

## Zárójelentés

### Rövid áttekintés

A 2012 elején indult pályázatunk célkitűzése az volt, hogy minél alaposabb, molekuláris szintű ismereteket szerezzünk az immunrendszer egyik központi elemének, a komplementrendszernek az aktivációs mechanizmusairól. A komplementrendszer egy rendkívül összetett fehérjehálózat, amely - bár szorosan együttműködik az immunrendszer sejtjes elemeivel -, önállóan is képes azokra a létfontosságú funkciókra, amelyek (természetesen még összetettebb és még hatékonyabb módon) az immunrendszer egészét jellemzik. Nevezetesen a komplementrendszer önmagában is i) megkülönbözteti az idegen, illetve veszélyesen megváltozott saját sejteket az ép, saját elemektől, ii) az előző két csoportot speciális fehérjékkel megjelöli, iii) és végül önállóan is képes ezek elpusztítására.

A komplementrendszernek három aktiválódási útvonala ismert. Ezek a klasszikus-, a lektin- és az alternatív út. A három út egymástól nagyrészt elkülönülő veszélyszignálokat ismer fel útvonalra jellemző felismerőmolekulák által. A veszélyszignál felismerését követően mindhárom esetben az adott útvonalra specifikus proteinázok aktiválódnak. Az aktiválódás csaknem inaktív, zimogén állapotú proenzimek specifikus proteolitikus hasításán alapul. Az egymást aktiváló enzimek egy gyors, és nagy jelerősítést jelentő kaszkádfolyamatban nagymennyiségű aktív proteázt eredményeznek, amelyek számos egyéb fehérje rendkívül szelektív hasítása révén szerteágazó immunválaszt eredményeznek. Az alternatív út az összes út jelerősítőjeként szolgál. A három út közös kivitelező szakaszba torkollik, így esetenként komoly alapkutatói kihívást jelent, hogy egy adott fiziológiás folyamatban éppen melyik útvonal aktiválódott.

Minden nagyhatékonyságú védelmi rendszerre igaz, hogy szabályozatlan működése hatalmas károkat okozhat. Így van ez a komplementrendszer esetében is, amelynek alul-működése immunhiányos állapothoz, túlműködése pedig a saját, ép struktúrák pusztításához, és ezáltal súlyos betegségekhez vezet. A legújabb ismeretek szerint az egyes komplementrendszerrel kapcsolatos kórképek mögött jellemzően a háromból mindig csak egy aktiválódási útvonal túlműködése áll, és így az adott útvonal fontos terápiás célpontként szolgálhat. A közegészségügyi szempontból is kiemelkedő jelentőségű szívinfarktust és szélütést kísérő masszív szövetpusztulás háttérében például az úgynevezett iszkémiás-reperfúziós sérülés áll, amelynek létrejöttében a komplementrendszer lektin útjának túlműködése játsza a főszerepet. Mind a fent említett alapkutatói, mind a terápiás célok eléréséhez elengedhetetlen, hogy olyan gátlószerekkel rendelkezünk, amelyek a három útvonal közül szelektíven csak egyet gátolnak.

Ennek a pályázatnak a keretében sikerült a világon elsőként szelektív inhibitorokat fejlesztenünk a lektin út mindhárom proteináza ellen.

Ezek birtokában átütő sikereket értünk el számos vonatkozásban. Egyrészt létrehoztuk az első lektin út-szelektív inhibitorokat, amivel új alapkutatói és terápiás lehetőségeket nyitottunk. Másrészt kiderítettük, hogy a lektin út aktiválódásának eredeti, tankönyvi molekuláris modellje hibás. Megalkottuk az aktiválódás új, helyes modelljét, amit azóta független

kutatócsoportok is igazoltak. Harmadrészt feltártuk a lektin út legrejtélyesebb proteinázának (MASP-3) a szerepét. Kiderítettük, hogy ez a korábban ismeretlen funkciójú enzim az egyetlen olyan proteínáz, amelyik gyulladással, vagy véralvadással nem befolyásolt, azaz „nyugvó” vérben aktiválja az alternatív út kulcsenzimét, a D-faktort. Mivel a D-faktor aktiválódási mechanizmusa addig rejtély volt, ez a felismerés egyszerre két új ismeretet szolgáltatott, és egyben feltárta azt is, hogy a komplementrendszer lektin útja és alternatív útja között esszenciális kapcsolat áll fenn.

