

Bevezetés

A komplementrendszer természetes immunitás fontos eleme. A kaszkád elsődleges szerepe a patogén mikrobák opszonizációja, fagocitózisa és komplement-függő sejtlyzise. A rendszer aktivációja eredményeként az antigén felszínéhez kötődő komplementfehérje-fragmentumok különböző komplementreceptorokat (CR) hordozó sejtekhez irányítják az idegen anyagot. Ezeknek a receptoroknak legfontosabb feladata a C1q-val, mannózkötő lektinnel (MBL) és C3-fragmentumokkal opszonizált antigén megkötése és felvétele. A komplementreceptorok különböző típusai jelen vannak az immunsejtek felszínén, így többek közt a dendritikus sejteken (DC) is.

A C1q és az MBL molekula szerkezete

A C1q molekula a C1 komplex felismerő alegysége, natív állapotban szerin-proteázok (C1r,C1s) kapcsolódnak hozzá. A 460 kDa-os molekula 18, hármásával összefonódott polipeptidláncból épül fel. Ezek N-terminális részén kollagénszerű motívumok (Gly-Xaa-Yaa) hármás hélix szerkezetet alakítanak ki. A teljes molekula hexamer, a C-terminálison lévő globuláris fejeket keresztül immunglobulinok CH2 és CH3 doménjéhez kötődik (Gaboriaud, 2004).

A kollektinek közé tartozó MBL strukturális és funkcionális analógiát mutat a C1q komponenssel. A komplementrendszert szabályozó fehérjék a szerin-proteáz alegységeket lehasítva lehetővé teszik, hogy a molekula sejt felszíni 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-t legnagyobb részben a máj hepatocitái termelik. Az MBL a baktériumok, gombákhoz és vírusokhoz sejt falában lévő mannóz-, N-acetil-glükózamin-, N-acetil-mannózamin, és fukóz-csoportokhoz kötődik.

A DC-k képesek a naív T-sejtek aktiválására, így kapcsolatot biztosítanak a természetes és az adaptív immunrendszer között. A DC-k testszerte jelen vannak és folyamatos cirkulációjuk ellenőrzi a szervezetbe belépő antigéneket. A DC-k éretlen formája a periférián az antigen felvételét végzi, majd ezt követően a nyirokcsomókba vándorolva érett DC-ké (maDC) differenciálódnak. Érésük során a fagocitotikus receptoraik (pl. mannóz-receptor, MR) expressziója csökken, míg az MHC molekulák, illetve a CD80, és CD86 kostimulátor molekulák mennyisége nő, továbbá fokozódik a CD83 molekulák szintje és a CCR7 kemokin-receptor is megjelenik felszínükön.

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

kalretikulín CD91 molekulával alkotott komplexe (Sim,1998). Humán dendritikus sejteken két C1q-kötő struktúrát írtak le, a kollagén-részt megkötő cC1qR-t, valamint a globuláris-részt megkötő gC1qR-t (Vegh, 2003). Korábban kimutatták, hogy a DC-k mindkét típusú C1qR-t expresszálják; a kollagén-részre specifikus cC1qR-t és a globuláris-részt megkötő gC1qR-t (Nauta, 2004).

Célkitűzés

A C1q és MBL komplementfehérjék DC-k érése és működésére gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták. Mivel ezek a komplementfehérjék *in vivo* kötődnek az immunkomplexekhez, a DC-kkel kölcsönhatásba lépve befolyásolhatják azok működését.

A pályázati munka során tanulmányoztuk az adaptív immunválasz megindításában fontos szerepet betöltő sejt típus, a dendritikus sejt C1q és MBL komplementfehérje megkötő képességét valamint a kötődés hatását a sejtek differenciálódására és aktivációjára. Vizsgáltuk a komplementfehérjék kötődésének MDC-k funkcióira gyakorolt hatását. Tanulmányoztuk a komplementfehérjékkel kezelt MDC-kben az NF- κ B transzkripciós faktor sejtmagba történő transzlokációjának változását, a sejtek citokin termelésében bekövetkező változásokat, továbbá tanulmányoztuk a T-sejtek aktivációjára és proliferációjára kifejtett hatásukat.

MDC-k érése

Kísérleteinkben emberi monociták *in vitro* tenyésztésével, rhIL-4 és rhGM-CSF jelenlétében éretlen DC-et (imMDC) differenciáltattunk. A C1q és MBL kötődését imMDC-hez citofluorimetria és konfokális mikroszkóp segítségével jellemeztük. Pozitív kontrollként LPS-el aktivált maMDC-eket alkalmaztunk (ma MDC).

