

dc_591_12

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

MTA doktori értekezés tézisei



Gál Péter

**Magyar Tudományos Akadémia
Természettudományi Kutatóközpont
Enzimológiai Intézet**

2013

Bevezetés

A komplementrendszer a természetes immunitás egyik fontos, ősi effektor ágát képezi. A kb. 40 fehérjemolekulából álló rendszer szinte minden olyan tulajdonsággal rendelkezik, ami a teljes immunrendszerre is jellemző: képes felismerni és megjelölni az idegen (pl. baktérium, vírus) illetve a megváltozott saját (pl. apoptotikus sejt, rákos sejt) struktúrákat és különböző mechanizmusok révén megkezdi azok semlegesítését, eliminálását. A komplementrendszer fontos szerepet játszik a fertőzések elleni védekezésben és az immun homeosztázis fenntartásában. Jóllehet a komplementrendszer a veleszületett immunitás része, számos ponton kapcsolódik az adaptív immunitáshoz is. A komplementrendszer egyik fő funkciója éppen az, hogy hidat képez a természetes és az adaptív immunválasz között: a komplementrendszer aktiválódása elősegíti az adaptív immunválasz kialakulását, az adaptív immunválasz során képződő antitestek viszont az antigénjükhöz kapcsolódva aktiválják a komplementrendszert. A komplementrendszer aktiválódásának első lépésében mintázatfelismerő molekulák kapcsolódnak az aktivátor struktúrához. A veszély szignálok felismerését végző molekulák szerin proteáz zimogénekkal alkotnak komplexet, amelyek a mintázatfelismerő molekulák által detektált vészjelet enzimatis jellé konvertálják és egy kaszkádfolyamat keretében nagymértékben felerősítik. A vérben több, a komplementrendszerhez hasonló, proteolitikus kaszkád található, amelyek közös jellemzője, hogy aktiválódásuk során tripszinszerű szerin proteázok aktiválódnak. Ezek a proteázok szinte kivétel nélkül több doménből álló moduláris fehérjék és szubsztrátjaikat limitált proteolízis során rendkívül specifikusan hasítják. Dolgozatomban a komplementrendszer klasszikus és lektin útjának beindításában szerepet játszó szerin proteázokkal kapcsolatos eredményeimet foglalom össze.

A komplementrendszer aktiválódási útvonalai

A komplementrendszer komponensei a testnedvekben (elsősorban a vérben) oldott állapotban jelenlévő fehérjemolekulák, valamint a különböző sejtek felszínén elhelyezkedő receptorok és regulátorok. A komplementrendszer fő komponensei tripszinszerű szerin proteáz enzimek, amelyek egymást kaszkádszerűen aktiválják. Szintén alapvető komponensek a tioészter kötést tartalmazó fehérjék (C3, C4) és a velük homológ C5, amelyek ugyancsak a szerin proteázok hatására aktiválódnak. A komplementrendszer komponensei a vérben inaktív állapotban vannak jelen és csak megfelelő stimulus hatására aktiválódnak. Az aktiválódásnak három alapvető útját különíthetjük el: a klasszikus, a lektin és az alternatív utat. A három aktiválódási útvonal a komplementrendszer legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponensének, a C3-nak, a hasításánál találkozik és beindul az egységes terminális útvonal, ami a membránkárosító komplex kialakulásához vezet.

A klasszikus út mintázatfelismerő molekulája a C1q, ami hat globuláris fejből és az azokhoz kapcsolódó kollagénszerű karokból áll. A globuláris fejek kötődnek a target struktúrákhoz (pl. immunkomplexben lévő IgG vagy IgM molekula), a kollagén karokhoz

pedig szerin proteáz zimogének kapcsolódnak. Egy C1q molekula valamint két C1r és két C1s szerin proteáz (C1s-C1r-C1r-C1s szekvenciájú tetramer) alkotja a C1 komplexet. A klasszikus út aktiválásának első lépése a C1q globuláris fejeinek kötődése az aktivátor struktúrához. A C1q hat fejből legalább kettőnek a kötődése szükséges ahhoz, hogy a kollagén szárákhoz kapcsolódó szerin proteáz zimogének aktiválódjanak. Az első enzimatis lépés a klasszikus útvonalban a C1r zimogén autoaktiválódása. Az autoaktiválódás egy Arg-Ile kötés hasadásával jár a szerin proteáz domén aktivációs peptid (linker) régiójában. Aktiváció után a két részre hasadt polipeptidláncot (A és B lánc) egy diszulfid híd tartja össze. A következő lépésben az aktív C1r hasítja, és ezzel aktiválja a zimogén C1s-t. A C1s a C1 komplex azon enzime, amelyik tovább viszi az enzimaszkádot a C4 és C2 komponensek hasítása révén. Először a C4 hasítására kerül sor, aminek az eredményeként a C4-ről leválik egy kisebb fragmentum (C4a), a nagyobb C4b fragmentum pedig tioészter kötés révén kovalensen kötődik az aktivátor felszínhez. A C4b nem rendelkezik enzimatis aktivitással, viszont megköti a zimogén formában jelenlévő C2 szerin proteázt, amelyet a C1s limitált proteolízissel aktivál. Az így keletkező C4b2a enzimkomplex a klasszikus út C3-konvertáza, amely a C3 molekulát két fragmentumra: a kisebb C3a-ra és a nagyobb C3b-re hasítja. A C3b fragmentum tioészter csoportja révén kötődik a felszínhez. Egy aktív C1 komplex több C3-konvertáz komplexet generál, amelyek még több C3 komponenst hasítanak, vagyis a kaszkádszerű proteolízis a kezdeti jel felerősödéséhez vezet.

