

## Válasz Dr. Sármai Gabriella (egyetemi tanár, MTA doktora) bírálói véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Sármai Gabriellának dolgozatom alapos áttanulmányozását és a munkámról alkotott pozitív értékelését. Az alábbiakban összefoglalom kérdéseire, megjegyzéseire adott válaszaimat.

Kérdések:

1.) *A C1q-t megkötő felszín milyensége (IgG, IgM, pentraxin, apoptotikus sejt vagy mikroba) befolyásolja-e a C1q karok távolságát, és így a C1q-tetramer kölcsönhatást és a C1r aktiválódás sebességét?*

Az aktivációs felszín milyensége és az aktivátor minősége befolyásolja a C1 komplex kötődését és a tetramer aktiválódását, jóllehet kevés kvantitatív kísérleti adat áll rendelkezésünkre. Leginkább az antitesteket vizsgálták ebből a szempontból. IgG esetén nem szükséges, hogy az antitest antigént kössön, kémiailag keresztkötött, vagy hóaggregált IgG is kiváltja a C1 aktiválódását. A döntő tényező az, hogy az aktivációs felszínen egymástól megfelelő távolságra helyezkedjenek el a lekötött IgG molekulák (Hughes-Jones és mtsi. 1983 Eur. J. Immunol. 13:635; Circolo és mtsi. 1985 Mol. Immunol. 22:207). Ha az IgG molekulák túl messze kötődnek le egymástól és nem alakulnak ki a megfelelő klaszterek, a C1 komplex nem tud aktiválódni. A C1q molekula multivalens és kooperatív módon kötődik az IgG Fc részéhez és legalább két C1q karnak kell lekötődnie ahhoz, hogy az aktiváció megtörténjen. A kritikus felszíni IgG sűrűséget elérve a C1 gyorsan aktiválódik, további IgG hozzáadása lényeges hatást nem eredményez, tehát tulajdonképpen egy „minden vagy semmi” hatásról beszélhetünk. Hipotézisünk szerint a C1q karok relatív helyzetének megváltozása az aktivációs felszínhez való kötődés után önmagában kiváltja a C1r autoaktivációját, és ez többféle felszíni geometria esetén megvalósulhat. A pentamer felépítésű IgM igen jó C1 aktivátor, hiszen a felszínre lekötődött IgM molekula önmagában biztosítja az egymástól ideális távolságban lévő C1q kötőhelyeket. Itt is fontos a felszíni antigén sűrűség, mivel a C1q kötőhelyek csak abban az esetben exponálódnak az IgM felszínén, ha több Fab kar lekötődik és ez konformációváltozást idéz elő az IgM molekulában (Borsos és mtsi. 1981 Mol. Immunol. 18:863). Ez a mechanizmus gátolja meg, hogy az IgM már oldatfázisban (a vérben) aktiválja a C1 komplexet. A pentraxinok családjába tartozó C-reaktív protein felépítésében (pentamer struktúra) hasonlít az IgM-re és szintén igen hatékony C1 aktivátor. Ha baktériumok vagy apoptotikus sejtek felszínére köt, biztosítja az ideális elrendezésű klasztert a C1q fejek megkötésére. Végezetül még egy érdekes aspektusra szeretném felhívni a figyelmet. Az aktivációs méréseket eddig általában sík felszínre rögzített molekulákkal végezték. A valóságban azonban a felszínnek rendelkeznek bizonyos görbülettel (sejtfelszínnek, szubcelluláris részecskék) és az antitestek illetve a mintázatfelismerő molekulák (C1q, MBL) ezekhez a görbült felszínhez kötődnek.

Nemrégiben kimutatták, hogy a felszín görbülete jelentősen befolyásolja a klasszikus út aktiválódását (Pedersen és mtsi. 2010 J. Immunol. 184:1931). A megfelelően görbült felszín elősegíti, hogy a C1q kötéshez szükséges konformációváltozás végbemenjen az IgM molekulában, és a kötőhelyek jobban hozzáférhetővé váljanak a C1q molekula számára.

