

Válasz Dr. Tózsér József (egyetemi tanár, MTA doktora) bírálói véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Tózsér Józsefnek értekezésemről adott pozitív értékelését és a bírálat gyors elkészítését.

Formai észrevételeivel kapcsolatban elismerem, hogy a bíráló munkáját megkönnyítette volna, ha a disszertáció alapjául szolgáló közlemények a disszertáció végére bekerültek volna. A disszertáció megírása során magam is fontolóra vettem ezt a lehetőséget, de végül azért döntöttem mégis a cikkek kihagyása mellett, mert szinte valamennyi publikáció szabadon elérhető elektronikus adatbázisokban. Az ábrákkal kapcsolatban azt a gyakorlatot követtem, hogy a mások közleményeiből átvett, esetleg módosított, ábrák esetében külön feltüntettem a forrást. Azokat az ábrákat, ahol nincs forrás külön megjelölve (az ábrák túlnyomó többsége), mind saját közleményekből (cikk, poszter, előadás) vettem át. Valóban, az egyértelműség kedvéért szerencsésebb lett volna ezt valahogy jelezni. Egyetértek opponensemvel, hogy a 43. oldalon bemutatott SDS-PAGE ábráján (17. ábra) megjelenő extra sávok csak a 60. oldalon található információk birtokában értelmezhetők. Célszerű lett volna, legalább röviden, ismertetni az extra sávok eredetét már a 43. oldalon.

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

1.) *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 komplementrendszer szerin proteázai kivétel nélkül a kimotripszin családba (Clan PA, Family S1) tartoznak. Ezeknek a proteázoknak a szerkezetére jellemző az ún. kimotripszin fold, (az értekezésben szereplő szerkezetek többségénél, a szerin proteáz domén esetében, a kimotripszinre jellemző számozást is feltüntettem), és aktiválódásuk is hasonló. Ugyanakkor a korai komplement proteázok (C1r, C1s, MASP-1/2) tripszin szerű szubsztrátspecifitással rendelkeznek, mivel bázikus aminosavak (lizin és arginin) után hasítanak. Ez az oka annak, hogy az irodalomban hol tripszin, hol pedig kimotripszin szerű enzimeknek nevezik a korai komplement proteázokat. Ami az aktiválódás mechanizmusát illeti, a kulcslépés mind a tripszinogén, mind pedig a kimotripszinogén esetében a 15. és 16. aminosavak közötti peptidkötés (Lys15-Ile16 tripszinogén, Arg15-Ile16 kimotripszinogén) hasadása az aktivációs peptidben. Az így keletkező (Ile16-tal kezdődő) új N-terminális fiziológiás pH-n protonált amino csoportja sóhidat hoz létre az Asp194 deprotonált karboxil csoportjával. A folyamat során az „aktivációs doménben” konformációváltozás következik be, amelynek eredményeként kialakul az oxianion kötő és a szubsztrátkötő zseb és a proteáz elnyeri teljes aktivitását. Ez a mechanizmus tehát közös a két proteáz esetében. Ugyanakkor vannak

jelentős különbségek is az aktiválódás mechanizmusában. Az egyik legfontosabb különbség az, hogy a tripszin képes autoaktivációra, míg a kimotripszin nem. Fiziológias körülmények között a tripszinogént kezdetben az enterokináz hasítja, azonban az így kialakult aktív tripszin hatékonyan hasítja és aktiválja a többi tripszinogén molekulát. A kimotripszinogént szintén az aktív tripszin aktiválja fel, ebben a folyamatban a kimotripszin nem vesz részt. Ebben a tekintetben a C1r, MASP-1 és MASP-2 proteázok aktiválódása inkább a tripszinére emlékeztet, hiszen ezek az enzimek autoaktiválódásra képesek; mégpedig definíciónk szerint „valódi autoaktiválódó” proteázok, ami alatt azt értjük, hogy zimogén formából külső proteáz közreműködése nélkül aktív formába jutnak. A teljesség kedvéért érdemes megjegyezni, hogy kimotripszin esetében az Arg15-Ile16 peptidkötés hasadása után keletkező már aktív ún. π -kimotripszin autolízissel tovább hasad, két kisebb peptid távozik, és kialakul a három láncból álló α -kimotripszin. Ebben a tekintetben sem hasonlítanak a komplement proteázok a kimotripszinre, mivel az aktivációs peptid hasadása után további hasítások már nem történnek. Abban a fontos tekintetben viszont a kimotripszinre emlékeztetnek az általunk tanulmányozott proteázok, hogy az aktivációs kötés hasadása után az aktivációs peptid nem távozik a molekuláról, hanem diszulfid híd által a szerin proteáz doménhez rögzítve marad, és kialakul az aktív proteázokra jellemző kétláncú struktúra. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a komplement proteázok aktiválódása bizonyos szempontból a tripszinre, míg más tekintetben a kimotripszinre emlékeztet; egyértelmű kijelentés nem tehető. Ez az oka az irodalomban és a dolgozatomban is található látszólagos ellentmondásnak, amit remélem, hogy ezúton sikerült feloldanom.

