klasszikus-, a lektin- és az alternatív utat. A mannoz-kötő-lektin(MBL)-asszociált szerinproteázok (MASP-1, MASP-2, MASP-3) a lektin út fontos összetevői. Az MBL és a fikolinok az idegen anyagok sejtfelszíni szénhidrát struktúráit ismerik fel. Ezekhez a felismerő molekulához kötődve fordulnak elő a MASP-ok, amelyek a felismerést követően aktiválódnak.

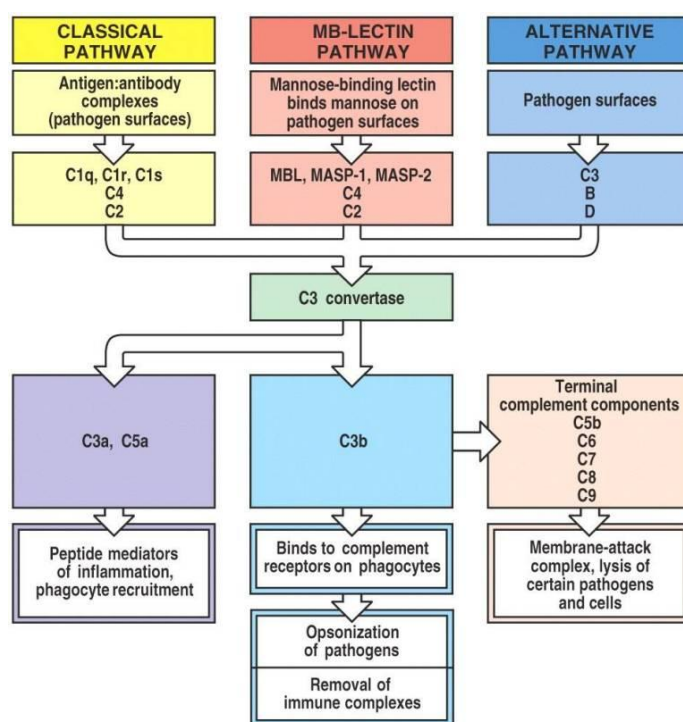
Dolgozatomat a Magyar Tudományos Akadémia Enzimológiai Intézetében készítettem Dr. Dobó József témavezető felügyelete alatt. Munkám során a MASP-ok Ca^{2+} -függő homo- és heterodimereinek képződését vizsgáltam. Ehhez a MASP-ok N-terminális fragmentjeit használtam, amelyek a MASP-ok első három – a dimerizációban részt vevő - doménjét tartalmazták. Ebben a rendszerben sikerült kimutatni MASP-1 és MASP-3, valamint MASP-1 és MASP-2 közti heterodimerek létrejöttét.

Az itt ismertetett munka alapján íródott cikk: „Dissociation and re-association studies on the interaction domains of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases, MASP-1 and MASP-2, provide evidence for possible heterodimer formation” (Katalin Paréj, Ágnes Hermann, Nóra Donáth, Péter Závodszy, Péter Gál, József Dobó, (2014) *Molecular Immunology* 59, 1–9).

Irodalmi áttekintés

A komplement rendszer

Bár a komplement rendszert először lineáris kaszkádként írták le, mára már kiderült, hogy inkább egy hálózathoz hasonlítható. Jelentősége egyértelmű, hisz elsődleges védelmi vonalként képes a megváltozott saját, valamint az idegen anyagok opszonizációjára és eliminációjára. Aktiválódása három különböző, azonban egy ponton összekapcsolódó úton zajlik (lásd 1. ábra).



1. ábra

A komplement rendszer aktiválódásának 3 útvonala
(Janeway et al. 2005)

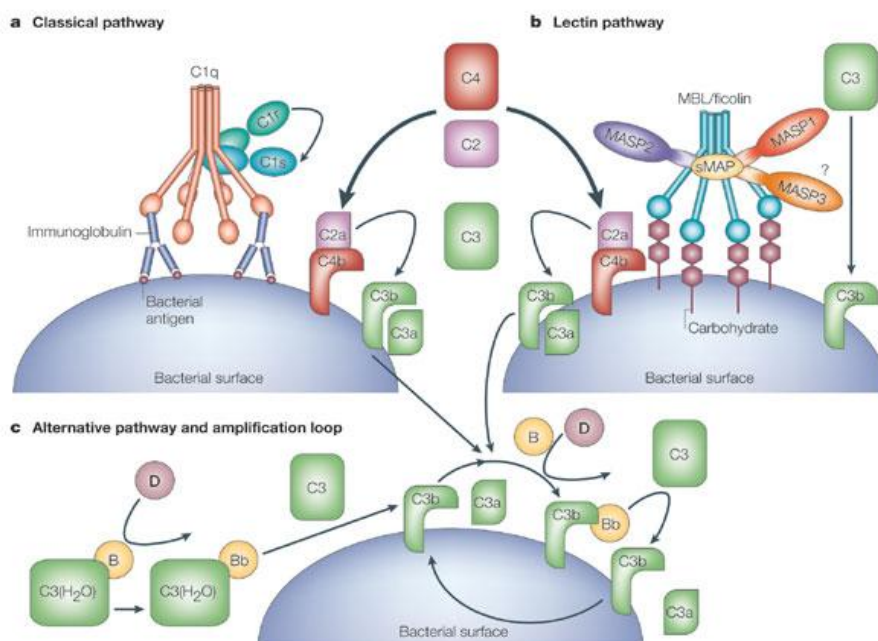
A klasszikus út kezdetén a felismerő C1q molekula a patogén felszínén lévő jellegzetes struktúrák felismerésével, ill. az azokhoz kötődő antitestek révén aktiválja a komplement rendszert (Ricklin et al., 2010) (lásd 2. ábra „a” része). A C1q-n kívül a C1 komplex részét képezi két-két C1r és C1s proteáz is. Utóbbi kettőt a C1q felszínhez való kötődése aktiválja. A C1s a C4-et hasítja C4a-ra és C4b-re, valamint a C2 molekulát C2a és C2b fragmentumra, miután a C4b a C2a-val kapcsolódva C3 konvertázt alkot (Wallis et al., 2010).

A lektin út során az MBL és a fikolinok töltik be a felismerő molekula szerepét, különböző szénhidrát oldalláncokhoz kötődve. Az MBL-hez ún. MASP-ok kötődnek (lásd 2. ábra „b” része). A MASP-2 mind a C2-t, mind a C4-et hasítja, ezzel szemben a MASP-1 csak a C2-t (Chen and Wallis, 2004). A C4bC2a itt is C3 konvertázként működik.

Az alternatív út fő komponense a C3 molekula. Ennek hidrolizált vagy hasított (C3b) formájához köt az ún. faktor B b fragmentuma. A Bb fragmentum a faktor B-ből a faktor D általi hasítással keletkezik (lásd 2. ábra „c” része). Az előző két útvonalhoz hasonlóan, a C3bBb C3 konvertáz szerepet tölt be. (Ricklin et al., 2010)

Mint láttuk, a három aktivációs útvonal a C3 konvertáz szintjén kapcsolódik össze. A C3 konvertáz újabb C3b kötése közben átalakul C5 konvertázzá, amely a C5-öt C5a és C5b fragmentumokra hasítja. A C5b a C6 és C7 molekulával együtt a patogén membránjába ékelődik és a C8-al kölcsönhatásba lép, miközben C9 alegységek csatlakozásával kialakul a terminális komplement komplex (TCC), más néven membrán károsító komplex (MAC), amely lehetővé teszi a patogén lízisét (Müller-Eberhard, 1985). A C3b a patogén felszínéhez kötődve az opszonizációban vesz részt.

A C3a, C4a és C5a fragmentumok anafilatoxinok, melyek a sejtfelszínre kötődve a gyulladáséktetésben vesznek részt, neutrofilokat, monocitákat és makrofágokat toborozva (Haas and van Strijp 2007; van Lookeren Campagne, 2007; Andreas Klos et al., 2009).

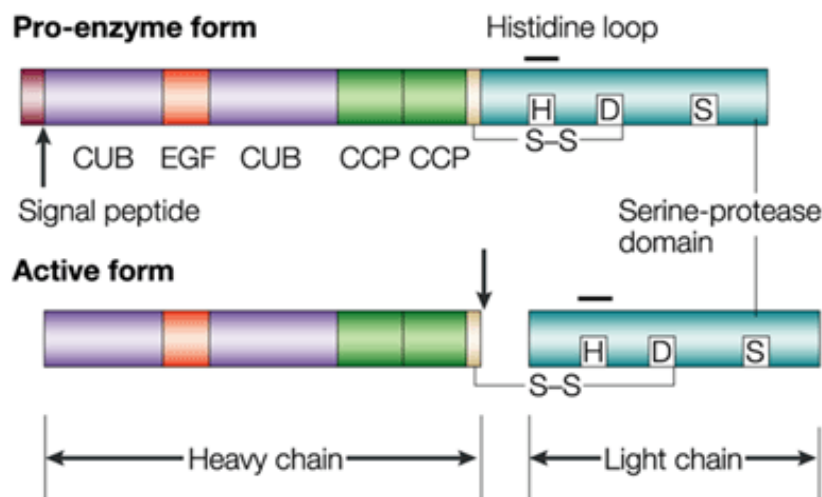


2. ábra

A klasszikus, a lektin és az alternatív út aktiválódása baktériumok felszínén
(Timothy J. Foster, 2005)