2.) *Ha a zimogén MASP-2 alkalmatlan a szubsztrát megkötésére és hasítására, viszont autoaktivációra alkalmas, ugyanakkor kimutatták, hogy az új modelljük szerint MASP-1 aktiválja a MASP-2-t, van-e, lehet-e az előző jelenségnek, a MASP-2 autoaktivációjának fiziológias jelentősége?*

A dolgozatban szereplő és a dolgozat beadása után kapott eredményeink alapján úgy gondolom, hogy a MASP-2 autoaktivációjának nincs fiziológias jelentősége. *In vitro* körülmények között a MASP-2 képes autoaktiválódni, és mesterségesen rekonstituált MBL-MASP-2 komplexek, igaz hosszú inkubálás után, beindítják a lektin utat. Ez alapján kezdetben úgy véltük, hogy a MASP-2 autoaktiválódásának akkor lehet fiziológias jelentősége, ha a MASP-2 természetes aktivátora, a MASP-1, nincs jelen. Azóta azonban megmértük az aktiválódás pontos kinetikai paramétereit és kiderült, hogy a MASP-2 túl lassan autoaktiválódik ahhoz, hogy fiziológias körülmények között beindítsa a lektin utat (Megyeri és mtsi. 2013 J. Biol. Chem. 288:8922). Egy dán kutatócsoport nemrégiben pedig azt publikálta, hogy MASP-1 hiányos beteg szérumában (normál MASP-2 szint (6 nM) mellett) nem indul be a lektin út (Degn és mtsi. 2012 J. Immunol. 189:3957). A cikk egyik gyengéje, hogy csak egy beteg szérumát vizsgálták, (aminek nyilván az az oka, hogy eddig összesen csak néhány ilyen beteget találtak), ezért nem zárhatjuk teljesen ki, hogy esetleg egy olyan embernél aki MASP-1 deficiens viszont a MASP-2 szintje emelkedett mégis lehet valami szerepe a MASP-2 autoaktiválódásának. Laboratóriumunkban tervezzük a teljes hosszúságú MASP-2 molekula rekombináns előállítását. Amennyiben rendelkezésünkre fog állni a teljes hosszúságú MASP-2 molekula meg fogjuk vizsgálni, hogy mekkora az a MASP-2 koncentráció, amelyik humán szérumban már képes önállóan beindítani a lektin utat.

3.) *Miután a MASP-1-nek számos szubsztrátja van, amelyek közül többet a szerző azonosított, felmerült bennem a kérdés, lehet-e ezek között valamiféle kompetíció in vivo körülmények között, pl. kóros állapotban, ha az egyik szubsztrátból nagyobb mennyiség áll rendelkezésre, vagy jobban hozzáférhető, mint a másik? Például, a 44. ábrán bemutatott modellben a baktériumhoz kötött MASP-1-MBL komplexben a MASP-1 aktiválódik, ez elindíthatja a lektin út aktiválódását a MASP-2-n keresztül, ami a kórokozó líziséhez vezethet. A másik lehetőség, amit a szerző bemutat, az endotél sejtek aktiválása, ami lokális gyulladás kialakulását eredményezheti.*

A MASP-1 különböző szubsztrátjai között természetesen lehet kompetíció *in vivo* körülmények között. Azt, hogy aktuálisan egy adott szubsztrátot milyen hatékonysággal fog hasítani a MASP-1 attól függ, hogy mennyire jó szubsztrátja a MASP-1-nek és hogy milyen koncentrációban van jelen, mennyire férhető hozzá a MASP-1 számára. A komplementrendszer hatása (legalábbis normál esetben) lokális, a MASP-1 azt a szubsztrátot

fogja elsősorban hasítani, ami a lekötődött MBL-MASP komplex közelében van. Az enzimkinetikai paraméterek alapján a MASP-1 legjobb szubsztrátja önmaga, a MASP-2 és a PAR4 receptor. Ahova a MASP-1 lekötődik ott nyilván MASP-2 is lesz, amit azonnal el tud hasítani, beindítva ezzel a lektin utat. Ha azonban PAR4 receptor is van a közelben, azt is hasítani fogja. A dolgotban is felvetem azt a lehetőséget, hogy amennyiben a baktériumok felszínén lévő aktivált MASP-1 pl. a hajszálerek felszínén érintkezik az endotél sejtekkel, ott hasítani fogja a PAR4-et. Más esetekben közvetlenül köthet saját sejtekhez az MBL, (pl. iszkémiás sejtek, vérlemezkék) és ott megtalálja a PAR4 szubsztrátot (Montalto és mtsi. 2001 J. Immunol. 166: 4148; Kozarcanin és mtsi. 2012 Immunbiol. 217:1129). A fibrinogén és a kininogén rosszabb szubsztrátjai a MASP-1-nek, viszont ezek a fehérjék nagy koncentrációban vannak jelen a vérben. A MASP-1-et ebből a szempontból a trombinhoz hasonlíthatjuk, aminek szintén sok (kb. egy tucat) szubsztrátja van, és amellett, hogy hasítja a fibrinogént aktiválja az endotél sejteket PAR receptorok hasítása révén.