2.) 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 rekombináns proteázok termelésére a bakteriális expressziót választottuk, mert csak ezúton tudtunk megfelelő mennyiségű aktív enzimet előállítani funkcionális és szerkezeti vizsgálatok céljára. Ez különösen igaz a MASP-1-re, amelynek aktív formája citotoxikusnak bizonyult eukarióta expressziós rendszerekben. A közelmúltban jelent meg egy publikáció, amelyben MASP-1-et termeltettek HEK sejtekben (Degn és mtsi. 2013 Protein Expr Purif. 88:173). Ez azonban csak úgy volt lehetséges, hogy a MASP-1 mellett inhibitorát, a C1-inhibitorát is kifejezték, amely zimogén formában tartotta a MASP-1-et. Az expresszió szintje azonban alacsony volt, a MASP-1 tisztítására kísérletet sem tettek, a szérumentes médiumot tartalmazó sejtfeülúszót közvetlenül használták funkcionális kísérletekhez. Ez a megközelítés szerkezeti munkára (pl. kristályosítás) nyilván nem alkalmas, és az anyag funkcionális megbízhatósága is vitatható. A bakteriális expressziós rendszer kiválasztása tehát egyfajta kényszer volt. A bakteriális expressziós rendszerek egyik nagy hátránya, hogy nem képesek az eukarióta proteineket megfelelően processzálni; így nem képesek glikozilációra sem. Szerencsénkre azonban, egyik fő kísérleti objektumunk, a MASP-2 esetében, ez nem probléma, hiszen a MASP-2 az eukarióta sejtekben sem glikozilálódik. A

glikoziláció tekintetében tehát a baktériumokban termeltetett MASP-2 megegyezik az eukarióta sejtekben termelt fehérjével. A többi proteáz esetében azonban nem ilyen jó a helyzet. Az általunk előállított katalitikus fragmentumokon a C1r és a MASP-1 esetében kettő, míg a C1s esetében egy N-glikozilációs hely található. A C1r és C1s humán szérumból viszonylag nagy mennyiségben izolálható, így összehasonlíthatjuk a természetes és a rekombináns fehérjék tulajdonságait. C1r és C1s fragmentumokat más kutatócsoportok is előállították *E. coliban* (Wijeyewickrema és mtsi 2013 J. Biol. Chem. 288:15571; Perry és mtsi. 2013 J. Biol. Chem. 288:15821) és rovarsejtekben (Rossi és mtsi 1998 J. Biol. Chem. 273:1232) is. A saját és más kutatócsoportok mérései alapján elmondhatjuk, hogy a natív és a rekombináns fehérjék enzimológiai tulajdonságai gyakorlatilag megegyeznek. A glikoziláció jelenléte vagy hiánya nem befolyásolja lényegesen a szubsztrátok hasítását. Összehasonlíthatjuk az általunk meghatározott C1r kristályszerkezetet a rovarsejtekben kifejezett C1r kristályszerkezetével (Budayova-Spano és mtsi. 2002 EMBO J. 21:231), ami tartalmaz, ugyan az emlős sejtektől eltérő, glikozilációt. Megállapíthatjuk, hogy a glikoziláció jelenléte nem befolyásolja a fehérje szerkezetét és a szénhidrát oldalláncok, elhelyezkedésük alapján, valószínűleg nem lépnek kölcsönhatásba a szubsztrátokkal. Ezek alapján nagy valószínűséggel elmondhatjuk, hogy a C1r és C1s esetén a bakteriális rendszerben termeltetett fehérjék enzimkinetikailag és funkcionálisan megegyeznek a szérum fehérjékkel. A probléma ebben az esetben is a MASP-1-gyel van, mivel jelenleg nincs olyan módszer, amellyel humán szérumból nagy mennyiségben, tisztán izolálni lehetne a MASP-1-et. Nem tudjuk ezért összehasonlítani a kétféle eredetű (szérum és rekombináns) fehérje enzimológiai és funkcionális tulajdonságait. A C1r, C1s és MASP-2 analógiája alapján legfeljebb valószínűsíteni tudjuk, hogy a rekombináns MASP-1 tulajdonságai is megegyeznek a szérum fehérje tulajdonságaival. A MASP-1 viszonylag nagy mennyiségben (11 µg/ml; 143 nM) van jelen a normál humán szérumban, ehhez képest mégis meglepő, hogy izolálása nehézségekbe ütközik. Ennek oka részben az lehet, hogy a MASP-1 többféle felismerő molekulához (MBL, háromféle fikolin, CL-11) is kapcsolódik, tisztítás közben aktiválódik és degradálódik. Nemrégiben dán együttműködőink segítségével új módszert dolgoztunk ki a szérum MASP-1 dúsítására (Megyeri és mtsi. 2014 Mol. Immunol. 59:39). A módszer lényege, hogy a szérumhoz nagy feleslegben rekombináns MBL-t adunk és mannán oszlopon affinitás kromatográfiával izoláljuk az MBL-MASP komplexeket. A feleslegben levő MBL elvonja a MASP-1-et a más (pl. fikolin) komplexekből és így preparátumunkban feldúsul a MASP-1. Ezzel a módszerrel sikerült 20-szorosára növelni MASP-1-re nézve a kitermelést az eredeti protokollhoz képest. Sajnos azonban még ez a módszer sem alkalmas arra, hogy megfelelő mennyiségben, tisztán izoláljuk a szérum MASP-1-et. A megfelelő protokoll kidolgozása jelenleg is kutatócsoportunk egyik fő célkitűzése.