A komplementaktiválódás lektin útját a múlt század nyolcvanas éveiben fedezték fel, de még a kétezres években is találtak új komponenseket. A lektin út első közelítésben nagyon hasonlít a klasszikus útra, ez a hasonlóság azonban többnyire felszínes, a valóságban a lektin út sokkal összetettebb a klasszikus útnál és még több a megválaszolatlan kérdés. A klasszikus út egyetlen felismerő molekulájával szemben a lektin út esetén legalább öt különböző felismerő molekula (MBL=mannózkötő lektin, H-, L- és M-fikolin, kollektin-11) ismert és a lista valószínűleg bővülni fog a jövőben. Ezek a molekulák annyiban hasonlítanak a C1q-ra, hogy C-terminális globuláris fejből (lektin domének) és N-terminális kollagén szárákból állnak (innen a gyűjtőnév: kollektinek). Lényeges különbség azonban, hogy csak egyféle polipeptidláncból épülnek fel, és a homotrimer alapegységekből többféle oligomerizációs fokú felismerő molekulák állhatnak össze a dimertől a hexamerig. A kollagén szárákhoz szerin proteáz zimogének és azok katalitikus aktivitással nem rendelkező fragmentumai kapcsolódnak. A vérben legnagyobb mennyiségben (11 µg/ml) található MASP (MASP=mannózkötő lektinhez kapcsolódó szerin proteáz) a MASP-1, ami ugyan képes autoaktiválódni és C2-t hasítani, azonban egyedül mégsem képes beindítani a komplementkaszkádot, mivel nem tud C4-et hasítani. A MASP-1 tényleges funkciója, fiziológiai szerepe, az utóbbi évek egyik legizgalmasabb és sokat vitatott kérdése, amellyel én is behatóan foglalkoztam munkám során. A jóval kisebb mennyiségben jelenlévő (0.4 µg/ml) MASP-2-t tartották idáig a lektin út kulcsenzimének, mivel képes autoaktiválódni és C3-konvertázt képezni C4 és C2 hasítása által. A MASP-2 tehát MBL-hez vagy fikolinhoz kapcsolódva egyedül is képes beindítani a lektin utat. A harmadik proteáz a MASP-3, aminek funkciója ma még jórészt ismeretlen. Jelenlegi ismereteink szerint nem járul hozzá

lényegesen a lektin út aktiválódásához. A MAp19 és a MAp44 a felismerő molekulákhoz kötődő de enzimatis aktivitással nem rendelkező molekulák, amelyek funkciója valószínűleg a lektin út szabályozása.

A komplementrendszer aktiválódásának harmadik útja az alternatív útvonal. Ez az útvonal önállóan is képes aktiválódni, azonban egyik fő funkciója a klasszikus és a lektin út hatásának felerősítése pozitív visszacsatolás révén. Az aktivációs felszínre lerakódott C3b-hez kapcsolódik a B-faktor szerin proteáz, amit a szérumban hasított formában jelenlévő D-faktor aktivál. Az így keletkező C3bBb az alternatív út C3-konvertáza, ami újabb C3 molekulákat hasít. A kezdeti C3b lerakódás történhet spontán módon, a vérben keringő C3 hidrolízise következtében, vagy pedig a klasszikus vagy a lektin út C3-konvertázának (C4b2a) hatására. Egyes becslések szerint az alternatív út által kiváltott erősítő hatás felelős az összes komplement aktiváció 80-90%-áért normál humán szérumban, akkor is, ha a kezdeti aktiváció a másik két útvonal valamelyikén indult be.

Ahogy a felszínre lerakódott C3b koncentrációja növekszik, a C3-konvertázok (C4b2a és C3bBb) fokozatosan C3b-t kötnek és átalakulnak C5-konvertázokká (C4b2a3b és C3bBb3b). Ekkor beindul a terminális útvonal, ami az úgynevezett membránkárosító komplex (C5b-C9_n) kialakulásához vezet. A membránkárosító komplex egy kb. 100 nm átmérőjű pórust képez a sejtmembránban megszüntetve ezzel a sejt integritását, ami a sejt pusztulásához vezet.

A membránkárosító komplex kialakulásán kívül a komplementrendszer egyéb módokon is hozzájárul a patogén mikroorganizmusok eliminálásához. Az egyik legfontosabb effektor mechanizmus az opszonizáció, vagyis a fagocitózis fokozása, ami már a komplementaktiválás korábbi fázisaiban is beindul. A megtámadott sejtek felszínére komplement komponensek rakódnak le, amelyeket speciális receptorok révén a leukociták érzékelnek és fagocitózis által eltávolítják a kórokozókat a keringésből. A leukocitáknak a fertőzés helyére való irányításában illetve aktiválásában fontos szerepet játszanak a komplementaktiválódás során felszabaduló anafilatoxinok. A két legjelentősebb anafilatoxin a C5a és a C3a. Az anafilatoxinok egyrészt kemotaktikus hatást fejtenek ki a sejtekre, másrészt aktiválják azokat a G-fehérje-kapcsolt C3aR és C5aR receptorokhoz kötődve. Ily módon az anafilatoxinok elősegítik a hatékony opszonizációt és gyulladást közvetítő anyagok felszabadulását a leukocitákból. Ezek a mechanizmusok hozzájárulnak a komplementaktiváció gyulladáskeltő (proinflammatorikus) hatásának kiteljesítéséhez. A gyulladáskeltés a komplementaktiváció egyik legfontosabb következménye, amit a rendszer több párhuzamos úton egyszerre vált ki.

