

Válasz Dr. Farkas Henriette (egyetemi tanár, MTA doktora) bírálói véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Farkas Henriette értekezésemről adott pozitív értékelését és a bírálat gyors elkészítését.

Bírálómnak a dolgozatommal kapcsolatos kérdéseire adott válaszaimat az alábbiakban foglalom össze.

1.) *A vizsgálatok nagy részét oldatfázisban végezték. A szérum kaszkádrendszerek aktiválódása általában felszíneken jön létre in vivo. Hogyan lehetne modellezni ezeket a felszíneket in vitro?*

Bírálómnak igaza van abban, hogy a vizsgálatok nagy részét oldatfázisban végeztük és ez nem modellezi teljes mértékben a fiziológiás szituációt, ahol az aktiválódás felszíneken történik. Mindazonáltal végeztünk olyan kísérleteket is (pl. C3, C4 depozíció), ahol különböző felszíneken indítottuk a komplementrendszer különböző aktiválási útjait. A klasszikus utat immunkomplexekkel fedett felszínen, az alternatív utat endotoxinnal fedett felszínen, az MBL-lektin utat mannánnal fedett felszínen, míg a fikolin-lektin utat acetilált BSA-val fedett felszínen indítottuk. A komplementrendszer egyik legfontosabb jellemzője, hogy lokálisan hat, csak a megfelelő mintázattal rendelkező idegen felszíneken indul be és, legalábbis normál esetben, nem terjed át a saját sejtekre. A komplement szerin proteázok szupramolekuláris komplexek részei, ahol olyan nemkatalitikus fehérjékhez (C1q, MBL, fikolinok, C3b, C4b) kötődnek, amelyek a proteázokat a megtámadandó felszínhez rögzítik ezáltal biztosítva a lokális hatást. Az általunk legtöbbször használt rekombináns katalitikus fragmentumok sajnos nem építhetők be a szupramolekuláris komplexekbe, mivel hiányoznak róluk az N-terminális kölcsönható domének. Arra azonban számos bizonyítékunk van, hogy enzimológiai tekintetben a komplexekben lévő proteázok ugyanúgy viselkednek, mint a szabadon úszó proteolitikus fragmentumok; ugyanazokat a szubsztrátokat ugyanolyan hatékonysággal hasítják. Az is valószínű ugyanakkor, hogy a komplexekben lehetőség van a proteázok aktivitásának sztérikus faktorok általi szabályzására. Valószínű például, hogy a zimogén MASP-ok csak az aktiválódás pillanatában, miután az MBL lekött a felszínre, „pattannak ki” az MBL-MASP komplexből ezáltal minimálisra csökkentve az oldatbeli nemkívánatos spontán autoaktiválódást, viszont lehetővé téve veszély esetén a hatékony aktiválódást.

2.) *A MASP-1 legerősebb inhibitora az antitrombin. A kísérletekben mégis C1-inhibítort használtak. Mi volt az oka?*

Az antitrombin heparin jelenlétében valóban a legerősebb inhibitora a MASP-1-nek ($k_{as}=4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Dobó és mtsi. 2009 J. Immunol. 183:1207). Ez a tény nem annyira meglepő annak fényében, hogy a MASP-1 számos tulajdonságában a trombinra emlékeztet. Ugyanakkor a korai komplement proteázok közös inhibitora, a C1-inhibitor, szintén jó

inhibitora a MASP-1-nek, heparin jelenlététől függetlenül ($k_{as}=6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). A kísérleteinkben tulajdonképpen bármelyik inhibitort használhattuk volna. Egy, a dolgozat beadása után megjelent publikációban (Paréj és mtsi. 2013 Mol. Immunol. 54:415) megmutattuk, hogy antitrombinnal hatékonyan gátolható a lektin út normál humán szérumban. Korábbi cikkeinkben elsősorban azért használtunk C1-inhibitort, mert széles körben elfogadott inhibitora a lektin útnak és nem igényli heparin jelenlétét. Érdekességként megemlítem, hogy egy svéd kutatócsoport is kimutatta az antitrombin lektin út gátló hatását vérlemezkék felszínén (Kozarcanin és mtsi. 2012 Immunobiol. 217:1129). Az aktivált vérlemezkék ugyanis kötik felszínükön az MBL-t és a fikolinokat, ami a MASP-ok aktiválódását, a lektin út beindulását eredményezi. A vérlemezkék felszínén egyaránt kimutattak MASP-1-C1-inhibitor és MASP-1-antitrombin komplexeket. A vérlemezkék felszínén lévő heparán szulfát és az aktiválódás során felszabaduló kondroitin szulfát a heparinhoz hasonló nagy negatív töltéssel rendelkező molekulák, amelyek nagymértékben meggyorsítják a MASP-1 antitrombin reakciót.