3.) *A jelölt a renaturált C1r fragmensek megfelelő feltekeredésének bizonyítékaként az autoproteolízist tekinti. Ez azonban csak abban az esetben lenne teljes mértékben bizonyító erejű, ha intramolekulás 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?

Teljesen egyetértek bírálómmal abban, hogy a megbízható enzimológiai jellemzés alapfeltétele, hogy a rekombináns katalitikus domének feltekeredését aktív centrum titrálással ellenőrizzük. Az általánosan használt aktív hely titráló reagensek olyan szubsztrátok, amelyeknél az acilezés gyorsan megtörténik és valamilyen könnyen detektálható (pl. kromogén) jelet generál, míg a deacilezés kellően lassú folyamat ahhoz, hogy az acilezés során keletkezett jelet lemérhessük addig, amíg a proteáz újabb szubsztrátot nem hasít. Ez gyakorlatilag azt jelenti, hogy a reakció befagy az acil-enzim fázisban. Sajnos az általunk kipróbált és más szerin proteázok esetében bevált kromogén szubsztrátok egyike sem volt alkalmas arra, hogy azzal megbízható aktív hely titrálást végezzünk a komplement proteázoknál. Szerencsére azonban, a C1r, C1s és MASP-ok természetes inhibitora, a szerpinek családjába tartozó C1-inhibitor, acil-enzim intermedier képződése révén ejti csapdába a proteázokat. Ezt a folyamatot, vagyis a C1-inhibitorral való kovalens komplex képződését, poliakrilamid gélelektroforézissel nyomon követhetjük és a gélt denzitometriával kiértékeljük. Ezzel a módszerrel határoztuk meg a feltekeredés határfokát a tisztított fehérjékre, ami minden esetben igen hatékonyan (>95%) bizonyult. Enzimológiai mérésekhez, csak ezzel a módszerrel előzetesen ellenőrzött preparátumokat használtunk.

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

A MASP-1 C3, illetve a MASP-1 C3i reakció esetén, összhangban a többi hasonló enzimkinetikai méréssel, úgy választottuk meg a kísérleti körülményeket, hogy a fehérje szubsztrát körülbelül fele hasadjon el a mérés első 20 percében, egy mérés se tartson 50 percnél tovább és a reakció jól nyomon követhető legyen poliakrilamid gélelektroforézissel. Mivel a C3 szubsztrátok hasítása alacsony hatékonyságú folyamat, a fenti feltételeknek csak a magas (1:5) enzim-szubsztrát arány felelt meg. Egy hatékonyabb reakció esetén (pl. MASP-2 C4) ez az arány jóval kisebb, 1:1000, volt.

Végezetül ismételten szeretném megköszönni Dr. Tózsér József bírálatát és pozitív véleményét.

Budapest, 2014. február 17.

Gál Péter