

HUMÁN DENDRITIKUS SEJTEK MŰKÖDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA KOMPLEMENTFEHÉRJÉK ÉS RECEPTORAIK ÁLTAL; EXOSOMÁK JELENTŐSÉGE A T-SEJT VÁLASZ KIALAKULÁSÁBAN

I. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

A dendritikus sejtek szerepe az immunválasz során

Szervezetünkben a dendritikus sejtek (DC-k) a leukociták mintegy 1%-át teszik ki és egészséges szervezetben az agy kivételével valamennyi szervben megtalálhatók. Nagy mennyiségben vannak jelen az antigén támadás szempontjából kitüntetett helyeken, úgymint a légutak és tápcsatorna nyálkahártyájában vagy a bőr környezetében. A DC-k származásuk, szöveti előfordulásuk, aktiváltságuk és funkcionális tulajdonságaik alapján az egyik legheterogénebb sejtpopulációt jelentik. Fejlődésük csontvelői előalakokból két úton történhet. A mieloid fejlődési vonalat képviselik pl. a bőr alatti rétegben nagy számban előforduló Langerhans sejtek és a több szervben előforduló intersticiális DC-k (1). A másik fejlődési utat az ún. limfoid DC-k képviselik, amelyek vírusfertőzés következtében aktiválódnak és nagy mennyiségben termelnek I. típusú interferonokat. A mieloid DC-ek számos patogén eredetű anyag pl. LPS, vagy citokinek pl. TNF- α és gyulladási citokinek hatására aktiválódnak és differenciálódnak. Az így kialakuló érett DC-k, mint antigénbemutató sejtek a T limfociták, elsősorban a naív T-sejtek leghatékonyabb aktiválói. Az aktiváció mechanizmusát meghatározza az antigén által stimulált DC-kből származó citokinek mintázata, ez határozza meg azt is, hogy melyik T-sejt alpopuláció aktivációja következik be.

Az eredet és fenotípus alapján történő osztályozással szemben nemrég vezették be az újabb, funkcionális különbségeken nyugvó DC nevezéktant (2). Eszerint megkülönböztetik a *pre-DC*, a *konvencionális DC* valamint a *gyulladási DC* sejttípusokat. A különböző *pre-DC* alakok differenciálódást követően tesznek szert a DC-kre jellemző morfológiai jegyekre és funkcionális aktivitásra. A konvencionális DC-k (cDC-k) már a jellegzetes nyúlványos alakkal rendelkeznek és DC funkciókat látnak el. A cDC-k további felosztását biztosítja lokalizációjuk; egyes sejtek az érésük helyszínén maradnak, míg mások migráló fenotípusúak. A migráló fenotípusú sejtek feladata a perifériás szövetek folyamatos ellenőrzése, az antigén felismerése és felvétele. Ezután a nyirokereken keresztül a nyirokcsomókba vándorolnak. Ilyen vándorló DC-k például az epidermiszben található Langerhans sejtek (LC). Ezzel ellentétben, a limfoid szövetekben előforduló DC-kre nem jellemző a migráció, ezek a limfoid szövetekben található antigéneket veszik fel és prezentálják az adott nyirokszervben. Zömében ide sorolhatók a csecsemőmirigyben és a lépben található DC-k. A nyirokcsomókban előforduló DC-k mintegy a fele rezidens sejt. Ezek a sejtek éretlen DC-k, aktívan antigént vesznek fel és dolgoznak fel, ellentétben azokkal a DC-kkel amelyek éretlen fenotípusúak és a nyirokereken keresztül érkeztek a szövetbe a periférián felvett antigénnel. A gyulladási DC-k nyugalmi állapotban nem mutathatók ki a szervezetben, ezek gyulladási stimulus hatására monocitákból differenciálódnak.

A mieloid eredetű, nyugvó, éretlen DC-k elsődleges feladata a szöveti környezet folyamatos megfigyelése, a szervezetbe jutó antigén azonnali felismerése. A környezetükből folyamatosan veszik fel pinocitózissal, receptor mediált endocitózissal és fagocitózissal az oldott részecskéket, partikulumokat, valamint a megváltozott vagy apoptotikus sejteket (3). A

DC-k számos receptort hordoznak felszínükön, mely lehetővé teszi a legkülönbözőbb antigének illetve opsonizált antigének felismerését: ezek a scavenger receptorok, a Toll-like receptorok (TLR), a C-típusú lektin receptorok, a komplement receptorok és az Fc-receptorok (4,5). Az antigén felismerése, megkötése és felvétele után a DC-k a nyirokcsomóba szállítják az antigént. Vándorlásuk során és a nyirokcsomóban töltött idő alatt válnak érett, teljes mértékben differenciálódott DC-é. Az aktiválódott DC-k antigén felvétele jelentős mértékben csökken, viszont fokozódik a felvett anyagok lebontása, és az antigénbemutató funkciójuk. A nyirokcsomóba érkező maDC-k felszínén ugrásszerűen megnő az MHCII – peptid komplexek és a CD40 molekulák száma, illetve azoknak a kostimulátoroknak (CD80, CD86) a mennyisége, amelyek más immunsejtekkel való kölcsönhatást biztosítanak. Az emberi érett DC-k jellemző markere a CD83 is. A sejtfelszíni molekulák mennyiségének változása mellett a sejt morfológiája is megváltozik, és fokozódik a migrációra való képessége. Az érés során a DC-k citokintermelése is megváltozik; más immunsejteket aktiváló IL-12-t és egyéb citokineket választanak ki, és a nyirokcsomóban lévő T-sejt eredetű faktorok hatására érésük teljessé válik. Mindemellett megnő a sejtek CCR7 kemokinreceptor expressziója, és ezáltal fogékonyvá válnak olyan kemokin-ingerre, amelyek elősegítik a nyirokcsomóba történő vándorlásukat. Ennek a receptornak a liganduma a MIP-3 β a kemotaktikus gradiensnek megfelelően a DC-eket a nyirokcsomó parakortikális részébe irányítja, ahol a naív T-sejtek is jelen vannak. Az érett DC-k sejtfelszínén expresszált kostimulátor molekulák segítik a kapcsolat kialakítását az antigénspecifikus T-sejtekkel, citokinjeikkel is elősegítve azok aktiválódását, effektor T limfocitákká differenciálódásukat. A DC-k az aktiváció típusától függően különböző citokineket termelnek, amelyek Th1 vagy a Th2 sejtek differenciálódását képesek kiváltani. Így, az adott antigén a DC-k stimulálása révén meghatározza a kialakuló immunválasz típusát, az IL-12 elsősorban Th1 választ, míg az IL-4 döntően Th2 választ indukál. Az immunológiai tolerancia fenntartásában fontos szerepet töltenek be a regulátor T limfociták (Treg), amelyek gátolják a sejt immunválasz kialakulását (6). Újabb kutatások eredményei azt mutatják, hogy bizonyos regulátor DC-k (DCreg) által közvetített jelek szükségesek, az IL-10-et és TGF β -t nagy mennyiségben szekretáló Treg sejtek aktiválódásához (7,8).