A komplement proteázok

A komplementrendszer összesen kilenc szerin proteáz enzimet tartalmaz. Ezek közül hat a kaszkád beindításában (C1r, C1s, MASP-1, MASP-2, MASP-3, D-faktor), kettő a felerősítésében (C2, B-faktor), egy pedig a regulációjában (I-faktor) vesz részt. A komplement szerin proteázok a D-faktor kivételével valamennyien mozaik fehérjék, vagyis több doménből

állnak. A C-terminális szerin proteáz domént megelőzi több (4-5) nemkatalitikus domén. A kimotripszin folddal és tripszin-szerű szubsztrátspecifitással rendelkező proteázok evolúciós értelemben rendkívül sikeres fehérjéknek tekinthetők: a vérplazma összes kaszkádrendszerét ilyen enzimek alkotják és más élettani folyamatokban is kulcsszerepet játszanak. A vérben tulajdonképpen a tripszinszerű szerin proteázok egy bonyolult hálózatot alkotnak, amelynek felosztása diszkrét kaszkád rendszerekre mesterséges jellegű. Ezt az bizonyítja a legjobban, hogy számos kölcsönhatás mutatható ki a kaszkádrendszerek között mind aktiválás, mind pedig gátlás (szabályzás) terén.

A komplement szerin proteázokra általánosságban jellemző, hogy hatásukat nem egyedül, hanem egy nagyobb enzimkomplex részeként fejtik ki. Bizonyos enzimeknek izoláltan is van proteolitikus aktivitásuk (pl. C1s, MASP-2), azonban ennek az aktivitásnak csak akkor van fiziológiás következménye, ha a felismerő molekula a megfelelő helyre rögzíti az aktív enzimet. További közös jellemzőjük ezeknek a proteázoknak a rendkívül szűk szubsztrátspecifitása és a viszonylag kicsi (tripszinhez, kimotripszinhez viszonyítva) aktivitás. A komplement proteázok néhány szubsztrát rendkívül specifikus limitált proteolízist katalizálják. Valószínű, hogy a szűk szubsztrátspecifitás kialakításában a nemkatalitikus doméneknek is fontos szerepe van.

A komplement proteázok doménszerkezetük alapján enzimcsaládokba sorolhatók. A legnépesebb családot a C1r, C1s, MASP-1, MASP-2 és MASP-3 enzimek alkotják. Ezeknél az enzimeknél a szerin proteáz domént öt nemkatalitikus modul előzi meg. Az N-terminális CUB1 domént egy EGF domén követi, majd egy újabb CUB domén (CUB2) következik. A CUB domének nevüket onnan kapták, hogy kezdetben csak a C1r/C1s proteázokban, a tengeri sünn **U**egf fehérjében és a csont (**B**one) morphogenetic protein-1-ben találták meg. Ezek a kb. 110 aminosav hosszúságú domének kalciumot kötnek, és döntő szerepet játszanak a proteázok dimerizációjában és a felismerő molekulához való kötődésben. A kisebb méretű (40-50 aminosav) EGF (epidermal growth factor) domének szintén kötnek kalciumot és a két CUB doménnel együtt viszonylag kompakt egységet alkotnak (α -fragmentum). A CUB2 és a szerin proteáz (SP) domén között két komplement kontroll protein (CCP) modul helyezkedik el. A CCP modulok döntő módon hozzájárulnak a szubsztrátspecifitás kialakításához. C1r és C1s esetében bizonyítást nyert, hogy a CCP1-CCP2-SP fragmentum (γ B fragmentum) enzimológiai tulajdonságait illetően egyenértékű a teljes hosszúságú molekulával és nagy valószínűséggel ugyanez igaz a MASP-okra is. Ez azt jelenti, hogy a CCP1-CCP2-SP fragmentum tartalmazza az összes olyan kötőhelyet, ami a szubsztrát molekulákkal való specifikus kölcsönhatáshoz szükséges. Az SP domén N-terminális részén található az aktivációs peptid, amelynek hasadásával válik a zimogén teljes aktivitású proteázzá. Aktiváció után a két lánc (A-lánc= CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2; és B-lánc= SP domén) csak redukáló körülmények között esik szét, mert egy diszulfid híd található közöttük. A MASP-1 és MASP-3, amelyek alternatív „splicing”-gal keletkeznek ugyanarról a génről (*MASP-1*), csupán szerin proteáz doménjükben különböznek, az A-láncuk teljesen megegyezik. A C1r/C1s/MASP családnak még a katalitikus aktivitással nem rendelkező alternatív „splice” formák: a MAp19 és a MAp44. A MAp19 a MASP-2 CUB1-EGF fragmentuma, míg a

MAp44 a MASP-1 CUB1-EGF-CUB2-CCP1 fragmentuma, mindkét fehérje esetén egy rövid egyedi C-terminális szakasszal.

A komplement proteázok közül csak a klasszikus és a lektin út iniciációs enzimeinek (C1r, C1s, MASP-1, MASP-2) van közvetlen inhibitoruk (C1-inhibitor). Érdekes módon az ugyanebbe az enzimszaládba tartozó és eddig még ismeretlen funkciójú MASP-3 aktivitását ez a szerpin nem gátolja. A többi komplement proteáz közvetett módon, elsősorban az I-faktor szerin proteáz közreműködésével, regulálódik.

Kérdések és célkitűzések

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

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

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

- A C1r CCP1-CCP2-SP (γ B) fragmentuma enzimatis tulajdonságaiban egyenértékű a teljes hosszúságú (hatdoménes) proteázzal. Fiziológias körülmények között kalcium-független dimert képez, képes autoaktiválódni és C1s-t hasítani. Mi lehet a három domén hozzájárulása ezekhez a tulajdonságokhoz? Mely domének vesznek részt a

dimerizációban? Szükség van-e a CCP modulokra az autoaktiválódáshoz és a C1s hasításához? A dimerizáció előfeltétele-e az autoaktiválódásnak?

