

A magasabbrendű szervezetek immunhomeosztázisát a veleszületett és az adaptív immunrendszer együtt tartja fenn; ez a két rendszer egymással szorosan összefonódik, folyamatosan együttműködik. E két rendszer sejtes és molekuláris elemei (köztük a limfociták, makrofágok, dendritikus sejtek, hízósejtek – ill. a komplementrendszer és a különböző citokinek) számos ponton érintkeznek, hatnak egymásra úgy a fiziológiás, mint a kóros immunfolyamatok során. E folyamatok ill. kölcsönhatások molekuláris mechanizmusának, a veleszületett immunrendszer elemeinek az adaptív választ befolyásoló hatásának további megismerése volt e pályázat célja. A pályázati munkába hét doktoranduszt vontunk be, és a munka alapján közülük öten már megszerezték a PhD fokozatot.

Vizsgálataink – a terveknek megfelelően - 4 fő téma köré rendeződtek:

1. B-limfociták aktivációjának szabályozása az 1-es (CR1, CD35) és 2-es (CR2, CD21) típusú komplement-receptor és által; CR1/2 megjelenésének vizsgálata egér T-limfocitákon;
2. Komplement-fehérjék (C3, C1q, MBL) szerepe dendritikus sejtek érésében és funkcióiban;
3. Hízósejtek IgE-közvetített aktiválásának gátlása komplement-eredetű peptidekkel, a gátlás molekuláris mechanizmusának vizsgálata;
4. A komplementrendszer szerepének vizsgálata a sclerosis multiplex (SM) egér model-rendszerében, a kísérletes autoimmun encephalitis (EAE - Experimental Autoimmune Encephalitis) betegségben.

1. B-limfociták aktivációjának szabályozása az 1-es (CR1, CD35) és 2-es (CR2, CD21) típusú komplement-receptor és által; CR1/2 megjelenésének vizsgálata egér T-limfocitákon

Háttér, előzmények:

A fiziológiás körülmények között is állandóan keletkező és bizonyos kórképek esetében jelentősen felhalmozódó immunkomplexek az antigén mellett ellenanyagot és komplementfehérjéket is tartalmaznak (ICC), így a B sejtek antigénkötő receptora (BCR)

mellett Fc- és komplement-receptorokhoz is kötődnek. Fontos kiemelni, hogy az egér és az ember esetében eltérő az ICC-t kötő receptorok szerkezete és funkciója, továbbá szöveti megoszlásuk sem azonos. Mivel egereket igen gyakran használnak az emberi immunrendszer működésének modellezésére, különösen fontos a fenti receptorok pontos szerepének és az általuk közvetített funkciók minél teljesebb megismerése e két fajban.

Eredmények:

Munkánk egyik célja az volt, hogy az egér komplementreceptorok új, korábban nem ismert szerepét tárjuk föl. A CR1 és a CR2 humorális immunválaszban játszott szerepét a CR1-et felismerő 8C12 scFv és a CR1/2-t felismerő 7G6 scFv egyláncú ellenanyagok segítségével vizsgáltuk. A B-sejtek sejtciklusának szabályozását vizsgálva azt találtuk, hogy a 7G6 scFv önmagában indukálja a lépből származó, érett B-sejtek proliferációját, és ez a folyamat befolyásolható a CR1/2 molekula B-sejt receptorral illetve Fc γ RIIb receptorral való keresztkötésével. Kimutattuk továbbá, hogy a lépsejtek 7G6 scFv-vel történő kezelése hatására az NF- κ B aktiválódik. Leírtuk továbbá, hogy a BCR által történő aktiválásra programozott sejthalállal reagáló tranzicionális B-sejtek pLA-indukált apoptózisának mértéke a CR1/2-specifikus ellenanyaggal való kezelés hatására csökkent.

