

Den rumlige opbygning af proteiner fra immunforsvaret

Vores krop er udstyret med mange mekanismer, som skal forsvare os mod sygdom. I blodet findes komplementsystemet, en del af vores immunforsvar, som hjælper med at angribe bakterier og fjerne døde celler. Ved hjælp af røntgen-krystallograf har vi bestemt den atomare struktur for et nøgleprotein i komplementsystemet

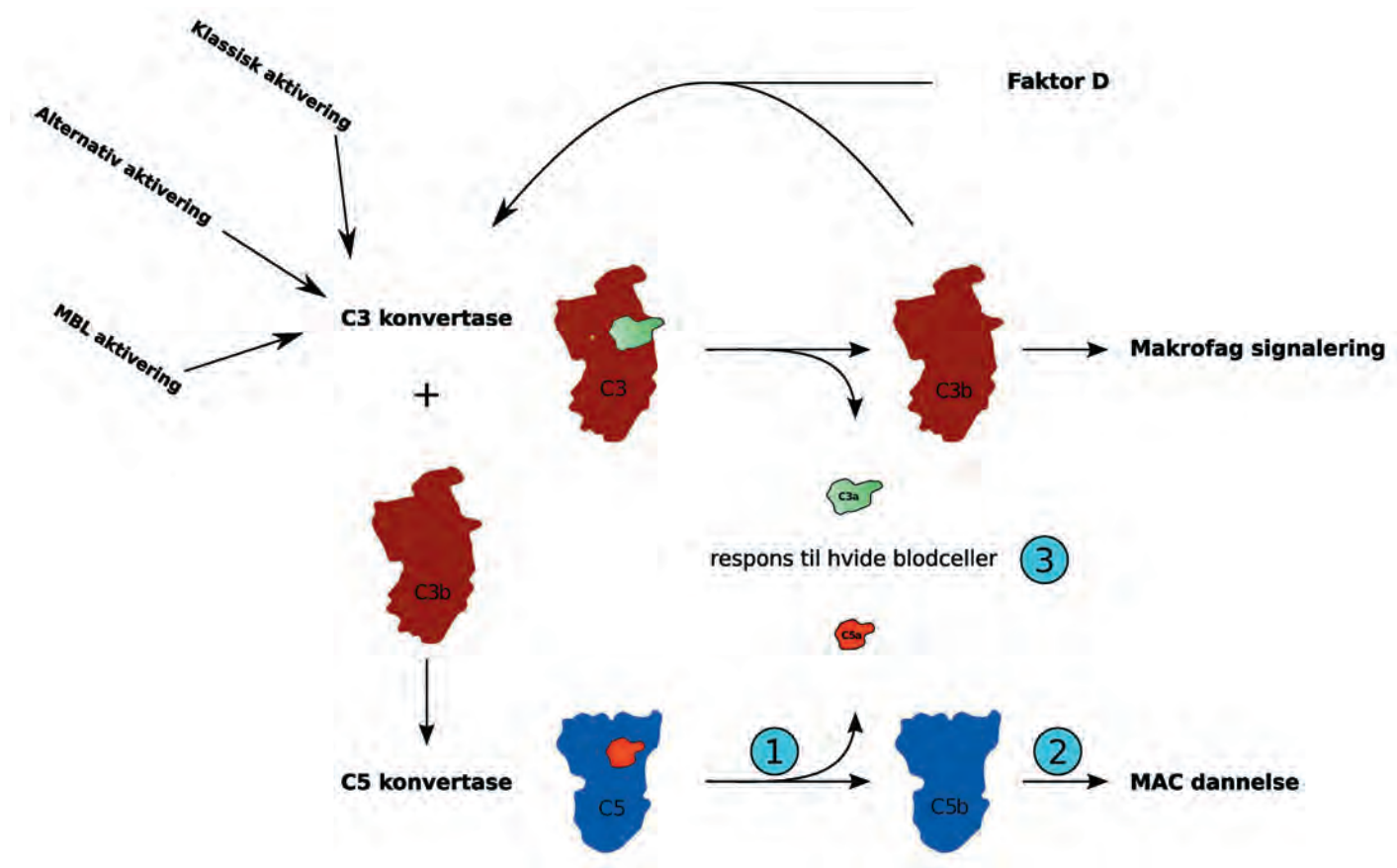
Af Folmer Fredslund, Nick Stub Laursen, Lars Sottrup-Jensen og Gregers Rom Andersen, Molekylærbiologisk Institut, Aarhus Universitet