- A zimogén C1r szerkezete miben különbözik az aktivált C1r szerkezetétől? A legújabb szerkezeti és funkcionális eredmények fényében, hogyan módosítható a C1 komplex funkcionális modellje? Hogyan megy végbe a C1r autoaktiválódása a C1 komplexen belül?
- Minden C1 aktiválódási modell közös eleme, hogy a C1r₂C1s₂ tetramer nagyfokú flexibilitását tételezi fel a folyamat során. Nem ismert azonban, hogy a C1r molekula melyik szerkezeti egysége a forrása ennek a flexibilitásnak. Korábbi hipotézis szerint a CCP1-CCP2 domének közötti linker régió lehet ilyen flexibilis. Az újabb eredmények fényében ez azonban kevésbé tűnik valószínűnek. Megvizsgáltuk, hogy a C1r molekula proteolízisre érzékeny CUB2-CCP1 régiója rendelkezik-e akkora flexibilitással, ami az autoaktivációs folyamathoz szükséges.

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

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

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

- Mi a MASP-1 szubsztrátspecificitása? Működhet-e a MASP-1 önmagában C3-konvertázként? Milyen hatékonysággal hasítja a MASP-1 a C2 és C4 szubsztrátokat? Vannak-e a MASP-1-nek a komplementrendszeren kívüli szubsztrátjai?
- Milyen inhibitorok szabályozzák a MASP-1 aktivitását?

- Képes-e a MASP-1, a trombinhoz hasonlóan, közvetlenül aktiválni sejteket? Milyen sejtfelszíni receptorok vesznek részt ebben az aktiválási folyamatban? Milyen proinflammatorikus mechanizmusokat aktivál a MASP-1?
- Mi a MASP-1 viszonylag széles szubsztrátspecifitásának szerkezeti háttere?
- Mennyiben járul hozzá a MASP-1 a lektin út beindításához? Jelentős-e a MASP-1 hozzájárulása az iniciációs folyamathoz, vagy pedig, mint ezt az általános vélekedés sugallja, a MASP-1 csupán kiegészítő funkciót lát el a MASP-2 mellett?

Új tudományos eredmények összefoglalása

A komplementrendszer aktiválódásának klasszikus útja

A C1r szerepével, aktiválódási mechanizmusával kapcsolatos legfontosabb új eredményeink a következők:

- Megmutattuk, hogy az autoaktiváció a szerin proteáz (SP) domén inherens tulajdonsága, ahhoz a többi domén jelenlétére nincs szükség. A szerin proteáz domén önmagában tartalmazza az összes kötőhelyet és a katalitikus apparátust, ami az autoaktiválódáshoz szükséges. A CCP domének jelenléte felgyorsíthatja az autokativáció folyamatát, azonban nem nélkülözhetetlenek a folyamathoz. A (CCP1-CCP2-SP)₂ dimer képződése szintén nem előfeltétele az autoaktivációnak.
- A CCP doménekről kimutattuk, hogy stabilizálják az SP domént és jelenlétük fehérjeszubsztrátok esetén megnöveli a katalitikus hatékonyságot. Ez arra utal, hogy a CCP domének külső kötőhelye(ke)t (exosite) tartalmaznak a nagyméretű fehérjeszubsztrátok számára. Ez nagy valószínűséggel igaz a C1r/C1s/MASP enzimcsalád többi tagjára is.
- Felderítettük, hogy a CCP1 modul kulcsszerepet játszik a C1r dimerizációjában. Ezt az eredményünket a későbbi kristályszerkezetek teljes mértékben megerősítették megmutatván, hogy a két CCP1-CCP2-SP monomer fej-láb orientációjú dimert képez oly módon, hogy az egyik monomer CCP1 modulja a másik monomer SP doménjéhez kapcsolódik.
- Az aktív C1r CCP1-CCP2-SP fragmentum kristályszerkezete alapján kimutattuk, hogy az aktív dimert erősebb kölcsönhatás stabilizálja a CCP1/SP kontaktfelszínen, mint a zimogént. Az aktív dimer tehát nehezebben bomlik monomerekre, mint a zimogén forma. Mivel a dimerben az egyik C1r monomer aktív centruma ~92 Å távolságra helyezkedik el a másik monomer hasítandó Arg-11e kötésétől, az autoaktivációhoz a dimer szerkezetnek fel kell bomlania. Az aktív C1r kristályszerkezetében két szomszédos dimer molekulái enzim-termék komplexet alkotnak.
- Az aktív C1r kristályszerkezete alapján új modellt dolgoztunk ki a C1r autoaktiválódására a C1 komplexen belül. Az általunk javasolt „hasadás és összekapcsolódás” (split and reassembly) modell jobban összhangban van a kísérleti tényekkel, mint a korábbi modellek. A zimogén C1r dimerek képesek spontán módon

is felbomlani, azonban aktiváció során, amikor a C1q fejei lekötődnek az aktivációs felszínre, a spontán disszociáció felgyorsul. Disszociáció után a C1r SP domének olyan térbeli helyzetben találkoznak, ami lehetővé teszi az autoaktivációt, vagyis az egyik SP domén hasítását a másik SP domén által. A kristályszerkezetben detektált CCP2/SP intermolekuláris kölcsönhatás hozzájárulhat az átmeneti aktivációs komplex stabilizálásához. Autoaktiváció után a C1r dimer szerkezet könnyen helyreállhat, hiszen modellünk, más modellekkel ellentétben, nem igényli a C1q karok olyan mértékű elmozdulását, ami ezt meggátolná. A helyreállt aktív dimer viszont már nem fog könnyen újra felbomlani, mivel több kölcsönhatás stabilizálja, mint a zimogén dimert. A zimogén C1s C1r általi aktivációja megtörténhet akár a disszociált akár az újra összekapcsolódott állapotban. Az aktív C1r molekulák által képzett dimer szilárd vázat biztosít a C1s molekuláknak ahhoz, hogy a C1 komplexből kinyúlva a C4 és a C2 molekulákat hasítani tudják. Modellünk, akár csak az összes többi funkcionális C1 modell, a tetramer nagyfokú konformációs flexibilitását tételezi fel az aktiválódás során a C1 komplexen belül.

