

K 72026 – A komplementrendszer immunfunkciókat szabályozó szerepe fiziológias és kóros folyamatok során

Projekt-záró beszámoló

A komplementrendszer immurendszerünk működésének integráns eleme, mely fontos szerepet tölt be a veleszületett és a szerzett immunválasz során egyaránt. A sérumban és a különböző testnedvekben legnagyobb mennyiségben jelenlevő komponense a C3 fehérje, mely a komplementkaskád aktiválásakor számos fontos biológiai funkcióval rendelkező fragmentumra hasad. Vizsgálataink során elsősorban a nagyobb hasítási termékek – a C3b, iC3b és a C3d – fragmentumok szerepét vizsgáltuk B- és T – limfociták különböző funkcióira, továbbá az adaptív immunválasz beindításában döntő szerepet játszó antigénbemutató sejtek működésére. Mivel az említett fragmentumok a CR1 (CD35), a CR2 (CD25), a CR3 (CD11b/CD18) és a CR4 (CD11c/CD18) komplementreceptorokhoz kötődnek, a kísérletek során e struktúrák kifejeződését és funkcióját is vizsgáltuk a különböző immunsejteken. Kutatásunk során egyrészt egészséges egyének, másrészt különböző autoimmun betegségben szenvedők sejtjeit is vizsgáltuk.

Célunk az volt, hogy a komplementrendszer eddig nem ismert immunreguláló szerepeit tárjuk fel. Mindemellett a kutatásainkat kiterjesztettük a projekt végzése során felmerült, a munkatervben még nem részletezett területre is, melynek során Dr. Prechl Józseffel és Dr. Papp Krisztiánnal együttműködve mikro-array rendszert dolgoztunk ki az ellenanyag (köztük autoantitestek) általi komplementaktiválás kimutatására.

Eredményeinkről számos hazai és nemzetközi konferencián mutattuk be, továbbá 18 angol nyelvű, nemzetközi közleményben számoltunk be, melyek mindegyikében köszönetet nyilvánítottunk az OTKA-támogatásért. Ezen publikációk összimpakt faktora 61.02. Mindemellett a projekt eredményei kettő már megvédett (Isaák Andrea, Terényi Nóra), és kettő folyamatban lévő (Török Katalin és Kremlitzka Marianna) PhD-dolgozat tárgyát is képezik, továbbá tudományos diákköri munkák (Kari és országos első helyezések), illetve MSc szakdolgozatok témájául is szolgáltak.

Az alábbiakban röviden ismertetem legfontosabb eredményeinket, a projektben meghatározott témák köré csoportosítva. Az egyes témakörök után azon cikkek felsorolása következik, melyek az OTKA támogatása nélkül nem jöhettek volna létre.

1. projekt – A CR1 expressziójának és funkciójának jellemzése különböző B- és T-sejt populációkon

B-sejtek

A humorális immunválasz kialakulásához nélkülözhetetlen a B-sejt receptoron (BCR) keresztül megindított jelátvitel, amit egyéb sejtfelszíni molekulák is nagymértékben befolyásolnak. A B-sejt aktiválás szabályozásában a komplementrendszer komponensei és receptorai (elsősorban a C3 ill. a CR1 és a CR2) kiemelkedően fontos szerepet játszanak.