A lektin út és a MASP-ok

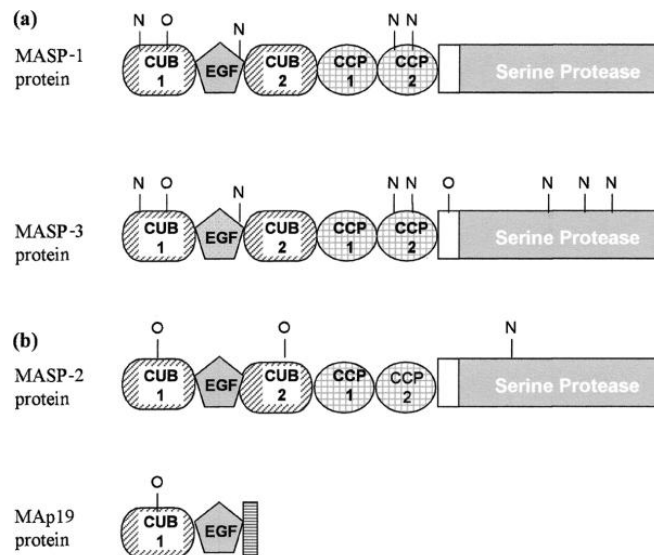
A lektin út aktivációja hasonló a klasszikus útéhoz. A C1q molekula szerepét az MBL és a fikolinok töltik be, míg a C1r és C1s-ét pedig a MASP-ok (MASP-1, MASP-2, MASP-3) és a MAp-ok (MAp19, MAp44). A MASP-okat és a MAp-okat összesen két gén kódolja. A MASP-1-et, MASP-3-at és MAp44-et a *MASP1* gén alternatív splicingja eredményezi, míg a MASP-2 és a MAp19 a *MASP2* génről íródik át. A MASP-ok szerkezetének alapját 5 szabályozó (CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2) és egy szerin-proteáz (SP) domén képezi. A szignál peptid levágódása után kapjuk a vérben található proenzim formát, ami az aktiválódás során diszulfid hídral összekötött két láncra hasad (lásd 3. ábra).



3. ábra

A klasszikus és a lektin út szerinproteázainak doménszerkezete
(Teizo Fujita, 2002)

A MASP-1 és MASP-3 csak az SP doménben tér el egymástól (Dahl et al., 2001) (lásd 4. ábra „a” része), míg a MASP-2 és a MAp19 csak az első két doménben egyezik meg (lásd 4. ábra „b” része). A MAp44-et lényegileg a MASP-1 első négy doménje alkotja.

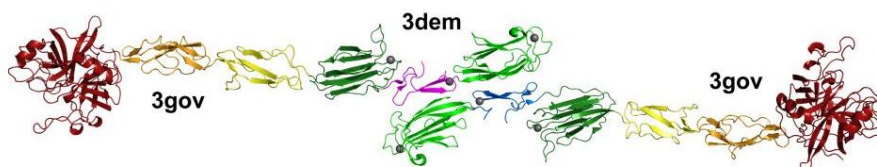


4. ábra

A MASP-1, a MASP-3, a MASP-2 és a MASP-19 doménszerkezete
(Presanis et al., 2003)

MAASP-1:

A MASP-1 (lásd 5.ábra) adja a legnagyobb hányadát az MBL-kötő szerin-proteázoknak, valamint ez volt a legelső amit felfedeztek (Matsushita and Fujita, 1992). Kiderült azonban, a C4 hasításában nem, csak a C2-ében szerepel (Ambrus et al., 2003). Ennek ellenére a MASP-2-höz hasonlóan létfontosságú szerepet tölt be a lektin út működésében, mivel a legújabb kutatások szerint a MASP-1 aktiválja a MASP-2-t és feltehetően a MASP-3-at is (Héja et al., 2012; Megyeri et al., 2013; Degn et al., 2012). Továbbá kiderült, hogy a MASP-1 képes a fibrinogén és a XIII-as faktor hasítására, melyek a trombin szubsztrátjai (Hajela et al., 2002; Krarup et al., 2008). A MASP-1 aktivitását a C1 inhibitorral, valamint antitrombinnal lehet gátolni (Dobó et al., 2009).



5. ábra

MAASP-1 homodimer: a fent látható modell az N-terminális 3 domén (CUB1-EGF-CUB2, Teillet et al., 2008) ÉS A C-terminális 3 domén (CCP1-CCP2-SP, Dobo et al., 2009) szerkezetének felhasználásával készült

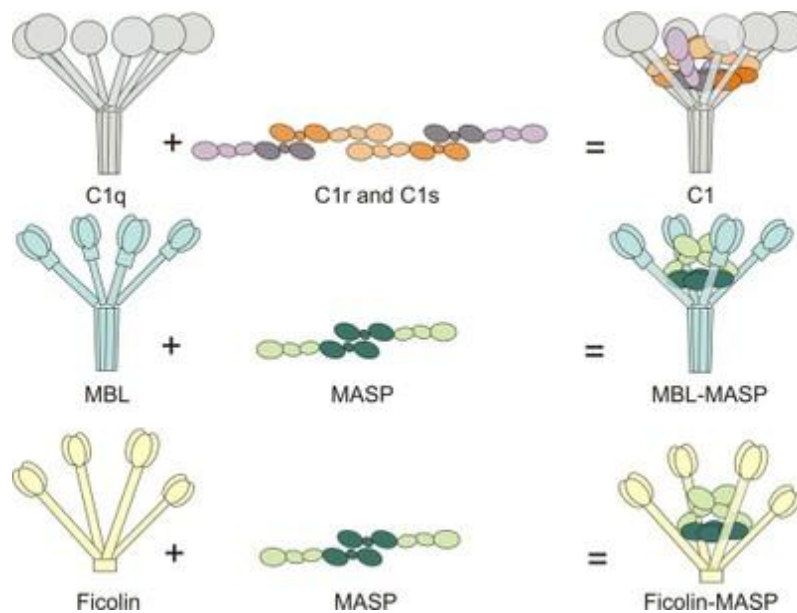
MASP-2:

A MASP család másik fontos tagja a MASP-2, bár humán szérumban jóval kevesebb található belőle, mint a MASP-1-ből (Thiel et al., 1997). Fő funkciója a C4b és C2a molekulák előállítása, amelyek a C3 konvertázt alkotják.

MASP-3:

A komplement rendszer aktiválódásában betöltött pontos szerepe eddig ismeretlen. Se a C2-t, se a C4-et nem hasítja. Főleg a MASP-2-vel együtt található meg komplexben (Dahl et al., 2001). Mint említettük a MASP-3 a *MASP1* gén alternatív splicinggal kapott terméke, az első öt doménje megegyezik a MASP-1 azonos régiójával.

A MASP-ok az MBL-en kívül a szintén felismerő molekulaként ismert fikolinokkal is komplexeket alkothatnak (lásd 6. ábra).



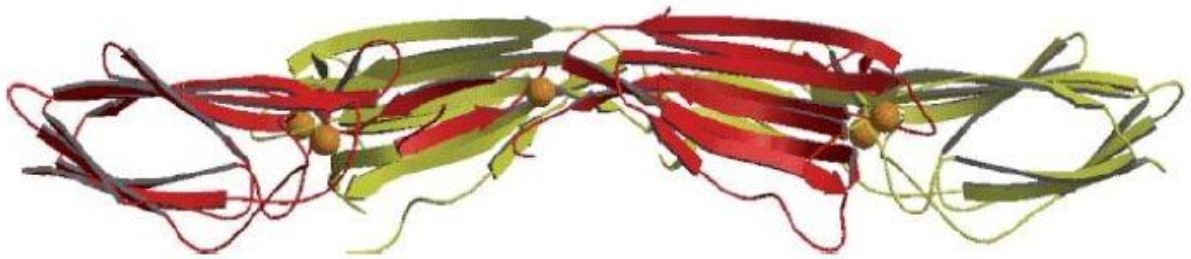
6. ábra

A klasszikus (1.) és a lektin út (2., 3.) kezdeti komplexei
(Wallis et al., 2008)

A MASP-ok dimerizációja

A MASP-ok MBL-hez és fikolinokhoz való kötődése Ca^{2+} -függő. A CUB1-EGF-CUB2 domének mindegyike egy Ca^{2+} -t köt meg, tehát minden MASP dimer 6 Ca^{2+} -t köt (Wallis et al., 2010). A Ca^{2+} -függő dimerizációért a CUB1-EGF régió a felelős (Wallis and Dodd, 2000; Thielens et al., 2001). A MASP-MBL/MASP-fikolin komplexek EDTA és 1 M NaCl jelenlétében disszociálnak.

MASP-1 (lásd 7. ábra) és MASP-2 homodimereket mind Ca^{2+} -os, mind EDTA-s pufferben kimutattak, amiből arra következtettek, hogy bár a dimerizáció Ca^{2+} -függő, a dimerekbe beépült Ca^{2+} az EDTA számára nem hozzáférhető (Thielens et al., 2001).



7. ábra
MASP-1 homodimer

A MASP-1, MASP-3 és MASP-4 közti heterodimerek keletkezésére irányuló kutatások más kutatócsoportban is folynak (Rosbjerg et al., 2013). Ezen dimerek kialakulásának nincs szerkezeti akadálya, mivel a fenti három fehérje első három – a dimerizációban részt vevő – doménje megegyezik.

A MASP-1:MASP-2 heterodimerek létrejöttét az eltérő domének gátolhatják.

Célkitűzések

2012 őszén nyertem bepillantást a Magyar Tudományos Akadémia Enzimológiai Intézetén folyó kutatásokba. 2013 tavaszán Dr. Dobó József felügyelete alatt kezdtem el a munkát. Eredetileg a MASP-1 humán vérplazmából/szérumból való izolálása miatt ismerkedtem meg a komplement rendszer MASP fehérjéivel. Az izolálásra irányuló kísérletek közben merült fel, hogy vajon a MASP-ok heterodimerizációja végbe megy-e, és ha igen milyen hatékonysággal, mennyi idő alatt. Ekkor fogalmazódott meg az új cél: a fent említett Ca^{2+} -függő MASP heterodimerek kimutatása és keletkezésének vizsgálata.

Korábban azt feltételezték, hogy a MASP-ok homodimerként kötődnek a felismerő molekulákhoz, ezért a heterodimerek képződésének lehetősége új megvilágításba helyezi a lektin út aktivációját.