Komplementsystemet er en del af det medfødte immunforsvar og består af en samling af proteiner, som kan reagere på angribende celler ved bakterieinfektion. Derudover hjælper systemet med til at fjerne cellerester fra vore egne døde celler. Proteinet komplement faktor 5 (forkortet C5) er en vigtig del af denne forsvarsmekanisme, og vi har ved hjælp af krystallografi samt småvinkelspredning med røntgenstråler undersøgt strukturen af dette molekyle. Vores resultater bidrager til at skabe et strukturelt grundlag for en detaljeret forståelse af komplementsystemets funktion. Derudover kan de anvendes indenfor medicinsk

forskning, da regulering af dette komplement protein med lægemidler kan være fordelagtig til sygdomsbehandling og ved organtransplantationer.

Komplementsystemet

Komplementsystemet fik sit navn, da det blev opdaget som en varmfølsom serum komponent, der "komplementerede" effekten af antistoffer (som er en del af det erhvervede immunforsvar) under bakterieudryddelse. I løbet af de mere end 100 år, der er gået siden opdagelsen af komplementsystemet



Figur 1. Oversigt over den centrale del af komplement systemet. De tre aktiveringsveje fører til dannelsen af en C3 konvertase, som kløver C3 til C3b og C3a. Dette kræver det proteolytiske enzym Faktor D. Det dannede C3b kan reagere med C3 konvertasen og herved danne en C5 konvertase. Så kan den terminale del af komplementsystemet aktiveres, idet C5-konvertasen spalter C5 til C5a og C5b, reaktionen mærket (1). Et terapeutisk C5-antistof forhindrer dette. I mange tilfælde vil det være bedre at lade dannelsen af MAC komplekset (2) fortsætte men forhindre den C5a medierede aktivering af hvide blodceller (3).



Udnyt dine fordele

Få de afgørende point med HiQ® specialgaskoncept

HiQ® står for det bedste AGA kan tilbyde, når du skal bruge højrene og specielle gasser, gasblandinger, distributionssystemer, rådgivning, installation, service og support.

HiQ® er intelligent specialgas. Så kan du koncentrere dig om at udnytte dine fordele fuldt ud.

AGA - ideas become solutions

AGA A/S | Vermlandsgade 55 | 2300 København S
Tlf. 32 83 66 00 | www.aga.dk

Linde Gas] **AGA**

Faktaboks 1: Krystallograf

En krystal består af et gentaget mønster af molekyler, som kan opfattes som et gitter med gitterpunkter. Krystallen er opbygget af enhedsceller, der gentages gennem hele krystallen ved translation langs alle tre akser i et koordinatsystem, som ikke nødvendigvis er retvinklet. Derudover er der som oftest symmetrioperatorer – translationer og rotationer – inden i enhedscellen. Man kan derfor nøjes med at bestemme den del af enhedscellen, den asymmetriske enhed, som ved hjælp af symmetrioperatorene frembringer resten af enhedscellen. Den asymmetriske enhed kan dog også indeholde de såkaldte ikke-krystallografiske symmetrioperatorer, som f.eks. relaterer et molekyle i den asymmetriske enhed til et andet.

Krystallernes gitter kaldes det direkte rum, og det diffraktionsmønster, der fremkommer når røntgenstråling afbøjes af krystallen, danner også et tredimensionelt gitter, hvor hvert punkt kaldes en refleks. Dette gitter kaldes det reciprokke rum, idet en stor afstand i det direkte rum bliver til en lille afstand i det reciprokke rum. Da den diffrakterede røntgenstråling er en bølge, har hver refleks både en amplitude og en fase. De observerede data er den målte intensitet for hver refleks i det reciprokke gitter, og kvadratroden af intensiteten er proportional med amplituden, mens fasen ikke kan måles. Kvaliteten af diffraktionsdata beskrives med deres maksimale opløsning, som afgør hvor små detaljer man kan forvente at se i elektrontætheden. Ved en opløsning på 2 Å kan positionen af næsten alle proteinets atomer og mange vandmolekyler bundet til proteinet identificeres. Ved en opløsning på 4 Å kan man derimod kun identificere om den enkelte aminosyre, som udgør byggestenene i proteiner, er placeret i en α -helix eller en β -streng. Da de observerede data udgør et tredimensionelt gitter, er der $(4/2)^3 = 8$ gange så mange data i et datasæt med en maximal opløsning på 2 Å sammenlignet med et 4 Å datasæt.

har utallige forskere været med til at kortlægge de medvirkende proteins indbyrdes interaktioner. Man ved nu at mere end 30 proteiner, både i blodet og forankret på celleoverflader, medvirker til at udføre komplementsystemets funktion.