Az autoantitestek megnövekedett mennyisége az autoimmun betegségben szenvedő egyének szervezetében a B sejtek működésének zavarára utal. Mivel az immunkomplex-kötő Fc γ - és komplementreceptorok (CR1, CR2) kifejeződésében bekövetkező zavarok nagy mértékben befolyásolják a BCR-en keresztül kiváltott szignálokat, ezek hozzájárulhatnak az autoreaktív sejtek túléléséhez, kóros aktiválódásához is.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy SLE-ben (Systemic Lupus Erythematosus) szenvedő betegekben a naív és a memória B-sejtek aránya (53% - 47%) az egészséges donorokban talált értékhez képest (75% - 25%) jelentős eltérést mutat. Aktív SLE-s betegekben a CD27^{high} plazmablasztok és a korai plazmasejtek aránya akár 20-szorosa is lehet az egészséges egyének esetében talált értéknek. Az Fc γ R2, a CR1 és CR2, valamint a sejtfelszíni IgG/IgM expressziójának vizsgálata során azt találtuk, hogy a gátló szerepű CR1 és az Fc γ R2 kifejeződése csökken az SLE-s betegekben származó CD27⁺ memória B-sejteken. Ugyanakkor ezen receptorok kifejeződése minimális mértékű volt a terminálisan differenciálódott CD19⁺/CD27^{high}/sIg^{low} plazmablaszt-populáción a betegek és az egészségesek csoportjában egyaránt. Megállapítottuk, hogy perifériás B-sejteken a CR1 és az Fc γ R2 expressziós mintázata hasonló a kontroll és az SLE-ben szenvedők csoportjában egyaránt, eltérően a CR2 receptor kifejeződésétől.

Ismert, hogy a B-limfociták, mint autoantitest-termelő és antigénprezentáló sejtek, továbbá a komplementaktiváció és az immunkomplexek lerakódása rendkívül fontos szerepet játszik a rheumatoid arthritis (RA) kialakulásában. Bár mások kimutatták, hogy a CR1 (CD35) és a CR2 (CD21) komplementreceptorok kifejeződése csökken az RA-ben szenvedő betegek B-sejtjein (Prokopec és mtsai, Clin. Immunol., 2010), ugyanakkor a receptorok szerepe a B-sejt tolerancia és az autoimmun folyamatok kialakulásában még nem tisztázott. A mechanizmus pontosabb megértéséhez megvizsgáltuk a CR1 és a CR2 expresszióját egészséges és RA-s betegek B-sejt alpopulációin, valamint a CR1 B-limfociták funkcióira kifejtett hatását.

Kimutattuk, hogy az RA-s betegek B-sejtjein szignifikánsan alacsonyabb mértékben fejeződik ki a CR1 és a CR2, mint az egészséges egyének esetében. Az inaktív és az aktív betegek receptorainak megjelenését összehasonlítva ez utóbbiak sejtjein csökkenést figyeltünk meg. Megállapítottuk, hogy a különböző B-sejt alpopulációk megoszlása azonos az egészségesek, az aktív és az inaktív RA-s betegek esetében. Ugyanakkor a CR1 és a CR2 expressziója ellentétesen változik a B-sejtek differenciálódása során; mivel a CR1-é emelkedik, míg a CR2-é csökken a naív sejtek memóriasejtté történő átalakulása során. A CR1 és a CR2 mennyisége minden esetben a plazmablasztokon a legkisebb.

Funkcionális vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az autoimmun betegek B-sejtjeinek csökkent CR1 expressziója nem befolyásolja a receptor szerepét, vagyis a korábban általunk leírt gátló hatás (Józsai és mtsai, Jorunal of Immunology, 2002, 168, 2782) az RA-s betegek esetében is kimutatható. Bizonyítottuk továbbá, hogy a CR1 a B-sejtek ellenanyagtermelésében és differenciálódásában is gátló szerepet tölt be. Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a CR1 és a CR2 eltérő módon fejeződik ki a az emberi B-sejtek különböző alpopulációin, és további bizonyítékokkal erősítettük meg korábbi eredményünket, miszerint emberi B limfocitákon a két komplementreceptor ellentétesen befolyásolja a B-sejtek BCR-indukált funkcióit. Mindezek alapján a CR1 újabb terápiás célpontnak tekinthető RA-s betegek esetében.