Az exosomák 50 nm-nél kisebb átmérőjű membrán vezikulumok, jelenlétüket különböző eredetű sejtek kultúráiban, így DC felülűszójában is kimutatták (9). Az exosomák akkor kerültek a tudományos érdeklődés középpontjába, amikor kiderült, hogy antigénprezentáló sejtekből ultracentrifugálással elkülönített kisméretű vezikulumoknak in vivo immunválaszt stimuláló hatása van (10). Ma már az ismert, hogy az exosomák endocitotikus vezikulumokból származtathatók, amint azt az citoplazmatikus transzfer folyamatokat jellemző marker fehérjék, pl. a transferrin molekula jelenléte bizonyítja (9). Az exosomákat, ellentétben az apoptotikus vezikulumokkal, kizárólag élő sejtek hozzák létre. A DC eredetű exosomákból jellegzetes alkotóelemeket sikerült azonosítani, ezek; MHC molekulák, adhéziós fehérjék, peptidázok, hősokk-fehérjék, citoskeletális és transzport fehérjék valamint bizonyos szignál fehérjék (11,12). Az exosomák funkciója, az exosoma-eredetű fehérjék szabályozó szerepe a DC-k funkcióban intenzív kutatások alapját jelenti napjainkban. Feltételezik, hogy az exosomák szerepet játszanak DC-k stimulálásában, ami ezeken a sejteken további sejtfelszíni molekulák expresszióját stimulálhatja, de a sejtek közötti információcserét is biztosíthatja membrán- és citoszól fehérjék átadásával. Az elmúlt években a professzionális antigénprezentáló DC-k a tudományos érdeklődés középpontjába kerültek, természetes adjuvánsként alkalmazzák tumor-ellenes terápiában (13) és vizsgálják szerepüket Treg sejtek kiváltotta kóros folyamatokban is (14). Ígéretes klinikai eredmények születtek a vírus fertőzések befolyásolása, a tumorok immunterápiája továbbá a vakcina tervezés területén.

A komplementfehérjék és receptoraik dendritikus sejteken

A komplementrendszer alkotó fehérjék a tesnedvekben inaktív formában találhatók meg. A komplementrendszer lektin-függő módon és az alternatív úton aktiválódva a veleszületett immunitás nélkülözhetetlen eleme, ellenanyag jelenlétében pedig a klasszikus úton indul meg aktivációja. A komplementrendszer az immunrendszer működése során alapvetően fontos effektor funkciókat lát el, ezen túl bizonyos komplementfehérjék és komplementreceptorok (CR) szabályozó szereppel is rendelkeznek az immunválasz különböző fázisaiban.

A C1q a komplementaktiváció klasszikus útja során először aktiválódó C1-komplex felismerő alegysége. A klasszikus út aktivációját elindító C1 komponens három alegységből álló, Ca^{2+} -ionokkal stabilizált makromolekula, amely a C1q mellett enzimatis aktivitással is rendelkező C1r és C1s alegységeket is tartalmaz.

A 450 kDa-os C1q molekula 18 hármásával összefonódott polipeptidláncból épül fel. Tulipáncsokorszerű hexamer szerkezetét három szerkezeti egység alkotja, melyeknek két-két alegységét diszulfid hidak kapcsolják össze. Az alegységek három különböző (A, B és C) polipeptidláncból állnak. A molekula N-terminális részén kollagénszerű motívumok (Gly-Xaa-Yaa) hármás hélix szerkezetet alakítanak ki. A C-terminális részén lévő hat globuláris fejen keresztül, a C1q az immunkomplexben lévő IgM, IgG1, IgG2, IgG3 molekula CH2 és CH3 doménjét ismeri fel (15). A C1q molekulához két C1r és két C1s szerin-proteáz molekula kötődik. Ezek aktiválódása a C1q aktiváló felszínhez való kötődését követő konformáció változás hatására következik be. Az aktiválódott C1-komplexről a C1-inhibitor hatására a C1r₂ és C1s₂ disszociál, így az immunkomplexhez továbbra is kötött C1q molekula kollagénszerű doménje révén C1q-receptorokhoz kapcsolódik. A teljes C1-komplex nem tud C1q-receptorhoz kötődni, mivel a C1r és C1s alegységek elfedik a kollagén részen található kötőhelyet.

A C1q molekula szoros szerkezeti hasonlóságot mutat a kollektin családba tartozó fehérjékkel - MBL, SP-A, SP-D, CL-43, conglutinin -, amelyekben szintén kollagénszerű rész és globuláris egység található. A kollektinek közé tartozó mannózkötő lektin, az MBL strukturális és funkcionális analógiát mutat a C1q komponenssel. A komplementrendszer szabályozó fehérjék a szerin-proteáz alegységeket lehasítva lehetővé teszik, hogy a molekula sejtfelszíni receptorokhoz kötődjön. A szérumban az MBL dimer, trimer vagy tetramer alakban van jelen. Az egyes alegységeket három azonos felépítésű 32 kDa méretű peptidlánc alkotja. Az MBL a baktériumok, gombákhoz és vírusokhoz sejtfalában lévő mannóz-, N-acetil-glükózamin-, N-acetil-mannózamin, és fukóz-csoportokhoz kötődik.