A kitűzött célok megvalósítására az alábbi lépésekre volt szükség:

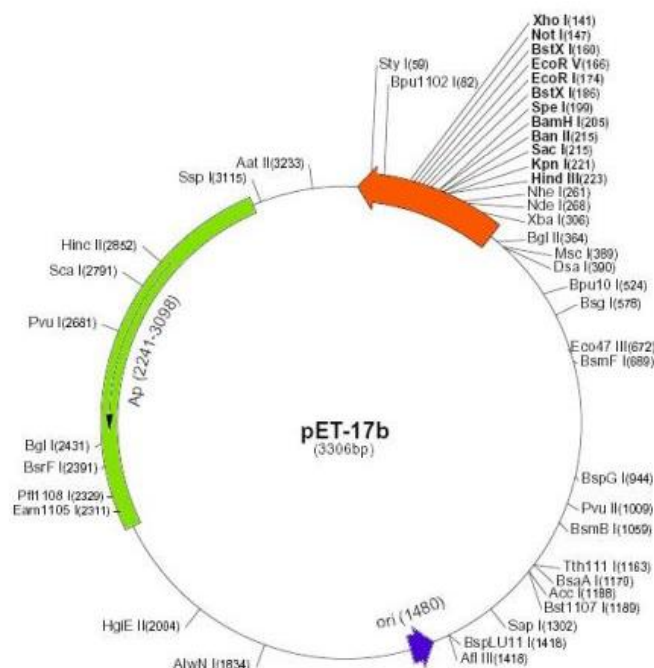
- MASP-1, MASP-2 és MASP-3 első három doménjének (CUB1-EGF-CUB2) kifejezése E.coli-ban
- az expresszált fehérjék renaturálása
- az expresszált fehérjék tisztítása kromatográfiás módszerekkel
- heterodimerek képződésének vizsgálata EDTA-s kezelést követő re-asszociáció során
- kicserélődési kísérletek Ca^{2+} jelenlétében

Anyagok és módszerek

A kicserélődést vizsgáló kísérletekben mind MASP-1 3D, MASP-1 3D-CBD, MASP-2 3D, MASP-2 3D-CBD, MASP-3-3D és MASP-3-3D-CBD fehérjéket használtunk, ezek expressziója és tisztítása azonos protokoll alapján történt. A következőkben a MASP-1 3D-CBD előállítását részletezem.

Expresszió

Az expressziót pET rendszerben végeztem, ez a legelterjedtebb módszer E.coli-ban való kifejeztetésre. A munkám során használt kitin kötő domén (CBD) ellátott humán MASP-1 CUB1-EGF-CUB2 doménjét kódoló DNS az Entelechon GmbH (Regensburg, Germany)-tól származott. A DNS szakaszok pET17b vektorba (lásd 8. ábra) inzertálása után olyan plazmidok jöttek létre, amelyek a natív CUB1-EGF-CUB2 doméneket, és egy linker szakaszt követően a C terminálison CBD-t kódolnak. A pET17b vektor előnye, hogy tartalmaz egy ún. T7 promóter régiót, melynek segítségével szabályozottan indukálható az expresszió (Novagen *pET System Manual*, 2005).



8. ábra

A pET-17 b vektor szerkezete
(Novagen *pET System Manual*, 2005)

A plazmidokat E.coli BL21(DE3)pLysS sejtekbe transzformáltam. A pLysS-es sejtek kloramfenikolra rezisztensek. Ezt, valamint a pET17b vektor ampicillin rezisztenciáját kihasználva szelektálhatók a plazmidokat tartalmazó sejtek, mivel ampicillint és kloramfenikolt tartalmazó táptalajon csak ezek nőnek fel.

A fenti módon előkészített sejtekben a MASP-1 3D-CBD expressziója IPTG hozzáadásával indukálható. A géntermék inklúziós testek formájában keletkezik.

Renaturáció

A renaturáció során 20 ml 5 mg/ml koncentrációjú 7.2 M GuHCl, 50 mM Tris, pH8.0, 50 mM DTT pufferben oldott MASP-1 3D-CBD oldatot adtam 1 L refolding pufferhez (0.75 M Arg, 50 mM Tris, 3 mM glutation, 2 mM oxidált glutation), majd ezt egy hétig 4°C-on inkubáltam. Kétféle pH-t is kipróbáltam (pH 8 és pH 9). Ezután 2 x 0,5 L-es adagokban először 2 x 10 L vízben, majd 2 x 10 L 10 mM Tris-t és 10 mM CaCl₂-ot tartalmazó pufferben dializáltam szintén 4 °C-on.

Tisztítás

A dializálás után kapott fehérjét 0,22 µM Millipore Express Plus Stericup szűrőn szűrtem át, hogy az esetleges csapadékot eltávolítsam. Utána vittem fel Source 30 Q (GE Healthcare) anioncserélő oszlopra.

Az oszlop ekvibrálására az A puffert, míg a fehérje eluálására a B puffert használtam. Az elúció 0-300 mM NaCl-os lineáris grádienssel történt, 5 mL-s frakciókba szedve.

A puffer	20 mM Tris, 10 mM CaCl ₂ , pH 8.0
B puffer	1 M NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl ₂ , pH 8.0

A fő csúcsokat tartalmazó frakciókat, amik a legtöbb tiszta anyagot tartalmazták egyesítettem és 15 mL-s Amicon/Millipore töményítő cellán töményítettem. Az így kapott anyagot Superdex-200 gélszűrő oszlopra vittem fel az alábbi pufferben.

150 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM CaCl ₂ , pH8.0
--

Natív gélelektroforézis

A natív gélelektroforézishez Ornstein-Davis puffer rendszert (Ornstein, 1964; Davis, 1964) használtam, ami valójában az SDS nélküli Laemmli puffer rendszer.

1,5 mM vastag, 10%-os géleket használtam 5 %-os stackinggel. Mind a szeparáló, mind a stacking részhez 2 mM CaCl_2 -t adtam. A futtató pufferbe is bemértem 2 mM CaCl_2 -t. A Ca^{2+} azért szükséges, mert e nélkül a MASP-1 fragmentumok kb. 90%-a szétesik monomerekre, míg Ca^{2+} jelenlétében a MASP-1 dimereket mutató éles sávokat kapunk (*lásd később*).

A mintákhoz futtatás előtt 5x natív mintapuffert adtam, ami 50% glicerint, 0.1% bróm-fenolkék festéket és 5-szörös koncentrációban futtató puffert tartalmazott. A futás során a gélben egy precipitációs sávot figyeltem meg, azonban ez a festés során eltűnt.

A futtatást konstans 50 mA-en végeztem 90 percig. A festés 0.1%-os Coomassie Brilliant Blue G-250-nel történt 7,5 térfogat %-os ecetsav oldatban.

SDS-PAGE

Az SDS poliakrilamid gélelektroforézishez a Laemmli puffer rendszert használtam. Itt is 1,5 mM széles, 12.5%-os géleket használtam 5 %-os stackinggel. A mintákat redukáló mintapufferrel (125 mM Tris, pH 6.8, 4.5% SDS, 15% glicerint, 0.03% BFK, 5 % merkaptó-etanol) kezeltem, majd 2 percig 95 °C-on inkubáltam. Nem redukáló körülmények esetén a mintapuffer ugyanaz, mint a redukáló, csak merkaptó-etanol nélkül. A futtatást konstans 50 mA-en végeztem 60 percig. A festés 0.1%-os Coomassie Brilliant Blue G-250-nel történt 7.5 térfogat %-os ecetsav oldatban többszöri cserével.

Heterodimerizációs kísérlet

150 mM NaCl-ot, 50 mM Tris-t és 10 mM EDTA-t tartalmazó pH 8.0-as pufferben összekevertem külön-külön MASP-1 3D-t MASP-1 3D-CBD-vel, MASP-2 3D-t MASP-2 3D-CBD-vel és MASP-1 3D-t MASP-2 3D –vel. A fehérjék végkoncentrációja egyenként 50 $\mu\text{g/mL}$ lett és EDTA feleslegben volt a CaCl_2 -hoz képest. A disszociáció elérése érdekében az elegyet 4 órán keresztül szobahőn inkubáltam. Ezután 1/100 térfogatnyi 2 M CaCl_2 -ot adtam hozzá (20 mM végkoncentrációban) és overnight inkubáltam hogy a re-asszociáció végbemehessen.

Az eredményt Ca^{2+} -os natív gélen ellenőriztem, kontrollnak az eredeti fehérjék 50 $\mu\text{g/mL}$ -s oldatát használtam.

Kicserélődési kísérlet

150 mM NaCl-ot, 50 mM Tris-t és 10 mM CaCl₂-ot tartalmazó pH 8.0-as pufferben összekevertem külön-külön MASP-1 3D-t MASP-1 3D-CBD-vel, MASP-2 3D-t MASP-2 3D-CBD-vel és MASP-1 3D-t MASP-2 3D-vel. A fehérjék végkoncentrációja egyenként 100 µg/mL lett. Szobahőn inkubáltam 7 napon keresztül, miközben mintát vettem 0 óránál, valamint 1,2,3,4 és 7 napnál úgy, hogy 1/5 térfogat natív mintapufferrel elegyítve lefagyasztottam a mintát. Az eredményt Ca²⁺-os natív gélen ellenőriztem, kontrollnak az eredeti fehérjék 100 µg/mL-s oldatát használtam.