## Eredmények

A pályázat során született eredményekből 2016 során 7, mindösszesen pedig eddig 23 rangos nemzetközi közlemény született (köztük két PNAS, egy Scientific Reports, két J. Immunology, két J. Biol. Chem., és egy Immunological Reviews cikk), amelyekre eddig összesen 147 független idézet érkezett. Az útmutatót követve most sorba vesszük azokat az eredményeket, amelyekből már közlemény született.

*1. Tisztáztuk a komplementrendszer lektin útjának mechanizmusát.* A lektin út felismerő molekuláihoz három tripszinszerű szerin proteáz, a MASP-1, 2 és 3 kapcsolódik. Ezek a jelfelismerés folyamatában aktiválódnak. A MASP-1 és a MASP-3 közös gén terméke. A korábbi, hibás modellben a lektin út aktiváció egyedüli kulcs enzime a MASP-2 volt. A téves modellt az izolált MASP-2 *in vitro* aktivitásaira, valamint MASP génkiütött modellállatok szérumvizsgálataira alapozták. A három enzim közül csak a MASP-2 hasítja a C4 komplement fehérjét. Ez a hasítás elengedhetetlen a C4b2a összetételű, központi jelentőségű C3 konvertáz enzim létrejöttéhez. Korábbi, kvalitatív vizsgálatok kimutatták, hogy a zimogén MASP-2 képes másik zimogén MASP-2 aktiválására, tehát zimogén „önaktivációra”. A már aktivált MASP-2 is képes zimogén MASP-2-t aktiválni, és képes a C2 fehérjét is hasítani. A hasított C2 a C4b2a C3 konvertáz proteáz komponense. A MASP-2 tehát az addigi ismeretek alapján minden olyan tulajdonsággal bír, ami ezt az enzimet a lektin út autonóm, önálló aktiválójává tehetette.

A MASP-1 is képes zimogén önaktivációra, autokatalitikus aktivációra, és a C2-t is hasítja, a C4-et azonban nem.

A MASP-3 nem képes önaktivációra, és egyetlen lektin út fehérjét sem hasít. A *MASP-1/3* génkiütött egerek szérumában a lektin út aktiváció (bár véleményünk szerint vitatható módon) kimutatható volt, míg a MASP-2 génkiütött egerekben nem. Ez is megalapozta a fenti aktivációs modellt, melyben a MASP-2 a fő enzim, a MASP-1 segédszereppel bír, míg a MASP-3 egyfajta negatív szabályozó lehet.

A helyes modellhez az vezetett el, hogy elsőként sikerült létrehoznunk monospecifikus MASP-1 és MASP-2 inhibitorokat (Héja és mtsi., J.Biol.Chem., 2012). Az SGPI családba tartozó kis fehérje inhibitor proteázköttő felszínének irányított evolúciójával létrehoztuk az SGMI-1 illetve SGMI-2 variánsokat. Az SGMI-1 kizárólag a MASP-1, míg az SGMI-2 csak a MASP-2 enzimet gátolja. Legfőbb felfedezésünk az volt, hogy nem csak az SGMI-2, de a

MASP-1 gátló SGMI-1 is tökéletesen blokkolja a lektin út aktivációt (Héja és mtsi., PNAS, 2012). Mint kimutattuk, ennek oka az, hogy normál humán szérumban a zimogén MASP-2 kizárólag a MASP-1 által aktiválódik. A MASP-1 tehát ugyanolyan elengedhetetlen szereplője a lektin út aktivációnak, mint a MASP-2.