- Megmutattuk, hogy a CUB2 modul kalcium hiányában nagyfokú flexibilitással rendelkezik, ami kulcsfontosságú lehet az aktiválódás során. A C1r CUB2 doménjének csak Ca^{2+} ion jelenlétében van rendezett térszerkezete, Ca^{2+} ion hiányában rendezetlen, flexibilis szerkezettel rendelkezik. Méréseink szerint normál humán szérumban a C1r molekulák kb. egynegyede nem köt kalciumot a CUB2 doménon keresztül, ami kellő mozgékonyt biztosíthat az egész molekulának az autoaktiváció során. A Ca^{2+} ion koncentráció szerepét a C1r autoaktiválódásának a szabályozásában szérumból izolált teljes hosszúságú zimogén C1r preparátumon is ellenőriztük. Ezek a mérések megerősítették, hogy a szérumban a CUB2 domén stabilitásának határán van és biztosítja az aktiválódási folyamathoz szükséges flexibilitást.

A komplementrendszer aktiválódásának lektin útja

A MASP-2 ideális objektumnak bizonyult az autoaktiválódás illetve a C3-konvertáz képzés mechanizmusának tanulmányozására. Legfontosabb új eredményeink ezen a területen a következők:

- Megmutattuk, hogy a MASP-2 magányos SP doménje a C2 szubsztrátot nagy hatékonysággal hasította, míg a hatékony C4 hasításhoz szükség van legalább a CCP2 modul jelenlétére. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az SP domén tartalmazza mindazon kötőhelyeket és katalitikus apparátust, ami a C2 szubsztrát hasításához szükséges, a nagymértű (203 kDa) C4 szubsztrát számára viszont külső kötőhelyek (exosite) vannak a CCP modulokon. Ezek a külső kötőhelyek már a zimogén MASP-2 molekulán is megtalálhatók, mivel a CCP domének szerkezete nem változik az aktiváció során.

- A MASP-2-C4 enzim-szubsztrát komplex térszerkezete igazolta a CCP domének szerepével kapcsolatos korábbi következtetéseinket. A MASP-2 CCP doménjei a C4 fehérje C-terminális C345C doménjéhez kötnek 500 Å² felületen keresztül. Egy másik, nem várt, külső kötőhelyet (exosite) is detektáltunk a C4 szulfotirozin régiója és a MASP-2 SP doménje között. A MASP-2 és a C1s szerkezetének és enzimatikus tulajdonságainak összehasonlítása alapján valószínűsíthető, hogy a két extra kötőhely a C1s molekulán is megtalálható. A CCP doméneken található külső kötőhely, mivel nagy valószínűséggel lassítja a termék (C4b) disszociációját a proteázról, fontos szerepet játszik a C3-konvertáz (C4b2a) kialakulásának mechanizmusában.
- A MASP-2 zimogén térszerkezete proteolitikusan inaktív konformációt mutat: a szubsztrátkötő zseb és az oxianionkötő zseb erősen torzult. Ezzel összhangban van az a tény, hogy a zimogén MASP-2 szintetikus szubsztrátot nem képes hasítani. Ugyanakkor meglepően hatékonyan hasítja a nagyméretű C4 fehérjeszubsztrátot. A MASP-2 zimogén, egyláncú formája tehát tranziens jelleggel képes felvenni az aktív enzimre jellemző térszerkezetet, amit a fehérjeszubsztráttal való kölcsönhatás stabilizál. A zimogén proteolitikus aktivitása az autoaktiválódási folyamat kulcsa, aminek első lépésében egy zimogén proteáz hasít egy másik zimogén molekulát. Az autoaktivációs képességgel rendelkező szerin proteázok SP doménje flexibilisebb térszerkezettel rendelkezik, mint a nem-autoaktiválódóké.

A MASP-1 szubsztrátspecifitása, fiziológiás szerepe egyike volt a legvitatottabb kérdéseknek az elmúlt évtized során. Munkánk során számos új megállapítást tettünk a MASP-1 szerepével kapcsolatban. Legfontosabb új eredményeink a következők:

- Megmutattuk, hogy a MASP-1 a MASP-2-nél gyorsabban autoaktiválódik, és az aktív MASP-1 további autolízisre hajlamos az Arg⁵⁰⁴-Asp⁵⁰⁵ kötés mentén. A MASP-1 proteolitikus aktivitása detektálható zselatin zimográfiával, ami egyedülálló a komplement proteázok között és jelzi, hogy a MASP-1 enzimatikus tulajdonságaiban eltér a rokon proteázoktól.
- Megcáfoltuk, azt a téves nézetet, miszerint a MASP-1 önmagában C3-konvertázként működne. A MASP-1 a tioészter kötésében hidrolizált C3 molekulát viszonylag hatékonyan hasítja, azonban az intakt C3 molekulát csak kis sebességgel. Valószínűleg a MASP-1 csak a hidrolizált C3 molekulát képes hasítani és az intakt C3 esetében mért aktivitás a hidrolízis következménye. Az irodalomban korábban közölt ellentmondásos eredmények a mérésekhez használt C3 preparátumok eltérő C3(H₂O) tartalmának voltak köszönhetőek.
- Kimutattuk, hogy a MASP-1 a komplement komponensek közül egyedül a C2-t hasítja számottevő hatékonysággal ($k_{\text{cat}}/K_M=30000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ez önmagában nem elegendő a C3-konvertáz (C4b2a) képzéshez, viszont a MASP-2 C3-konvertáz képző hatékonyságát megnövelheti.
- A MASP-1 szubsztrátspecifitását vizsgálva számos jel utal arra, hogy a MASP-1 hasonlít a trombinra. A MASP-1 a P1 helyen arginint tartalmazó szubsztrátokat

preferálja és hasítja a fibrinogént és a XIII-faktort, térhálós fibrin polimert hozva létre. A lokális koaguláció a természetes immunitás egyik ősi mechanizmusa, ami megakadályozza a fertőző mikroorganizmusok szervezetben belüli elterjedését. A MASP-1, mint a C1r/C1s/MASP proteáz család legősibb tagja, hidat képez a komplement és a koagulációs kaszkád között. Megmutattuk, hogy a MASP-1 leghatékonyabb inhibitora az antitrombin heparin jelenlétében.