A C1q fehérje imMDC-hez és maMDC-hez egyaránt kötődött dóziszfüggő módon, a kötődés mértéke a sejtek érése során kismértékben csökkent. A kötődést C1q-specifikus F(ab')₂ fragmentummal gátolni tudtuk. A C1q-val szoros szerkezeti rokonságot mutató MBL viszont nem kötődött sem imMDC-khez sem maMDC-khez.

Az *in vivo* C1q-fedett antigén felszínt rendszerünkben oly módon modelleztük, hogy az MDC-eket C1q-val fedett felszínen, immobilizált C1q jelenlétében tenyésztettük. Tanulmányoztuk az immobilizált C1q jelenlétében és hiányában tenyésztett MDC-k sejt felszíni molekuláinak expresszióját. Eredményeink szerint a C1q jelenléte erőteljesen fokozta az MHCII, CD86 és CD83 molekulák sejt felszíni megjelenését. A kontrollként alkalmazott LPS-kezelés hasonlóan hatott. A CD80 kostimulátor molekulák expressziója MDC-ken magas volt, azt a C1q-kezelés csak kismértékben fokozta, hasonlóképpen hatott az LPS-kezelés is. Az maMDC-k esetében megjelenő CCR7 molekulák sejt felszíni megjelenése szintén enyhe növekedést mutatott C1q-

kezelés következtében. A fagocitotikus MR mennyisége csökkent, a pozitív kontrollhoz hasonlóan.

Megpróbáltuk tisztázni, hogy a C1q MDC-kre gyakorolt hatása a molekula mely szakasza által szabályzott, ezért megvizsgáltuk a tisztított gC1q és cC1q fragmentumok hatását. Tapasztalatunk szerint mindkét fragmentum hasonlóan befolyásolta az MDC-k érést, ami azt valószínűsíti, hogy a C1q molekula egyaránt kötődik gC1qR-hoz és cC1qR-hoz.

T-sejt aktiváció

Vizsgáltuk a C1q-val kezelt imMDC-k allogén T-sejt aktiváló képességét, ³H-timidin beépülés mérésével. Eredményeink szerint, a C1q-val történő kezelés erősen fokozta az imMDC-k T-sejt proliferációt kiváltó képességét. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a C1q fontos szabályozó szerepet tölt be az MDC-k antigén bemutatásának folyamatában.

Összehasonlítottuk az imMDC-k, maMDC-k illetve C1q jelenlétében stimulált imMDC-k szerepét az allogén T-sejtek proliferációjára. Eredményeink szerint a C1q kezelés jelentősen fokozta az imMDC-k által indukált T-sejt proliferációt, megközelítve az LPS kezelt maMDC-k hatását.

NF-κB transzlokáció, citokin termelés

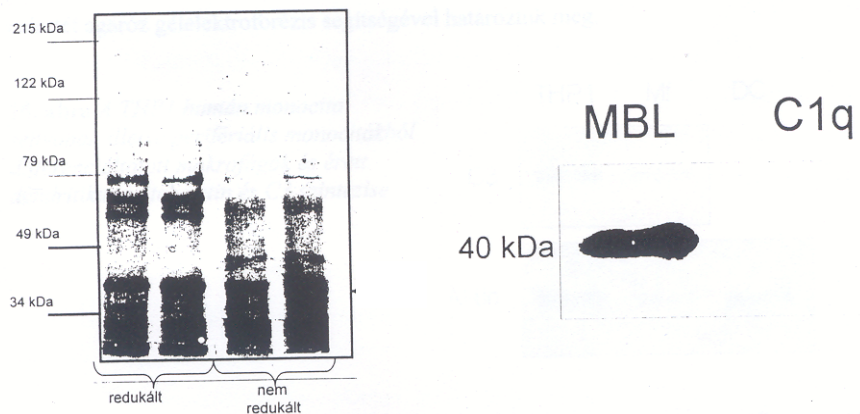
Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a DC-k főbb funkcióiban; MHCII és kostimulációs molekuláik expressziója, valamint citokin szekréciójuk szabályozásában szerepet játszik az NF-κB transzkripciós faktor. Ezért imMDC-ben C1q-kezelést követően vizsgáltuk az NF-κB aktivációt. Western blot technika alkalmazásával megállapítottuk, hogy 30 perces C1q kezelést követően, a sejtek citoplazmájában az NF-κB mennyisége jelentős mértékben csökken, ami az NF-κB sejtmagba történő transzlokációjára utal. Ezt az eredményt erősítettük meg konfokális lézer mikroszkóp segítségével végzett vizsgálatatainkban, amelyekben jelzett rekombináns humán NF-κB alkalmazásával sikerült bizonyítani a nukleáris faktor sejtmagban történő felhalmozódását.