Komplementresponset kan startes på tre forskellige måder, som alle fører til dannelsen af et proteolytisk enzym, en konvertase (figur 1).

Denne kløver proteinet komplement faktor 3 (C3), der er nært beslægtet med C5. Den først karakteriserede var den klassiske aktiveringsvej, der omfatter en interaktion med det erhvervede immunforsvar, idet antistof bundet til sit antigen kræves for at danne konvertasen og derved starte aktiveringsvejen. I MBL aktiveringsvejen, dannes konvertasen ved at proteinet mannan-binding lectin genkender specifikke sukkerarter på bakterielle celleoverflader.

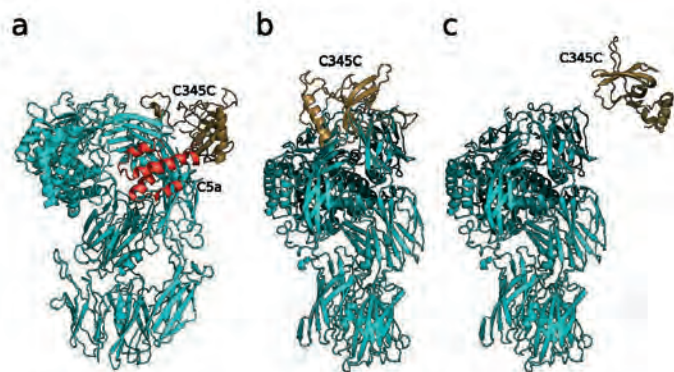
C3 proteinet indeholder en intramolekylær thioester, som er begravet i et apolært miljø. Denne er dannet ved reaktion mellem en bestemt glutamin sidekæde og en nærvedliggende cystein sidekæde. Normalt eksponeres thioesteren kun efter proteolytisk kløvning af C3 ved hjælp af konvertaserne. Thioesteren kan så reagere med tilstedeværende nukleofiler og bindes derved kovalent til den aktiverende celleoverflade, hvorved der

signaleres til makrofager, at cellen skal destrueres. Men thioesteren kan også hydrolyseres meget langsomt spontant ved en "tick-over" proces. Dette starter den alternative aktiveringsvej, hvor der også dannes konvertase, men som altså ikke kræver molekylær genkendelse.

Efter dannelsen af den initierende C3 konvertase sker en kædereaktion, hvorved der spaltes endnu mere C3. Senere initieres den såkaldte terminale aktiveringsvej. I stedet for at kløve C3, vil konvertasen her kløve C5 i en lille (kaldet C5a) og en stor (kaldet C5b) del (Figur 1). Ved denne kløvning gøres funktionen af proteinet dobbelt, idet C5a (også kaldet anaphylatoxin) binder til membranindlejrede receptorer, og herved påvirker hvide blodceller til at aktivere en anden gren af immunforsvaret. Den tilbageblevne del (C5b) reagerer i stedet i en ordnet rækkefølge med fire forskellige, men relaterede, proteiner; komplement faktorerne 6, 7, 8 og 9 (kaldet C6, C7, C8 og C9). Først dannes et kompleks med C6, C5bC6, dernæst bliver de to næste proteiner tilføjet komplekset på lignende måde. Under hele denne proces vil komplekset blive mere hydrofob og kan interagere med en cellemembran. Det sidste trin er en tilføjelse af flere (typisk mellem 8-16) C9 molekyler, som danner en ring med en stor central pore, der så at sige punkterer cellen. Dette enorme proteinkompleks med en molekylvægt på 1-2 MDa kaldes for MAC (efter *m*embrane *a*ttack *c*omplex).

