

Gál Péter: „A komplementrendszer aktiválódásának kezdeti lépései: Moduláris szerin proteázok szerepe a természetes immunválasz beindításában” című MTA doktori értekezésének bírálata.

Gál Péter doktori értekezésében – az irodalmi hivatkozások kivételével - 105 oldalon ismerteti tudományos eredményeit. A disszertáció alapjául 13, az egyetemi doktori PhD megszerzése után született közlemény szolgált. Ezek közül négy publikációban (közülük háromban megosztott) első szerző, míg öt publikációban utolsó szerző. Ezen publikációk létrejöttében meghatározó szerepet játszott, elsősorban a problémafelvetés, tudományos koncepció kidolgozása, kísérletek tervezése és kiértékelése, következtetések levonása és a cikkek megírása terén, valamint bizonyos esetekben a kísérleti munkából is kivette a részét. A jelölt igen jelentős tudományos teljesítményét mutatja, hogy az értekezés témájában megjelent további 30 közleménynek is az első vagy társszerzője, melyek eredményeit a disszertációban nem ismerteti részletesen. Mind a disszertációt megalapozó, mind a további közlemények döntő többsége nagy presztízsű nemzetközi folyóiratban (J. Immunol, JBC, PNAS, Plos one) jelent meg. A mű hiteles adatokat tartalmaz.

A disszertáció kiválóan, és nagy gondossággal megírt, könnyen olvasható. Véleményem szerint külön értéke, hogy magyar nyelven íródott, így egyrészt hozzájárul a magyar tudományos nyelv ápolásához, másrészt ez eleve lehetetlenné tette az eredeti közleményekből való közvetlen szövegmásolást. Felépítése is nagyon jó, a személyes kötődést is bemutató bevezetést a munka körülményeinek és a szakmai hozzájárulásoknak a részletes leírása, a tudományterületi háttér kiváló, saját hozzájárulásokat is tartalmazó és szakterületen nem annyira járatos olvasót is segítő ismertetése, kérdések és célkitűzések, a módszertani megközelítések rövid összefoglalása, a kutatási eredmények és azok megbeszélése követi. A szerző az összefoglalás előtt ismerteti a további tudományos terveit és a perspektívákat is. A részletes köszönetnyilvánítás után irodalomjegyzék zárja a disszertációt. A bíráló – vagy olvasó – munkáját jelentősen megkönnyítette volna, ha a disszertáció alapjául szolgáló közlemények a disszertáció végére bekerültek volna, különös tekintettel arra, hogy a módszerek leírása a disszertációban csak igen vázlatos, és a közleményekre hivatkozik.

A gondos munka bizonyítékként elírás kifejezetten ritka a pályázatban („C-terminális” a 21. oldalon, „követtük” a 27. oldalon).

A disszertációban kifejtett új eredmények (rövid összefoglalásban):

C1r szerepével, aktiválódásával kapcsolatban:

Bizonyították, hogy az autoaktiváció a szerin proteáz (SP) domén inherens tulajdonsága. A CCP domének jelenléte ugyan gyorsíthatja az autoaktivációt, de annak az enzim dimerizációja nem előfeltétele.

A CCP domének stabilizálják az SP domént, a katalitikus hatékonyság növelése valószínűleg „exosite-ok” révén történik.

A CCP1 modul kulcsszerepet játszik a C1r dimerizációban: ezt kristályszerkezeti adatok is megerősítették.

A C1r (CCP1-CCP2-SP)₂ kristályszerkezete alapján az aktív dimert erősebb CCP1-SP kölcsönhatás stabilizálja, mint a zimogént, valamint a dimernek az autoaktivációhoz fel kell bomlania. Az aktív C1r kristályszerkezetében két szomszédos dimer molekulái enzim-termék komplexet alkotnak.

Az aktív C1r kristályszerkezete alapján új („split and reassembly”) modellt dolgoztak ki a C1r autoaktiválódására a C1 komplexen belül.

Kimutatták, hogy a CUB2 modul kalcium hiányában nagyfokú flexibilitással rendelkezik, ami kulcsfontosságú az aktiválódás során. Szérumban a CUB2 domén az alacsony Ca²⁺ koncentráció miatt stabilitásának határán van és biztosítja az aktiválódási folyamathoz szükséges flexibilitást.

A lektin útvonallal kapcsolatban:

Kimutatták, hogy a MASP-2 SP doménje a C2 szubsztrátot nagy hatékonysággal képes hasítani, míg a C4 hasításhoz szükség van legalább a CCP2 domén jelenlétére. A CCP2 „exosite” kötőhelyek már a zimogén MASP-2 molekulában is megtalálhatóak.

A MASP-2-C4 komplex szerkezet igazolta a CCP domének szerepével kapcsolatos korábbi következtetéseiket, továbbá egy új „exosite” kötőhelyet is azonosítottak a C4 szulfotirozin régiója és a MASP-2 SP doménje között.

A MASP-2 zimogén térszerkezete proteolitikusan inaktív konformációt mutat, jó összhangban azzal, hogy a zimogén forma nem képes kromogén szubsztrátokat hasítani, ugyanakkor meglepően jól hasítja a C4 fehérjét. A zimogén proteolitikus aktivitása az autoaktiválási folyamat kulcsa. Az autoaktivációs képességgel rendelkező szerin proteázok SP doménje flexibilisebb térszerkezettel rendelkezik mint a nem autoaktiválódóké.