Irodalmi adatok szerint a C1q molekula, a komplement aktivációban betöltött felismerő szerepe mellett, fokozza a makrofágok antigén felvételét és az apoptotikus sejtek fagocitózist (16). A közlemények több, a globuláris- és a kollagén-domén megkötésére alkalmas C1q-receptort írnak le. A kollagén-C1q-receptort (cC1qR) MBL kötésére is alkalmasnak tartják, viszont ezt újabb eredmények nem erősítik meg. A leginkább elfogadott cC1qR a membrán-kötött kalretikulin CD91 molekulával alkotott komplexe (17). Korábbi OTKA pályázatainkhoz kapcsolódóan vizsgáltuk az MBL molekula kötődését különböző leukocitákhoz. Megállapítottuk, hogy az MBL elsősorban monocita-makrofág sejtekhez kapcsolódik, T és B limfocitákhoz nem, ellentétben a C1q molekulával, továbbá az MBL molekula a C1q molekulától eltérő receptorhoz kapcsolódik monocita/makrofág sejtek felszínén (18).

A C3, C4, és C5 komplementfehérjék az α_2 -makroglobulin család tagjai. Ezek a fehérjék mintegy 700 millió éve jelentek meg a többsejtű szervezetekben. A molekulacsalád tagjaira jellemző a molekulaláncon belüli *tioészter csoport (TED)*, valamint a funkcionálisan

fontos *makroglobulin domének (MG)*. A C3 187 kDa tömegű, két diszulfid híddal kapcsolt láncból; az α és β láncokból álló molekula.

A C3 aktivációja proteolitikus hasítás révén valósul meg (19). A C3a lehasításának hatására C3b fragmentum és feltárul az eddig rejtett helyzetű, igen reaktív tioészter kötés, melyen keresztül a molekula az aktiváló felszínhez kovalensen képes kapcsolódni. A C3b fragmentum az aktivációt elindító sejt, részecske vagy molekula, a környezetében levő ún. akceptor struktúrák OH-csoportjaival észter-, NH_2 -csoportjaival pedig amidkötést alakít ki. Amennyiben a C3b kialakítja a C5 konvertázt, akkor a kaszkád a membránkárosító komplex (MAC) kialakulásához vezet. Abban az esetben viszont, ha az I faktor szolubilis vagy membránkötött kofaktorról tovább hasítja a C3b molekulát, akkor kialakul az *inaktivált C3b (iC3b)*, amely a kaszkád továbbvitelére már nem alkalmas, de komplementreceptorhoz való kapcsolódásra igen. Következő hasítási lépésben az iC3b-ből kihasad a C3c fragmentum. Ezt követően a target felszínéhez kötötten a 40 kDa tömegű C3dg fragmentum marad. A C3 komponens központi szerepet játszik a komplementrendszer működése során, az aktiválása eredményeként keletkező fragmentumok sokoldalú biológiai funkciókat látnak el.

Az antigén felszínéhez kovalensen kötődött C3b, C3d és iC3b fragmentumok CR1, CR2 és CR3 komplementreceptort hordozó sejtekhez kapcsolódhatnak. A CR1 (CD35) C3b/C4b fragmentumokkal reagáló komplementreceptor. A lép és a nyirokcsomók csíráközpontjaiban jelenlevő follikuláris dendritikus sejteken a CR1 és a CR2, főleg B-limfocitákon expresszálódik, az előbbi a BCR-en keresztüli aktivációt negatívan, míg az utóbbi pozitívan befolyásolja, az immunológiai memória kialakulásában játszanak szerepet. A vörösvértesteken jelenlevő CR1 alapvető funkciója immunkomplexek eltávolítása a keringésből. A komplementfehérje-fragmentumokkal opsonizált immunkomplex a vörösvértesteken található CR1-el kölcsönhatásban elősegíti azok elszállítását a máj makrofágjai és dendritikus sejtjei által (20). A CR2 (CD21) B-limfocitákon, aktivált T-sejteken, hízósejteken és follikuláris dendritikus sejteken jelenik meg, DC-en jelenlétét nem sikerült igazolni. A CR3 (CD11b/CD18) és ligandumai közötti reakció Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionokat igényel. A CR4 receptor CD18 és CD11c láncból áll. A CR3 és CR4 receptorok az opsonizált részecskék valamint az apoptotikus sejtek fagocitózisában játszanak szerepet (21,22). Kemotaktikus faktorok jelentősen fokozzák expressziójukat neutrofil granulocitákon valamint monocitákon és makrofágokon. A *C3aR* és *C5aR* az anafilatoxikus hatású C3a és C5a peptidet kötésére képes 7 transzmembrán régiót tartalmazó receptor. Előbbiről kimutatták, hogy dendritikus sejtek kemotaxisában és aktivációjában játszik szerepet, de az általunk is használt monocita eredetű dendritikus sejteken nem expresszálódik (23). A C3-receptorok mellett a C1q komponenst kötő C1qR-ok jelenléte ismert dendritikus sejteken (24). A legújabban leírt Ig domént tartalmazó CRIg-t csak makrofágokon mutatták ki, szerepük a komplementfehérjével opsonizált partikulumok fagocitózisa (25).

II. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Vizsgálatainkban emberi monocitákból *in vitro* differenciáltatott dendritikus sejteket (MDC) használtunk. Az MDC-eket emberi egészséges donorok véréből sűrűség-gradiens centrifugálással és adherencia módszerrel izolált monocitákból állítottuk elő (26). A monociták rekombináns humán IL-4 és GM-CSF jelenlétében, savó-mentes médiumban tenyésztve, 5 nap múlva éretlen DC-é (imMDC) differenciálódnak és további stimulus – LPS vagy TNF - hatására érett DC-é (maMDC) alakulnak (27,28). Kísérleteinkben MDC kultúrák sejtjein meghatároztuk komplementfehérjék kötődésének mértékét, jelzett ellenanyag segítségével, citofluorimetriával. Előkísérletben beállított szendvics ELISA módszer segítségével, MDC-k felülűszóiból határoztunk meg komplementfehérje és citokin termelést. Az MDC-k aktiválódásának nyomkövetésére vizsgáltuk az NF- κ B magi transzlokációját

Western blot módszerrel, illetve konfokális lézer scanning mikroszkópiával (CLM). A sejtmembránhoz kötődött fehérje-fragmentumok internalizációját FACS és CLM segítségével követtük nyomon. Sejtfelszíni receptorok működésének jellemzésére géncsendesítés módszerét alkalmaztuk. Az allogén T-sejtek proliferációját ³H-timidin beépülés vizsgálatával és CFSE módszerrel határoztuk meg.

