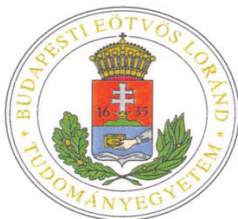


# **A C3 komplementfehérje hatása humán monocita eredetű dendritikus sejtek funkcióra**



**Sándor Noémi**

**Témavezető: Bajtay Zsuzsa PhD, habilitált adjunktus**

**ELTE TTK Biológiai Intézet  
Immunológia Tanszék**

**ELTE TTK Biológia Doktori Iskola  
Doktori Iskola Vezető: Prof. Erdei Anna  
Immunológia Program  
Programvezető: Prof. Erdei Anna**

**2010**

## Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés	5
I. Dendritikus sejtek általános jellemzése	6
II. Dendritikus sejt populációk és fejlődésük	7
II/1. Egér dendritikus sejtek	8
II/2. Humán dendritikus sejtek	10
II/3. A DC-k fejlődésében szerepet játszó citokinek	11
III. Dendritikus sejtek szerepe az immunválasz kialakításában	12
IV. A komplementrendszer	16
IV/1. A C3 szerkezete és aktivációja	18
IV/2. Komplementreceptorok és regulátorok	22
IV/3. Immunfolyamatok szabályozása a komplementrendszer elemei által	23
Célkitűzések	25
Felhasznált anyagok és módszerek	26
I. Oldatok, pufferek, anyagok	26
II. Módszerek	29
Intakt C3 tisztítása friss humán savóból	29
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot	30
NHS és C3 metilamin kezelése	31
Monocita eredetű dendritikus sejtek (MDC) és makrofágok (MM) előállítás	31
Áramlási citofluorimetria	33
Konfokális lézerpasztázó mikroszkópia	33
C3 kötődés vizsgálata imMDC-k felszínéhez	33
imMDC-k kezelése	34
MDC-k allogén T-sejt aktiváló képességének meghatározása	35
Citokin mérése ELISA módszerrel sejtenyészet felülészéből	35
MDC-k és MM-k C3 termelésének meghatározása	35
MDC-MM kokultúrák	36
Birka vörösvérsejt (BVVS) fagocitózis	36

CR3 expresszió csökkentése RNS silencing technikával	36
C3 tartalmú nanopartikulumok kimutatása natív C3 kezelt MDC-k felülúszójából	37
Eredmények	38
I. C3 kötődése dendritikus sejtekhez	38
I/1. Humán MDC-k nem termelnek C3-at	38
I/2. A makrofágok által termelt C3 funkcionális vizsgálata	39
I/3. MDC-k képesek az aktivált MM-ok által termelt C3-at felszínükön fixálni	40
I/4. C3 komplementfehérje MDC-khez való kötődésének <i>in vitro</i> vizsgálata	43
I/5. A MDC-k felszínéhez kötődött C3 fragmentumok sorsa	46
II. A C3 hatása MDC-k fenotípusára	50
III. A C3 szerepe MDC-k és T-sejtek kapcsolatában	52
III/1. C3 kezelt MDC-k hatása allogén T-sejtek osztódására	52
III/2. A CR3 szerepe a natív C3 kezelt MDC-k allogén T-sejt aktivációjában	54
III/3. A C3 hatása MDC-k gyulladásos citokin termelésére	55
IV. Komplementreceptorok funkcióinak vizsgálata MDC-ken	58
IV/1. A receptorok ligandumkötő képességének vizsgálata	58
IV/2. A CR3 és CR4 receptorok funkcionális vizsgálata	61
V. Diszkusszió	64
Összefoglalás	73
Summary	74
Irodalom	75
Publikációk	83
Köszönetnyilvánítás	87