Az egér T-sejtek vizsgálata során kimutattuk, hogy a periférián található sejtek egy csoportjának felszínén megjelenik a CR1/2 molekula. Azt találtuk, hogy a receptor megjelenése indukálható, mivel a 7G6 scFv-vel intraperitoneálisan oltott egerek mezenterialis nyirokcsomójában az oltás után két órával kimutattunk egy CD21-t kifejező CD4⁺, IgD⁻ sejtpopulációt. Azt találtuk, hogy a T-sejtek 7G6 scFv-vel való kezelés hatására osztódnak, és ez NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódásával jár.

Eredményeinket az alábbi publikációkban tettük közzé:

- Molnár E, Prechl J, Erdei A.

Immunol Lett. 2008 Mar 15;116(2):163-7.

- Molnár E, Erdei A, Prechl J.

Immunol Lett. 2008 Mar 15;116(2):156-62.

Munkánk másik célja az volt, hogy emberi limfociták CR1 és CR2 receptorának megjelenését és szabályozó szerepét vizsgáljuk egészséges emberek és autoimmun betegek esetében. 50 rheumatoid arthritisben, 25 szisztémás lupus erythematosusban

(SLE) szenvedő ill. 30 egészséges donortól származó sejteken mértük az immunkomplex (IC)-kötő Fc γ -és komplement receptorok expresszióját. Eredményeink szerint a CD35 (CR1), CD21 (CR2) és CD32 (Fc γ RII) expressziója csökkent az SLE-ben szenvedő betegek B-sejtjein. Megvizsgáltuk ezen receptorok expressziós mintázatát különböző normál B sejt alpopulációkon is, ill. megnéztük, hogy az SLE-s betegeknél talált receptorcsökkenés milyen B sejt alpopulációkat érint. A B memóriasejtekre jellemző CD27 pozitivitás, valamint sejtfelszíni IgM/IgG expresszió alapján a következő alpopulációkat különítettük el: IgM⁺/CD27⁻ naív, IgM⁺/CD27⁺ IgM memória, IgG⁺/CD27⁺ IgG⁻memória és Ig^{low}/CD27^{high} plazmablasztok. Egészséges egyének esetében fokozott CD35 és CD32 expressziót találtunk a CD27⁺ memóriasejtek populációjában. Összehasonlítva az IgM⁻ memória és az IgG⁻memória sejteket, a CD32 expresszió az előbbieket esetében nagyobb mértékű volt. CD35 expressziót tekintve nem találtunk különbséget IgM⁻ és IgG⁻ memóriasejtek között. Ellentétben a CD35 és a CD32 fokozott expressziójával memóriasejteken, a CD21 esetében nem volt különbség naív és memória B sejtek között. Ig^{low}/CD27^{high} plazmablasztokon (normál donorban a B sejtek kb.1-2%-a) minimális Fc γ - és komplementreceptor expressziót detektáltunk. SLE-ben a memóriasejtekre jellemző CD32 és CD35 fokozott expresszióját nem találtuk. Az Ig^{low}/CD27^{high} plazmablasztok aránya az aktív betegeknél a 20%-ot is elérte, a normál mintákhoz hasonlóan azonban az IC-kötő receptorok expressziója minimális volt. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a korábban sokak által mért receptorcsökkenés a memória B sejtek CD32 és CD35 csökkent expresszióját, valamint az ezeket a receptorokat minimálisan kifejező plazmablasztok nagyobb arányát tükrözik.

Eredményeinket az alábbi publikációkban tettük közzé:

- Isaák A., Prechl J., Gergely J., Erdei A.

Autoimmunity. 2006 Aug;39(5):357-66. Review.