A B-sejtekkel végzett kísérleteink eredményei tehát egyértelműen mutatják, hogy a CR1 és a CR2 eltérő módon fejeződik ki az emberi B-sejtek különböző alpopulációjában, és további bizonyítékokkal erősítettük meg korábbi eredményeinket, miszerint emberi B limfocitákon e két komplementreceptor funkciója ellentétesen befolyásolja a B-sejtek BCR-indukált funkcióit. Mivel a CpG által kiváltott stimulus esetében ezt nem tapasztaltuk, feltételezzük, hogy a CR1 általi gátlás a BCR-en át megindított jelátviteli folyamatokat befolyásolja. A két komplementreceptor eltérő expressziója és szerepe a különböző emberi B-sejt populációk funkcióinak újabb szabályozási szintjét jelenti, aminek szerepe lehet autoimmun folyamatok kialakulásában, ill. pathogenezisében.

A témához szorosan kapcsolódó, referált folyóiratban megjelent cikkek:

Isaák A, Gergely P Jr, Szekeres Z, Prechl J, Poór G, Erdei A, Gergely J.
Physiological up-regulation of inhibitory receptors Fc gamma RII and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients.

Int Immunol. 2008 Feb;20(2):185-92.

Erdei, A., Isaak, A., Torok, K., Sandor, N., Kremlitzka, M., Prechl, J., and Bajtay, Z. Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions.

2009. Molecular Immunology 46:2767-2773.

Kremlitzka M., Plogár A., Fülöp, L., Kiss E., Poór Gy., Erdei A.
Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients

Int Immunol. 2012. accepted for publication (doi:10.1093/intimm/dxs090)

T-sejtek

Ahogy korábban említettük, a C3b-t kötő CR1 gátolja a B-sejtek antigénkötő receptoron keresztül történő aktivációját (Józsi et al., J.Immunol., 2002). Korábban leírták a CR1 hasonló szerepét emberi T-sejteken is (Wagner et al., Mol.Immunol., 2005). Kemper és mtsai kimutatták, hogy az MCP (Membrán Kofaktor Protein/CD46) – egy másik C3b kötő sejtfelszíni struktúra – az anti-CD3-mal aktivált Th-sejtek regulátor sejtekké való differenciálódását indítja el (2003., Nature). Feltételezések alapján ez a folyamat T-sejt eredetű C3 hatására indul meg, és IL-10 citokin termelést indukál (Kemper et al., Nat. Immunol., 2010.).

Saját vizsgálatainkban MACS-szal, illetve sejt-szortírozó készülékkel negatívan szeparált perifériás, és mandulából izolált T-sejteken követtük a CR1 expresszióját, amely aktiváció hatására – erősen donorfüggő módon – megemelkedett. PCR-rel megerősítettük, hogy RNS szinten minden T-sejt kifejezi a CR1-et. Funkcionális vizsgálatok során igazoltuk, hogy mind a „C3b-szerű” aggregált C3 – amely a CR1 természetes ligandumaként kötődik a receptorhoz -, mind az anti-CR1 mAb To5 – amely imitálja a ligandum kötődését (Wagner et al., Mol.Immunol., 2005) – az anti-CD46-hoz hasonló módon gátolja a T-sejtek proliferációját. Kimutattuk azt is, hogy IL-2 jelenléte felülírja ezt a hatást, és az IL-10 citokin termelődése pedig – szintén az anti-CD46 szerepéhez hasonló módon – IL-2 jelenlétében mind a „C3b-szerű” aggregált C3, mind az anti-CR1 mAb To5 hatására emelkedik.

Mivel eddig még nem vizsgálták, fontos volt annak megállapítása e kísérletek értelmezése szempontjából, hogy termelnek-e a T-sejtek C3-at, illetve kötődik-e a sejtek

felszínéhez a T-sejtekből származó komplementfehérje. A kísérletekhez 99,8%-os tisztaságú T-sejt szuszpenziót alkalmaztunk, és PCR-rel kimutattuk, hogy az aktivált T-sejtek kifejezik a C3-at. Poliklonális anti-C3-FITC (Fab')₂ ellenanyaggal azt is kimutattuk, hogy a termelt komplementfehérje a sejtfelszínhez kötődik. Ezután azt vizsgáltuk, hogy a T-sejtek felszínére kötődött C3 befolyásolja-e a limfociták proliferációját allogen, monocita-eredetű DC-k jelenlétében. Eredményeink szerint fokozódik a limfociták osztódása, amit a T-sejtek által termelt és a limfocitához kötődő C3 biztosít. Azt találtuk továbbá, hogy az aktiváció eredményeként csökken a sejtek IL-10 termelése. A folyamat C3-specifitását az bizonyítja, hogy anti-C3 F(ab')₂ fragmentum jelenlétében elmarad ez a hatás.