III. EREDMÉNYEK

A C1q komplementfehérje szerepe MDC-k funkcióira

A komplementaktiváció klasszikus útjának aktiválása mellett a C1q számos immunológiai folyamat résztvevője, mint a baktériumok és vírusok fagocitózisa és neutralizációja és az immunológiai tolerancia biztosítása az apoptotikus sejtek clearance révén (29). Mivel a C1q komplementfehérje kimutatható a szervezetben jelenlévő immunkomplexekben valamint a kórokozók és apoptotikus sejtek felszínéhez is kötődik, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon ez a komplementfehérje képes-e befolyásolni a DC-k különböző funkcióit.

A tisztított C1q koncentráció függő módon kötődik az imMDC-khez, viszont ez a kötődés a sejtek differenciációja során visszaszorul. Ezzel ellentétben, a C1q szerkezeti homológja; az MBL nem kötődik sem az éretlen, sem az érett MDC-khez.

Humán dendritikus sejteken kétféle C1q-kötő struktúrát azonosítottak; a kollagén-részt (cC1q) megkötő cC1qR-t, valamint a globuláris-részt (gC1q) megkötő gC1qR-t (30). Korábban kimutatták, hogy az MDC-k mindkét típusú C1qR-t expresszálják (16).

Vizsgálatainkban az MDC-eket C1q-val fedett felszínen inkubáltuk, majd megvizsgáltuk a sejtek CD80, CD83, CD86, MHCII és CCR7 expresszióját. Valamennyi membránfehérje esetében növekedést tapasztaltunk. Abból a célból, hogy tisztázzuk, a C1q kollagén-szerű része, vagy a globuláris doménje közvetíti-e az aktivációt, az MDC-eket kezeltünk tisztított cC1q-val és gC1q-val. Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét fragmentummal történő kezelés fokozta a sejtfelszíni CD83, CD86 és MHCII mennyiségét, vagyis mind a cC1qR, mind a gC1qR résztvesz az MDC aktivációjában.

Az MDC-k funkcionális aktivitását az NF- κ B transzlokáció nyomkövetésével, a sejtfelülűsözből citokinek mennyiségi meghatározásával és az allogén T-sejt aktiváló képesség mérésével jellemeztük. A C1q kezelés hatására az imMDC-kben az NF- κ B gyors magi transzlokációját mutattuk ki. Az aktivált MDC-kből származó citokinek célzottan stimulálják a különböző T-sejt alpopulációkat. Az IL-12-t termelő MDC-k főképp Th1, az IL-4 elsősorban Th2 választ vált ki (1). Az is ismert, hogy bizonyos DC-k képesek a tolerancia kialakításában meghatározó szerepet játszó Treg sejtek aktiválására, ezek jellemzően IL-10-t szekretáló DC-k (7). A C1q-val kezelt MDC-k fokozott mennyiségben termeltek IL-12-t és TNF α -t, a C1q kezelt MDC-T-sejt kokultúrák felülűsójában pedig fokozott IFN γ szekréciót mértünk. Feltételezhetően, az aktivált MDC-kből származó IL-12 által stimulált Th1 sejtek felelősek a megövekedett IFN γ szintéziséért. Ezután meghatároztuk a C1q-val aktivált MDC-k allogén T-sejt aktiváló képességét, proliferációs teszt segítségével, ³H-timidin beépülés mérésével. Eredményeink azt mutatták, hogy a C1q kezelés következtében, az imMDC-k T-sejt proliferációt kiváltó képessége szignifikánsan megnőtt.

HANO betegek szérum MBL mennyiségének meghatározása

A *herediter angioneurotikus ödéma (HANO)* egy ritka (1/10000 és 1/50000 között), de potenciálisan életet veszélyeztető betegség, amit a C1 inhibitor fehérje (C1INH) csökkent szintje vagy abnormális funkciója okoz. A HANO-ra jellemző a visszatérő, rohamokban

jelentkező ödéma, ami leggyakrabban a bőrön, a légutak vagy a tápcsatorna nyálkahártyájában jelenik meg. A C1INH hiánya miatt a komplementrendszer klasszikus útjának autoaktivációja jön létre. A HANO kialakulását tekintve, öröklött és szerzett formája egyaránt ismert. A lektin-függő útvonal aktiválódásának jelentősége HANO betegek esetében nem ismert. Ennek tisztázása volt a célja annak a munkának, amelyben kollaborációs partnerként vettünk részt. Eredményeink a kollaborációban készült közlemény részét képezik. Az intézetünkben korábban kifejlesztett ELISA módszer alkalmazásával határoztuk meg az MBL koncentrációját HANO betegek vérszérumában. Méréseink szerint, a HANO páciensek szérum MBL szintje és a komplementkaskád MBL-függő aktivációja nem mutatott eltérést a normál értékhez képest (31).