- Isaák A, Gergely P Jr., Szekeres Z, Prechl J, Poór G, Erdei A, Gergely J

Int Immunol. 2008 20(2):185-192 (IF:4,015)

A komplementrendszer működésével kapcsolatos vizsgálataink egy új módszer kifejlesztését is lehetővé tették, az eredeti munkaterv kiegészítéseként. Ismert, hogy a nagydenzitású fehérje microarray technikák alkalmazásával több ezer antigén – ellenanyag kölcsönhatás követhető nyomon. A keringő ellenanyag-repertoár

jellemzésével pontosabb képet kaphatunk a kórokozók, daganatok és autoantigének ellen irányuló immunválaszról. Az idegen, illetve megváltozott saját felismerésére a komplementrendszer alkotóelemei is képesek, aminek eredményeképpen - többek között – komplement-komponensek kötődnek kovalensen a nanométeres közelségben lévő molekulákhoz. Az antigén *chip*-ek alkalmazásával történő ellenanyagprofil meghatározás körülményeinek megfelelő kialakításával elsőként használtuk ki a komplementrendszer ezen molekuláris „címkézését” a komplementet aktiváló antigének azonosítására. Az antigén *chip*-eket szérumban inkubáltuk 37°C-on, majd fluoreszcensen jelölt ellenanyagokkal azonosítottuk a lerakódott C3b és C3d fragmentumokat. Genetikailag C3 hiányos egereket vagy komplementgátló szereket alkalmazva bizonyítottuk, hogy a C3 kötődés mérése specifikus az aktivációt követő lerakódásra. A C3 fragmentum depozíció ellenanyagfüggő- és független módon is lezajlik a *chip*-eken. Szintén elsőként alkalmaztunk kétszínű fluoreszcens detektálást az antigénekhez kötődött ellenanyagok és komplement-fragmentumok egyidejű mérésére. Jelenleg a módszer diagnosztikai jelentőségét vizsgáljuk.

Eredményeinket az alábbi publikációkban tettük közzé:

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

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

- Papp K., Szekeres Zs., Terényi N., Isaák A., Erdei A., Prechl J.

Mol Cell Proteomics. 2007 6:133-140.

2. Komplement-fehérjék szerepe dendritikus sejtek érésében és funkcióiban

Háttér, előzmények

A specifikus immunválasz kialakulását és jellegét a patogén, ill. antigén felvételére, feldolgozására és nagyon hatékony bemutatására specializálódott, professzionális antigénbemutató sejtek, a *dendritikus sejtek* (DC) alapvetően meghatározzák. E sejtek elsődleges feladata a kórokozók periférián történő felvétele majd az antigén elszállítása a másodlagos nyirokszervekbe, és azok feldolgozott, átalakított fehérje-szakaszainak bemutatása MHC-molekuláikon a T sejteknek. Az érett DC-k a felszínükön nagy számban jelenlévő kostimulátor molekulák - CD86, CD80,

ICAM-1 - révén fontos szerepet játszanak a T sejtek aktiválásában. Azt, hogy a T-sejtek T_H1 vagy T_H2 alpopulációja aktiválódik-e, vagyis, hogy a celluláris vagy a humorális immunválasz dominál-e, jelentősen befolyásolja a DC-k mikrokörnyezete – köztük a testszerte mindenütt jelenlévő, számos sejt által termelt komplementfehérjék.

Mivel ismert, hogy az *in vivo* kialakuló és a szövetben keringő immunkomplexek tartalmazznak komplementfehérjéket is – elsősorban C1q-t és a C3 molekula különböző aktivációs termékeit (C3b, iC3b, C3d), vizsgálainkkal arra keressük a választ, hogy ezek a fehérjék hogyan befolyásolják a DC-k különböző funkcióit.

- A C1q és a vele rokon szerkezetű komplement-fehérje, a mannóz-kötő lektin (MBL) hatását vizsgálva azt találtuk, hogy míg az immobilizált C1q jelentős mértékben indukálja a DC-k érését és gyulladási citokin-termelését, addig az MBL hatástalan volt mindezekre a folyamatokra. Ezek az eredmények megerősítik korábban közölt adatainkat (EJI, 2000), miszerint a C1q és az MBL nem azonos sejtmembrán-struktúrához kötődik.

- Jelenleg is folyamatban levő kísérleteinkben a C3 molekula DC-kre gyakorolt hatását vizsgáljuk. Eddigi eredményeink arra a nagyon figyelemreméltó jelenségre utalnak, hogy lényegesen eltérő hatása van a sejtekhez kovalensen kötődő C3-fragmentumoknak, és a CR3 ill. CR4 komplementreceptorokhoz kötődő ligandumoknak.