## Rövidítésjegyzék

- BCR** – B-sejt receptor (B cell receptor)  
**TCR** – T-sejt receptor (T cell receptor)  
**DC** – dendritikus sejt  
**LC** – Langerhans sejt  
**MDC** – monocita eredetű dendritikus sejt  
**MM** – monocita eredetű makrofág  
**MHC** – fő hisztokompatibilitási antigén  
**MR** – mannóz receptor  
**APC** – antigénprezentáló sejt  
**PRR** – Pattern Recognition Receptor, mintázatfelismerő receptor  
**IFN- $\gamma$**  – interferon gamma  
**CD** – cluster of differentiation  
**DC-SIGN** – Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin  
**TLR** – Toll-Like Receptor  
**LPS** – lipopoliszacharid  
**imDC** – éretlen dendritikus sejt  
**maDC** – érett dendritikus sejt  
**cDC** – konvencionális dendritikus sejt  
**pDC** – plazmacitoid dendritikus sejt  
**preDC** – prekurzor dendritikus sejt  
**TipDC** – TNF és NO termelő dendritikus sejt (TNF iNOS producing DC)  
**TNF** – tumor nekrozis faktor  
**NO** – nitrogén monoxid  
**IL** – interleukin  
**HSC** – hemopoetikus őssejt (hemopotic stem cell)  
**MPP** – multipotens progenitorok  
**CMP** – közös mieloid prekurzor (common myeloid precursor)  
**CLP** – közös limfoid prekurzor (common lymphoid precursor)  
**MEP** – megakariocita-eritrocita prekurzor

**GMP** – granulocita-makrofág prekursor

**M-DC** – makrofág-DC prekursor

**MG** – makroglobulin

**GM-CSF** – granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)

**Sirp- $\alpha$**  – signal regulating protein alfa

**HSV** – herpesz szimplex vírus

**Flt3L** – FMS-related tyrosin kinase ligand 3

## Bevezetés

Az immunválasz során az evolúciósan újabb adaptív immunrendszer sejtjei, a B- és T-limfociták eltérő módon aktiválódnak. A B-sejtek az antigéneket intakt formában ismerik fel B-sejt receptoruk (BCR) segítségével, míg a T-sejtek csak az MHC molekulákhoz kötött antigén eredetű peptideket érzékelik T-sejt receptoruk (TCR) által. Ez utóbbi tény szükségessé teszi olyan sejtek részvételét, melyek feladata a szervezetbe kerülő antigének felismerése, megkötése, feldolgozása, és bemutatása a T-limfocitáknak. Erre a funkcióra az immunrendszerben három sejttípus szakosodott, ezeket összefoglalóan hivatásos antigénprezentáló sejteknek (APC) nevezzük, ide tartoznak a makrofágok, dendritikus sejtek (DC-k) és a B-limfociták. Közös jellemzőjük, hogy sok, a patogének konzervált molekuláit megkötő mintázatfelismerő receptort (pattern recognition receptor – PRR) hordoznak, és a helper T-sejtek aktivációjához szükséges MHCII molekulát konstitutív módon kifejezik.

A három hivatásos APC típus a közös feladat ellenére sok tekintetben különbözik egymástól. Makrofágok esetében az antigénprezentáció szigorúan vett feladata, hogy a nyirokcsomóban specifikusan aktivált T-sejtek a periférián az ugyanazt az antigént bemutató makrofágot felismerve azt  $\text{IFN-}\gamma$  termelésükkel aktiválják. Ez a mechanizmus szükséges ugyanis ahhoz, hogy a makrofágok a bekebelezett kórokozót hatékonyan képesek legyenek elpusztítani, mivel a reaktív oxigén és nitrogén intermediereket termelő enzimrendszereik  $\text{IFN-}\gamma$  általi stimulusra aktiválódnak. Összefoglalva, ez esetben az antigénprezentáció feladata a makrofágok specifikus aktivációjának biztosítása.

B-limfociták esetében is hasonló feladatról van szó. Számukra az azonos antigént felismerő helper T-sejteken kifejeződő CD40 ligandum (CD40L) általi jel szükséges ahhoz, hogy hatékony ellenanyagtermelő plazmasejtekké differenciálódjanak.