A MASP-1, MASP-2 és MASP-3 enzimek esetében sikerült megmérnünk a zimogén önaktiváció, az autokatalitikus aktiváció és részben a kereszt-aktivációk kinetikai paramétereit. A MASP-1 és a MASP-2 esetében olyan formákat állítottunk elő, amelyek az aktiválódás során vagy csak zimogén enzimként, vagy csak zimogén szubsztrátként működhetnek. A proenzim stabil zimogén állapotát a hasadó kötés menti arginin glutaminra cserélésével értük el. Azokat a zimogén formákat pedig, amelyek kizárólag szubsztrátként vehetnek részt az aktiválódás folyamatában katalitikus szerin alaninra való cseréjével hoztuk létre. A MASP-3 nem képes zimogén önaktivációra, ezért annak a vad típusú formáját használtuk. Azt kaptuk, hogy a zimogén MASP-1 3000-szer hatékonyabban aktiválódik, mint a zimogén MASP-2, mely utóbbi aktiválódási sebessége olyan alacsony, hogy annak vélhetően nincs fiziológiás jelentősége. Az aktivált MASP-1 100-szor hatékonyabban aktivál MASP-1 zimogént, mint az aktivált MASP-2, MASP-2 zimogént. A MASP-1 20-szor hatékonyabban aktiválja a MASP-2 zimogént, mint a MASP-2. Kimutattuk, hogy a MASP-1 hatékony aktivátora az önaktiválódásra képtelen MASP-3 zimogénnek is (Megyeri és mtsi., J.Biol.Chem., 2013). Ezek az eredmények megerősítik a korrigált lektin út aktivációs modellünket, amelyben a MASP-1 a MASP-2 kizárólagos aktivátora. A fenti eredményekből összefoglaló cikkeink is születtek (Gál, The Journal of Angioedema, 2013; Gál és mtsi., Adv. Exp. Med. Biol., 2013).

*2. Újraértékeljük a potenciális fiziológiás inhibitorok szerepét.* A korrigált lektin út aktiválódási mechanizmus fényében felmerült bennünk, hogy újra kellene értékelni a potenciális fiziológiás inhibitorok (C1-inhibitor, antitrombin,  $\alpha$ 2-makroglobulin) szerepét, különösen azokét, amelyek hatékonyan gátolják a lektin út kulcsenzimévé „előlépett” MASP-1 enzimet. Kiderült, hogy az antitrombin, ami heparin jelenlétében a MASP-1 leghatékonyabb inhibitora, a C1-inhibitorhoz hasonlóan gátolja a lektin utat normál humán szérumban. Az antitrombin tehát a C1-inhibitor mellett a lektin út másik fiziológiás inhibitora. Az  $\alpha$ 2-makroglobulin komplexet képez MASP-1-gyel, azonban szérumban nem képes gátolni a lektin utat, valószínűleg sztérikus és/vagy kinetikai okok miatt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az  $\alpha$ 2-makroglobulin nem játszik szerepet a lektin út szabályozásában (Paréj és mtsi., Mol. Immunol., 2013).

*3. Vizsgáltuk a MASP-2 MASP-1 általi aktiválásának topológiáját.* Miután tisztáztuk, hogy a MASP-1 a MASP-2 egyedüli fiziológiás aktivátora, egy következő kérdés az volt, hogy a MASP-1 általi zimogén MASP-2 aktiválás milyen topológia szerint megy-e végbe: felismerő komplexen belül, komplexek között, esetleg mindkét út párhuzamosan megvalósul. A MASP proenzimek mindegyike nem-katalitikus doméneken keresztül, kalcium-függő dimereket képez. Eddig kizárólag homodimerek létét igazolták. Első lépésként azt vizsgáltuk meg, hogy kísérletesen egyáltalán létrehozhatók-e vegyes dimerek. Ahhoz, hogy ezt megvizsgálhassuk, előállítottuk a MASP-1 és MASP-2 dimerizációért felelős nem-katalitikus fragmentumát

(CUB1-EGF-CUB2). A következőket kaptuk. Amennyiben kalcium ionok jelenlétében inkubáltuk együtt a homodimereket, hosszú idő után sem keletkeztek vegyes dimerek. Amennyiben azonban EDTA kezelést alkalmaztunk, majd ezt követően visszapótoltuk a kalcium ionokat, MASP-1/MASP-2 vegyes dimerek is keletkeztek, mégpedig 50%-os arányban. A (MASP-1 homodimer): (vegyes dimer) : (MASP-2 homodimer) 1:2:1 aránya egyértelműen igazolja, hogy a vegyes dimerek ugyanolyan stabilak, mint a homodimerek. Ezek alapján kijelenthető, hogy az élő szervezetben csak abban az esetben keletkezhetnek MASP-1/2 vegyes dimerek, ha az enzimet termelő sejt mindkét proteázt egyidőben állítja elő. A jelenleg elfogadott modell szerint azonban minden MASP-termelő sejt csak egyfajta proteázt termel. Amennyiben ez így van, úgy a kísérletünk azt igazolja, hogy a sejtek által termelt homodimerekből fiziológias körülmények között nem keletkeznek heterodimerek (Paréj és mtsi., Mol. Immunol., 2014).