A C3 komplementfehérje hatása MDC-k érésére és működésére

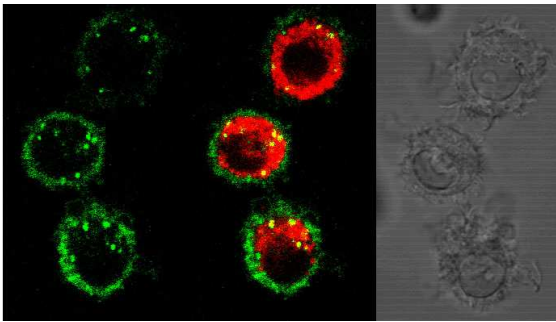
A C3 komplementfehérje sejtekhez kötődésére két egymástól eltérő út kínálkozik; ezek a komplementreceptorhoz kapcsolódás, valamint a kovalens fixáció. A humán MDC-k *in vitro* differenciálódása során a sejtek komplementreceptor mintázata gyökeresen átalakul. Ismert, hogy a CR1 molekulák a monociták és makrofágok esetében fontos szerepet játszanak az opsonizált antigén megkötésében és fagocitózisában. Ezzel szemben a CR1 expresszióját az *in vitro* MDC érés során nem jellemezték. Munkánk során kimutattuk, hogy a monocitákból történő differenciáltatás alatt a CR1 mennyisége a sejtek felszínén folyamatosan csökken, majd a tenyésztés 5. napjától, az imMDC-ken nem mutatható ki a receptor, továbbá nem detektálható CR1 az aktivációs stimulus hatására éretté váló maMDC-k sejtmembránjában sem (32).

A mieloid eredetű dendritikus sejtek esetében ismert, hogy felszínükön a CD11c és CD11b konstitutív módon expresszálódik, valamint a CD11c a mieloid sejtekre jellemző marker molekula is. A CR3 és CR4 elsődleges liganduma a C3 molekula aktiválódása során keletkező iC3b-fragmentum (24).

A CR-ok mellett további lehetőség a C3 molekula megkötésére a naszcensz C3b-fragmentum sejtmembránhoz való kovalens kapcsolódása, ezt a folyamatot munkacsoportunk korábban monociták és makrofágok esetében részletesen jellemezte. Sajnos, a kovalens kötésért felelős struktúrát, a C3b akzeptort - bár számos kutatócsoport próbálkozott vele -, máig nem sikerült azonosítani.

Kutatócsoportunk az 1980-as évek elején leírta, hogy a B-sejtek 57%-a kötött C3 fragmentumot hordoz, ellentétben a nyugvó T-sejtekkel (33). Az aktivált C3b elméletileg bármilyen nukleofil csoportokhoz kapcsolódhat, viszont a sejtek felszínén jelenlevő C3b akceptor struktúrák telíthetőnek mutatkoztak. Kísérleteinkben ugyanerre az eredményekre jutottunk MDC-k esetében; a sejtek a natív, tisztított C3-at dózisfüggő módon, kovalensen fixálják felszínükön. Hasonló eredményt tapasztaltunk, ha normál humán savót (NHS) alkalmaztunk komplement forrásként. A kizárólag komplement receptorokhoz kötődni képes, metilamminnal (MA) kezelt C3 esetében kötődést nem tudtunk kimutatni. Ez arra utal, hogy az MDC-khez a C3 túlnyomórészt kovalensen fixált. Mivel az MDC-k CR3-at és CR4-et is kifejeznek, ellenőriztük a CR3-on keresztül történő kötődés lehetőségét egy további kísérletben; a ligandumkötőhelyre specifikus monoklonális ellenanyaggal - TMG6-5, Dr Andó István ajándéka -, inkubálva a sejteket a natív C3 kezelést megelőzően, a C3b depozíciót nem sikerült visszaszorítani, ami megerősíti, hogy fragmentum kovalensen kötött. A felszínhez kapcsolódó C3 fragmentumok mennyiségét vissza tudtuk szorítani, ha a natív C3 kezelés előtt a sejteket szerin-észteráz gátló PMSF-el előinkubáltuk. Ez, a más sejtek esetében is tapasztalt megfigyelésünk alátámasztja, hogy a C3 elhasításában, a kovalensen kötődő C3b fragmentumok előállításában, a sejtek által termelt proteázoknak szerepük van.

Tanulmányoztuk a natív C3 MDC-khez kötődését konfokális mikroszkópiával is. Jelöltük a C3-al kezelt, majd feltárt mintákon a C3-at (zöld) és a lizoszómák LAMP-1 fehérjét (vörös). Az 1. ábrán látható, hogy a kötődött C3 fragmentumok erős festődést mutatnak mind a sejtek felszínén, mind a sejtek belsejében. A felszínen nagyjából egyenletes eloszlást láttunk, viszont intracellulárisan vezikulumok formájában volt jelen a fehérje. A vezikulumok részben lizoszómával asszociáltak, részben nem. Annak megállapítása, hogy a kétféle vezikulum populáció hogyan alakul ki, további vizsgálatokat igényel.



1. ábra

C3 fragmentumok kötődése és internalizációja imMDC-ken, CLM vizsgálat

A natív C3-al kezelt, majd feltárt imMDC-k anti-C3-FITC (zöld) jelölve (bal oldal), anti-LAMP-1-PE (vörös) jelölve (középen)