A dendritikus sejtek antigénprezentációjában betöltött fontosságát kiemeli, hogy ez a sejttípus képes egyedül a naív T-limfociták aktiválására. Erre az teszi alkalmassá a DC-eket, hogy az antigén belépésének helyén találhatóak, azt hatékonyan képesek felvenni, feldolgozni, és a legközelebbi nyirokcsomóba, azon belül is a T-sejtes területre szállítani. Másik elengedhetetlenül fontos tulajdonságuk,



nomenklatúra, így jelenleg ezek vannak használatban. Ezek a jelölések (*imDC* és *maDC*) viszont minden esetben a funkcionális különbségre utalnak.) Ez az elmélet, amely szerint a DC-k minden populációja ugyanezt az utat járja be élete során, megdőlt. Ennek legmeggyőzőbb bizonyítéka, a limfoid szövet rezidens DC-k azonosítása volt, amely sejtek funkcióikat úgy látják el, hogy egész életük során az adott nyirokszervben maradnak<sup>9</sup>.

A különböző DC populációk közös tulajdonsága antigén bemutató és T-limfocita aktiváló képességük, de egyéb jellemzőikben – amely az aktiválódó T-sejtek sorsát meghatározza – különbözőek. Képesek kiváltani immunválaszt vagy toleranciát, indukálhatják effektor és regulátor T-sejtek képződését és a T-limfociták citokintermelését is irányítják<sup>10</sup>.

Az utóbbi időben egyre inkább a tudományos érdeklődés előtérébe kerül a dendritikus sejtek *toleranciában* betöltött szerepe. A tímuszban jelenlévő DC-k a centrális tolerancia kialakításáért felelősek, az autoreaktív T-sejtek negatív szelekciója azonban nem tökéletes. A perifériára kikerülő autoreaktív klónok szabályozása szintén a DC-k feladata. Felmerült, hogy léteznek eleve regulátor funkciójú DC populációk, illetve hogy az *imDC*-k toleranciát indukálnak, míg az *maDC*-k immunválaszt. Nem tisztázott, hogy a toleranciát milyen hatásmechanizmussal váltják ki: elpusztítják az autoreaktív T-sejteket, esetleg anergikus állapotukat idézik elő vagy regulátor T-sejtek képződését és aktivációját indukálják. Valószínűsíthető, hogy a nyugalmi állapotban lévő (*steady-state*) DC-k toleranciát indukálnak, illetve különböző tolerogén faktorok is hathatnak a DC-kre, melyek funkciójukat ebbe az irányba terelik<sup>11,12</sup>.

## II. Dendritikus sejt populációk és fejlődésük

A dendritikus sejtek fejlődése napjaink intenzíven kutatott tudományos kérdése. A legújabb felosztás szerint megkülönböztetnek *konvencionális DC-keket* (*cDC-k*), melyek már differenciált sejtalakok és *prekurzor DC-keket* (*preDC-k*), melyek még előalakok, de DC-vé válásukhoz további osztódás már nem, vagy csak kevés számú szükséges. A *preDC-keket* további két funkcionális csoportra oszthatjuk: melyek nyugalmi állapotban is képeznek DC-keket, illetve melyekből csak gyulladás esetén alakulnak DC-k<sup>9</sup>. A felosztás szerint a harmadik csoportot alkotják a *gyulladásos DC-k*, amelyek nyugalmi állapotban nem mutathatók ki, gyulladási stimulus



hatására differenciálódnak monocitákból. Ilyen sejtek a TNF és NO-termelő, ún. *TipDC-k (TNF, iNOS producing DC)*.