Krystallograf med proteiner

Vores forskergruppe har bestemt den atomare struktur af C5 ved hjælp af røntgen-krystallografi (faktaboks 1). Fremstilling af proteinkrystaller forbruger store mængder rent protein, som ofte fremstilles ved langvarige kromatografiske oprensningprocedurer. Krystallisation foregår ved en trial-and-error proces, hvor koncentreret protein blandes med opløsninger, som ned-sætter proteinets opløselighed. Når egnede krystaller er opnået,



Figur 2. Strukturen af komplement faktor 5. Proteinets er repræsenteret med en såkaldt "cartoon", hvor de enkelte domæner og foldningen af disse i α -helikser og β -strenger træder tydeligt frem. (a) Krystalstrukturen af C5 med C5a og C345C domænet farvet henholdsvis rødt og brunt, mens resten af molekylet er farvet grønt. (b) Krystalstrukturen af C5 efter en drejning på 180° om en lodret akse. C345C domænet ses at være i kontakt med resten af C5. (c) Modellen af C5 modelleret efter SAXS data viser C345C domænet i en meget mere eksponeret position sammenlignet med krystalstrukturen i panel b.

indsamles diffraktionsdata ved hjælp af røntgenstråling. De observerede data beskriver intensiteten af de enkelte reflekser i diffraktionsmønsteret (faktaboks 1), men beregning af proteinets elektronsky – kaldes også *elektrontætheden* – kræver også information om fasen for hver refleks. Denne information kan ikke måles direkte og derfor må man bruge andre metoder.

Kendes hele eller dele af strukturen i forvejen kan man beregne hvilken position af proteinet i krystallen, der bedst passer til de observerede data. Derefter kan man via en Fourier

transformation beregne foreløbige faser ud fra modellen. Denne information kan undertiden være nok til at fuldføre struktur-løsningen. En anden strategi er at binde tunge atomer – ofte metaller – i proteinkrystallen og sammenligne de opnåede diffraktionsdata med de tilsvarende fra en krystal uden tunge atomer. Differensen mellem disse to datasæt giver udelukkende information om de tunge atomer. Da der ofte er forholdsvis få, stærkt spredende tunge atomer kan deres positioner bestemmes og foreløbige faser kan beregnes.

Med en foreløbig elektrontæthed kan der bygges en start-model af proteinet. Alt efter hvilken *opløsning* (faktaboks 1) diffraktionsdataene har kan dette gøres på flere måder. Ved høj opløsning kan de enkelte atomer placeres automatisk med computerprogrammer. Ved lidt lavere opløsning må man manuelt bygge modellen og her bruges større fragmenter af proteiner som ”legoklodser”: Aminosyrer, α -helixer og β -strenger, alt ef-

Faktaboks II: Paroksyttisk nokturn hæmoglobinuri (PNH)

I denne sjældne sygdom kan røde blodlegemer (erythrocytter) ikke forankre visse proteiner til membranen via et såkaldt glykosylfosfatidylinositol anker. Dette gælder først og fremmest proteinet CD59, som er med til at regulere komplement-systemet og forhindre dannelsen af det membranødelæggende MAC kompleks på vore egne celler. Mangel på dette protein gør, at erythrocytterne hyppigt ødelægges af MAC komplekset. Dette kan forhindres af et rekombinant antistof, eculizumab, som binder specifikt til C5, og som derfor kan stoppe dannelsen af MAC komplekset.

Se også: Ugeskrift for læger, 2008;170(24):2115; Nye medicinske behandlingsprincipper inden for hæmatologien

ter kvaliteten af elektrontætheden. Efter bygning af den foreløbige model forfines denne med computere, så den passer bedst muligt med de observerede data. Man opnår så en bedre model, hvorfra man kan beregne nye faser, og igennem en iterativ proces med modelbygning og forfining forsættes beregningerne indtil strukturen konvergerer mod den endelige.