- Felfedeztük a komplementrendszer egy új funkcióját, a proteáz általi közvetlen sejtaktiválást. A MASP-1 proteolitikus aktivitása révén képes endotél sejteket aktiválni. A MASP-1, a trombinhoz hasonlóan, hasítja a PAR4 receptort az endotél sejtek felszínén. A PAR4 hasításának proinflammatorikus következményei vannak: kalcium szignál, NF- κ B transzlokáció, p38 MAP-kináz foszforiláció. A PAR4 általi endotél sejtaktiváció elősegítheti a leukociták toborzását, letapadását és gördülését (rolling).
- Proteomikai módszerrel azonosítottuk a MASP-1 egy újabb szubsztrátját: a nagymolekulasúlyú kininogént. A MASP-1 képes a kininogénből felszabadítani a vazóaktív hatású bradykinin peptidet. A reakció hatékonysága meglehetősen alacsony, azonban lokálisan hozzájárulhat a komplementaktiválás által gerjesztett gyulladási folyamatokhoz.
- A MASP-1 CCP1-CCP2-SP katalitikus fragmentumának általunk meghatározott térszerkezete magyarázatot ad a MASP-1 viszonylag széles szubsztrátspecifitására. A MASP-1 felszíni topológiája inkább hasonlít a széles szubsztrátspecifitással rendelkező tripszinéhez, mint a szűk specifitású komplement proteázokéhoz. A MASP-1 szubsztrátkötő árka széles és viszonylag nyitott. A MASP-1 potenciális proteolitikus aktivitását ugyanakkor csökkenti a hosszú B-hurok (60-as hurok) és az a belső sóhíd, amit az S1 aszparaginsav (Asp⁶⁴⁰) alakít ki egy belső arginin oldallánccal (Arg⁶⁷⁷).
- *In vitro* evolúciós technikával (fág bemutatás) lektin út specifikus inhibitorokat fejlesztettünk ki. A napraforgó tripszin inhibitorból kiindulva olyan kanonikus inhibitorokat szelektáltunk, amelyek csak a MASP-okat gátolják. Az SFMI-2 inhibitor csak a MASP-2-t gátolja ($K_i=180$ nM), míg az SFMI-1 erősen gátolja a MASP-1-et ($K_i=65$ nM), a MASP-2-t viszont csak jóval gyengébben ($K_i=1030$ nM). Mindkét inhibitor szelektíven gátolta a lektin utat, azonban a MASP-1-et is gátló inhibitor a mérésben hatékonyabbnak bizonyult, mint a csak MASP-2-t gátló. Azt is kimutattuk, hogy, zimogén komponensekből kiindulva, a MASP-1 gátlása megakadályozta a C4 MASP-2 általi hasítását. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a MASP-1-nek fontos szerepe van a lektin út beindításában. A MASP-1 egyedül nem képes beindítani a lektin utat, mivel nem képes C4-et hasítani, azonban normál humán szérumban mégis kulcsszerepet játszik az aktiválódásban, nagy valószínűséggel a zimogén MASP-2 gyors hasításán keresztül. Mindezek alapján a MASP-1 egy új targetnek tekinthető a patológus komplementaktiválódás gátlásában.

- Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a MASP-1 a legérdekesebb, legsokoldalúbb proteáz a komplementrendszerben. Egyik legfontosabb funkciója a lektin út beindítása MASP-2 aktiválása és C2 hasítása által, míg a komplementrendszeren kívüli szubsztrátjainak hasítása révén hozzájárul egy hatékonyabb természetes immunválasz felépüléséhez. A MASP-1, hasonlóan a trombinhoz, egyszerre széles specificitású és szelektív, mivel az összes eddig azonosított természetes szubsztrátja az immunválasszal kapcsolatos. A MASP-1 szerepe a felismerőmolekulák által közvetített veszély szignálokra adott sokrétű válasz beindításában van.

További tervek, perspektívák

A komplementrendszer kutatása világszerte reneszánszát éli. Ennek oka elsősorban az, hogy egyre több betegségről, köztük súlyos, sok millió embert érintő népbetegségről, derül ki, hogy patogenezisében szerepet játszik a komplementrendszer kontrolálatlan aktivitása. Ilyen például a szívinfarktus vagy a stroke során fellépő iszkémia-reperfúziós sérülés, ami elsősorban a lektin úttal kapcsolatos. Az Alzheimer kór esetén a klasszikus út érintettségét mutatták ki, míg az időskori makula degeneráció az alternatív út fő inhibitorának, a H-faktornak a hibás, elégtelen működésével kapcsolatos. Érthető, hogy a komplementrendszer aktiválódási mechanizmusának felderítésére és gyógyszerként alkalmazható komplement gátlószerek kifejlesztésére nagy erőfeszítéseket tesznek nemzetközi szinten.

Ebben a nemzetközi versenyben számos olyan kérdés merül fel, amelynek megválaszolásához kutatócsoportunk, együttműködőink segítségével, a siker reményében láthat hozzá. A legtöbb nyitott kérdés kedvenc kutatási témámmal, a lektin úttal, kapcsolatban merül fel. A második legnagyobb mennyiségben (5 µg/ml) jelenlévő proteáz, a MASP-3, szerepe meglehetősen tisztázatlan. Genetikai vizsgálatok kapcsolatba hozták egy fejlődési rendellenességgel, a 3MC szindrómával, azonban szubsztrátspecificitása és aktiválódási mechanizmusa nem ismert és nem rendelkezünk róla kristályszerkezettel sem. Előkísérleteink szerint, a MASP-3 nem képes autoaktiválódni, tehát egy másik proteáznak kell aktiválnia. Az irodalmi adatok szerint, a komplementrendszer aktiválásához a MASP-3 nem járul hozzá, sőt mivel képes a felismerő molekulákról leszorítani a MASP-1-et és MASP-2-t, inkább inhibitoroként viselkedik. Magam részéről nehezen hihető elképzelésnek tartom, hogy egy proteolitikusan aktív szerin proteáznak ilyen inhibitor jellegű szerepe lenne.