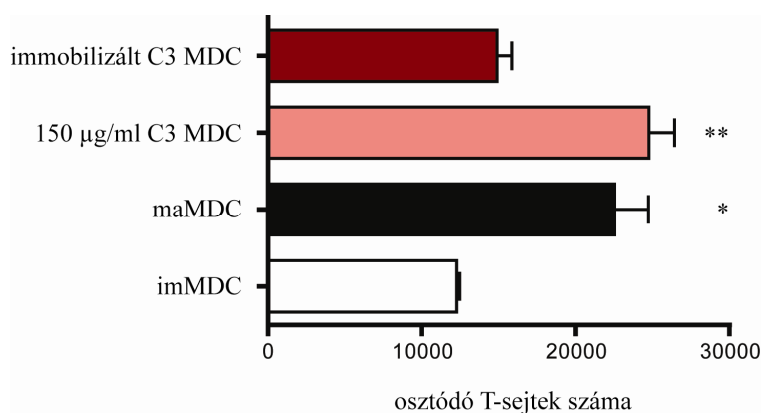
Megvizsgáltuk a C3 kezelés hatását az MDC-k érésére, FACS vizsgálattal nyomonkövetve a sejt felszíni membránfehérjék expresszióját. Rendszerünkben a natív C3-mal kezelt MDC-k esetében szignifikánsan megnőtt a CD83, a CD86 és az MHCII molekulák expressziója, így az LPS jelenlétében teljesen éretté vált maMDC-khez hasonló fenotípust nyertek. Viszont különböztek az LPS kezelt sejtektől abban, hogy a kezelés a CD80 és MR molekulákra nem volt hatással. Abban az esetben, ha az MDC-k csak CR révén köthették meg a műanyag felszínhez kötődött, ezáltal kovalens kapcsolódásra már nem képes, *immobilizált* C3 fragmentumokat, akkor a sejtek fenotípusa nem változott. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a CR3-nak van-e közvetett szerepe a kovalensen kapcsolódó C3b aktivációs stimulusának közvetítésében. Ehhez RNS silencing technikával csökkentettük a CD11b, ezáltal a CR3 mennyiségét a MDC-ken. A kontroll siRNS szekvencia nem befolyásolja a receptor expresszióját. A normál és a csökkent CR3-at hordozó sejteket kezeltük natív C3-mal. Az eredmények azt mutatják, hogy a szignifikánsan kevesebb CR3-at expresszáló sejtek natív C3-mal kezelve ugyanolyan hatékony aktivátorai voltak az allogén T-sejteknek, mint a kontroll, a CR3-at normális mennyiségben kifejező, natív C3 kezelt MDC-k. Mindezekből arra következtethetünk, hogy a CR3 indukció nem aktiválja a sejteket, ellentétben a kovalensen megkötött C3b hatásával.

Egy nemrég megjelent közlemény adatai szerint az MDC-k igen jelentős mennyiségben szintetizálnak C1q-t, ami - hasonló koncentrációban -, korábban csak aktivált makrofágok esetében volt ismert (34). Ezért tartottuk érdekesnek megvizsgálni azt, hogy a C3 kötődése vajon befolyásolja-e egy másik komplementfehérje, a C1q termelését. Kísérleteink szerint a C3 fixációja nem okozott szignifikáns változást a sejtek C1q termelésében.

A T-sejtek aktiválásában fontos szerepet játszanak a DC-k által szekretált citokinek. Vizsgálatainkban HS/C3 kezelt MDC kultúrák illetve MDC-T-limfocita kokultúrák felülűszóiból meghatározzuk a termelt citokineket, amit Th1/Th2 microbead assay segítségével citofluoriméterrel, valamint ELISA teszttel mérünk meg. Méréseink szerint, a

natív C3 kezelés dózis-függő módon fokozta az imMDC-k IL-6, TNF α és IL-8 gyulladási citokin szekrécióját, viszont az immobilizált C3 kezelésnek nem volt hatása.

A dendritikus sejtek fő feladata a T-limfociták aktivációja, ezért vizsgáltuk, hogy a C3 hogyan vesz részt ebben a folyamatban. Korábbi eredményeink szerint az APC-hez kötődő C3-fragmentumok megerősítik T-sejtekkel való kölcsönhatásukat, így fokozva a T-sejtek aktiválhatóságát (35). Kísérleteinkkel alátámasztottuk, hogy a C3 a MDC-k felszínéhez kovalensen kapcsolódva, elősegíti azok allogen T-sejt stimulációját (2. ábra). Bizonyítottuk, hogy ezért nemcsak a C3 által a DC-kben előidézett változások; úgymint fokozott kostimulátor és MHCII expresszió felelősek, hanem a sejtek felszínéhez kapcsolódó C3 által létrehozott kölcsönhatás. Ezen eredményeink, más adatokkal összhangban arra utalnak, hogy valószínűleg a DC-k felszínéhez kovalensen kötődött C3 a T-sejteken jelen levő komplement receptorokhoz kapcsolódva stabilizálhatja a két sejt kapcsolatát, és jelátviteli folyamatokat is beindíthat (36).



2. ábra

Natív C3-mal kezelt és immobilizált C3-al fedett felszínen tartott MDC-k allogen T-sejt stimuláló képessége

Tisztázni kívántuk, hogy a natív C3-al kezelt MDC-k vajon nem szolubilis faktorok (pl. citokinek) közvetítésével aktiválják-e a limfocitákat. A C3-al kezelt MDC-k sejtmentes felülszóját az imMDC-khez adva nem fokozódott a sejtek T-sejt stimuláló képessége. Másik kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a C3 kezelés után még 48 órával is az MDC felszínén kimutatható C3 fragmentumok milyen szerepet töltenek be T-sejt osztódás fokozásában. Ehhez, a MDC-eket fixáltuk a C3 kezelés után, így a kostimulátor fokozó hatás nem érvényesülhetett. Eredményeink alapján az ilyen módon kezelt MDC-k szignifikánsan fokozták a T-sejtek proliferációját összehasonlítva a kezeletlen imMDC-khez. Mindez bizonyítja, hogy az MDC-ken fixált C3 által közvetített aktivációs jel meghatározó a T limfociták stimulálásában. Végül, bizonyítottuk azt is, hogy a C3 váltja ki az MDC-k funkcionális változását, ugyanis ha egyidejűleg a C3 kezeléssel, anti-C3 F(ab')₂ ellenanyag-fragmentumok hozzáadásával blokkoljuk a C3 közvetített aktivációt, akkor a stimuláló hatás elmaradt.

Az immunsejtek számos komplementfehérje szintézisére képesek, a C3 elsődleges előállítói a makrofágok (37). A szakirodalom nem volt egységes tekintetben, hogy a DC-k képesek-e C3-t termelni. Az erre vonatkozó vizsgálatok C3 mRNS kimutatásával történtek (38,39). Saját eredményeink szerint, az MDC kultúrák felülszójából nem mutatható ki

szekretált C3. Ezzel ellentétben, az aktivált monocita eredetű makrofágok nagy mennyiségben termelnek C3-t.