A C1q-val fedett felületen tenyésztett imMDC-k fokozott mértékben termeltek TNFα, IL-6, IL-12 és IL-10 citokineket. További kísérleteinkben immobilizált C1q jelenlétében tenyésztett imMDC-kból és allogén T-sejtekből kokultúrákat állítottunk elő. A kokultúra felülúszókból két nap múlva vett mintákból megállapítottuk, hogy a C1q-val aktivált imMDC-k hatására, az aktivált T-sejtek IFN-γ termelése mintegy háromszorosára nőtt. Mindez arra utal, hogy a C1q-val kezelt MDC-k Th1 típusú immunválaszt indukálnak.

Makrofágok MBL-kötő struktúrájának vizsgálata

Korábbi eredményeink szerint emberi monocitákhoz, makrofágokhoz és monocita-makrofág sejtvonalakhoz kötődött az MBL (Bajtay, 2000). Izoláltuk a THP1 humán monocita-

makrofág sejtvonal sejteinek MBL-kötő membránfehérjéjét, C1q-, illetve MBL-bead-ek segítségével, amit S. Thiel (University of Aarhus, Denmark) bocsátott a rendelkezésünkre. A sejtlizátumot mannózzal fedett bead-eket tartalmazó oszlopon kimerítettük, ugyanis a makrofágok nagy mennyiségben expresszálnak MR-t.



A két bead-ről eluált fehérjék Western-blot analízise alapján, az MBL-beadról egy kb. 40 kD molekulásúlyú fehérjét azonosítottunk, ami nem redukáló és redukáló körülmények között is azonos méretűnek tűnt. További sejtvonalak és normál emberi makrofágok vizsgálatára, amelyekben MBL-kötő struktúrát izoláltuk volna, nem volt módunk. Részben azért, mert komoly nehézségbe ütközött, hogy nagy mennyiségben tisztítsunk MBL-t, aminek a szérumban alacsony a koncentrációja. Ezen túl, amint az a kötődési vizsgálatainkból kiderült, az MBL-kötő membránfehérjék alacsony expressziót mutatnak a makrofágokon.

Az egészséges emberekben mért szérumban MBL szint egyénenként igen változó, európai országokban végzett mérések szerint az átlag 1-1,5 µg/ml között van. Becslések szerint a népesség mintegy 10 – 20 %-a MBL deficiens, ezekben az emberekben a szérumban MBL koncentrációja 50 ng/ml-nél kevesebb. Az alacsony MBL szint számos fertőzésre fogékonyabbá tesz hordozójukat, mert bizonyos kórokozókkal szemben elégtelen az opsonikus védelem. Miután az MBL hiány nem jár együtt a molekulához kapcsolódó szerin-proteázok hiányával, így MBL adásával a normális védekezőfunkció helyreállítható. (Valdimarsson 2004). Terveztük annak vizsgálatát, hogy influenza fertőzött egerek esetében lehet-e védő szerepe az MBL-nek. Továbbá, visszatérő fertőzésekben szenvedő gyerekek szérumban MBL szintjét is tanulmányozni akartuk. Mivel ezekben a témakörben számos közlemény jelent meg a közelmúltban (Takahashi 2005, Dean 2005, Gordon 2006), az általunk korábban tervezett kísérletek eredményeként már

nem volt várható lényeges új ismeret. Ezért érdekesebbnek tűnt az MBL-szint vizsgálata bizonyos emberi kórképekben. A HANO (öröklött angioneurotikus ödéma) a C1-inhibitor öröklött deficienciája. Megvizsgáltuk a HANO betegek szérum MBL szintjét és megnövekedett MBL koncentrációt mutattunk ki. Ezzel párhuzamosan meghatároztuk a szérum C3 komplementfehérje tartalmát is, amely csökkent szintet mutatott az egészséges értékhez viszonyítva. HANO betegekben az MBL-függő komplement aktivációját nem vizsgálták. Mivel a betegek esetében jelentősen megnövekedett az MBL szint, ezért érdemes lenne megvizsgálni az MBL-függő komplement aktivációt. Mivel az MBL koncentrációja és funkcionális aktivitása az MBL haplotípusa által meghatározott, érdekes lenne azt összevetni a betegek MBL polimorfizmus vizsgálatával. Ez utóbbi vizsgálatok elvégzésére lehetőség lenne az Semmelweis Egyetem III.sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában, ezért ezeket a vizsgálatokat szeretnénk kollaborációban elvégezni.