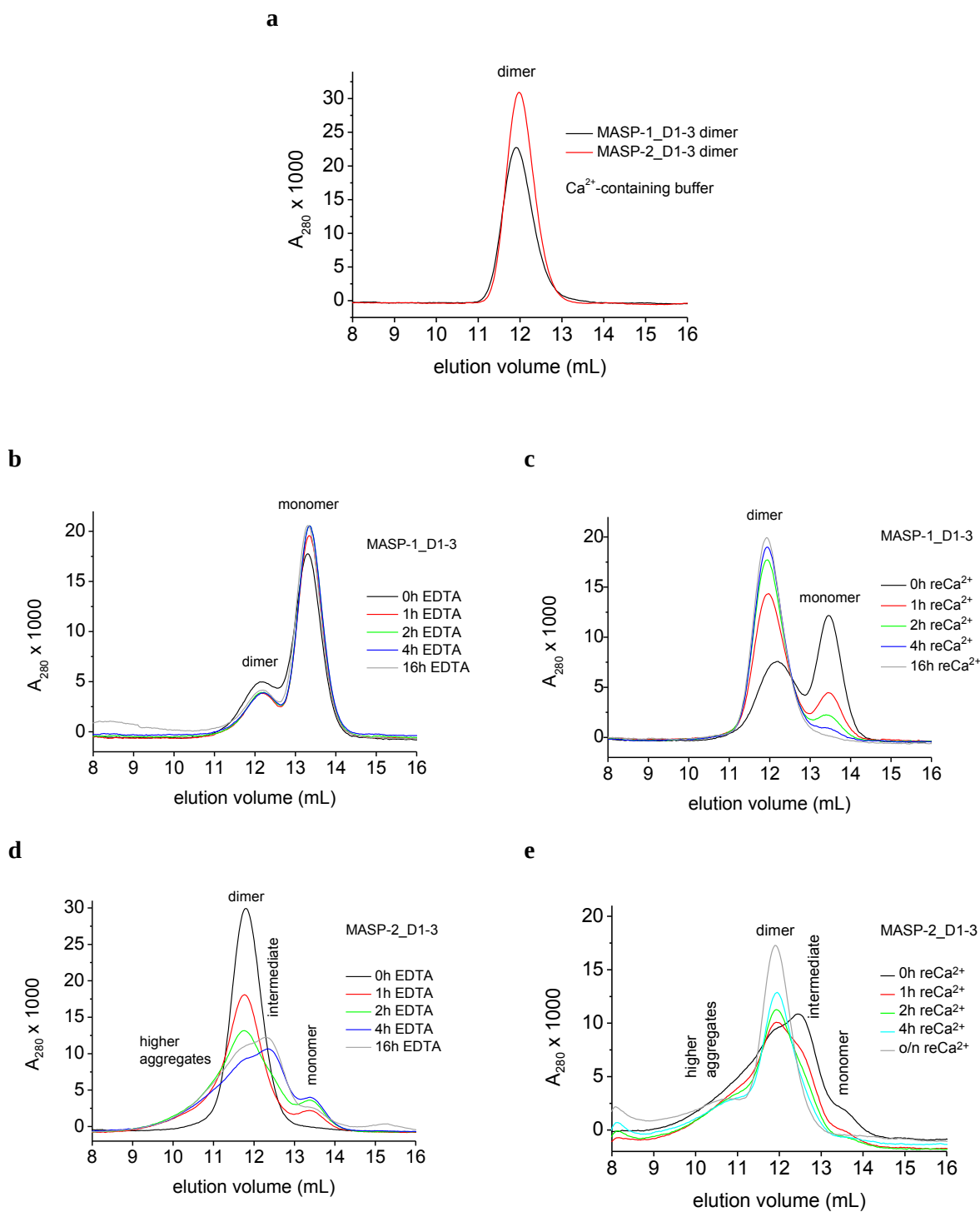
Kutatási előzmények

Az általam is használt MASP fragmentumok disszociációs és re-asszociációs vizsgálatát Donáth Nóra végezte. A minták vizsgálata méretkizárásos kromatográfiával történt Superose 12 GL oszlopon. A 9. ábra mutatja a kapott csúcsokat. Az A, a C és az E esetben TBS-Ca (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , pH8.0), míg a B és a D esetben TBS-EDTA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8.0) pufferben történt az analízis. A 9./a ábrán látható a MASP-1 3D és a MASP-2 3D Ca^{2+} -os pufferben kapott csúcsa, ami – mivel Ca^{2+} -os pufferben dimer formában van jelen - mindkét fehérje esetében szimmetrikus. A 9./b ábra a MASP-1 3D EDTA-val történt kezelése utáni disszociációt, míg a 9./c ábra a hozzáadott CaCl_2 hatására bekövetkező re-asszociációt mutatja. A 9./d és 9./e ábrán a MASP-2 3D EDTA hatására történő disszociációját, valamint re-kalcifikálás utáni re-asszociációját figyelhetjük meg. Látható, hogy a két fehérje eltérő módon viselkedik a kísérletek során.

A MASP-1 3D disszociációja sokkal gyorsabban következett be, kb. 1 óra után beállt az egyensúly, azonban a dimer forma még 16 órás inkubálás után sem tűnt el, vagyis a disszociáció nem volt teljes. A re-kalcifikációt követően 16 órás inkubáció után visszaállt a 100% dimer állapot. 4 órás várakozás után már a fehérje kb. 95 %-a dimerizálódott.

A MASP-2 3D esetében EDTA hozzáadása után jelentős mennyiségű aggregátum keletkezett, valamint a dimer és monomer csúcsok között megjelent egy intermedier csúcs is. Itt 4 óra után állt be az egyensúly, melynek során a MASP-2 3D legnagyobb hányada az intermedier formát vette fel. Re-kalcifikáció után overnight inkubációt alkalmazva is csak az eredeti dimerek kb. 70%-a állt helyre, a többi aggregátum formájában volt jelen.

Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Ca^{2+} nem teljesen hozzáférhető az EDTA számára, illetve a fehérje hasonló erősséggel köti a Ca^{2+} -ot, mint az EDTA. Emiatt egyik fehérje esetében sem tapasztaltunk teljes disszociációt.



9. ábra

**A MASP-1 és a MASP-2 EDTA-val indukált disszociációja és re-kalcifikálás utáni dimerizációja
(Donáth Nóra)**

A fenti kísérletek homodimerek képződését vizsgálták, azonban kimutattak olyan MBL-MASP komplexeket is, melyekben két féle MASP (MASP-1 és MASP-2) kapcsolódik az MBL-hez, azaz heterokomplexek is létrejöhetnek. Azonban végül arra jutottak, hogy az ilyen

heterokomplexek nem MASP-1:MASP-2 heterodimereket, hanem egy MASP-1 homodimert és egy MASP-2 homodimert tartalmaznak (Degn et al. 2013). MASP-1:MASP-2 dimerek EDTA és 1M NaCl jelenlétében szérumból való kimutatása (Degn et al., 2013) a fenti kísérleteink fényében nem sikerülhetett.

A MASP-1, MASP-3 és MASP-4 közti heterodimereket már sikerült kimutatni (Rosbjerg et al., 2013). Mivel ez a három fehérje ugyanarról a génről íródik át és az interakciós doménjeik (CUB1-EGF-CUB2) azonosak, ezért itt nincs szerkezeti akadálya a heterodimerizációnak.

Az itt ismertetett eredmények szerepelnek a „Dissociation and re-association studies on the interaction domains of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases, MASP-1 and MASP-2, provide evidence for possible heterodimer formation” (Katalin Paréj, Ágnes Hermann, Nóra Donáth, Péter Závodszy, Péter Gál, József Dobó, (2014) *Molecular Immunology* 59, 1–9) című cikkben.

Eredmények és következtetések

MASP-1 3D-CBD előállítása és tisztítása

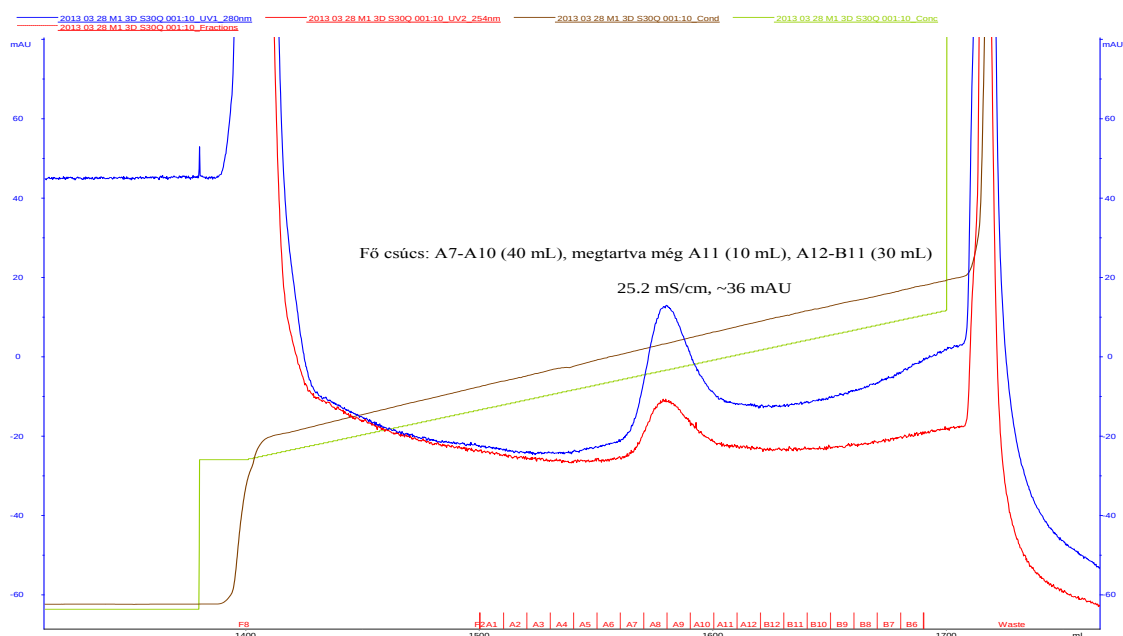
Az általam használt MASP fragmentumok közül én a MASP-1 3D-CBD rekombináns előállítását és tisztítását végeztem. Ebben a részben az ezzel kapcsolatos eredményeket ismertetem.

