

# A C1-inhibitor specificitásának és deficienciájának atomi szintű magyarázata

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Beinrohr László

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

A doktori iskola vezetője:  
Prof. Erdei Anna

A program vezetője:  
Prof. Gráf László

Témavezetők:  
Dr. Lőrincz Zsolt és Prof. Závodszy Péter



Enzimológiai Intézet, Szegedi Biológiai Központ, Magyar Tudományos Akadémia  
Budapest, Magyarország, 2009



## BEVEZETÉS

C1-inhibitor (C1-inh) a komplementrendszer és a bradykinin felszabadító rendszer fő szabályozója az emberi vérben. A C1-inh ezen kaszkádok szerpin típusú proteáz inhibitoraként széles, de mégis specifikus gátló hatással rendelkezik, aminek köszönhetően gyulladásgátló hatása van. Annak a mechanizmusnak a megértése volt a célom, ami megmagyarázza hogyan lehet ilyen sokoldalú egyetlen inhibitor, milyen mechanizmusok irányítják célproteázaihoz.

Régóta ismert tény, hogy a szerpinek (szerin proteáz inhibitorok, működésük „egérfogóra” emlékeztet) önmagukban nem specifikusak (Gettins & Olson, J. Biol. Chem., 2009). Ennek a flexibilis szubsztrát-szerű reaktív hurok (a „csali”), valamint az irreverzibilis csapdába ejtő mechanizmus (az „egérfogó”) az oka. A „csali” elvágása után a proteáz inaktívvá válik: aktív centruma eltorzul, a katalízis megreked a kovalens acil-enzim átmeneti állapotban. Ezt az energetikailag kedvezőtlen lépést a szerpin reaktív hurokjának beékelődése kompenzálja, amikor a felszíni „csali” a szerpin  $\beta$ -lemezének részévé válik. Úgy tűnik, minden proteáz gátolható, ha létrejön a katalízis során egy kovalens intermedier. Mivel a C1-inh a P1 helyen egy arginint tartalmaz, ezért a C1-inh minden olyan szerin proteázt gátol, mely bázikus aminosavaknál hasít. Ilyen proteázok viszonylag sokfélék lehetnek a C1-inh környezetében (a trombintól kezdve plazmin, fXIa, fXIIa, plazma kallikrein, MASP-1, MASP-2, C1r, C1s, ...). Lehetséges lenne, hogy a C1-inh specificitását kizárólag a reaktív centrumában lévő hurok szekvenciája határozza meg?

Abból a megfigyelésből, hogy a C1-inh aktivitását modulálja a savas heparin poliszacharid, arra következtethetünk, hogy a C1-inh kifinomultabb mechanizmust használ. A modulálás az enyhe „gátlás gátlásától” (felére csökkent reakciósebesség az fXIIa proteázzal szemben) az erőteljes gyorsításig terjed (két nagyságrenddel megnőtt reakciósebesség az fXIa koagulációs proteázzal, valamint kevésbé megnőtt reakciósebesség a komplement C1s-sel szemben). Más szerpinek esetében kifinomult mechanizmusokat találunk, melyek nemcsak megnövelik a proteázokkal szembeni aktivitást, de módosítani is képesek azt. Egy ilyen mechanizmus iskolapéldája, ahogy a heparin modulálja az antitrombint. *In vivo* a heparin (és heparán) láncok beborítják a vérerek falait. Az antitrombin a heparinlánc egy meghatározott pentaszacharid egységéhez kötve allosztérikusan aktiválódik: a reaktív hurok felcsapódik. A flexibilis hurok kiemelkedik a fehérjéből, ezáltal a proteázok könnyebben hozzáférnek. Ez önmagában még mindig nem elegendő a heparin hatásának megértéséhez. Ezenfelül a trombin képes ugyanahhoz a heparin lánchoz kötni, mint az antitrombin, de kisebb affinitással, így végigvándorol a heparinlánc mentén, míg el nem jut az antitrombin molekulához. Így a heparin mintegy hídként

funkcionál a szérpin és a proteáz között és egyben stabilizálja is a kialakult komplexet („áthidaló” mechanizmus). Ezeknek hatására a reakciósebesség mintegy ~10 000-szeresére nő, eredményesen meggátolva a vérrögképződést.