Összefoglalás

Tekintettel arra, hogy szervezetünkben jelenlévő immunkomplexek C1q molekulát is tartalmaznak, ami hasonlóan az IgG-hez a dendritikus sejtek érését indukálhatja az általunk vizsgált folyamat fiziológiás jelentőséggel bír.

Jelen munkánkban kimutattuk, hogy az IgG mellett egy másik szérumfehérje is; a C1q szintén stimulálja a DC-k érését, ami MDC-k esetében fenotípusos és funkcionális érést váltott ki. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a szérum összetétele, a DC sejtek környezetében jelenlévő fehérjék befolyásolják a DC-k funkcióit. Bizonyos szérumfehérjék az immunkomplexhez kötődve kimutathatók és DC-k receptorai számára szolgálnak ligandumként. Vizsgálataink során a C1q molekula új funkciójára derült fény, amennyiben fontos szerepét igazoltuk a DC-k aktivitásának szabályozásában. Kimutattuk, hogy a MDC-khez kötődő C1q képes fokozni az adaptív immunválaszt, ugyanakkor T-sejt toleranciát is indukálhat, az adott szöveti környezett által meghatározott módon.

Mivel szervezetünkben a keringő IC-k további komplementfehérjéket is megkötnek, ezek DC-k funkcióira gyakorolt hatását érdemesnek tartjuk tovább vizsgálni. Előzetes eredményeink szerint a C3 komplementfehérje eredetű fragmentumok kötődnek a DC-khez kovalensen és nem kovalensen, receptor közvetített módon egyaránt. Ez a kötődés szintén befolyásolja a sejtek differenciálódását, citokin termelését, aktivációs képességét. Ezeknek a folyamatoknak részletes feltárása intézetünkben folyamatban van, egy új OTKA pályázat keretében.

A pályázat segítségével született új eredményekből két nemzetközi folyóiratban megjelent közlemény született, egy PhD értekezés készült (Csomor Eszter, 2007), valamint további pályázat és kollaboráció alapjául szolgál.

Irodalomjegyzék

Bajtay, Z., Jozsi, M., Banki, Z., Thiel, S., Thielens, N., Erdei, A. (2000) Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. *Eur.J.Immunol.* **30**, 1706-1713.

Vegh, Z., Goyarts, E. C., Rozengarten, K., Mazumder, A., Ghebrehiwet, B. (2003) Maturation-dependent expression of C1q binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells. *Int.Immunopharmacol.* **3**, 39-51.

Sim, R. B., Moestrup, S. K., Stuart, G. R., Lynch, N. J., Lu, J., Schwaeble, W. J., Malhotra, R. (1998) Interaction of C1q and the collectins with the potential receptors calreticulin (cC1qR/collectin receptor) and megalin. *Immunobiology* **199**, 208-224.

Gaboriaud, C., Thielens, N. M., Gregory, L. A., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J. C., Arlaud, G. J. (2004) Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* **25**, 368-373.

Nauta, A. J., Castellano, G., Xu, W., Woltman, A. M., Borrias, M. C., Daha, M. R., van, K. C., Roos, A. (2004) Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J.Immunol.* **173**, 3044-3050.

Valdimarsson H, Vikingsdottir T, Bang P, Saevarsdottir S, Gudjonsson JE, Oskarsson O, Christiansen M, Blou L, Laursen I, Koch C. (2004) Human plasma-derived mannose-binding lectin: a phase I safety and pharmacokinetic study. *Scand. J. Immunol.* **59(1)**, 97-102.

Gordon AC, Waheed U, Hansen TK, Hitman GA, Garrard CS, Turner MW, Klein NJ, Brett SJ, Hinds CJ. (2006) Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome. *Shock.* **25(1)**, 88-93.

Takahashi K, Shi L, Gowda LD, Ezekowitz RA. (2005) Relative roles of complement factor 3 and mannose-binding lectin in host defense against infection. *Infect. Immun.* **73(12)**, 8188-93.

Dean MM, Minchinton RM, Heatley S, Eisen DP. (2005) Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection. *J Clin Immunol.* **25(4)**, 346-52.