Expresszió és renaturáció:

Az anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon végeztem a MASP-1 3D-CBD expresszióját és renaturációját. A renaturálást 8-as és 9-es pH-n is kipróbáltam, de a 9-es pH esetén jelentős mennyiségű csapadékot figyeltem meg.

Kromatográfia pH 8.0-on renaturált - MASP-1 3D-CBD:

Source 30 Q anioncserélő oszlopon tisztítottam 1 L renaturációs elegyből származó dializált MASP-1 3D-CBD-t, (mért pH: ~8.5, 8 °C-on). A kapott kromatogramot a 10. ábra mutatja.

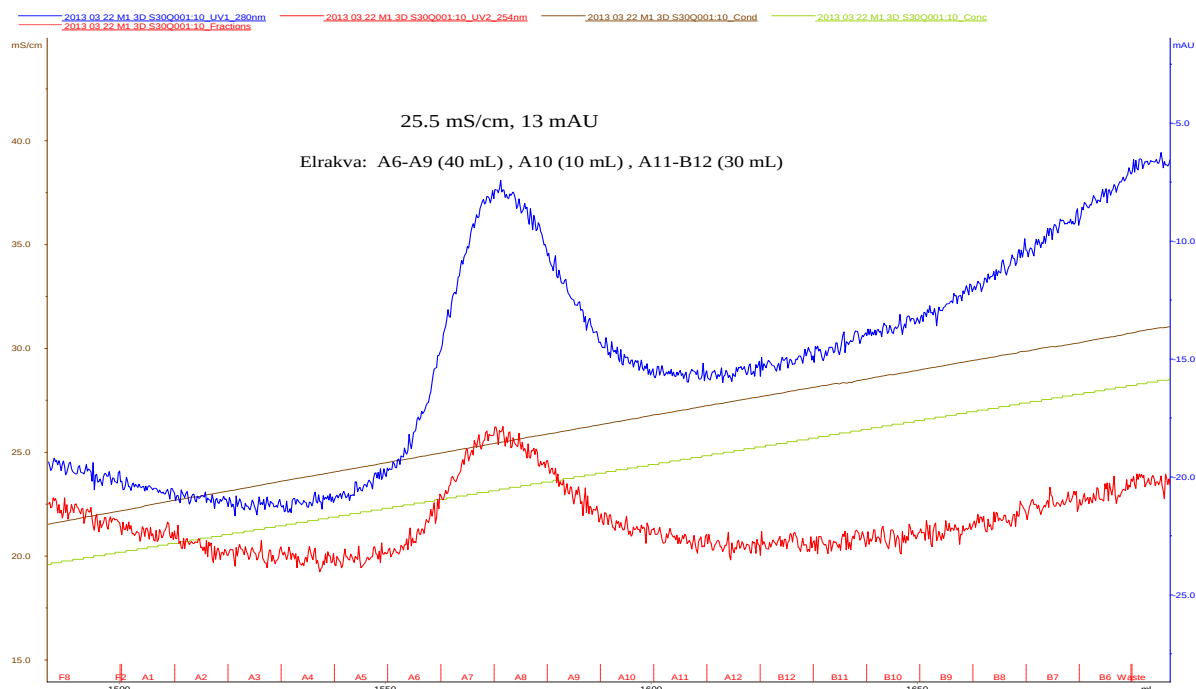


10. ábra

A 8-as pH-n renaturált MASP-1 3D-CBD fehérje anioncserélő kromatográfia során kapott kromatogramja

Kromatográfia - pH 9.0-en renaturált MASP-1 3D-CBD:

Source 30 Q anioncserélő oszlopon tisztítottam 1.3 L dializált MASP-1 3D-CBD-t (mért pH: 8.6, 15 °C) A kapott kromatogramot a 11. ábra mutatja. A fenti tisztításhoz képest kisebb csúcsot kaptam, valamint a dializált fehérje is sokkal csapadékosabb volt, ezért megállapíthatjuk, hogy a továbbiakban 8.0-as pH-n érdemes végezni a renaturációt.

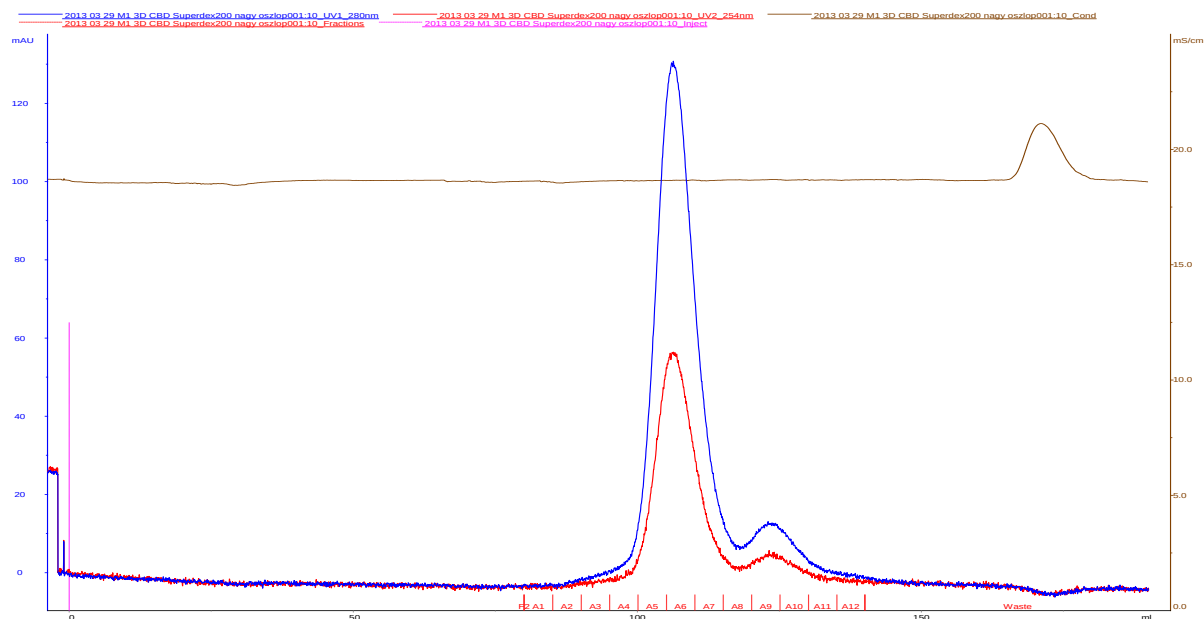


11. ábra

A 9-es pH-n renaturált MASP-1 3D-CBD fehérje anioncserélő kromatográfia során kapott kromatogramja

Gélszűrés - MASP-1 3D-CBD:

Az első tisztításból az A7-A10, a másodikból az A6-A9-es frakciókat - amik a legtöbb tiszta anyagot tartalmazták - egyesítettem és 3,3 mL végtérfogatúra töményítettem. Ebből 3 mL-t Superdex-200 gélszűrő oszlopra vittem fel. A kapott kromatogram a 12. ábrán látható. Az anioncserélő kromatográfiánál, valamint a gélszűrésnél az Anyagok és módszerek fejezetben részletezett Ca^{2+} -os puffereket használtam.

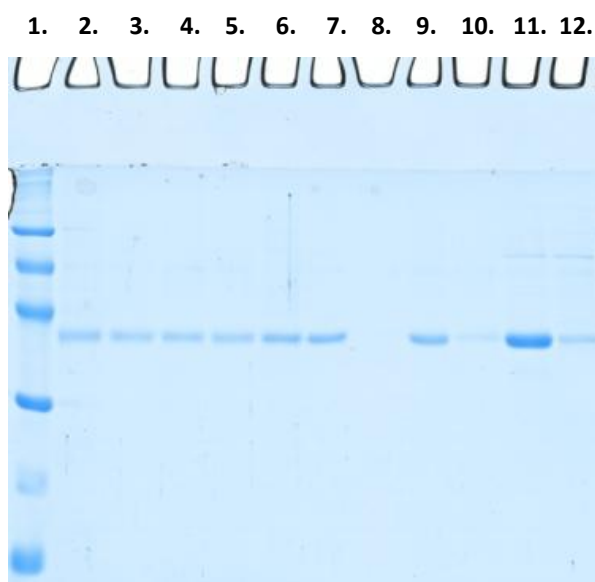


12. ábra

A MASP-1 3D-CBD fehérje géliszűrés során kapott kromatogramja

Az anioncserélő kromatográfia, valamint a géliszűrés során kapott frakciókat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem redukáló és nem redukáló körülmények között (lásd 13. és 14. ábra):

Redukáló:

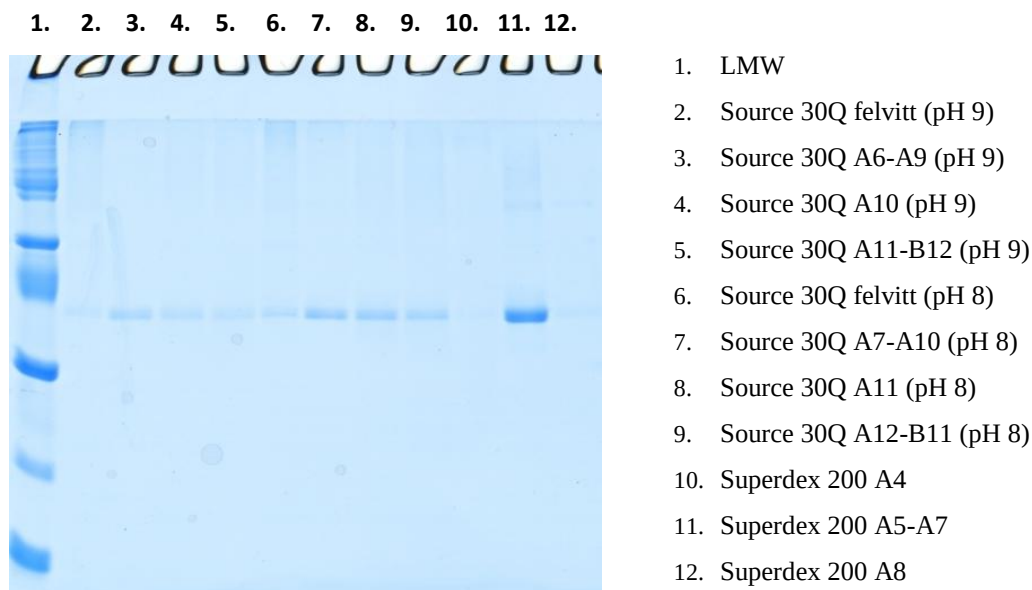


1. LMW
2. Source 30Q felvitt (pH 9)
3. Source 30Q A6-A9 (pH 9)
4. Source 30Q A10 (pH 9)
5. Source 30Q A11-B12 (pH 9)
6. Source 30Q felvitt (pH 8)
7. Source 30Q A7-A10 (pH 8)
8. Source 30Q A11 (pH 8)
9. Source 30Q A12-B11 (pH 8)
10. Superdex 200 A4
11. Superdex 200 A5-A7
12. Superdex 200 A8