3.) *Mi az α 2-makroglobulin fiziológiás hatása? Melyik proteáz inhibitornak van a legjelentősebb szabályozó szerepe a lektin út aktiválódásában?*

Az α 2-makroglobulin egy széles specificitású proteáz inhibitor, amely sokféle proteázt képes gátolni mechanizmustól függetlenül (ezért pán-proteáz inhibitornak is nevezik). Inhibitor hatását azáltal fejt ki, hogy a reaktív hurok hasadása következtében fellépő konformációváltozás eredményeként az aktív proteázt izolálja környezetétől, mintegy kalitkába zárja, megakadályozva ezzel, hogy a proteáz újabb fehérjeszubsztrátokat tudjon hasítani. Azok a kis molekulás szubsztrátok azonban, amelyek bejutnak a fehérjekalitka belsejébe el fognak hasadni, mert a proteáz aktív centruma sértetlen marad. Az α 2-makroglobulin négy nagyméretű (1451 aminosav) alegységből álló tetramer, és egy ilyen tetramer akár két proteáz molekulát is képes csapdázni. Az α 2-makroglobulin a vérben magas koncentrációban (1-2 g/L) jelenlévő fehérje, koncentrációja összemérhető a legtöményebb komplement fehérjével, a C3 koncentrációjával. *In vitro* gátolja a véralvadás és a fibrinolízis proteázait, fiziológiai szerepe azonban vitatott. Alacsony α 2-makroglobulin koncentráció a vérben nem okoz semmilyen tünetet. Méréseink szerint az α 2-makroglobulin a MASP-1 katalitikus fragmentum aktivitását oldat fázisban viszonylag hatékonyan, míg a MASP-2 aktivitását csak kevésbé gátolja. Többféle módszerrel is kimutattuk, hogy a MASP-1 oldatfázisban komplexet képez az α 2-makroglobulinnal, vagyis az inhibitor képes csapdába ejteni a MASP-1-et (Paréj és mtsi. 2013 Mol. Immunol. 54:415). Ehhez képes meglepő volt az az eredmény, hogy mannánnal borított felszínre lekötődő MBL-MASP komplexek esetében az inhibitorhatás nem észlelhető. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a nagyméretű makroglobulin tetramer nem fér hozzá a felszínre rögzített MASP-1-hez, más szóval sztérikus gátlás áll fenn. Ezek alapján én úgy gondolom, hogy a α 2-makroglobulinnak az oldatfázisban keringő MBL/fikolin-MASP komplexek esetében lehet gátló szerepe, ami megakadályozhatja a rendszer spontán aktiválódását. A komplexek aktivációs felszínre való kötődése után azonban a proteázok felszabadulnak az α 2-makroglobulin inhibitor hatása alól és a lektin út

aktiválódik. Hangsúlyozom azonban, hogy ez csak egy hipotézis, amit még további kísérletekkel kell igazolni vagy cáfolni. Összefoglalva az inhibitorokkal kapcsolatos eredményeinket és az irodalmi adatokat elmondhatjuk, hogy a C1-inhibitor és az antitrombin egyformán hatékony inhibitorai a lektin útnak. Az antitrombin hatását nagymértékben növeli a polianionok (pl. heparin, heparán szulfát, kondroitin szulfát) jelenléte (pl. sejtek felszínén). Az α 2-makroglobulin szerepe még nem teljesen tisztázott, valószínűleg a spontán aktivációt gátolja a vérben.

4.) Mivel a kaszkádrendszerek szorosan összefüggnek egymással és így egy finom egyensúlyi állapotot tartanak fenn, aktiválódásuk számos úton lehetséges. Vajon hogyan modellezhető ez a komplex rendszer? Van-e lehetőség több kaszkádrendszer egyidejű vizsgálatára.