Den rumlige struktur af C5

Ved krystallisation dannes en fast form af proteinet, der pakkes i en regelmæssig struktur. For at få proteiner til at krystallisere må, man ofte anvende betingelser, som ikke er naturligt forekommende i kroppen, f.eks. høje saltkoncentrationer og ikke-fysiologiske pH-værdier. Proteinkrystaller er dog ikke opbygget på samme måde som krystaller af små molekyler. Proteiner eksisterer naturligt i et vandigt miljø og har en velordnet skal af vand. Dette miljø bliver til dels opretholdt ved hjælp af vandkanaler i krystallerne. Proteiner er som oftest opbygget af mindre globulære dele, domænerne, med en typisk størrelse på 10-20 kDa. C5 proteinet indeholder 13 domæner (figur 2). Ved store proteiner med mange domæner, kan krystallernes vandkanaler give et eller flere domæner bevægelsesfrihed. Da diffraktion fra krystallerne er et gennemsnit, vil elektrontætheden for mobile domæner være mindre klar eller helt forsvinde. I krystallerne af C5 observerede vi to kopier af proteinet. Tolv af de tretten domæner var identisk placeret i hver sin kopi, men det sidste, kaldet C345C domænet, opførte sig forskelligt. I den ene kopi af C5 var domænet pakket mellem to kopier af C5, mens positionen af den anden kopi af C345C domænet ikke kunne bestemmes.

Det er ikke lige meget hvilke creme og engangshandske der bruges sammen. Det forkerte valg kan halvere din sikkerhed!



HERWE Emulsion reducerer sveddannelsen og beskytter mod hudopblødning under Dermatril engangshandsken - uden at ændre på handskens beskyttelse!



Få mere at vide på www.arsima.dk



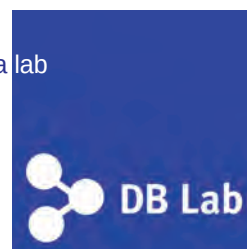
Contract Laboratory

Chemical and microbiological GMP analyses for the pharmaceutical and biotechnological industries

Fermentation and downstream processing in pilot and laboratory scales as a business partner in R&D projects

More than a lab

DB Lab A/S
Stenhuggervej 22
DK-5230 Odense M
Denmark
Tel: +45 6593 2920
www.dblab.dk



For at få flere, og mere komplette, informationer om den rumlige struktur af C5 benyttede vi os af røntgen småvinkelspredning (SAXS, efter *small angle X-ray scattering*). SAXS og krystalstrukturer kombineres nu ofte ved strukturbestemmelse af makromolekyler, idet de giver komplementære oplysninger. I modsætning til den tætpakkede krystal kan man ved småvinkelspredning måle på proteinet i opløsningen og derfor under betingelser, som er meget lig de fysiologiske. Hermed kan man afsløre artefakter forårsaget af ikke-fysiologiske krystallisationsbetingelser og konformationer af proteiner, som skyldes krystalpakkningseffekter. Der findes flere måder, hvorpå man efterfølgende kan fortolke SAXS data. Når strukturen af proteinet er kendt fra en krystalstruktur, kan man bruge denne som udgangspunkt, idet man pertuberer den kendte struktur indtil den passer med de observerede data. Man kan tilføje kendt information om intramolekulære afstande, kendt som "restraints". I vores tilfælde vidste vi, at et bestemt punkt i C345C domænet måtte være under 20 Å fra et andet bestemt punkt i den øvrige del af C5, som vi havde strukturbestemt i krystallerne. Beregningerne viste, at i opløsning er positionen af C345C domænet meget mere eksponeret end i den kopi af C5, hvor vi kunne bestemme dets position (figur 2). Domænets position i krystallen er derfor formentligt et artefakt, hvorimod den fysiologisk relevante position formodentligt er den vi bestemte med SAXS.

Komplementrelaterede sygdomme

Visse sygdomme, som f.eks. paroxysmal nocturn hæmoglobinuri (faktaboks 2), forårsages af defekte eller manglende komplementproteiner. Derudover forårsager komplementsystemet formentligt skader i forbindelse med f.eks. gigt, blodforgiftning,

astma og organtransplantationer. Der arbejdes derfor ihærdigt på at udvikle komplement hæmmere (inhibitorer). Dette er dog vanskeligt, idet man også risikerer at undertrykke komplement systemets gavnlige egenskaber. Det er derfor vigtigt at hæmmerne er specifikke og målrettede mod bestemte sygdomstilstande. Dette dilemma illustreres af forsøg på at anvende C5 inhibitorer terapeutisk til mere end et formål. Der er fornyelig frigivet et terapeutisk C5-antistof til behandling af paroxysmal nocturn hæmoglobinuri. Dette antistof forhindrer kløvning af C5 til C5a og C5b, og herved forhindres den C5b medierede dannelse af MAC komplekset, som perforerer de røde blodlegemer. Herved forsvinder mange af sygdommens symptomer og patienternes livskvalitet forbedres betydeligt. Men denne strategi vil formentligt ikke kunne anvendes til behandling af blodforgiftning, hvor en bakterieinfektion spreder sig til hele blodsystemet. Her vil man gerne dæmpe effekten af det lille C5a fragment, som aktiverer hvide blodceller, hvorimod dannelse af MAC komplekset, som angriber bakterierne, er ønskelig. Her vil en inhibitor, som i modsætning til C5-antistoffet, angriber EFTER aktiveringen af C5 og kun dæmper effekten af C5a være ønskeligt.