A cDC-eket szintén további két nagy csoportra oszthatjuk. Az első csoportba a „klasszikus” életciklusú, *migráló DC-eket* sorolják, melyek a periférián folyamatosan pásztázzák környezetüket, veszély szignál esetén pedig a nyirokcsomókba vándorolnak. Valószínűleg, a nem limfoid szövetekben előforduló DC-k mindegyike ebbe a csoportba tartozik: az epidermis *Langerhans sejtek (LC-k)*, a *dermális DC-k* és egyéb szöveti DC-k. A másik csoportot a limfoid szövetek *rezidens DC-i* alkotják, melyek nem vándorolnak, ilyenek a *tímusz DC-i*, a *lép DC-k* és a nyirokcsomókban található DC-k fele. Fontos funkcionális különbségüket jellemzi, hogy a migráló DC-k a nyirokcsomóban nem vesznek fel antigént, míg a rezidensek igen<sup>9</sup>.

A továbbiakban összefoglalom az egér és humán populációk ezen új rendszer szerinti besorolását, illetve a populációk fejlődéséről alkotott mai elképzeléseket.

## **II/1. Egér dendritikus sejtek**

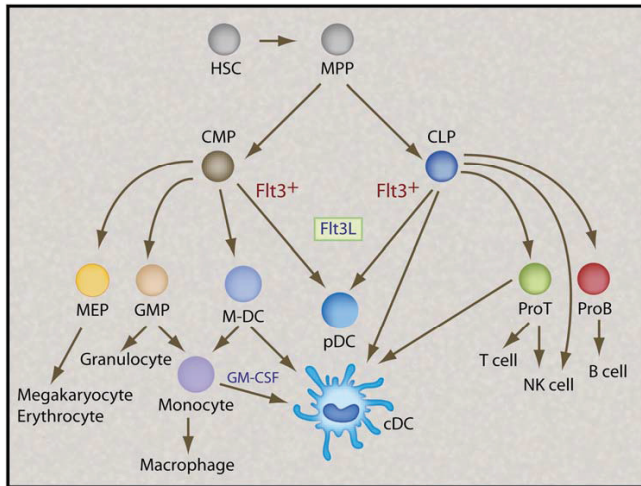
A fejlődéstanilag érettnek tekinthető egér DC populációk mindegyikére jellemző a CD11c, CD80, CD86, CD40 és MHCII molekulák expressziója, mely aktiváció hatására fokozódik. A populációk megkülönböztetése CD4, CD8, CD11b, CD205 és Sirp- $\alpha$  molekulák meglétén, illetve hiányán alapul. Alapvetően öt különböző DC típust találunk egerek limfoid szöveteiben, a lépben három féléit, a nyirokcsomókban további két féléit, ezeken kívül természetesen megtalálhatóak még plazmacitoid DC-k (pDC-k) és LC-k is a szervezetben.

A lépben megtalálhatók a marginális zóna DC-k, melyek CD4+, CD8-, CD11b-, CD205-, Sirp- $\alpha$ + fenotípussal jellemezhetőek, és aktiváció (pl. LPS stimulus) hatására a lép T-sejtes zónájába vándorolnak. A T-sejtes zónában, nyugalmi állapotban CD4-, CD8+, CD205+, CD11b-, Sirp- $\alpha$ - DC-k találhatóak, bár újabb eredmények szerint ezek is aktivációs stimulus hatására vándorolnak ide a marginális zónából<sup>13</sup>. A harmadik populáció CD4-, CD8-, CD11b+, CD205-, Sirp- $\alpha$ + és szintén nyugalmi állapotban megtalálható a lépben<sup>19</sup>. Fontos megemlíteni, hogy a lépben nincs migráló DC populáció, hiszen ezek a sejtek csak a nyirokerekben kerülhetnének ide, de a lépnek nincs kapcsolata a nyirokhálózattal<sup>9</sup>.

A nyirokcsomó plusz két populációját a CD205+, CD11b+, langerin+ és a CD4-, CD8-, CD11b+ DC-k alkotják. Ezek valószínűleg a perifériás szövetekből

ideáramló aktivált, érett DC-k<sup>1</sup>. Előbbiek feltehetően a bőrből származó LC-k, melyek valószínűleg az idehozott antigént a CD8<sup>+</sup> populációnak adják át<sup>1,14</sup>.