A közelmúltban felmerült a lektin út és az alternatív út kapcsolata. Ugyanabból a laboratóriumból származó egymásnak részben ellentmondó adatok alapján a pro-D-faktor hasításáért a MASP-1 és/vagy a MASP-3 a felelős. A lektin út és az alternatív út esetleges kölcsönhatásainak tisztázása nagyon fontos, hiszen az alternatív út a komplementrendszer legfontosabb jelerősítő mechanizmusa. Ha a lektin út normális működése valóban előfeltétele az alternatív út aktiválódásának, akkor a komplementrendszerrel eddig kialakult képet alaposan felül kell vizsgálnunk. MASP-3 specifikus, *in vitro* evolúciós technikával előállított, kanonikus inhibitorok segítségével ezt a kérdést egyértelműen meg tudnánk válaszolni.

Ugyancsak évek óta tisztázatlan kérdés az MBL-MASP és fikolin-MASP komplexek összetétele és szerkezete. Különösen érdekes ez a kérdés annak az eredményünknek a fényében, hogy a MASP-1 aktiválja a MASP-2-t. További nyitott probléma a nemkatalitikus fragmentumok, a MAp19 és a MAp44 szerepe. Különösen érdekes ebből a szempontból az a tény, hogy a MAp44 legnagyobb mennyiségben a szívizomban fejeződik ki. Elképzelhető, hogy a MAp44 természetes inhibitorként védi a szívizmot a lektin út túlzott aktiválódásától, például iszkémia-reperfúziós esetén.

A lektin út specifikus inhibitorok mellett a másik két útvonalra szelektív inhibitorokat is fejlesztünk. A klasszikus utat a C1r vagy C1s gátlásával, míg az alternatív utat a D-faktor gátlásával lehetne szelektíven blokkolni. Az útvonalspecifikus inhibitorok segítségével állatmodellekben vizsgálhatjuk a három aktiválódási út részvételét a különböző betegségek patomechanizmusában. Az útvonalspecifikus inhibitorok gyógyszerfejlesztés szempontjából is ígéretes molekulák, mivel a komplementkaskád elején avatkoznak be a folyamatba és nem okoznak teljes immunszuppressziót.

Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

*1.) Kardos, J., **Gál, P.**, Szilágyi, L., Thielens, N. M., Szilágyi, K., Lőrincz, Zs., Kulcsár, P., Gráf, L., Arlaud, G. J. and Závodszy, P. (2001) The role of the individual domains in the structure and function of the catalytic region of a modular serine protease, C1r

The Journal of Immunology **167**, 5202-5208

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

Immunobiology **205**, 467-475

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

The Journal of Immunology **170**, 1374-1382

*4.) **Gál, P.**, Harmat, V., Kocsis, A., Bián, T., Barna, L., Ambrus, G., Végh, B., Balczer, J., Sim, R.B., Náráy-Szabó, G. and Závodszy, P. (2005)

A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activation

J. Biol. Chem. **280**, 33435-33444

- 5.) **Gál, P.**, Barna, L., Kocsis, A. and Závodszy P. (2007) Serine proteases of the classical and lectin pathways: Similarities and differences
Immunobiol. **212**, 267-277
- 6.) Kardos, J., Harmat, V., Palló, A., Barabás, O., Szilágyi K., Gráf, L., Náray-Szabó, G., Goto, Y., Závodszy, P., **Gál, P.** (2008) Revisiting the mechanism of the autoactivation of the complement protease C1r in the C1 complex: Structure of the active catalytic region of C1r
Mol. Immunol. **45**, 1752-1760
- 7.) Krarup, A., Gulla, K.C., **Gál, P.**, Hajela, K. and Sim, R.B. (2008) The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen
Biochim Biophys Acta. (Proteins and proteomics) **1784**, 1294-300
- 8.) Dobó, J., Harmat, V., Beinrohr, L., Sebestyén, E., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity
J. Immunol. **183**, 1207-1214
- 9.) Megyeri, M., Makó, V., Beinrohr, L., Doleschall, Z., Prohászka, Z., Cervenak, L., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function
J. Immunol. **183**, 3409-3416
- 10.) Major, B., Kardos, J., Kékesi, K.A., Lőrincz, Z., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2010) Calcium-dependent conformational flexibility of a CUB domain controls activation of the complement serine protease C1r
J. Biol. Chem. **285**, 11863-11869
- 11.) Kocsis, A., Kékesi, K.A., Szász, R., Végh, B.M., Balczer, J., Dobó, J., Závodszy, P., **Gál, P.** and Pál, G. (2010) Selective Inhibition of the Lectin Pathway of Complement with Phage Display Selected Peptides against Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 and -2: Significant Contribution of MASP-1 to Lectin Pathway Activation.
J. Immunol. **185**, 4169-4178
- 12.) Dobó, J., Major, B., Kékesi, K.A., Szabó, I., Megyeri, M., Hajela, K., Juhász, G., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2011) Cleavage of Kininogen and Subsequent Bradykinin Release by the Complement Component: Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1
PLoS ONE 6(5): e20036. doi:10.1371/journal.pone.0020036
- 13.) Kidmose, R.T., Laursen, N.S., Dobó, J., Kjaer, T.R., Sirotkina, S., Yatime, L., Sottrup-Jensen, L., Thiel, S., **Gál, P.** and Andersen, G.R. (2012) Structural basis for activation of the complement system by C4 cleavage
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **109**, 15425-15430