Összegzésképp elmondható, hogy az emberi T-sejtek felszínén kifejeződő CR1 IL-2 jelenlétében hozzájárul a Th-sejtek Treg sejté alakulásához, amit a T-sejtek által termelt C3 indíthat el. Mindemellett a T-sejtekhez visszakötődő komplementfehérje kostimulátor molekulaként is szerepet játszik a T-sejtek osztódásában.

A témához szorosan kapcsolódó, referált folyóiratban megjelent cikk:

Török K, Kremlitzka M, Sándor N, Tóth EA, Bajtay Z, Erdei A.
Human T cell derived, cell-bound complement iC3b is integrally involved in T cell activation.
Immunol Lett. 2012 Mar 30;143(1):131-6

2. projekt – A különböző sejtekhez (limfociták, makrofágok, dendritikus sejtek) kötődő C3-fragmentumok sorsa és szerepe immunfolyamatokban

A szakcikkek utóbbi években jelentősen megnövekedett száma azt bizonyítja, hogy az exoszomáknak számos fontos szerepük van különböző immunfolyamatokban. Ezek a 40-90 nm átmérőjű vezikulumok a sejtek multivezikuláris testjeiben képződnek, melyek egyben az MHC-molekulák peptidekkel való feltöltődésének helyei is. Az exoszomák az MHC-fehérjék mellett számos kostimulációs és adhéziós molekulát hordoznak a felszínükön, és így hatékonyan képesek antigént bemutatni a T-sejteknek.

Eredményeink azt mutatják, hogy friss, autolog szérumban való inkubálás során az egér makrofágokhoz és B-sejtekhez C3 fragmentumok kötődnek kovalensen, míg a T-sejteknek nincs ilyen aktivitásuk. Elsőként mutattuk ki, hogy a plazmamembránhoz kötődött komplement-fragmentumokat a sejtek a folyamatosan képződő exoszomák segítségével távolítják el. Kísérleteinkhez BALB/c és CR1/2 knock out (KO) egerekből származó sejteket, A20 és 2PK3 egér B-sejt vonalakat, valamint a P388D1 makrofág sejt vonalat használtunk. A natív C3 forrásaként friss Balb/c savót, negatív kontrollként pedig C3 KO egérből származó (azaz C3-mentes) szérumot, illetve Balb/c egerek metilamminnal kezelt savóját alkalmaztunk. Ez utóbbi esetben a C3 molekula kovalens kötés kialakítására képes tioészter csoportja inaktiválódik, Míg emberi B limfociták esetében a CR2 bizonyult a fő C3b-akceptor helynek, egér sejtek esetében eredményeink más, eddig még nem azonosított kötőhely(ek) jelenlétét bizonyítják. Kimutattuk ui., hogy a CR1/2 KO állatokból származó sejtek felszínéhez is képes kovalensen kötődni a C3b. Vizsgáltuk a C3-at hordozó exoszomák szerepét az antigénprezentáció folyamatában. Kísérleti eredményeink azt bizonyítják, hogy szuboptimális antigén-dózist alkalmazva, a

szérummal kezelt és ovalbuminnal feltöltött A20 sejtekből származó exoszomák szignifikánsan erősebb T-sejt választ képesek kiváltani, mint a szérummal nem kezelt sejtekből származó exoszomák. Eredményeink tehát bizonyítják az APC-k által termelt exoszomák fontos szerepét, és kiemelik a sejtmembránhoz kovalensen kötődő C3-fragmentumok jelentőségét.

