

Opponensi vélemény

Gál Péter: A komplementrendszer aktiválódásának kezdeti lépései: Moduláris szerinproteázok szerepe a természetes immunválasz beindításában című MTA doktori értekezéséről.

Gál Péter disszertációjának alapjául 13 saját tudományos közlemény szolgál, ehhez járul még a PhD fokozat megvédése óta az értekezés tárgyában megjelent további 27 publikáció.

Valamennyi közlemény magas impakt faktoral rendelkező, tekintélyes nemzetközi szakfolyóiratban jelent meg. A munka, amely a szerző az utóbbi 15 évben, széleskörű hazai és nemzetközi kollaborációban végzett kutatómunkájának eredményeit foglalja össze, magyar nyelven, olvasmányos stílusban íródott. Szép kivitelezésű, elütéseket elvéve tartalmaz, az anyag jobb megértését számos színes ábra szolgálja.

A disszertáció 10 fejezetre oszlik, a Bevezetés elhelyezi a szűkebb kutatási témát az immunválasz egészében, ezt követi munka szakmai előzményei és a szakmai hozzájárulások, kollaborációs partnerek ismertetése. Ez a fejezet pontosan bemutatja a disszertáns szerepét az egyes munkákban. A Tudományterületi háttér fejezet 15 oldalon mutatja be a komplementrendszer aktiválódási útvonalait, ennek fiziológiai következményeit, a szabályozási mechanizmusokat és végül a disszertáció kísérleti alanyait, a komplement proteázokat. A Kérdések és célkitűzések fejezetben a szerző szubjektív hangvételű indoklását olvashatjuk kutatási témájáról, amely elsősorban három autoaktiválódásra képes enzim, a C1r, a MASP-2 és a MASP-1 szerinproteázok aktiválódási mechanizmusának felderítésére irányul. A Módszertan fejezet igen röviden, mindössze két oldalon tekinti át a legfontosabb alkalmazott módszerek lényegét, amit az tesz indokoltta, hogy az érdeklődők számára a részletek az eredeti közleményekben megtekinthetők. A munka során alkalmazott kísérletes módszerek magas színvonalúak és korszerűek.

A kutatási eredmények és megbeszélésük közös fejezetet kapott, mintegy 70 oldalon mutatja be a legfontosabb eredményeket és következtetéseket. Ez a felépítés igen szerencsés, jól követhető, élvezetes olvasmánnyá tette a disszertációt. Ezt követi egy fajta kitekintés, az elért eredmények továbbgondolása - igen tanulságos fejezet, amely azt is mutatja, hogy a tiszta alap kutatás hogyan vezethet terápiás célra alkalmazható készítmények fejlesztéséhez. Ezután az Új tudományos eredmények összefoglalása 6 oldalon, a köszönetnyilvánítás és az irodalomjegyzékek (23 oldal) zárják a disszertációt.

A disszertáció a formai követelményeknek mindenben megfelel, tetszetős kivitelezésű, szépen dokumentált, jól követhető munka.

A disszertáció legfontosabb **új eredményei** a következők:

- 1) A C1r autoaktivációval kapcsolatban megállapították, hogy ez a C1r szerin proteáz doménjének (SP domén) inherens tulajdonsága, a molekula többi doménjére ehhez nincs szükség. Ugyanakkor a CCP domének stabilizálják az SP domént és külső kötőhelyeik következtében növelik a C1r katalitikus hatékonyságát fehérjeszubsztrátok esetén.
- 2) Felderítették, hogy a CCP1 modul kulcsszerepet játszik a fehérje dimerizációjában, amelyet később krisztallográfiai vizsgálataik megerősítettek. Kimutatták, hogy az aktív C1r CCP1-CCP2-SP dimerje nehezebben bomlik monomerekere mint a zimogén forma, és az autoaktivációhoz a dimer szerkezet felbomlása szükséges.