A dendritikus sejtek fejlődésének feltárásával több kutatócsoport foglalkozik napjainkban. Az utóbbi pár évben sikerült felállítani egy fejlődési modellt, mely az 1. ábrán látható<sup>15</sup>.



*1.ábra*

*A dendritikus sejtek fejlődése*

*(Wu, Immunity, 2007)*

Fejlődésük plasztikusabb, mint bármely más immunsejté, az egér csontvelőből izolált közös mieloid és limfoid prekurzorok (CMP és CLP) képesek valamennyi DC populáció kialakítására<sup>14,16,17</sup>. Ez az új eredmény annak fényében, hogy korábban a pDC-n kívül a többi populációt mind szigorúan mieloid eredetűnek tekintették, igen meglepő. Az öt érett DC populáció prekurzorait sikerült azonosítani, így az elmondható, hogy ezeken a ponton már biztosan elvált az egyes populációk fejlődése. A közvetlen előalakokat, amelyek az érett DC-ket megelőző állapotot reprezentálják, preDC-ként említi az irodalom. A legújabb osztályozás alapján megkülönböztetik a nyugalmi állapotban kialakuló populációkat, és azokat, amelyek csak gyulladás esetén alakulnak DC-vé közvetlen előalakjukból<sup>9</sup>. Az utóbbi,

gyulladásos kategóriában két sejttípus szerepel. Egyik ezek közül a plazmacitoid DC populáció (pDC). Ezek kerek, nem DC morfológiájú sejtek melyek a vérben és minden limfoid szövetben megtalálhatók és aktiváció hatására érési folyamaton mennek keresztül, DC alakot nyernek, és I. típusú interferonokat termelnek nagy mennyiségben<sup>1</sup>. Leginkább a CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup> populációra hasonlítanak ilyen érett formában. Másik ilyen közvetlen előalak a gyulladásos CCR2<sup>+</sup> monocita, mely GM-CSF és TNF- $\alpha$  hatására kilépve az érpályából gyulladásos TipDC-vé alakul<sup>18</sup>.

## II/2. Humán dendritikus sejtek

A humán sejtek vizsgálata komoly nehézségekbe ütközik, hiszen a DC-k testszerte elszórtan találhatóak, túlnyomórészt azokban a szervekben, melyek humán rendszerben kísérletesen nem vizsgálhatók. A humán és egér populációk egymásnak való megfeleltetése sem könnyű, tekintve hogy a humán DC-k nem expresszálják a CD8 molekulát<sup>19</sup>.

Egyértelműen azonosítható populációt alkotnak a Langerhans sejtek, melyek az epidermisben találhatóak, jellemző markereik a Birbeck granulomok, a CD1a és a langerin. Ezek hosszú életű sejtek, prekurzoraik elsősorban a bőrben vannak, de keletkezhetnek CCR2<sup>+</sup> gyulladásos monocitákból is<sup>20</sup>. A thímuszban két populáció található: a CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD45RO<sup>lo</sup> markerekkel jellemezhető thímusz DC-k, melyek az egér CD8<sup>+</sup> thímusz DC-kkel megfeleltethetők, illetve kisebb számban megtalálhatók CD11c<sup>hi</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD45RO<sup>hi</sup> mieloid eredetű DC-k, melyek az egér CD8<sup>-</sup> thímusz populáció megfelelői. A thímuszban jelenlevő DC-k feladata az érett, diverz specificitású CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-limfociták, a természetes regulátor T-sejtek, az NKT sejtek és a mukóza asszociált invariáns  $\gamma\delta$ T-sejtek fejlődésének irányítása<sup>21</sup>. A pDC-k is jellegzetes populációt alkotnak, CD4<sup>+</sup>, IL-3R<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup> sejtekként azonosíthatók. Az egerekhez hasonlóan, emberek esetén is a vérben és a nyirokszervekben fordulnak elő. Az aktivált pDC-k belépése a nyirokcsomókba L-szelektin függő folyamat. Limfoid eredetűek, melyre limfoid markerek megléte és mieloid markerek hiánya utal, valamint az, hogy csíravonal kódolt Igc és preTCR $\alpha$  mRNS is található bennük. In vitro IL-3 és CD40L vagy CpG, illetve HSV stimulációra I típusú IFN termelő sejtekké alakulnak.