13. ábra

A MASP-1 3D-CBD tisztítása során kapott frakciók gélképe redukáló körülmények között

Nem redukáló:



14. ábra

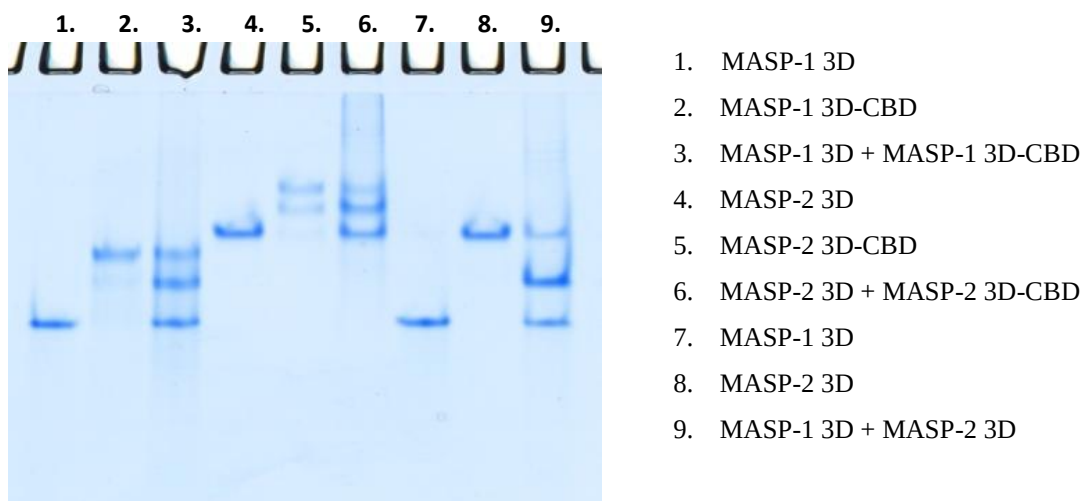
A MASP-1 3D-CBD tisztítása során kapott frakciók gélképe nem redukáló körülmények között

A gélszűrés után kapott A5-A7 frakciók abszorbanciáját megmértem, majd ennek segítségével kiszámoltam a koncentrációt, ami 0,201 mg/ml lett. A gélképek alapján az anyag tisztaságát 80-90%-osra becsültem.

Heterodimerizációs kísérlet

A korábban már részletezett módon EDTA-s pufferben összekevertem MASP-1 3D-t MASP-1 3D-CBD-vel, MASP-2 3D-t MASP-2 3D-CBD-vel, valamint MASP-1 3D-t MASP-2 3D-vel. Ezt 4 órás inkubálás után re-kalcifikáltam, majd overnight inkubáltam és a kapott eredményeket 2mM Ca^{2+} -os 10%-os natív gélen ellenőriztem

A gélképen (lásd 15. ábra) látható, hogy mindhárom vizsgált fehérje esetében keletkeztek heterodimerek. A sávok erősségét denzitometriás vizsgálattal határoztam meg, a homodimer:heterodimer:homodimer arány kb. 1:2:1 lett. Ebből arra lehetett következtetni, hogy szerkezetileg nincs akadálya a heterodimer formák kialakulásának. Tehát a kicserélődés feltételei is adóttak.



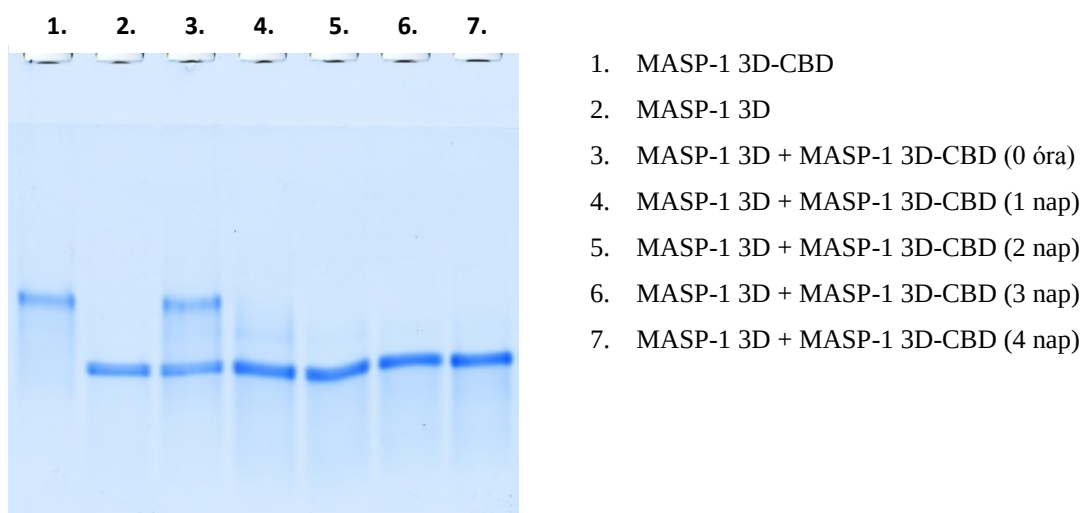
15. ábra

A különböző MASP fragmentumok és a köztük létrejött heterodimerek gélképe

Kicserélődési kísérlet

A módszerek fejezetben ismertetett módon végeztem el a kicserélődés vizsgálatára irányuló kísérleteket. Ca^{2+} -os pufferben összekevertem MASP-1 3D-t MASP-1 3D-CBD-vel, MASP-2 3D-t MASP-2 3D-CBD-vel, valamint MASP-1 3D-t MASP-2 3D-vel. Az elegyeket szobahőn inkubáltam 4 napig napi mintavételezés mellett. Az eredményeket 2mM Ca^{2+} -os 10%-os natív gélen ellenőriztem.

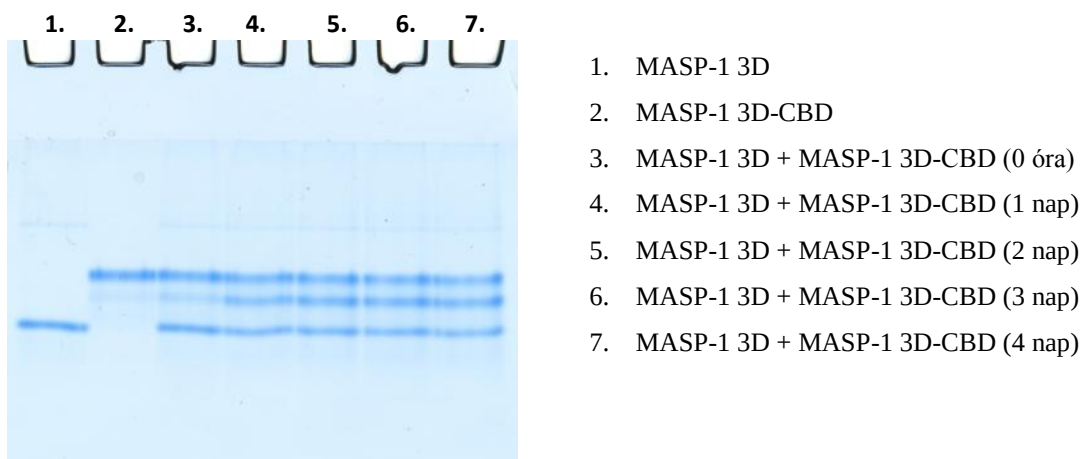
Kicserélődés a MASP-1 3D és a MASP-1 3D-CBD között



16. ábra

Spontán kicserélődés a MASP-1 3D és a MASP-1 3D-CBD között

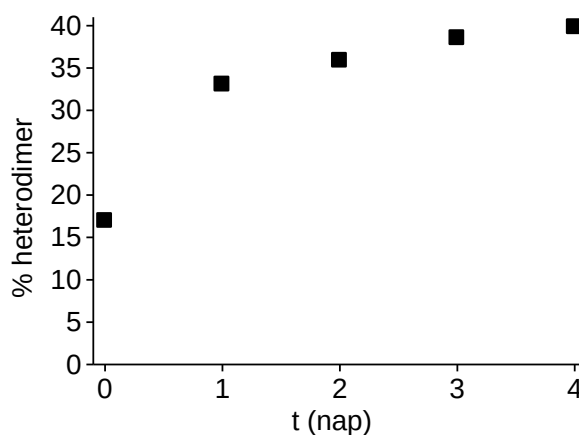
A 16. ábrán látható, hogy a MASP-1 3D-CBD degradálódott, emiatt meg kellett ismételni a kísérletet 1 mM PMSF jelenlétében, hogy a degradációt elkerüljem. Ebben az esetben már intenzív kicserélődést tapasztaltam (lásd 17. ábra).