- A C3 aktivációs fragmentumainak az antigénprezentációra gyakorolt hatását egér rendszerben is vizsgáltuk. Korábbi adataink alapján (Int.Immunol., 1998) ui. ismert, hogy a C3b molekula képes az antigénprezentáló sejtek felszínére is lerakódni, így segítve az antigén-specifikus T-sejtek proliferációját. Munkánk során követtük a sejtmembránhoz kötődő C3- fragmentumok sorsát, és kimutattuk, hogy ezek a molekulák exosomák felszínén válnak le a sejtekről. Bizonyítottuk, hogy ezen kis vezikulumok fokozzák az antigénbemutatás hatékonyságát naiv APC jelenlétében.

Eredményeinket az alábbi publikációkban tettük közzé:

- Bajtay Z, Csomor E, Sándor N, Erdei A:

Immunol Lett. 2006 15;104(1-2):46-52.

- Csomor E, Bajtay Z, Sándor N, Kristóf K, Arlaud GJ, Thiel S, Erdei A.

Mol Immunol. 2007 Jul;44(13):3389-97.

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

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

3. Hízósejtek IgE-közvetített aktiválásának gátlása komplement-eredetű peptidekkel, a gátlás molekuláris mechanizmusának vizsgálata

Háttér, előzmények:

A hízósejtek és a bazofil granulociták az allergiás reakciók fő effektor sejtjei. Ezek a sejtek számos különböző stimulusra képesek válaszolni; így például az antigén/IgE kölcsönhatást követően illetve különböző komplement-eredetű faktorokra. Munkacsoportunk korábban leírta (Imm.Lett.1999), hogy a C3a anafilatoxikus peptid, ami a szeróza típusú hízósejteket aktiválja a C3a receptoron keresztül, gátolja a mukóza típusú hízósejtek IgE-mediált aktivációját. Feltérképeztük, hogy a C3a molekulának mely része felelős ezért a gátlásért, és az azonosított szakasz aminosav-szekvenciája alapján két peptidet szintetizáltattunk: a C3a7-et (CCNYITELR), amely a C3a természetes szekvenciája, illetve C3a9-et (DCCNYITR), ami ennek módosított származéka.

A pályázati munka során bizonyítottuk, hogy a C3a9, ami a leghatékonyabb gátló peptidnek bizonyult, a C3a-hoz hasonlóan az FcεRI β-láncához kötődik mind nyugvó, mind antigénnel stimulált sejteken. A C3a9-es peptiddel kezelt sejtek esetében az antigénnel keresztköött FcεRI internalizációja fokozódott éppen abban az idő-intervallumban, amikor a jelátviteli utak elindulnak. Kimutattuk, hogy a receptor és két src kináz, a Lyn és a Fyn, asszociációja - mely elengedhetetlen kezdeti lépése az FcεRI-közvetített jelátviteli utaknak -, csökkent a peptid jelenlétében, ugyanúgy, mint a receptor β alegysége és a Lyn kináz tirozinon való foszforilációja. Leírtuk továbbá, hogy a C3a eredetű peptid gátolja számos intracelluláris fehérje foszforilációját és az antigén indukálta $[Ca^{2+}]_i$ -szint növekedést is. Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a C3a eredetű peptid gátolja az FcεRI-közvetített jelátviteli folyamatok legkorábbi lépéseit gátolja azáltal, hogy a receptor β-láncához kapcsolódik.

A hízósejtek számos citokint is termelnek, melyek szerepet játszanak az immunválasz szabályozásában és az allergiás folyamatokban. A citokin-gének expressziójának a szabályozásában résztvesznek a MAP kinázok is. Kimutattuk, hogy a C3a9-es peptid gátolja az ERK1/2 és p38 kinázok foszforilációját, és a TNF-α és IL-6 citokinek termelését is.