- 3) Az aktív C1r kristályszerkezete alapján új modellt dolgoztak ki a C1r autoaktiválására a C1 komplexen belül (hasadás és visszakapcsolódás modell). A modell a tetramer nagyfokú flexibilitását tételezi fel az autoaktiválódás során.
- 4) Kimutatták, hogy a C1r CUB2 modulja Ca^{2+} hiányában rendezetlen flexibilis szerkezettel rendelkezik, és fiziológiai körülmények között stabilitásának határán van, ami biztosítja a C1r aktiválódásához szükséges flexibilitást.
- 5) A komplementrendszer lektin útjában kulcsszerepet játszó MASP2 tanulmányozása során megállapították, hogy a MASP2 SP doménje egymaga hatékonyan hasítja a C2 szubsztrátot, de a C4 hasításához szükség van a CCP2 modul külső kötőhelyeire.
- 6) Meghatározták a MASP2-C4 komplex térszerkezetét, amely igazolta korábbi következtetéseiket és a CCP doménekben levő külső kötőhelyek szerepét, amelyek fontos szerepet játszanak a C4b2a C3 kovertáz kialakulásának mechanizmusában. Továbbá, azonosítottak egy nem ismert, további külső kötőhelyet is, a C4 szulfotirozin régiója és a MASP-2 SP doménje között.
- 7) Megállapították, hogy a MASP-2 zimogén térszerkezete proteolitikusan inaktív konformációt mutat, szintetikus szubsztrátot nem képes hasítani, ugyanakkor a C4 szubsztrátot igen. A zimogén proteolitikus aktivitása az autoaktiválódás kulcsa.
- 8) Megállapították, hogy a MASP-1 a MASP-2-nél gyorsabban autoaktiválódik, és az aktív MASP-1 további autolízisre hajlamos, valamint, hogy a MASP-1 eltér a rokon proteázoktól.
- 9) Megcáfolták a korábbi téves nézetet, miszerint a MASP-1 önmagában C3 konvertázként működik. A MASP-1 nem hasítja az intakt C3-t, csak tioészterkötésének hidrolízise után. Kimutatták, hogy a MASP-1 egyedül a C2-t hasítja, ami a MASP-2 C3 konvertáz-képző hatékonyságát növelheti.
- 10) Megállapították, hogy a MASP-1 a trombinnal mutat rokonságot, hasítja a fibrinogént és a XIII faktort és így térhálós fibrin polimert hoz létre, ami ősi mechanizmus lehet a fertőző mikroorganizmusok elterjedésének gátlásában.
- 11) Felfedezték a komplementrendszer egy új funkcióját, azt hogy a MASP-1 közvetlenül aktiválja az endotél sejteket. A MASP-1 a PAR4 receptort hasítja a sejtek felszínén, amelynek következtében intracelluláris kalcium ion koncentráció növekedés, NFkB transzlokáció és p38 MAPK foszforiláció következik be, ami proinflammatorikus folyamatok kialakulásához vezet.
- 12) Azonosították a MASP-1 egy újabb szubsztrátját, a kininogént, amelyből a MASP-1 bradikinin peptidet szabadít fel.
- 13) Meghatározták a MASP-1 CCP1-CCP2-SP katalitikus fragmentumának térszerkezetét, ami megmagyarázza a MASP-1 széles szubsztrátspecifitását: a szubsztrátkötő árok széles és viszonylag nyitott.
- 14) In vitro evolúciós technikával lektin út specifikus inhibitorokat fejlesztettek ki (SFMI-1, SFMI-2). Ezek segítségével új modellt állítottak fel a lektin út aktiválására.

Megállapították, hogy bár a MASP-1 egyedül nem képes beindítani a lektin utat, de gátlása megakadályozza a C4 MASP-2 általi hasítását. A MASP-2 fő aktivátora tehát a MASP-1.

Nehéz kérdéseket feltenni a körültekintően megtervezett és kivitelezett kísérletek eredményeivel és a jól alátámasztott következtetésekkel kapcsolatban, amelyek igényes tudományos szakfolyóiratokban kerültek közlésre, és így átmentek a referee-k szigorú szűrőjén. Így a kérdések inkább csak az opponens kíváncsiságát tükrözik a témában.

Kérdéseim a következők.

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?

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 autoaktivációnak fiziológias jelentősége?

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.

4) A MASP1-endotél sejt kölcsönhatás kapcsán vizsgáltak-e más aktivációs jeleket is? Történtek-e funkcionális vizsgálatok?

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

További 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.

A 97. oldalon az, hogy a MASP1 szerepe a felismerő molekulák által közvetített veszély szignálokra adott válasz beindításában van, pillanatnyilag kissé általánosításnak tűnik, milyen konkrét példákra gondol?

Természetesen a kérdések és megjegyzések nem érintik a disszertáció lényegét, amelyet igen értékes munkának tartok.

Összefoglalva Gál Péter MTA doktori disszertációjában bemutatott munka számos, jelentős új tudományos eredménnyel járult hozzá a tudományterület fejlődéséhez.

A doktori munka eredményei messzemenően elegendőek az MTA doktori cím megszerzéséhez. A nyilvános védés kitűzését és az MTA doktori cím odaítélését javaslom.

2014. február 2.

Dr. Sármay Gabriella
egyetemi tanár
az MTA doktora