17. ábra

Kicserélődés a MASP-1 3D és a MASP-1 3D-CBD között PMSF jelenlétében

A denzitometriás vizsgálat során azt kaptam, hogy a 4. napra a MASP-1 3D és a MASP-1 3D-CBD kb. 40%-a heterodimer formában volt jelen (lásd 18. ábra).



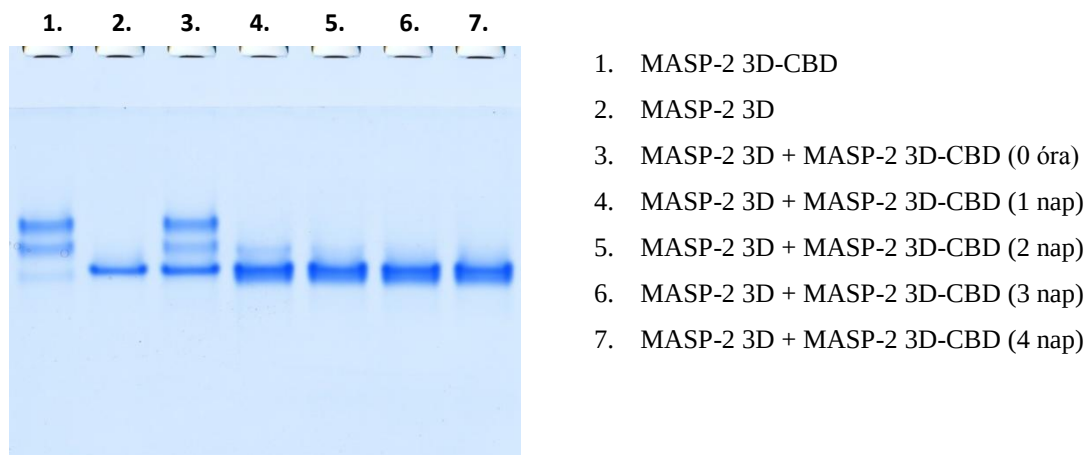
18. ábra

A MASP-1 3D és a MASP-1 3D-CBD közti heterodimerek %-os aránya az idő függvényében

A fenti kísérlettel ugyancsak modellezhető a MASP-1 és a MASP-3, a MASP-1 és a MASP-4, valamint a MASP-3 és a MASP-4 közötti kicserélődés is, mivel ezen 3 fehérjének a dimerizációban részt vevő CUB1-EGF-CUB2 doménje azonos.

Kicserélődés a MASP-2 3D és a MASP-2 3D-CBD között

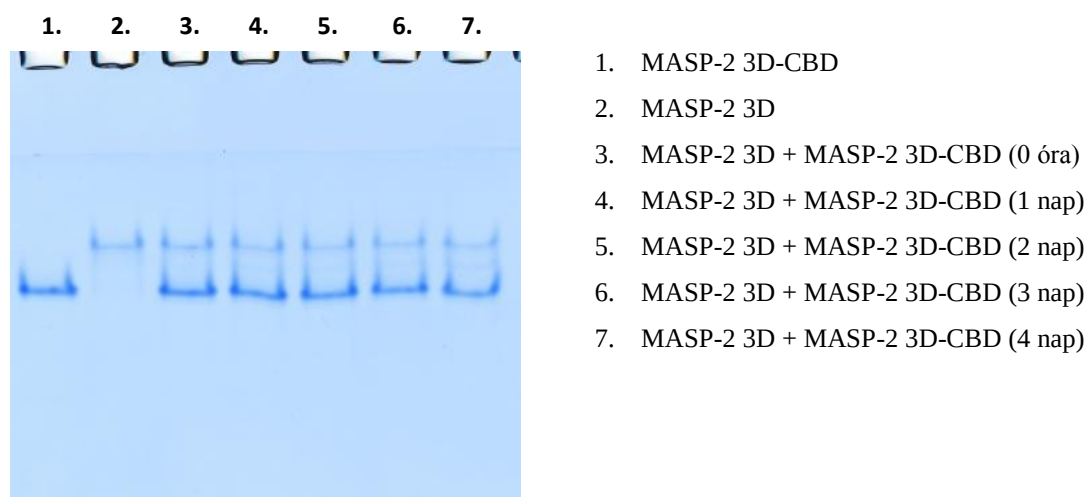
Hasonlót tapasztaltam a MASP-2 3D és MASP-2 3D-CBD vizsgálatokor is (lásd 19. ábra). A MASP-2 3D-CBD részben degradált volt, ezért 2 csíkot is mutatott, valamint az 1. napra teljesen degradálódott.



19. ábra

Spontán kicserélődés a MASP-2 3D és a MASP-2 3D-CBD között

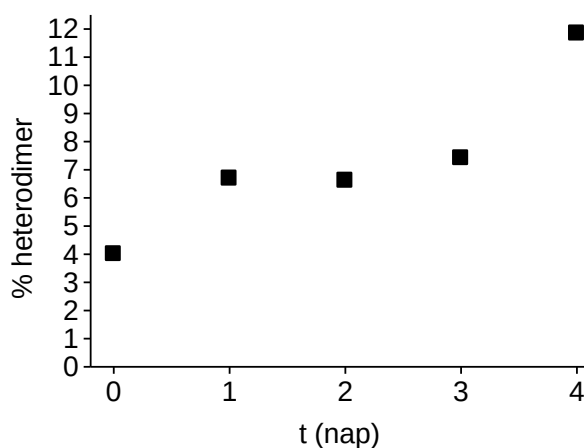
A kísérletet újra elvégeztem 1 mM PMSF jelenlétében, a fenti esethez hasonlóan. Ekkor már tapasztaltam minimális kicserélődést (lásd 20. ábra).



20. ábra

Kicserélődés a MASP-2 3D és a MASP-2 3D-CBD között PMSF jelenlétében

Két nap után kb. 7 %, 4 nap után pedig kb. 12 % lett a heterodimerek aránya (lásd 21. ábra).



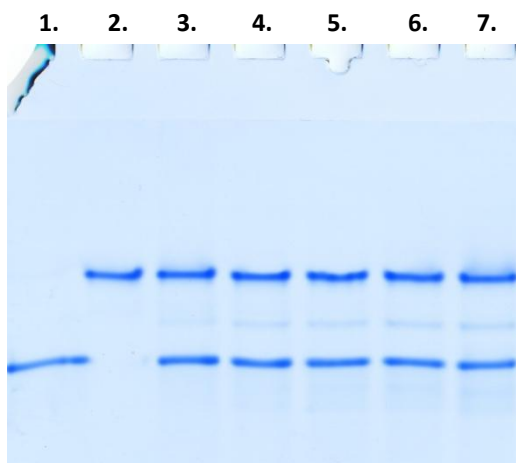
21. ábra

A MASP-2 3D és a MASP-2 3D-CBD közti heterodimerek %-os aránya az idő függvényében

Mivel szignifikáns kicserélődés nem történt a MASP-2 fragmentumok között, arra lehet következtetni, hogy Ca^{2+} jelenlétében a MASP-2 monomerek nagyon szoros komplexeket alkotnak. Valószínűsíthető, hogy a MASP-2 erősebben köti a Ca^{2+} -ot mint a MASP-1. Ezt az is alátámasztja, hogy Ca^{2+} nélküli natív gélen a MASP-2 3D dimerként, míg a MASP-1 3D monomerként fut (lásd később).

A fenti kísérlet alkalmas a MASP-2 és a MASP-1 közti kicserélődés modellezésére is, hiszen ezeknek a fehérjéknek a dimerizációért felelős CUB1-EGF doménje megegyezik.

Kicserélődés a MASP-1 3D és a MASP-2 3D között

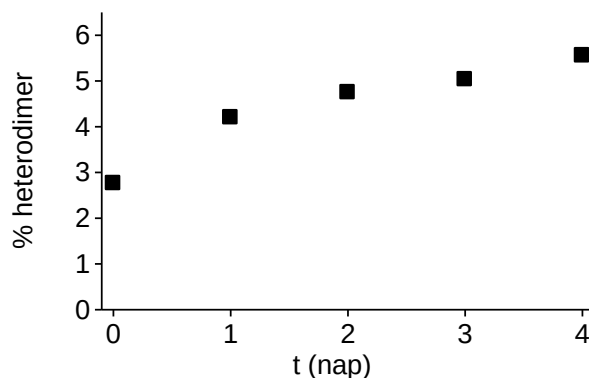


1. MASP-1 3D
2. MASP-2 3D
3. MASP-1 3D + MASP-2 3D (0 óra)
4. MASP-1 3D + MASP-2 3D (1 nap)
5. MASP-1 3D + MASP-2 3D (2 nap)
6. MASP-1 3D + MASP-2 3D (3 nap)
7. MASP-1 3D + MASP-2 3D (4 nap)

22. ábra

Spontán kicserélődés a MASP-1 3D és a MASP-2 3D között

A MASP-1 3D és MASP-2 3D-vel végzett kísérletben sikerült spontán kicserélődést is kimutatni, PMSF hozzáadása nélkül is. A 22. ábrán látható, hogy a MASP-1 3D és a MASP-2 3D között megjelenik egy új sáv, ami a heterodimer formát mutatja.