A szerin proteáz enzimek a vérben egy egységes hálózatot alkotnak, amelynek felosztása diszkrét kaszkádrendszerekre (véralvadás, fibrinolízis, komplement, kinin) didaktikai szempontból hasznos ugyan, de meglehetősen önkényes. Ezért azután sorra jelennek meg olyan publikációk, amelyek a különböző kaszkádrendszerek közötti kölcsönhatásokat (keresztaktiválás, keresztgátlás) mint különleges jelenségeket tárgyalják, jóllehet az lenne a furcsa, ha nem észlelnénk ilyen kölcsönhatásokat. Az utóbbi időben a véralvadás és a lektin út kölcsönhatásaival kapcsolatban mi is több cikket publikáltunk. Számos jel utal arra, hogyha a véralvadás beindul, arra a lektin út is reagál; és fordítva, a lektin út enzimeit, akár közvetlenül (MASP-1), akár közvetve (MASP-2) hozzájárulhatnak a véralvadáshoz. Az utóbbi idők szerintem egyik legizgalmasabb eredménye ebből a szempontból az volt, hogy a trombólízis egér modelljében a MASP-1 hiánya (La Bonte és mtsi. 2012 J. Immunol. 188:885) vagy gátlása (Pavlov és mtsi. 2012 Circulation 126:2227) meggátolta a trombus képződést. Ehhez hasonló fenotípust mutatnak a XII-faktor (a kontaktrendszer indító enzime) deficiens egerek is. Ennek terápiás szempontból is nagy jelentősége lehet, hiszen ez azt jelenti, hogy egy kaszkádrendszerbe (komplement) beavatkozva egy másik kaszkádrendszeren (kontakt) kapunk hatást. A vérben lévő komplex szerin proteáz rendszer modellezése hálózatelméleti kérdés, amihez bevallom, jómagam nem értek. A szűken vett komplementrendszer matematikai modellezésére több próbálkozás is történt (Hirayama és mtsi. 1996 Biosystems 39:173; Korotaevskiy és mtsi. 2009 Math. Biosci. 222:127; Liu és mtsi. 2011 Plos Comp. Biol. e1001059). Ezek a modellek olyan differenciálegyenleteket használnak, amelyek tartalmazzák a különféle biokémiai reakciók kísérletesen megállapított kinetikai állandóit. Sajnos azonban nem minden reakcióra rendelkezünk megbízható kinetikai adatokkal, ilyen esetekben csak becslésekre hagyatkozhatunk, ami nyilván csökkenti a modellek megbízhatóságát. Ráadásul ezek a modellek a lektin utat nem is tartalmazzák, mivel a közelmúltig nem volt tisztázva a mechanizmus és megbízható kinetikai állandók sem álltak rendelkezésre. Remélem, hogy kutatócsoportunk munkája hozzájárult egy pontosabb matematikai modell jövőbeli megalkotásához. Több kaszkádrendszer egyidejű kísérletes vizsgálata szintén bonyolult feladat. Legegyszerűbb megközelítés talán bizonyos végtermékek (pl. szerpin-proteáz kovalens komplexek) mennyiségének meghatározása pl. ELISA rendszerrel. Svájci együttműködő partnerünkkel jelenleg is folytatunk olyan

vizsgálatokat, amelyekben a lektin út hatását vizsgáljuk a véralvadás időbeli lefolyására és a kialakult véralvadék mechanikai tulajdonságaira (Jenny és mtsi 2013 Mol. Immunol. 56:266).

5.) *Elképzelhető-e, hogy „kereszt” komplexek (MBL-C1r₂s₂ és C1q-MASP) alakuljanak ki in vivo? Hexamer MBL képes a C1r₂s₂ tetramert leghatékonyabban aktiválni, jöllehet a tetramer az MBL leggyakoribb formája. In vivo a hexamer forma milyen százalékban fordul elő és hogyan alakul ki?*

Az MBL-C1r₂s₂ és a C1q-MASP „kereszt” komplexek *in vitro* kialakulását többen is igazolták és azt is megmutatták, hogy a felismerő molekulák aktivációs felszínre kötődése kiváltja a szerin proteáz zimogének aktivációját. A rendelkezésünkre álló egyensúlyi állandók alapján azonban nem valószínű, hogy ilyen komplexek a normál humán szérumban is kialakulnak jelentős mértékben (Phillips és mtsi. 2009 J. Immunol. 182:7708). Mindazonáltal a „kereszt” komplexek kialakulása és a „kereszt” aktiváció mégsem zárható ki teljesen bizonyos speciális esetekben, pl. ha az egyik komponens elfogy aktiválódás közben, vagy pedig eleve hiányzik a szérumból (deficiencia). Tudjuk azonban, hogy csak a nagy oligomerizációs fokú MBL formák képesek megkötni és aktiválni a C1r₂s₂ tetramert, ezért valóban lényeges kérdés a „kereszt” aktiváció szempontjából, hogy ezek milyen százalékban fordulnak elő. Erre vonatkozóan pontos adataink nincsenek, legfeljebb becslésekre hagyatkozhatunk. Különböző MBL preparátumok gélelektroforézissel és géliszűrővel való analízise alapján azt mondhatjuk, hogy a magasabb oligomerizációs fokú formák (pentamer vagy nagyobb) legfeljebb 20%-át teszik ki a teljes preparátumnak. A magasabb oligomerizációs fokú MBL molekulák a szintézis során alakulnak ki a sejtekben és a C1q-tól eltérően az alegységeket teljes mértékben diszulfid hidak tartják össze. Arról nincs információnk, hogy a különböző szövetekben (máj, vese) szintetizálódó MBL oligomerizációs foka azonos vagy eltérő-e.