A C1-inhibítort sokan vizsgálták első leírása óta – jelentőségét és a róla szóló irodalom nagyságát talán a deficienciáját leíró tanulmányok fejezik ki legjobban. A C1-inh deficiencia rejtőzködő, de potenciálisan halálos betegség. Mivel gyulladásgátló hatású molekuláról van szó, terápiás alkalmazása sem elhanyagolható. Az irodalomban található tanulmányok azonban egy dologgal adósak maradtak: nem tartalmazták a felmerült kérdések és jelenségek atomi szintű magyarázatát. Arról tudomásom volt, hogy a C1-inh szerkezetének megoldásával sok-sok évig, ha nem évtizedig próbálkoztak. Doktori értekezésemben ennek a megoldatlan kérdésnek a megoldására vállalkoztam.

## CÉLKITŰZÉSEK

Az első szerpín röntgenszerkezet publikálása (Loebermann *et al.*, J. Mol. Biol., 1984) óta rengeteg információ gyűlt össze a szerpinekről: alapvető működési mechanizmusukról, valamint betegségekben való szerepükről is sokat tudunk. Kevésbé ismertek viszont azok a járulékos mechanizmusok, amelyek az egyes szerpíneket a vér fehérjékben gazdag közegében is a célproteázaikhoz irányítják (pl. „áthidaló” mechanizmus). A szerpín családba tartozó fehérjék a közös szerpín domén váz mellett számos egyéb kapcsolódó elemet tartalmazhatnak. Például szénhidrátokat (C1-inh), diszulfid kapcsolókat (plazminogén aktivátor inhibitor-2), illetve N- vagy C-terminális polipeptid láncokat (heparin kofaktor II, C1-inh,  $\alpha_2$ -antiplazmin). Fontos megértenünk, hogy ezek a kapcsolt elemek miként működnek, a szerpinek biológiai hatását milyen járulékos mechanizmusok szabályozzák. A már meglévő terápiás alkalmazások (pl. antitrombin, C1-inh) tovább bővíthetők a szerpinek finomszabályozásának megértésével. A doktori munkámban a C1-inhibitorra koncentráltam, amely az antitrombinhoz vagy az  $\alpha_1$ -proteáz inhibitorhoz képest kevésbé jellemzett szerpín fehérje. A C1-inhibitorral kapcsolatos kérdéseimet az alábbi pontokban foglaltam össze:

1. Milyen mechanizmus(ok) szabályozzák a C1-inh aktivitását különböző proteázokkal szemben?
2. Hogyan változtatja meg a heparin a C1-inh aktivitását?
  - a. Hasonló-e ez a mechanizmus a heparin antitrombint gyorsító hatásához?
  - b. A heparin a C1-inhibitorral együtt miért gyorsítja néhány proteáz inaktiválását (fXIa, C1s), míg más proteázokkal szemben nincs (plazma kallikrein) vagy ellentétes (fXIIa) hatású?
3. Mi a szerepe a ~100 aminosav hosszúságú N-terminális doménnek és kiterjedt glikozilációjának?

Ezen kérdéseket elsősorban a C1-inh atomi szerkezetének segítségével terveztem megválaszolni.

# MÓDSZEREK

- Rekombináns DNS technikák

Megterveztem és klónoztam a C1-inh gén csonkított és irányított mutáns változatait. Az expresszióhoz és klónozáshoz továbbfejlesztett vektorokat terveztem és használtam.

- Rekombináns fehérjexpresszió

A megtervezett C1-inh géneket *E. coli*-ban és *P. pastoris*-ban fejeztem ki, rázatott és fermentált kultúrákban. Az *E. coli* eredetű fehérjét renaturáltam. A *P. pastoris* eredetű fehérje expresszióját fermentorban optimalizáltam.