A MASP-1 specificitásával és fiziológiai szerepével kapcsolatban:

A MASP-1 gyorsabban autoaktiválódik mint a MASP-2. A MASP-1 viszonylag széles specificitású proteáz, aktivitása – egyedülálló módon a komplement proteázok között - zselatin zimográfiával detektálható.

A MASP-1 önmagában nem képes C3 konvertázként működni, egyedül a tioészter kötésében hidrolizált C3 molekulát képes viszonylag hatékonyan hasítani. A MASP-1 a komplement komponensek közül egyedül a C2-t hasítja számottevő hatékonysággal.

A MASP-1 specificitásában hasonlít a trombinra (P1 Arg preferencia, fibrinogén, XIII hasítási képesség). A MASP-1 mint a C1r/C1s/MASP proteáz család legősibb tagja, hidat képez a komplement és a koagulációs kaszkád között. A MASP-1 leghatékonyabb inhibitora az antitrombin, heparin jelenlétében.

A MASP-1 a PAR4 receptorok aktiválásán keresztül képes endotél sejteket aktiválni, mely aktiválásnak proinflammatorikus hatásai (NF-kB transzlokáció, p38 MAPK foszforiláció) vannak.

Proteomikai módszerrel kimutatták, hogy a MASP-1 képes a nagy molekulásúlyú kininogénből bradikinin kihasítására.

A MASP-1 CCP1-CCP2-SP térszerkezete magyarázattal szolgált a MASP-1 viszonylag szélesebb specificitására (topológiai hasonlóság a tripszinhez, széles és nyitott szubsztrátkötő árok).

In vitro evolúciós technikával, a napraforgó tripszin inhibitorból kiindulva lektin út specifikus inhibitorokat fejlesztettek ki. Az inhibitorok felhasználásával kapott eredmények arra utaltak, hogy míg a MASP-1 egyedül nem képes beindítani a lektin utat, normál szérumban mégis kulcsszerepet játszik az aktiválódásban, nagy valószínűséggel a zimogén MASP2 gyors hasításán keresztül. Mindezek alapján a MASP1 egy új gyógyszercélpontnak tekinthető a patológiás komplementaktiválódás gátlásában.

Néhány észrevételem a dolgozattal kapcsolatban:

Az egyébként kiváló és igen szemléletes ábráknál nincs külön feltüntetve az ábra forrása, így nem derül ki, hogy ezek mennyiben saját ábrák illetve mások közleményéből származnak-e (módosításokkal)?

A 43. oldalon bemutatott rekombináns MASP fragmentumok SDS-PAGE analízisének feltűnő az extra sávok jelenléte a MASP-1 CCP1-CCP2-SP mintánál, azonban erre a magyarázat csak a 60. oldalon található. Szerencsésebb lett volna ezt előbb, az ábra apropóján (is) megtagyalni.

Kérdéseim a dolgozattal kapcsolatban:

A jelölt a 11. oldalon a C1r és C1s aktiválódását kimotripszin-szerű aktiválásként jellemzi, ezzel szemben a 19. oldalon ezt írja a C1r és C1s CCP1-CCP2-SP fragmentumának jellemzésénél: „Az aktiválódás mechanizmusa megegyezik a tripszinnél leírtakkal...”. Tekintettel arra, hogy a kimotripszinogén és a tripszinogén aktiválódása alapvetően eltérő, melyik megállapítás az igaz?

A jelölt bakteriális expresszióban kapott megfelelő kitermeléssel enzimeket. Ugyanakkor ismert, hogy a glikoziláció ezen esetekben nem történik meg. Milyen bizonyítékok igazolják, hogy a bakteriális expresszióval előállított rekombináns fehérjék enzimkinetikailag és funkcionálisan is ekvivalensek az eukarióta sejtekben termelt fiziológias fehérjével?

A jelölt a renaturált C1r fragmensek megfelelő feltekeredésének bizonyítékaként az autoproteolízist tekinti. Ez azonban csak abban az esetben lenne teljes mértékben bizonyító erejű, ha intramolekuláris aktiválás történne, miközben intermolekuláris aktiválás történik. Épp ezért az első táblázat adatai csak abban az esetben összevethetőek, ha feltételezzük, hogy a feltekeredési hatékonyság mindegyik fragmentum esetén azonos mértékű. A feltekeredés hatékonyságának vizsgálatára végeztek-e aktív centrum titrálást?

A 61. oldalon bemutatott MASP-1 C3i hasításnál 1:5 enzim-szubsztrát arányt választottak. Ez milyen megfontolások alapján történt?

A fenti észrevételek a dolgozat lényegi részét nem érintik.

Összefoglalva, Gál Péter PhD fokozatának megszerzése után is jelentős, eredeti tudományos eredményekkel járult hozzá a komplementrendszer működésének, aktiválódásának megismeréséhez. Tudományos teljesítménye messzemenően megfelel az MTA doktori fokozathoz elvárt követelményeknek, ezért a mű nyilvános vitára tűzését és elfogadását javaslom.

2013. december 20.



Dr. Tózsér József
egyetemi tanár
MTA doktora