A dendritikus sejtek (DC-k) azon tulajdonságuk révén, hogy naív T-sejteket képesek aktiválni, kapcsolatot teremtenek a veleszületett és az adaptív immunrendszer között. Az *in vivo* képződő immunkomplexek tartalmazznak C3 komplementfehérjét is, emellett a C3 aktivációja megtörténhet a DC-k felszínén vagy környezetükben.

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a C3 hatását a DC-k érésére és funkcióira. Kísérleteink során humán monocita eredetű DC-eket (MDC) differenciáltattunk *in vitro* rhuIL-4 és rhuGM-CSF jelenlétében. A sejteket natív, tisztított humán C3-al vagy friss normál humán savóval (NHS), mint complement-forrással kezeltük. Áramlási citofluorimetriával kimutattuk a C3 dózisfüggő kötődését a sejtekhez. Abban az esetben, ha a sejteket metilamminnal inaktívált C3-al kezeltük - amely kezelés megakadályozza az aktiváció során keletkező C3-fragmentumok kovalens kapcsolódását -, a kötődés mértéke csökkent. Natív C3-al vagy NHS-el való kezelés fokozta a sejtek CD83, CD86 és MHCII expresszióját, míg a mannóz-receptor megjelenésére és funkciójára nem volt hatással. Mivel az aktivált makrofágok jelentős mennyiségű C3-at termelnek, megvizsgáltuk, hogy a makrofág-eredetű C3 kötődik-e a MDC-khez. Eredményeink szerint az aktivált makrofágokkal együtt inkubált MDC-k megkötik a C3-at. Ismert, hogy a makrofágok által szekretált C3 lokálisan opszonizálja a sejtek környezetében lévő patogéneket. Ezt mi is kimutattuk továbbá azt találtuk, hogy a C3-mal vagy NHS-sel kezelt MDC-k jelentősen fokozzák az allogén T-sejtek proliferációját. A DC-k fontos tulajdonsága, hogy az általuk termelt citokinek révén szabályozzák a gyulladás folyamatát, ezért megvizsgáltuk a C3-kezelt MDC-k TNF α , IL-6 és IL-8 termelését. Eredményeink szerint a C3-kezelés mindhárom citokin szekrécióját dózisfüggően fokozta.

Kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a C3 fontos szerepet játszik a DC-k érésében és T-sejt aktiváló funkciójában, ezáltal a lokális gyulladásos folyamatok egyik fontos szabályozója.

A dendritikus sejtek és a C3 molekula kapcsolatát, ill. a kötődés körülményeit és funkcionális következményeit tovább jellemzzük. Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a CR3 és a CR4 szerepe között jelentős eltérések vannak.

A témához szorosan kapcsolódó, referált folyóiratban megjelent cikkek:

B lymphocytes and macrophages release cell membrane deposited C3-fragments on exosomes with T cell response-enhancing capacity.

Papp K, Végh P, Prechl J, Kerekes K, Kovács J, Csikós G, Bajtaj Z, Erdei A.

Mol Immunol. 2008 Apr;45(8):2343-51.

A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes.

Sándor N, Pap D, Prechl J, Erdei A, Bajtaj Z.

Mol Immunol. 2009 Dec;47(2-3):438-48.

CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells.

3. projekt – A komplementrendszer szerepe az EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) pathogenezisében