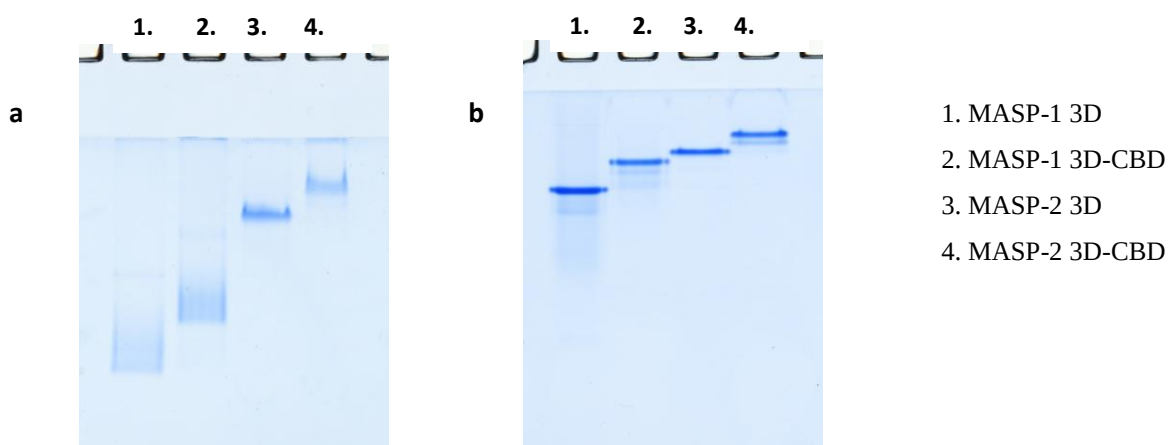
23. ábra

A MASP-1 3D és a MASP-2 3D közti heterodimerek %-os aránya az idő függvényében

Négy nap alatt kb. 6 %-os kicserélődés ment végbe (lásd 23. ábra). Ebből az következik, hogy ha már egyszer kialakultak a homodimerek, akkor már nem várható szignifikáns kicserélődés a MASP-1 3D és MASP-2 3D között.

Natív gélelektroforézis Ca^{2+} -os és Ca^{2+} nélküli közegben

Az eredményeim ellenőrzéséhez 1,5 mm széles, 10 %-os géleket használtam 5 %-os stackinggel. Mind a szeparáló, mind a stacking részhez 2 mM CaCl_2 -t adtam (24. ábra „b” panel). A futtató pufferbe is bemeztem 2 mM CaCl_2 -t.



24. ábra

A MASP-1 és MASP-2 fragmentumok gélképe Ca^{2+} nélküli (a) és Ca^{2+} -os (b) közegben

A Ca^{2+} azért szükséges, mert e nélkül a MASP-1 fragmentumok kb. 90%-a szétesik monomerekre és elnyúló sávként látszik a gélen (lásd 24. ábra „a” része), míg Ca^{2+} jelenlétében a MASP-1 dimereket alkot, aminek eredményeképpen éles sávokat kapunk (lásd 24. ábra „b” panel). A MASP-2 CaCl_2 -ot nem tartalmazó gél esetén is dimerként fut és meglehetősen éles sávot ad (24. ábra „a” panel). Ez megerősíti azt a korábbi feltevést, hogy a MASP-2 erősebben köti a Ca^{2+} -ot, mint a MASP-1.

Összefoglalás

Kezdeti kísérleteink során megállapítottuk, hogy a MASP-1 és a MASP-2 első három doménjét tartalmazó fragmentumok (MASP-1 3D, MASP-2 3D) disszociációja, valamint a dimer formák újbóli kialakulása mindkét MASP esetén lehetséges, azonban ez viszonylag lassú, órákig tartó folyamat. Tekintettel arra, hogy a MASP-1, a MASP-3 és a MASP-4 első három doménje megegyezik, ezért a MASP-1-re tett megállapításaink az utóbbi kettőre is igazak.

A továbbiakban a MASP-ok közötti heterodimerek képződését vizsgáltuk. Bár heterodimerek keletkezését már mások is kimutatták (Degn et al., 2013), kísérleteim során a Ca^{2+} -os natív gélelektroforézis segítségével a heterodimerek képződése kvantitatív módon is jellemezhető.

A dolgozatom egyik legfontosabb megállapítása, hogy a MASP-1 3D:MASP-2 3D disszociációs, majd re-kalcifikációs kísérlete esetében a homodimer:heterodimer:homodimer arány a denzitometriás vizsgálatok alapján hozzávetőlegesen 1:2:1 lett. Ebből arra következtethetünk, hogy a MASP-1 3D ugyanolyan erősen köti a MASP-2 3D-t, mint egy másik MASP-1 3D-t.

A MASP-1 3D és MASP-2 3D fragmentumok esetében spontán kicserélődést is tapasztaltam Ca^{2+} jelenlétében, azonban ez a folyamat meglehetősen lassú volt: a negyedik napra kb. 6 % volt a heterodimerek aránya. Hasonló körülmények között a negyedik napra a MASP-1 3D:MASP-1 3D-CBD esetén kb. 40 % és a MASP-2 3D:MASP-2 3D-CBD esetén kb. 12 % volt a heterodimerek aránya.

Az általam használt MASP 3D fragmentumok alkalmasak a natív MASP-ok dimerizációjának vizsgálatára, mivel a dimerizációért felelős CUB1-EGF-CUB1 domént tartalmazzák, tehát a kapott eredményeket valószínűleg kiterjeszthetjük a natív MASP-okra is.

Valószínűsíthető, hogy a MASP-1 és MASP-2 heterodimerek in vivo a szintézis során képződhetnek, mert ha már kialakultak a homodimerek, csekély az esély arra, hogy a MASP-2 homodimerek szétváljanak. A MASP-1, MASP-3 és MASP-4 közti heterodimerek kialakulása valószínűleg a szintézis helyétől függetlenül is lehetséges, mivel ezek nem kötik annyira erősen a Ca^{2+} -ot, mint a MASP-2 és emiatt akár már néhány nap alatt is szignifikáns kicserélődés tapasztalható. Elképzelhető, hogy a MASP-ok MBL-lel alkotott komplexének struktúrája befolyásolja a heterodimerek létrejöttét. Ennek tisztázásához további, a komplexeken végzett kísérletek szükségesek.

Eddigi ismeretek alapján azt feltételezték, hogy a MASP-ok homodimerként kötődnek a felismerő molekulákhoz, azonban a heterodimerek képződésének lehetősége új

megvilágításba helyezi a lektin út aktivációját. Nemrég kimutatták, hogy a MASP-1 a lektin út elindításáért felelős proteáz és a MASP-1 aktiválja a MASP-2 valamint a MASP-3 enzimeket (Héja et al., 2012; Megyeri et al., 2013; Degn et al., 2012). A heterodimerek létezése egy lehetséges magyarázatot nyújt a MASP-ok közötti aktivációra.

Irodalomjegyzék

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

Andreas Klos, Andrea J. Tenner, Kay-Ole Johswich, Rahasson R. Ager, Edimara S. Reis, Jörg Köhl The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol. Immunol.* 2009, 46: 2753–2766

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

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 mannanbinding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15, 127-135

Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis-II, Method and application to human serum proteins. *Anal.N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427

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

Degn, S.E., Jensen, L., Olszowski, T., Jensenius, J.C., and Thiel, S. (2013) Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable by MAp44. *J. Immunol.* 191, 1334-1345

Dobo, J., Harmat, V., Beinrohr, L., Sebestyen, E., Zavodszky, P. and Gal, 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

Haas, P.J. & 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., Gal, P. and Sim, R. B. (2002) The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs) *Immunobiology* 205, 467-475

Héja, D., Kocsis, A., Dobó, J., Szilágyi, K., Szász, R., Závodszky, 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

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomcik (2005) *The Immune System In Health and Disease. M. Immunobiology*: 6th ed.

Krarup, A., Gulla, K.C., Gal, 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

Matsushita, M. and Fujita, T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannosebinding protein in association with a novel C1s-like serine protease *J. Exp. Med.* 176, 1497-1502

Megyeri, M., Harmat, V., Major, B., Végh, Á., Balczer, J., Héja, D., Szilágyi, K., Datz, D., Pál, G., Závodszky, P., Gál, P., and Dobó, J. (2013) Quantitative characterization of the activation steps of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) points to the central role of MASP-1 in the initiation of the complement lectin pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 8922-8934

Müller-Eberhard, H.J. (1985) The killer molecule of complement. *J. Invest. Dermatol.* 85, 47s–52s

Novagen pET System Manual. 2005, 11. kiadás

Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis-I, Background and theory. *Anal. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321-351

Presanis, J.S., Kojima, M. and Sim, R.B. (2003) Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL) *Biochemical Society Transactions* Volume 31, part 4

- 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
- Rosbjerg, A., Munthe-Fog, L., Garred, P., Skjoedt, M.-O. (2013) MAP-1, MASP-1 and MASP-3 form heterocomplexes with each other. (14th European Meeting on Complement in Human Disease, Aug. 17-21, 2013, Jena, Germany) *Mol. Immunol.* 56, 242
- Teizo Fujita (2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity *Nature Reviews Immunology* 2, 346-353
- 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., Jensenius, J.C., (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*, 386, 506-510.
- Thielens, N.M., Cseh, S., Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Rossi, V., Jensenius, J.C., and Arlaud, G.J. (2001) Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases-1 and -2, MBL-associated protein 19, and MBL. *J. Immunol.* 166, 5068-5077
- Timothy J. Foster (2005) Immune evasion by staphylococci *Nature Reviews Microbiology* 3, 948-958
- van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C. & Brown, E.J. (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.* 9, 2095–2102
- Wallis, R., and Dodd, R.B. (2000) Interaction of mannose-binding protein with associated serine proteases: effects of naturally occurring mutations. *J. Biol. Chem.* 275, 30962-30969
- Wallis, R., Krarup, A., and V., G. U. (2008) Structure and function of Ficolins, MBLs and MASPs, in Molecular Aspects of Innate and Adaptive Immunity *RSC Publishing, Cambridge*. (Reid, K. B. M., and Sim, R. B., Eds.), pp 147-156
- Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J., and Keeble, A.H. (2010) Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 215, 1-11

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Hermann Ágnes a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a(z):

- E. coli transzformációt,
 - MASP-1 3D-CBD fragmentum expresszióját E.coli-ban,
 - MASP-1 3D-CBD fragmentum renaturációját,
 - MASP-1 3D-CBD fragmentum tisztítását,
 - heterodimerizációs kísérleteket,
 - kicserélődési kísérleteket,
- végeztem el.

Budapest, 2014. 05. 13.