*4. Vizsgáltuk a MASP enzimek fiziológias szerepeit különböző modellekben.* Egyfelől igazoltuk, hogy a MASP-1 enzim többféle mechanizmuson keresztül is közrejátszik az endotél sejtek aktiválásában (Jani és mtsi., PLoS One, 2014; Megyeri és mtsi., Mol Immunol., 2014). Másfelől kimutattuk, hogy a MASP-1 nem csak a veleszületett immunitásban játszik központi szerepet, de közreműködik a véralvadás folyamatában is (Dobó és mtsi., Mol Immunol., 2014). Kollaborációban végrehajtott tromboelasztográfiával vizsgáltuk a MASP-1 véralvadásra gyakorolt hatását. A MASP-1 jelenléte jelentősen gyorsította a véralvadás folyamatát protrombin jelenlétében. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a MASP-1 képes aktiválni a protrombint. Trombin mutánsok segítségével részletesen feltártuk az aktiválás mechanizmusát. Megállapítottuk, hogy a MASP-1 két párhuzamos úton is képes protrombint aktiválni. Az egyik esetben először az Arg271 mellett, a másik esetben pedig az Arg393 mellett hasítja a MASP-1 a protrombint. Végül mindkét útvonal egy  $\beta$ -trombin szerű forma kialakulását eredményezi, amely aktívan részt vesz a véralvadásban. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy bizonyos patofiziológias körülmények között a MASP-1 gyorsítja, vagy akár önmagában is elindíthatja a véralvadás folyamatát. Az 1-es típusú cukorbetegség során a MASP-1 szintje megemelkedik a vérben. Ez egy hajlamosító tényező lehet a trombózis kialakulására, ami gyakori szövődménye a cukorbetegségnek. Ezekből az eredményekből két közleményünk született (Lorenz és mtsi., PLoS One, 2015; Lorenz és mtsi., Mol. Immunol., 2015).

*5. Azonosítottuk a MASP-3 egyik szerepét, és egyben a D-faktor aktiváció mechanizmusát.* Miután korábban említett vizsgálataink révén tisztáztuk a MASP-1 és a MASP-2 pontos szerepkörét a lektin út aktiválásában, érdeklődésünk a MASP-3 szerepének kiderítése felé fordult. Nem túlzás azt állítani, hogy a MASP-1 korábbi tévesen felmért szerepköre ellenére valójában a MASP-3 (volt) a lektin út legrejtélyesebb enzime. Ez az enzim sem C2, sem C4 komponenst nem hasít, sőt a vizsgálataink időszakában egyetlen szubsztrátja sem nyert kétségkívüli igazolást. Ugyanakkor ismert, hogy hiánya, vagy mutációja fejlődési rendellenességekkel jár, vagyis szerepe van az embriogenezisben. A MASP-1 és a MASP-3 egyazon gén két alternatív splice terméke. Génkiütött, MASP-1 / MASP-3 hiányos egerekben az alternatív út nem működik, és annak indítóenzime, a D-faktor inaktív proenzim állapotban van a vérben. Mivel régóta ismert volt, hogy a D-faktor aktív formában kering a vérben,