A humán sejteket és fejlődésüket leginkább *in vitro* kísérletek alapján ismerjük. DC-ket differenciálthatunk CD34<sup>+</sup> csontvelői őssejtekből (melyek között

vannak már elkötelezett DC prekursorok) GM-CSF és TNF- $\alpha$  hatására<sup>22-24</sup>. Másik lehetőség, a széleskörben használt, monocitákból történő differenciáltatás GM-CSF és IL-4 jelenlétében<sup>63,64</sup>. Ez utóbbi módszer Shortman szerint a TipDC-k fiziológiás fejlődését modellezi<sup>9</sup>. Az *in vivo* DC fejlődést legjobban megközelítő *in vitro* modell exogén citokinek hozzáadása nélkül állít elő DC-eket; kollagén bevonaton tenyésztett endotél sejtekre helyezük a monocitákat, majd azok átvándorolva a sejt és kollagén rétegen az érből való kilépést utánozzák. A legtöbb sejt az endotél réteg alatt marad és makrofággá differenciálódik, de egy részük visszavándorol a sejtréteg fölé újra, és DC-vé differenciálódik<sup>25</sup>.

### II/3. A DC-k fejlődésében szerepet játszó citokinek

*In vitro* körülmények között DC-eket GM-CSF jelenlétében differenciáltatnak legelterjedtebben, de a nyugalmi állapotú DC fejlődéséhez ez a faktor egyáltalán nem szükséges, hiszen ekkor koncentrációja alacsony. Gyulladásos folyamat hatására a GM-CSF koncentrációja megnő. Hasonló körülményeket biztosítunk az *in vitro* tenyésztés során, ezáltal a gyulladással DC fejlődést modellezzük.

Minden DC alak nyugalmi állapotú fejlődéséhez elengedhetetlen az Flt3L (FMS-related tyrosin kinase ligand 3), mind egér, mind humán szervezetben. *In vitro* modellrendszerben, ha csontvelői CD34+ sejteket kezelünk Flt3L-al akkor mind pDC-k mind cDC-k differenciálódnak. Az Flt3L jelentőségét az is alátámasztja, hogy ha a CMP és CLP prekursorokhoz képest differenciáltabb prekursorok DC képzését vizsgálták, kiderült, hogy az Flt3+ sejtekből mindig lehet DC-eket differenciáltatni, illetve minden azonosított DC prekursor Flt3+<sup>9,26-31</sup>.

A Langerhans sejtek fejlődése TGF- $\beta$  függő folyamat, a géniütiött egérmodellben hiányoznak az LC-k<sup>32</sup>.

### III. Dendritikus sejtek szerepe az immunválasz kialakításában

Az, hogy a DC-knek elengedhetetlen szerepük van a primer immunválasz indukciójában és az immunválasz irányának meghatározásában, ma már nem kérdéses. Az 1980-as évek elején vált világossá, hogy ez az egyetlen sejtípus, amely a naív T-sejteket képes aktiválni és ezáltal *de novo* immunválaszt indukálni. Szintén ezekhez a kísérletekhez köthető a *priming*, azaz tanítás és a *restimuláció* fogalmának

szétválasztása. Előbbi alatt értjük a naív T-limfociták és DC-k kapcsolódását, utóbbira pedig minden antigénprezentáló sejt képes, és a már „kitanított” T-sejtek effektor sejtekké aktiválását értjük alatta.