*4.) A MASP-1-endotél sejt kölcsönhatás kapcsán vizsgáltak-e más aktivációs jeleket is? Történtek-e funkcionális vizsgálatok?*

A MASP-1 általi endotél sejt aktiválás kapcsán először a  $Ca^{2+}$  mobilizációt, az NF-kappaB transzlokációt és p38-MAPK foszforilációt vizsgáltuk, mivel ezek jellegzetes proinflammatorikus változások az endotél sejtekben. (Hasonló hatása van a trombinnak is az endotél sejtekre). Ezek a mérések azonban még nem adnak semmilyen információt arról, hogy van-e az így kiváltott endotél sejt aktivációnak valamilyen fiziológiai következménye. Együttműködőink (SOTE Kútvölgyi Klinika Kutatólaboratórium) segítségével nemrégiben sikerült kimutatnunk, hogy MASP-1 hatására, dózisfüggő módon, citokinek (IL-6 és IL-8) szabadulnak fel az endotél sejtekből (Jani és mtsi. 2014 PlosOne 9:e87104). A citokin termelés kapcsán, a p38-MAPK és az NF-kappaB útvonalak mellett, vizsgáltuk a JNK és a CREB aktivációt is, és megállapítottuk, hogy ugyan mind a négy útvonal aktiválódik MASP-1 hatására, de csak p38-MAPK inhibitor volt képes a citokin termelés jelentős gátlására. Ráadásul a MASP-1-gyel kezelt endotél sejtek felülúszója neutrofil granulociták kemotaxisát idézte elő. A komplementrendszer és a neutrofil granulociták az anti-mikrobiális védelmi rendszer első vonalát képezik. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a MASP-1, a komplementrendszer lektin útjának aktiválása mellett, közvetett úton, az endotél sejtek által, kiválthatja a neutrofil granulociták aktiválódását is. Ezáltal felfedeztünk egy új kapcsolatot a két védelmi mechanizmus, a komplementrendszer és a neutrofil aktiváció között. Azt sem zárhatjuk ki teljesen, hogy a MASP-1 közvetlenül, valamilyen receptor hasításán keresztül is képes neutrofil granulocitákat aktiválni, erre nézve azonban még nem végeztünk kísérleteket.

*5.) Hasíthat-e a MASP-1 más PAR4-hez hasonló receptort is? Milyen sejteken lenne erre lehetősége?*

Kísérleti eredményeink szerint, amelyeket a receptorok hasítási helyét reprezentáló peptidszubsztrátok felhasználásával kaptunk, a MASP-1 rendkívül jól hasítja a PAR4-et

( $k_{\text{cat}}/K_M=1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), de a PAR1 ( $k_{\text{cat}}/K_M=1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) és PAR2 ( $k_{\text{cat}}/K_M=1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) hasító képessége is jelentős. Elképzelhető, hogy a PAR2 hasításnak lehet fiziológias jelentősége is, mivel a PAR2 általában a legnagyobb koncentrációban jelenlévő proteáz-aktivált receptor az emberi sejteken (pl. leukocitákon), és hasítását kapcsolatba hozták gyulladásos reakciókkal (Lindner és mtsi. 2000 J. Immunol. 165:6504; Shpacovitch és mtsi. 2004 J. Leukoc Biol. 76:388; Shpacovitch és mtsi. 2008 J. Leukoc Biol. 83:1309; Vergnolle 1999 J. Immunol. 163:5064). Együttműködőinkkel (ELTE Immunológiai Tanszék) jelenleg is vizsgáljuk MASP-1 hatását monocitákra. Az előző kérdésre adott válaszban már említettem a neutrofil granulocitákat, amiket szintén tervezünk vizsgálni ebből a szempontból. Az is elképzelhető, hogy a MASP-1 a PAR-okon kívül képes még egyéb receptorokat is hasítani és ezáltal működésüket befolyásolni (aktiválni, inaktiválni, receptort a sejt felszínéről eltávolítani, stb.), ezt a kérdést azonban eddig még nem vizsgáltuk közelebbről.