6.) *A MASP-2 fragmentumok reakciókészségét vizsgálva azt találták, hogy a CCP1-CCP2-SP fragmentum sokkal hatékonyabb a C4 hasításnál, mint az SP domén, jöllehet nem éri el a CCP2-SP fragmentum hatékonyságát. Mi ennek az oka? Mi a CCP1 szerepe?*

Enzimkinetikai méréseink tanúsága szerint a CCP2 domén jelenléte drasztikusan megnöveli a MASP-2 szerin proteáz C4 hasító képességét. A CCP1 domén ezt a hatásfokot már nem növeli, sőt inkább valamelyest csökkenti. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a C1r esetében is, bár ott tudjuk, hogy a CCP1 domén felelős a dimerizációért és a dimer képződése kézenfekvő magyarázat lehet a hatásfok csökkenésre. A MASP-2-C4 kristályszerkezet azt mutatja, hogy a C4 C345C doménje kölcsönhatásba lép a MASP-2 CCP doménjeivel, elsősorban a negatívan töltött CCP2 doménnel. Ez megmagyarázza azt, hogy miért elég önmagában a CCP2 domén jelenléte a hatékony C4 hasításhoz. A kisebb, kompaktabb CCP2-SP fragmentum valószínűleg könnyebben tud kölcsönhatást kialakítani oldatfázisban a C4 molekulával, mint a nagyobb, flexibilisebb háromdoménes konstrukció. A CCP1 domén szerepe nem ismert. Valószínűleg távtartóként működik a CUB2 és a CCP2 domének között, lehetővé téve, hogy az MBL aktivációs felszínre való kötődése után a MASP-2 szerin proteáz doménje kellően messzire ki

tudjon nyúlni ahhoz a komplexből, hogy egy másik komplexen lévő MASP-1 aktiválni tudja, illetve jól hozzá tudjon férni a nagyméretű C4 szubsztráthoz.

7.) Vajon mitől függ, hogy a lektin út komponenseinek a hiánya okoz-e betegséget?

A lektin út komponensei hiánya következtében fellépő betegségekről még keveset tudunk. Ennek elsősorban az az oka, hogy nem állnak rendelkezésre minden komponens esetében megbízható mérési rendszerek a koncentráció pontos meghatározására. Az MBL deficiencia régen ismert és viszonylag gyakori, tulajdonképpen ez vezetett a lektin út felfedezéséhez. Az MBL hiánya kisgyermek korban, amikor még nem alakult ki teljesen az adaptív immunitás, fertőzésekre való fokozott fogékonyságra vezet. Szérumból izolált, vagy rekombináns MBL adásával a komplementrendszer normális működése helyreállítható. Rekombináns MBL terápiával próbálkoztak más immunhiányos állapotú betegeknél is, pl. rákos betegeknél, akik kemoterápiás kezelést kapnak. A MASP-ok deficienciáiról jóval kevesebbet tudunk. A mai napig mindössze kilenc esetben mutattak ki MASP-2 deficienciát. Ebben az esetben olyan mutációról van szó (Asp120Gly), amely megakadályozza, hogy a MASP-2 kötődjön az MBL-hez, tehát nem alakulnak ki az aktivációhoz szükséges MBL-MASP-2 komplexek (Stengaard-Pedersen és mtsi. 2003 N. Engl. J. Med. 349:554). A kilenc emberből öt teljesen egészségesnek bizonyult, a MASP-2 mutáció semmilyen tünetet nem okozott. Három betegnél közepes erősségű, visszatérő fertőzéseket észleltek gyermekkorban. Végül egy betegnél igen súlyos tünetek léptek fel, visszatérő súlyos tüdőgyulladás, ami többszöri, intenzív osztályon való kórházi kezelést igényelt még felnőtt korban is. Mindezekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy önmagában a MASP-2, és ezáltal a lektin út, deficiencia nem okoz betegséget, feltéve, hogy az immunrendszer többi része megfelelően működik. Ha azonban az immunrendszer más része is sérült, akkor a MASP-2 deficiencia súlyosbítja a betegséget. Ezek alapján a MASP-2 deficienciát mint betegség módosító (disease modifier) tényezőt tekintik az irodalomban. Mint azt dolgozatomban is írtam, az utóbbi évek egyik legnagyobb szenzációja a lektin úttal kapcsolatban az volt, hogy kiderült, hogy a MASP-3 hiánya súlyos fejlődési rendellenességhez, a 3MC szindróma kialakulásához vezet. Ez arra utal, hogy a lektin útnak fontos szerepe lehet az egyedfejlődésben is. Mivel a MASP-1 és a MASP-3 fehérjét ugyanaz a gén kódolja, a MASP-3 deficiens betegek egy része MASP-1 deficiens is egyben. Az egyik ilyen beteg szérumát felhasználva kimutatták, hogy MASP-1 hiányában a lektin út egyáltalán nem működik (Degn és mtsi. 2012 J. Immunol. 189:3957). Ezek alapján feltételezhető, hogy a MASP-1 deficiencia, a MASP-2 deficienciához hasonló tüneteket okozhat. Mivel a MASP-1 koncentráció meghatározására csak nemrég sikerült egy mérési protokollt beállítani még nem áll rendelkezésünkre megfelelő mennyiségű adat a MASP-1 deficiencia gyakoriságáról.