felmerült, hogy a MASP-1, a MASP-3, vagy mindkét enzim pro-D-faktor aktivátor lehet. A kérdés vizsgálatára első lépésben rekombináns pro-D-faktort állítottunk elő, és vizsgáltuk, hogy a MASP-1,2,3 enzimek, illetve ezek zimogénjei képesek-e azt aktiválni. Míg a zimogének egyike sem hasította a pro-D-faktort, mindhárom MASP aktív formája hatékony aktivátornak bizonyult a tisztított fehérjéken alapuló *in vitro* tesztben. Ezek után a fő kérdés az volt, hogy vajon nyugvó, azaz sem véralvadás, sem komplementrendszer szempontjából nem aktivált vérben is ellátnak-e ilyen funkciót a MASP enzimek. Ennek vizsgálatára kifejlesztettünk egy újfajta tesztet. Fluoreszcensen jelölt pro-D-faktort készítettünk, és azt kevertünk a nyugvó vér modelljeként használt, kalciummegvonással, vagy hirudinnal stabilizált vérplazmába, és mértük a pro-D faktor hasadás ütemét. A nyugvó vér határozott pro-D-faktor aktivátor hatást mutatott. Ezt a hatást sem a szelektív MASP-1 inhibitorunk, sem a szelektív MASP-2 inhibitorunk nem gátolta. Vérplazmába extra MASP enzimeket keverve kimutattuk, hogy a MASP-1 és a MASP-2 adása nem gyorsítja fel a pro-D-faktor hasadás ütemét, míg MASP-3 adása növeli azt. Mindezek alapján a három MASP enzim közül csak a MASP-3 esetében állt fenn továbbra is a lehetősége annak, hogy fiziológiás pro-D-faktor aktivátorként működhet nyugvó vérben. A nyugvó vér nagy koncentrációban tartalmaz C1 inhibitorot. Ez a serpin típusú fehérje nagy hatékonysággal, kovalens komplexet képezve gátolja a MASP-1 és MASP-2 enzimeket. Ugyanakkor ez a gátlószer a MASP-3 enzimre nem hat. Ezzel magyaráztuk azt a megfigyelésünket, hogy inherens pro-D-faktor aktiváló képességük ellenére a MASP-1 és MASP-2 enzimek nem tölthetnek be ilyen szerepet nyugvó vérben, míg a MASP-3 kétségtől minden olyan tulajdonsággal bír, amivel egy aktivátornak rendelkeznie kell.

Szelektív MASP-3 inhibitor hiányában ugyanakkor a MASP-3 szerepét nem tudtuk kétséget kizáróan igazolni, illetve nem adtunk választ arra, hogy vajon a nyugvó vér a MASP-3 enzimen kívül tartalmaz-e egyéb olyan proteinázokat, amelyek pro-D-faktort aktiválnak. Eredményeinket, amelyek kizárták a MASP-1 és MASP-2, és erősen valószínűsítették a MASP-3 fiziológiás szerepét, és ezáltal közelebb vittek bennünket a D-faktor aktiválódás rejtélyéhez, tavaly közzeltük (Oroszlán és mtsi., J.Immunol., 2016).

Mire elfogadták a fenti cikkünket, sikeresen kifejlesztettünk irányított evolúcióval egy szelektív MASP-3 inhibitor is. Ennek az egyedülálló reagensnek a segítségével minden kétséget kizáróan igazoltuk, hogy a MASP-3 az egyedüli olyan enzim, amely nyugvó vérben aktiválja a pro-D-faktort (Dobó és mtsi., Scientific Reports, 2016).

A MASP-3 eddig csak feltételezett szerepe tehát igazolást nyert, és egyben arra a váratlan ismeretre is fény derült, hogy ez a nyugvó vérben betöltött fiziológiás szerep kizárólagos.

**Összefoglalva:** az ötéves projekt alatt részleteiben feltártuk a lektin út minden proteázának a legfontosabb szerepét, kidolgoztuk a lektin út aktiváció új, számos oldalról megalapozott mechanizmusát, tisztáztuk a MASP-2 és MASP-1 ebben betöltött szerepét, azonosítottuk a MASP-1 enzim számos más szerepét, és igazoltuk a MASP-3 alternatív út aktiválódásban játszott központi szerepét. Ezáltal egy korábban rejtett új, központi jelentőségű kapcsolatot tártunk fel a komplementrendszer lektin útja és alternatív útja között.

A közeljövőben szeretnénk nagy erővel feltárni a MASP-3 enzim egyedfejlődésben játszott szerepének molekuláris mechanizmusát, és egy ezzel párhuzamos kutatássorozat keretében mind több ismeretet szerezni a klasszikus és az alternatív út aktivációjával kapcsolatban is.