Megjegyzések:

*A 96. oldalon helytelen a kifejezés, hogy „a MASP-1 ... hozzájárul egy hatékonyabb immunválasz kialakulásához”, hiszen a komplementrendszer aktiválódásakor leginkább az effektor funkciók beindításáról, a mikrobák eltávolításáról és nem az immunválasz egészének kialakításáról van szó.*

Egyetértek bírálómmal abban, hogy a komplementrendszer elsődleges funkciója egy gyors és hatékony antimikrobiális válasz kialakításában van. Ugyanakkor egyre több bizonyíték lát napvilágot arra nézve, hogy a komplementrendszer aktiválódása az immunrendszer többi elemére is hatással van (pl. az anafilatoxinok, vagy a MASP-1 proinflammatorikus hatása) és a komplementrendszer hidat képez a veleszületett és az adaptív immunitás között (Ricklin és mtsi. 2010 Nat. Immunol. 11:785). A komplementrendszer felfedezése után sokáig úgy tűnt, hogy mindössze egy olyan effektor rendszerről van szó, amelyik az antitestek hatását mintegy kiegészíti (komplementálja). Innen ered – véleményem szerint – félrevezető neve és mindmáig némileg marginális státusza az immunológia tudományán belül. Ma már tudjuk, hogy a komplementrendszer rendkívül komplex, sokrétű funkciót lát el, és szinte nincs olyan eleme az immunrendszernek, amivel ne lépne kölcsönhatásba. Ennek köszönhetően számos betegség kialakulásában játszik szerepet a komplementrendszer rendellenes működése (Ricklin és Lambris 2007 Nat. Biotech. 25:1265). Dolgozatomban kifejtem, hogy a lektin út mintázatfelismerő molekulái (pl. MBL, fikolinok) révén azonnal és közvetlenül felismeri a szervezetbe behatoló mikrobákat és a megváltozott saját struktúrákat, az enzimaszkád beindításával, amelyben a MASP-1 fontos szerepet játszik, jelet generál és azt nagymértékben felerősíti, az aktivált komplement komponensek pedig egyrészt közvetlenül elpusztíthatják a megtámadott mikroorganizmust, másrészt vészjelzéseket küldenek az immunrendszer más elemei számára. Ebben az értelemben használtam azt a kifejezést, hogy „a MASP-1 ... hozzájárul egy hatékonyabb immunválasz kialakulásához”. Beismerem, hogy elfogult vagyok a komplementrendszer iránt és elnézést kérek, ha néha túlzó megállapításokra ragadtattam magam.

*A 97. oldalon az, hogy a MASP-1 szerepe a felismerő molekulák által közvetített veszély szignálokra adott válasz beindításában van, pillanatnyilag kissé általánosításnak tűnik, milyen konkrét példákra gondol?*

Erre a megjegyzésre adott válaszom szorosan kapcsolódik az előző megjegyzéssel kapcsolatban leírtakkal. A lektin út felismerő molekulái, hasonlóan pl. a toll-like receptorokhoz, felismerik azokat az ősi, evolúciósan változatlan struktúrákat, amelyek a baktériumok felszínén találhatóak és vészjelzésként szolgálnak az immunrendszer számára. A felismerést jelgenerálás és jelerősítés követi. A jel generálását az autoaktiválódó proteázok, a jel felerősítését pedig a proteolitikus kaskádrendszer végzi. A MASP-1 szerepe ebben a folyamatban döntő. Egyrészt beindítja az enzimkaskádot a MASP-2 aktiválása révén, másrészt PAR receptor hasítás útján közvetlenül aktivál sejteket. Ez utóbbi folyamat megelőzi az anafilatoxinok kialakulását, tehát akkor is lesz sejtaktiváció, ha valamilyen oknál fogva nem alakul ki C3 és C5 konvertáz és nem szabadulnak fel anafilatoxinok. A MASP-1 ezen kívül a fibrinogén és a kininogén hasításával további kemotaktikus és vazóaktív hatást fejthet ki.

Végezetül ismételtén szeretném megköszönni Dr. Sármay Gabriella bírálatát és pozitív véleményét.

Budapest, 2014. február 17.

Gál Péter