8.) A C1-INH deficiens egyének jó modellt jelenthetnének a klasszikus és lektin út aktivációjának vizsgálatára. Terveznek-e ilyen kísérleteket?

A valamilyen komplement komponensben deficiens szérumok, mintegy természetes génszünet eredményeként, nagyon értékes kísérleti objektumnak számítanak. Amennyiben

sikerülne C1-inhibitor deficiens szérumban jutnunk, az nagyban segítené kutatásainkat. Azt azonban számításba kell venni a kísérletek tervezésénél, hogy a C1-inhibitor deficiencia a komplementrendszer spontán aktivációját eredményezi, ezért ezekben a szérumban valószínűleg csökkent a klasszikus és a lektin út komponenseinek koncentrációja. Érdekes lenne megvizsgálni például azt, hogy mekkora a MASP-1 szintje és milyen a MASP-1 aktiváltsági státusza ezekben a szérumban. Mekkora a MASP-1-C1-inhibitor és a MASP-1-antitrombin komplexek mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya? C1-inhibitor deficiens szérumban hasznos lenne a saját fejlesztésű proteáz inhibitoraink tesztelésére is, hiszen ebben az esetben tisztán mérhetnénk inhibitoraink hatását a komplement aktivációra, kizárva a természetes inhibitor hozzájárulását.

9.) Hereditár angioödémában (HANO) szenvedő betegek MASP-1 szintjének mérése ödémás rohamban, illetve rohammentes állapotban fontos információval szolgálhatna. Van-e elérhető laboratóriumi módszer hazánkban arra, hogy a HANO-s betegek MASP-1 szintjét meghatározzuk?

Ez a kérdés nagyban kapcsolódik az előző kérdéshez, így részben már az előzőekben megválasoltam. A MASP-1 szint és aktiváltsági státusz mérése valóban roppant érdekes lenne örökletes angioödémában szenvedő betegek vérében. A MASP-1 szint mérésére ugyan már dán együttműködőinkkel kidolgoztunk egy protokollt, azonban az antitestek korlátozott hozzáférhetősége miatt nagyszámú minta rutinszerű vizsgálatára ez a módszer még nem igazán alkalmas. Jelenleg is dolgozunk megfelelő MASP-1 elleni antitestek kifejlesztésén. A problémát az jelenti, hogy a MASP-1 csak a szerin proteáz doménjében különbözik a MASP-3-tól és tartalmazza a M_{Ap}44 doménjeit is. Ha a katalitikus fragmentummal (CCP1-CCP2-SP) immunizáltunk, az antitestek felismerték a CCP doméneket és reagáltak a MASP-3-mal és a M_{Ap}44-is. Monoklonális antitestek kizárólag a CCP domének ellen szelektálódtak. Ezért immunizáláshoz először elő kellett állítani az izolált MASP-1 szerin proteáz domént. Válaszom írásakor a poliklonális és monoklonális antitestek előállítás és tesztelése még folyamatban van.

Végezetül ismételtelen szeretném megköszönni Dr. Farkas Henriette bírálatát és pozitív véleményét.

Budapest, 2014. február 17.

Gál Péter