- Fehérjetisztítás és kristályosítás

A *P. pastoris*-ból származó rekombináns C1-inhibitort  $\text{Ni}^{2+}$ -affinitás és más kromatográfiákkal tisztítottam. A fehérjét enzimátikus úton deglikoziláltam Endo H<sub>f</sub> glikozidázzal, majd további tisztítás után az egyik C1-inh módosulatot kristályosítottam a függőcsepp módszerrel.

- Röntgenkristallográfia, modellezés és egyéb számítások

A C1-inh szerkezetét röntgendiffrációval határoztuk meg molekuláris helyettesítéssel. Az elektromos potenciálfelszín megállapítását, egy heparin diszacharid dokkolását, illetve egyéb számításokat számítógéppel végeztük.

- Egyéb mérések

A C1-inh fehérjék aktivitását és proteázokkal szembeni viselkedését SDS-PAGE kísérletekkel követtem. A hőstabilitásukat DSC kísérletekkel, affinitásukat heparinhoz heparinaffinitás kromatográfiával állapítottam meg.

## EREDMÉNYEK

1. Különböféle C1-inh módosulatokat fejeztem ki több expressziós rendszerben és sikeresen optimalizáltam az expressziós körülményeket.
2. Egy új, eddig nem jellemzett inaktív (látens) C1-inh módosulatot írtam le.
3. A C1-inh glikozilációja kiterjedt, ami megakadályozta a kristályosodást. A probléma megoldására egy kíméletes enzimátikus módszert dolgoztam ki.
4. Meghatároztuk a látens C1-inh szerpin doménjének röntgenszerkezetét 2,4 Å felbontásban. Az N-terminális doménről ezzel szemben azt állapítottam meg, hogy valószínűleg rendezetlen szerkezetű.
5. Atomi szintű magyarázatot adtunk számos C1-inh deficienciára.
6. Egyszerű hipotézist („szendvics-mechanizmus”) javasoltam a heparin hatásának magyarázatára.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A szerkezeti biológiában a „glikozilációs probléma” megoldható olyan gazdasejtekben való kifejeztetéssel, melyek Endo H érzékeny szénhidrátokat fejeznek ki. A termelés után a poliszacharidok Endo H enzimmal eltávolíthatók. A módszer változatai tölem függetlenül mostanában válnak népszerűvé (Chang *et al.*, Structure, 2007).

A szerkezet alapján választ kaptunk az inaktivitás okára, valamint arra, hogy sok természetben megjelenő mutáció miért eredményez betegséget okozó látens és polimer C1-inh módosulatokat. Néhány mutáció (pl. Ala436Thr) valószínűsíthetően további hidrogén kötések hoz létre a szerkezetben, ami a látens formát még stabilabbá teszi az aktívval szemben. Más mutációk ezzel szemben (pl. Pro476Ser) az energiagátat csökkenthetik az aktív-látens átmenetnél. Ez a szerkezet mutatott rá először arra, hogy az amúgy erősen konzervált szerpin foldban a hélix I és az ezt követő szekvenciák plasztikusak lehetnek. Friss kutatások szerint ennek az a következménye, hogy ezek a szakaszok részt vesznek a szerpin specifikus polimerizációban, mert lehetővé teszik a lineáris polimer láncok ütközésmentes növekedését (Yamasaki *et al.*, Nature, 2008).

A heparin aktivációs jelenséget legegyszerűbben egy „szendvics-mechanizmus” magyarázza. A heparin molekulák beékelődnek a szerpin és a proteáz közé a sebességmeghatározó Michaelis-komplexben, ezáltal a negatívan töltött heparin ellensúlyozza a pozitívan töltött C1-inh és proteáz közötti taszítást. Ez megmagyarázza, hogy a heparinnak miért csak a pozitívan töltött proteázoknál (C1s és fXIa) van sebességgyorsító hatása, és miért nincs vagy ellentétes hatású a semleges plazma kallikrein illetve a savas fXIIa esetében.