Az Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) modell beállítása a tervezettnél gyorsabban haladt, így a sclerosis multiplex (SM) egér-modelljét alkalmazva a vártnál rövidebb idő alatt sikerült elvégeznünk a tervezett vizsgálatokat. Az SM a leggyakoribb gyulladásos, demyelinizációval járó központi idegrendszeri betegség. A fehér állományba belépő limfociták és más gyulladásos sejtek okozzák a demyelinizációt és később az axonok károsodását. Munkánk során elsősorban a komplementrendszer szerepét vizsgáltuk a kórfolyamat során. A nőstény C57BL/6 egereket myelin oligodendrocita glikoprotein eredetű peptidet (MOG 35-55) és komplett Freund adjuvánt tartalmazó emulzióval, valamint két ízben Pertussis toxinnal oltottuk be. A klinikai tüneteket naponta pontosztuk 0-tól 5-ig, az általánosan elfogadott kritériumok szerint. Eredményeink alapján a kobra mérég faktorra (CVF, ip. oltás) dekomplementált állatok csoportjában a betegség első tünetei szignifikánsan később jelentek meg, továbbá proteolipid proteinnel (PLP 139-151) oltott SJL/J állatok esetében a betegség remittáló és relaxáló fázisa is gátlódott. A C57BL/6 egerek esetében a MOG-specifikus ellenanyag-szint szignifikánsan alacsonyabb volt a dekomplementált egerek esetében. A CVF-fel kezelt, MOG-gal oltott egerek nyirokcsomóiból származó T-sejtek *in vitro* proliferációs képessége jelentősen csökkent. Mindez összhangban áll a szövettani képpel, mely alapján ezekben az állatok gerincvelőjében az infiltráló CD4+ sejtek száma is csökkent. Összegezve tehát eredményeink arra utalnak, hogy a komplementrendszer befolyásolja az EAE patogenezisét, mivel a komplementaktivitás hiánya a betegség indukciójakor csökkenti a később megjelenő MOG-specifikus T-sejtek aktivációját és a MOG-specifikus ellenanyagok megjelenését. Mindennek eredményeként a tünetek szignifikánsabban később jelennek meg a dekomplementált állatokban, mint a kontrol csoportban.

A témához szorosan kapcsolódó, referált folyóiratban megjelent cikk:

Terényi N, Nagy N, Papp K, Prechl J, Oláh I, Erdei A.
Transient decompensation of mice delays onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and impairs MOG-specific T cell response and autoantibody production.
Mol Immunol. 2009 Nov;47(1):57-63.

A projekthez kapcsolódó mikro-array vizsgálatok

Ahogy korábban erről már szó volt, az immunrendszer kóros működése a saját ellen irányuló humorális és sejtes válaszokban is megnyilvánulhat, autoimmun kórképek formájában. E kórképek gyakori jellemzője a saját struktúrákat felismerő autoantitestek jelenléte a vérben. Az autoantitestek kimutatása a betegség diagnózisát, jellemzését, osztályozását, kezelését és prognosztikáját is segíti. Az MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoportban végzett munkánk – melyhez az OTKA-támogatást is felhasználtuk,

mivel a téma szorosan kapcsolódik az előzőekben részletezett alprojektekhez - ezek kimutatásra szolgáló módszerek fejlesztését szolgálja, elsősorban két autoimmun betegségben: a rheumatoid arthritisben (RA) és a szisztémás lupus erythematosusban (SLE).

A különböző autoimmun betegségek differenciáldiagnózisát elősegíti a multiplex autoantitest meghatározás, melynek egyik formája egy antigén-panel együttes tesztelése, fehérje microarray formátumban. Az autoantitestek minőségének jellemzését elősegíti komplementaktiváló képességük mérése. A komplementrendszer aktivációja gyulladós folyamatok kialakulásához vezet és részt vehet az autoimmun betegségek pathogenezisében is. Az array technika és a komplementaktiváció mérés kombinálásával olyan diagnosztikai eszközhöz juthatunk, amely még több információt szolgáltat egy egyén betegségével kapcsolatban.

A témához szorosan kapcsolódó, referált folyóiratban megjelent cikkek:

Papp K, Szekeres Z, Erdei A, Prechl J.

Two-dimensional immune profiles improve antigen microarray-based characterization of humoral immunity.

Proteomics. 2008 Jul;8(14):2840-8.

Prechl J, Papp K, Erdei A.

Antigen microarrays: descriptive chemistry or functional immunomics?

Trends Immunol. 2010 Apr;31(4):133-7.

Detection of complement activation on antigen microarrays generates functional antibody profiles and helps characterization of disease-associated changes of the antibody repertoire.

Papp K, Végh P, Miklós K, Németh J, Rásky K, Péterfy F, Erdei A, Prechl J.

J Immunol. 2008 Dec 1;181(11):8162-9