Bestemmelse af de atomare strukturer for C5 og andre proteiner i komplementsystemet åbner nye muligheder for at forbedre eksisterende lægemidler og udvikle nye medikamenter rettet mod komplementsystemet. For kendte medikamenter, det være sig småmolekyler eller terapeutiske proteiner, kan man i atomare detaljer bestemme hvorledes disse genkender og påvirker deres "targets", og man kan så anvende denne viden til at modificere medikamenterne.

Udfra biokemiske, cellebiologiske, genetiske og bioinformatiske data vides ofte hvilke dele af et protein, der er vigtige for dets funktion. I tilfældet med C5 er det f.eks. hvilke områder af molekylet der er vigtigt for kløvning af C5 til C5a og C5b. Krystalstrukturer kan også anvendes til at identificere nye mulige ligander rettet mod sådanne områder ved såkaldt virtuel screening ved hjælp af massive computerberegninger. De atomare strukturer giver en meget detaljeret viden om den molekulære overflade og dens egenskaber med hensyn til f.eks. ladningsfordeling, mobiliteten af aminosyre sidekæder, tilstedeværelse af apolare områder, og fordybninger i overfladen. Alle disse forhold påvirker vurderingen af, hvorvidt et bestemt område af overfladen vil være egnet til at binde en ligand, som eventuelt kan udvikles til et medikament.

Litteratur:

Fredslund, F., Laursen, NS, Roversi, P, Jenner, L, Oliveira, CLP, Pedersen, JS, Nunn, MA, Lea, SM, Discipio, R., Sottrup-Jensen, L & Andersen, GR. *Nature Immunology*. Structure of and influence of a tick complement inhibitor on human complement component 5, **9**, 753-60 (2008).
Fredslund, F, Jenner, L, Husted, LB, Nyborg, J, Andersen, GR & Sottrup-Jensen, L. *J. Mol. Biol.* **361**, 115-127. The structure of bovine complement component 3 reveals the basis for thioester function (2006).
Walport, MJ. Complement. *New Eng. J. of Med.*, **344**, 1058-66 (2001).
Rother, RP, Rollins, SA, Mojcik, CF, Brodsky, RA & Bell, L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1256-1264 (2007).
Forskergruppens arbejde er støttet af Forskningsrådet for Natur og Univers, Novo Nordisk fonden og Carlsberg fonden.
Kontakt information:
Ph. d studerende Folmer Fredslund, ff@mb.au.dk
Ph. d studerende Nick Stub Laursen, nsl@mb.au.dk
Docent Lars Sottrup-Jensen, lsj@mb.au.dk, tlf 89425051
Lektor Gregers Rom Andersen, gra@mb.au.dk, tlf 89425024
Molekylærbiologisk Institut, Aarhus Universitet
Gustav Wiedsvej 10C, DK8000 Århus C

Effektivt økonomisk udstyr til analysering i industrien og til miljøanalyse Arena 20XT, 30 & 60, Aquakem 250 & 600



Besøg os på
Scanlab
Bella Center
23.-25. sep.
stand C2-160

Fulldautomatisk fotometrisk udstyr

- Fleksibel software med mulighed for en bred vifte af tests
- Mulighed for egne applikationer
- Økonomisk, lavt reagensforbrug
- Engangskuvetter
- Kontinuerlig loading af prøver og reagenser
- Automatisk fortynding
- Applikationer til brug indenfor vin-, fødevarer-, drikkevareproduktion, farmaceutisk- og kemisk industri samt miljøanalyser.



LABORATORIES
SCANDINAVIA

Gydevang 22A, 3450 Allerød
Telefon. 4814 1850, www.ilsdk.dk



Elektroforese



Koagulation



Blodgas