A dolgozatomban leírt eredmények hozzásegítenek a C1-inh deficiencia (betegség: örökletes angioödéma) molekuláris szintű megértéséhez. Mivel a C1-inh a gyógyászatban is használatos molekula, elképzelhető megnövekedett aktivitású rekombináns C1-inh előállítása a „szendvics-mechanizmus” kihasználásával, és ennek a mutáns C1-inhibitornak a terápiákban történő felhasználása (Beinrohr *et al.*, Trends Mol. Med., 2008).



# TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

A konferenciákon előadó szerző **vastagon** jelölt.

## Közlemények referált tudományos folyóiratokban:

1. **Beinrohr László**, Dobó József, Závodszy Péter, Gál Péter  
„*C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation*”  
Trends Mol. Med. (2008) 14: 511-521
2. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
„*C1 Inhibitor Serpin Domain Structure Reveals the Likely Mechanism of Heparin Potentiation and Conformational Disease*”  
J. Biol. Chem. (2007) 270: 21100-21109

## Kivonatok referált tudományos folyóiratokban:

3. Harmat Veronika, **Beinrohr László**, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Náray-Szabó Gábor, Závodszy Péter  
„*C1-inhibitor structure reveals a novel mechanism of heparin potentiation*”  
Acta Crystallogr. A (2007) 63: s129
4. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
„*Crystal structure of C1-inhibitor: Understanding the mechanism of its deficiency and heparin's antiinflammatory activity*”  
Mol. Immunol. (2007) 44: 3928

## Konferencia előadások:

5. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
„*A komplement C1-inhibitor térszerkezete - amit megtudtunk a C1-inhibitor heparin aktiválásáról és deficienciájáról*”  
2007, Hajdúszoboszló, a Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése
6. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
„*Crystal structure of C1-inhibitor: understanding the mechanism of its deficiency and heparin's antiinflammatory activity*”  
2007, Cardiff, 11th European Meeting on Complement in Human Disease
7. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
„*A C1-inhibitor térszerkezete: a polianionok moduláló hatásának és egy konformációs betegség mechanizmusának atomi szintű magyarázata*”  
2007, Debrecen, a Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése

8. **Gál Péter, Beinrohr László**, Dobó József, Harmat Veronika, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
*„Crystal structure of C1-inhibitor: insight into the mechanism of conformational disease”*  
2007, Budapest, 5th C1 Inhibitor Deficiency Workshop
9. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
*„Crystal structure reveals how polyanions bind and regulate activity of the multifunctional regulatory protein, C1-inhibitor”*  
2006, Szeged, Straub- napok
10. **Lőrincz Zsolt, Beinrohr László**, Závodszy Péter, Gál Péter  
*„HUMÁN REKOMBINÁNS C1-INHIBITOR ELŐÁLLÍTÁSA BAKTÉRIUMOKBAN”*  
2004, Sopron, a Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése

#### **Konferencia poszterek:**

11. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
*„Crystal structure of C1-inhibitor: insight into the mechanism of conformational disease and heparin modulation of inflammation”*  
2008, Leuven, Serpins2008
12. **Beinrohr László**, Harmat Veronika, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
*„Crystal structure of C1-inhibitor: understanding the mechanism of its deficiency and heparin’s antiinflammatory activity”*  
2007, Cardiff, 11th European Meeting on Complement in Human Disease
13. **Harmat Veronika, Beinrohr László**, Dobó József, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Náráy-Szabó Gábor, Závodszy Péter  
*„C1-inhibitor structure reveals a novel mechanism of heparin potentiation”*  
2007, Marrakech, 24th European Crystallographic Meeting
14. **Beinrohr László**, Dobó József, Harmat Veronika, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
*„Crystal structure of C1-inhibitor: understanding the mechanism of heparin potentiation”*  
2007, Budapest, 5th C1 Inhibitor Deficiency Workshop
15. **Beinrohr László**, Lőrincz Zsolt, Gál Péter, Závodszy Péter  
*„Production of human recombinant C1-inhibitor in Escherichia coli”*  
2004, Szeged, Straub- napok