Az immunszervekben makrofágok és dendritikus sejtek egymás közvetlen környezetében fordulnak elő. Abból a célból, hogy megvizsgáljuk a makrofágok és DC-k közti kölcsönhatásban a C3 szerepét, beállítottunk egy fiziológiai körülményeket modellező kísérleti rendszert. Vizsgálatunkban ugyanannak a donornak a monocitáiból *in vitro* makrofágokat (MM) és MDC-ket differenciáltattunk és azokból kokultúrákat készítettünk. A sejteket szérumentes közegben tartottuk, így rendszerünkben a MM-ok jelenthették a kizárólagos C3 forrást. Eredményeink szerint, az MDC-k képesek az aktivált makrofágok által termelt C3-at felszínükön kovalensen megkötni. A PMA-val történő aktiváció a MM-ok C3 termelését fokozta a nyugalmi állapothoz képest. Mivel a C3 differenciálódást kiváltó hatását az MDC-k esetében igazoltuk, ezért feltételezzük, hogy az aktivált makrofágokból felszabaduló és dendritikus sejtekhez kötődő C3, mint gyulladáshoz vezető stimulus, fontos szerepet játszhat a DC-k *in vivo* differenciációjában és aktivációjában. A nem aktivált MM-ok által termelt C3 mennyisége nem volt elegendő az MDC-k aktiválásához. Feltételezésünk szerint, a gyulladáshoz vezető stimulus hatására lépi át a C3 szintet a kritikus küszöbértéket, ami már kiváltja az MDC-k aktivációját.

Ghannam és munkatársai nemrég megjelent közleményükben a *C3 deficiencia* következményeit vizsgálták (40). Egy C3 hiánnyal rendelkező homozigóta gyermeket és heterozigóta szüleit vizsgálták. A gyermek szérumban a C3 szintje és CH50 értéke a detektálási küszöb alatt volt, szüleinél mindkét érték a normális felének adódott. A beteg perifériás mononukleáris sejteit elemezve megállapították, hogy azok nem képesek normális antigénprezentáló funkciót ellátni. Mindez magyarázat arra, hogy ezekben a betegekben súlyos, visszatérő bakteriális fertőzések alakulnak ki, ami a beteg halálához vezet. Vizsgálták a homozigóta gyermek monocitáiból differenciáltatott dendritikus sejtek működését. Súlyos differenciálódási zavart állapítottak meg, mert az egészséges donorok monocitáihoz képest, amelyek 90%-ban alakultak MDC-vé, a beteg sejteinek csak töredéke volt erre képes. Ezek az eredmények összhangban állnak vizsgálatainkkal és erősen alátámasztják azt a megfigyelésünket, hogy a C3 kivételesen fontos szerepet tölt be, nemcsak az immunválasz szabályozásában, hanem a dendritikus sejtek megfelelő fejlődésében is.

Az MDC eredetű exosomák vizsgálata

Amint korábbi közleményeinkben leírtuk, a C3-fragmentumok fokozzák a T-sejt választ (35). A DC-k által közvetített aktivációs folyamatokban az exosomákhoz kapcsolódott komplementfragmentumok szerepét korábban nem vizsgálták. Feltételeztük, hogy a komplementfehérje mediált aktiváció az antigénprezentáló sejtek által szekretált exosomák közvetítésével is megvalósulhat. Vizsgáltuk a P388D1 egér makrofág továbbá B sejtvonal sejteit szérummal történő kezelés után. Kimutattuk, hogy a kezelés hatására a sejtek felszínén megnőtt a fixált C3-eredetű fragmentumok mennyisége (41). A szérum kezelést követően, az idő előrehaladtával a sejt felszínén fixált komplementfragmentumok mennyisége csökkent, ezzel párhuzamosan viszont a sejtek felülcsúszójában kimutatott C3-fragmentumok mennyisége szignifikánsan megnőtt. Ezeknek a C3-eredetű fragmentumoknak a túlnyomó része, az ultracentrifugálással elkülönített exosoma frakcióban volt azonosítható. Az exosomák jelenlétét és a felszínükön fixált C3-fragmentumokat elektromikroszkópos vizsgálattal is megerősítettük. A fehérje antigénnel és szérummal kezelt makrofágokból exosoma frakciót különítettünk el. Az izolált, C3 fragmentumokat tartalmazó exosoma frakcióval kezelt makrofágok fokozott mértékben tudták stimulálni a specifikus T sejtek proliferációját.

Az elmúlt évben beállítottuk intézetünkben az egér csontvelőből történő DC tenyésztés in vitro módszerét. Az in vitro differenciáltatott egér DC-k estében igazoltuk, hogy a sejtek fixálják felszínükön a savóból származó C3 fragmentumokat és ez kimutatható a sejtek által szekretált exosomák frakciójában. Mivel azt is kimutattuk, hogy az emberi MDC-k is megkötik kovalensen a C3b-t ezért megvizsgáltuk, hogy a kezelést követően a sejtek felülúszójának exosomákat tartalmazó frakciójában is megjelenik-e a C3b, úgy mint a másik két sejtípus esetén. Ennek érdekében a natív C3 kezelés után a sejteket különböző ideig inkubáltuk, a felülúszót ultracentrifugálással ülepítettük és C3 tartalmát ELISA módszerrel mértük. Eredményeink szerint, a natív C3-al kezelt MDC-k által termelt nanopartikulum frakcióban megjelenik a C3 molekula. A nanopartikulumok jellemzésére és funkcionális vizsgálatára további kísérleteket tervezünk elvégezni laboratóriumunkban. A módszer lehetőséget nyújt arra is, hogy a jövőben megvizsgálhassuk a DC érést C3 hiányos környezetben, C3 KO állatokban.

A pályázat témakörében készült dolgozatok:

TDK dolgozat

Kristóf Katalin: A komplementrendszer lektinfüggő aktivációs útjának vizsgálata hereditár angioneuroticus oedemában. TDK I Díj, 2007.

Paréj Katalin: C3 komplementfehérje hatása egér dendritikus sejtek érésére és funkcióira. TDK Különdíj, 2008.

Pap Domonkos: CR3 komplementreceptor vizsgálata humán dendritikus sejteken. TDK I. Díj, 2010.

Szakkolgozat

Paréj Katalin: C3 komplementfehérje hatása egér dendritikus sejtek érésére és funkcióira. 2009.