*Megosztott első szerzőség

Az értekezés tárgyában a Ph.D. fokozat megszerzése óta megjelent további saját publikációk

- 1.) **Gál, P.** and Závodszy, P. (1998) Structure and function of the serine-protease subcomponents of C1: Protein engineering studies
Immunobiology **199**, 317-326
- 2.) Dobó, J., **Gál, P.**, Szilágyi, K., Cseh, S., Lőrincz, Zs., Schumaker, V. N. and Závodszy, P. (1999) One active C1r subunit is sufficient for the activity of the complement C1 complex: Stabilization of C1r in the zymogen form by point mutations
The Journal of Immunology **162**, 1108-1112
- 3.) Lőrincz, Zs., **Gál, P.**, Dobó, J., Cseh, S., Szilágyi, K., Ambrus, G. and Závodszy, P. (2000)
The cleavage of two C1s subunits by a single active C1r reveals substantial flexibility of the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer in the C1 complex
The Journal of Immunology **165**, 2048-2051
- 4.) **Gál, P.** and Ambrus, G. (2001) Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs
Current Protein and Peptide Science **2**, 43-59
- 5.) Lacroix, M., Ebel, C., Kardos, J., Dobó, J., **Gál, P.**, Závodszy, P., Arlaud, G. J. and Thielens, N. M. (2001) Assembly and enzymatic properties of the catalytic domain of human complement protease C1r
The Journal of Biological Chemistry **276**, 36233-36240
- 6.) **Gál, P.**, Ambrus, G. and Závodszy, P. (2002) C1s, the protease messenger of C1. Structure, function and physiological significance
Immunobiology **205**, 383-394
- 7.) Sárvári, M., Vágó, I., Wéber, C. S., Nagy, J., **Gál, P.**, Mák, M., Kósa, J. P., Závodszy, P. and Pázmány, T. (2003) Inhibition of C1q- β -amyloid binding protects hippocampal cells against complement mediated toxicity
Journal of Neuroimmunology **137**, 12-18
- 8.) Presanis, J. S., Hajela, K., Ambrus, G., **Gál, P.** and Sim, R. B. (2004) Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2
Mol. Immunol. **40**, 921-929
- *9.) Harmat, V., **Gál, P.**, Kardos, J., Szilágyi, K., Ambrus, G., Végh, B., Náray-Szabó, G. and Závodszy, P. (2004)
The structure of MASP-2 reveals that nearly identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions
J. Mol. Biol. **342**, 1533-1546

- 10.) Beinrohr, L., Harmat, V., Dobó, J., Lőrincz, Zs., **Gál, P.**, and Závodszy, P. (2007) C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease
J. Biol. Chem. **282**, 21100-21109
- 11.) Krarup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., **Gál, P.** and Sim, R.B. (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2
PLoS ONE 2(7): e623. doi:10.1371/journal.pone.0000623
- 12.) Szeplaki, G., Varga, L., Laki, J., Dosa, E., Rugonfalvi-Kiss, S., Madsen, H.O., Prohaszka, Z., Kocsis, A., **Gál, P.**, Szabo, A., Acsady, G., Karadi, I., Selmei, L., Garred, P., Füst, G., Entz, L. (2007) Low C1-inhibitor levels predict early restenosis after eversion carotid endarterectomy
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **27**, 2756-62
- 13.) Varga, L., Széplaki, G., Laki, J., Kocsis, A., Kristóf, K., **Gál, P.**, Bajtay, Zs., Wieslander, J., Daha, M.R., Garred, P., Madsen, H., Füst, G., Frakas, H. (2008) Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema
Clin. Exp. Immunol. **153**, 68-74
- 14.) Dobó, J., Harmat, V., Sebestyén, E., Beinrohr, L., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannose-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region
Acta Crystallographica Section F **64**, 781-784
- 15.) Beinrohr, L., Dobó, J., Závodszy, P. and **Gál, P.** (2008) C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation
Trends in Molecular Medicine **14**, 511-521
- 16.) **Gál, P.**, Dobó, J., Závodszy, P. and Sim, R. B. (2009) Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions
Mol. Immunol. 46, 2745-2752
- 17.) Gulla, K.C., Gupta, K., Krarup, A., **Gal, P.**, Schwaeble, W., Sim, R.B., O'Connor, D.C. and Hajela, K. (2010) Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot
Immunology **129**, 482-495
- 18.) Kocsis, J., Mészáros, T., Madaras, B., Tóth, E.K., Kamondi, S., **Gál, P.**, Varga, L., Prohászka, Z. and Füst, G. (2011) High levels of acute phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer
Cell Stress Chaperon. **16**, 49-55
- 19.) Degn, S.E., Jensen, L., **Gál, P.**, Dobó, J., Holmvdad, S.H., Jensenius, J.C. and Thiel, S. (2010) Biological variations of MASP-3 and MASP44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system

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

20.) Láng, A., Szilágyi, K., Major, B., **Gál, P.**, Závodszy, P. and Perczel A. (2010) Intermodule cooperativity in the structure and dynamics of consecutive complement control modules in human C1r

FEBS J. **277**, 3986-98

21.) Láng, A., Major, B., Szilágyi, K., Gáspári, Z., **Gál, P.**, Závodszy, P. and Perczel, A. (2010) Interaction between separated consecutive complement control modules of human C1r: Implications for dimerization of the full-length protease

FEBS Lett. **584**, 4565-4569

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

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

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

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

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

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

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

PLoS ONE 7(4): e35690

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

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **109**, 10498-10503

27.) **Gál, P.**, Dobó, J., Beinrohr, L., Pál, G. and Závodszy, P. (2013) Inhibition of the serine proteases of the complement system

Adv. Exp. Med. Biol. **734**, 23-40