Eredményeinket az alábbi publikációkban tettük közzé:

- Andrásfalvy M, Péterfy H, Tóth G, Matkó J, Abramson J, Kerekes K, Vámosi G, Pecht I, Erdei A:

J Immunol. 2005. ,175:2801-6.

- Péterfy H, Tóth G, Pecht I, Erdei A.

Int Immunol. 2008 Jul 24. [Epub ahead of print]

Jelenleg is zajló *in vivo* egér modell (PSA – Passive Systemic Anaphylaxis) kísérleteinkben kimutattuk, hogy a hízósejtek FcεRI-n keresztüli aktivációjához kapcsolható vér hisztamin-szint növekedést is gátolják a vizsgált komplement-eredetű peptidek. Továbbá – szintén folyamatban levő kutatásaink eredményei – arra utalnak, hogy a humán bazofil granulociták FcεRI-en keresztüli stimulációját is szignifikánsan csökkenti a C3-eredetű peptidek jelenléte.

4. A komplementrendszer szerepének vizsgálata a *sclerosis multiplex* (SM) egér modell-rendszerében, a kísérletes autoimmun encephalitis (EAE - Experimental Autoimmune Encephalitis) betegségben

Háttér

A sclerosis multiplex (SM) a központi idegrendszer leggyakrabban előforduló gyulladásos megbetegedése, amely a neuronok axonját borító myelinhüvely roncsolása miatt alakul ki. Az autoimmun eredű SM kialakulhat T-sejt függő illetve antitestek által felerősített módon is. Mindkét esetben megjelennek a központi idegrendszerben T-sejtek és makrofágok, de csak az utóbbi esetében mutatható ki myelin specifikus ellenanyag és komplementaktiváció. Úgy a Sclerosis Multiplex, mint annak egér modellje, az EAE iniciációjában és fenntartásában számos ponton játszhat szerepet a komplementrendszer. A gyulladás miatt könnyebben átjárható vér-agy gát is lehetővé teszi a komplementkomponensek bejutását az agyszövetbe, ugyanakkor a komponensek lokálisan is szintetizálódnak, az agyi asztrociták és mikroglia sejtek, valamint az infiltráló makrofágok által.

Munkánk során elsősorban a komplementrendszer szerepét vizsgáltuk, az állatmodellt alkalmazva. A nőstény C57BL/6 egereket myelin oligodendrocita glikoprotein eredetű peptidet (MOG 35-55) és komplett Freund adjuvánst tartalmazó emulzióval, valamint két ízben Pertussis toxinnal oltottuk be. A klinikai tüneteket naponta pontoztuk 0-tól 5-ig, az általánosan elfogadott kritériumok szerint. Eredményeink alapján a kobra mérég faktorral (CVF, *ip.* oltás) dekomplementált állatok csoportjában a betegség első tünetei szignifikánsan később jelennek meg, azonban a kór súlyosságát tekintve nincs különbség a normál komplement aktivitással rendelkező csoporttal szemben. Két héttel a betegség tüneteinek megjelenése után megvizsgáltuk az állatok gerincvelőjét, de a szövettani metszeteken nem találtunk különbséget a két csoport között. Vizsgáltuk a MOG-specifikus ellenanyag szintet is, azonban nem találtunk összefüggést a klinikai tünetekkel.

Jelenleg zajló kísérleteinkben azt vizsgáljuk, hogy az állatok nyirokcsomójából izolált T-sejtek proliferációs képessége hogyan változik a dekomplementált egerekben, EAE indukció után. A T-sejteket a tünetek megjelenésének idejében izoláljuk, antigénprezentáló sejt-ként pedig csontvelői eredetű dendritikus sejteket használunk, melyeket MOG peptiddel töltöttünk fel. Eddigi eredményeink szerint a CVF-fel kezelt állatokból származó T-sejtek szignifikánsan kisebb mértékben aktiválhatók, mint a normál komplementrendszerrel rendelkező állatok.

*Eredményeinket az alábbi publikációban tettük közzé:
- Terényi N., Prechl J., Erdei A.
Adv Exp Med Biol. 2006;586:177-88*