Pap Domonkos: C3 komplementfehérje szerepe emberi monocita eredetű dendritikus sejtek (MDC-k) működésére. Várható befejezés 2011.

PhD értekezés

Csomor Eszter: The effect of complement C1q and Toll-like receptor ligands on human monocyte-derived dendritic cells; immunity versus tolerance. 2007.

Sándor Noémi: A C3 komplementfehérje hatása humán monocita eredetű dendritikus sejtek funkcióira. 2010.

Hivatkozások

1. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767. Review.
2. Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 19-30 (2007).
3. Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 111(7):927. Review
4. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004 Oct;5(10):987-95. Review
5. Kaisho T, Akira S. Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Curr Mol Med.* 2003 Dec;3(8):759-71. Review

6. Pulendran B. Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2457-65. Review
7. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004 Nov;4(11):841-55. Review
8. Smits HH, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 2005 Mar;26(3):123-9. Review.
9. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002 Aug;2(8):569-79.
10. Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* 2002 Dec;3(12):1156-62.
11. Segura E, Nicco C, Lombard B, Veron P, Raposo G, Batteux F, Amigorena S, Thery C. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T cell priming. *Blood.* 2005 Mar 24.
12. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD Jr, Thomson AW. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* 2004 Nov 15;104(10):3257-66.
13. Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulleire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.* 2005 Mar 2;3(1):10.
14. Akbari O, Umetsu DT. Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005 Jan;5(1):56-61. Review.
15. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* 2004 Jul;25(7):368-73.
16. Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3044-50.
17. Sim RB, Moestrup SK, Stuart GR, Lynch NJ, Lu J, Schwaeble WJ, Malhotra R. Interaction of C1q and the collectins with the potential receptors calreticulin (cC1qR/collectin receptor) and megalin. *Immunobiology.* 1998 Aug;199(2):208-24. Review
18. Bajtay Zs, Józsi M, Bánki Z, Thiel S, Thielens N, Erdei A. MBL and C1q bind to distinct structures on lymphocytes and macrophages and mediate differential effects. *European Journal of Immunology*, 2000. 30. 1706-1713.
19. Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature.* 2006 Nov 9;444(7116):213-6.
20. Erdei A, Isaák A, Török K, Sándor N, Kremlitzka M, Prechl J, Bajtay Z. Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions. *Mol. Immunol.* 2009 Sep;46(14):2767-73. Epub 2009 Jun 25. Review.
21. Le Cabec V, Carreno S, Moisan A, Bordier C, Maridonneau-Parini I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *J Immunol.* 2002 Aug 15;169(4):2003-9.
22. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Zahorchak AF, Logar AJ, Papworth GD, Wang Z, Watkins SC, Falo LD Jr, Thomson AW. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood.* 2003 Jan 15;101(2):611-20.

23. Soruri, A. *et al.* IL-4 down-regulates anaphylatoxin receptors in monocytes and dendritic cells and impairs anaphylatoxin-induced migration in vivo. *J. Immunol.* **170**, 3306-3314 (2003).
24. Bajtay, Z., Csomor, E., Sandor, N. & Erdei, A. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol. Lett.* **104**, 46-52 2006.
25. Helmy, K. Y. *et al.* CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* **124**, 915-927.2006.
26. Freundlich, B., N. Avdalovic. 1983. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripleral blood monocytes. *J. Immunol. Meth.* 62:31.
27. Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180(1):83.
28. Sallusto, F., Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179(4):1109.
29. Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KB, Sim RB, Arlaud GJ. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol.* 2004 Oct;25(10):551-61. Review
30. Vegh Z, Goyarts EC, Rozengarten K, Mazumder A, Ghebrehiwet B. Maturation-dependent expression of C1q-binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2003 Mar;3(3):345-57
31. Varga, Lilian; Széplaki, Gábor; Laki, Judit; Kocsis, Andrea; Kristóf, Katalin; Gál, Péter; Bajtay, Zsuzsa; Wieslander, J; Daha, M R; Garred, P; Madsen, H; Fust, George; Farkas, Henriette: Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol.* 2008 Jul;153(1):68-74.
32. Sándor N, Pap D, Prechl J, Erdei A, Bajtay Z. A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes *Mol Immunol.* 2009 Dec;47(2-3):438-48.
33. Erdei, A., Fust, G., Gyenes, J., Fabry, Z. & Gergely, J. C3b acceptors on human peripheral blood mononuclear cells; characterization and functional role. *Immunology* **49**, 423-430 (1983).
34. Castellano G, Woltman AM, Nauta AJ, Roos A, Trouw LA, Seelen MA, Schena FP, Daha MR, van Kooten C. Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro. *Blood.* 2004 May 15;103(10):3813-20.
35. Krisztina Kerekes, József Prechl, Zsuzsa Bajtay, Mihály Józsi, Anna Erdei: A further link between innate and adaptive immunity: C3-deposition on antigenpresenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells *International Journal of Immunology*, 1998. 10, 1923-1930.
36. Longo, A. *et al.* C3-induced 3LL cell proliferation is mediated by C kinase. *J. Cell Biochem.* **94**, 635-644. 2005.
37. Colten, H. R., Strunk, R. C., Perlmutter, D. H. & Cole, F. S. Regulation of complement protein biosynthesis in mononuclear phagocytes 10. *Ciba Found. Symp.* **118**, 141-154. 1986.
38. Peng, Q., Li, K., Patel, H., Sacks, S. H. & Zhou, W. Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. *J. Immunol.* **176**, 3330-3341. 2006.
39. Reis, E. S., Barbuto, J. A. & Isaac, L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm. Res.* **55**, 179-184. 2006.
40. Ghannam, A. *et al.* Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J. Immunol.* **181**, 5158-5166. 2008.

41. Krisztián Papp, Péter Végh, József Prechl, Krisztina Kerekes, János Kovács, György Csikós, Zsuzsa Bajtay, Anna Erdei: B lymphocytes and macrophages eliminate cell membrane deposited C3 fragments by forming exosomes with immune response enhancing activity. *Mol Immunol.* 2008 Apr;45(8):2343-51.