Később kiderült, hogy ha DC-ket TNF- $\alpha$ -val, LPS-sel vagy CD40L-al stimulálják, akkor egy átmeneti antigén felvétel növekedés figyelhető meg, mely hamar lecseng<sup>33</sup>. Ezt követően nő a sejtek érési marker expressziója (CD83, CD80, CD86, MHCII) és T-sejt stimuláló képessége is. Korábban a kiinduló, nyugvó DC stádiumra jellemző fenotípust éretlen DC-knek nevezték (imDC) és ehhez az állapothoz toleranciát kiváltó funkciót kapcsoltak. Az utóbbi, érett fenotípust (maDC) viszont egyértelműen immunogén tulajdonságokkal kötötték össze. Az utóbbi pár év kísérletei alapján sokkal árnyaltabb lett ez a kép.

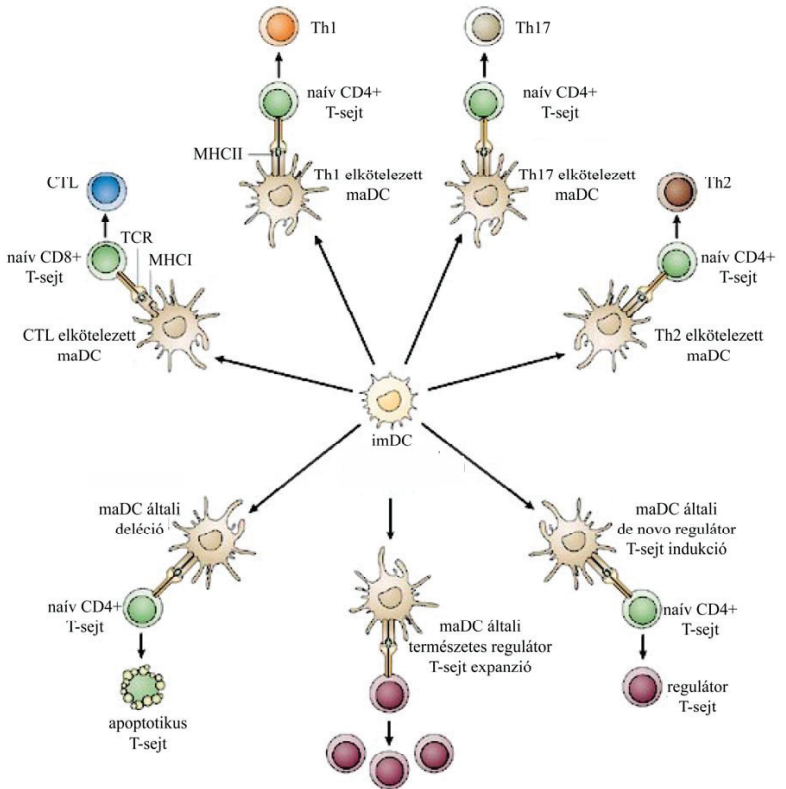
Kialakult a T-sejt aktiváció mechanizmusára ma legelfogadottab „3 szignál” elmélet, mely definiálja azt a 3 jelet, mely az APC-ről éri a T-sejtet és meghatározza annak sorsát. Az első az MHC-peptid komplex és T-sejt receptor közötti kapcsolat. Abban az esetben, ha csak ezt a jelet kapja a T-limfocita, az a tímuszban zajló negatív szelekció mintájára anergiába taszítja vagy elpusztítja a sejtet, esetleg regulátor sejtek képződéséhez vezet, de mindenképpen *tolerogén* választ jelent. Ehhez társulhat a második jel, azaz a kostimulációs szignál. Ez a kettő jel együtt már elég lehet immunválasz indukciójához, összegződésük esetén a sejtek klonális expanziójához vezethet, effektor- és memóriasejtek képződhetnek. Sokszor a T-sejteken jelen levő CD28 és az APC-k CD80/CD86 molekuláinak kapcsolódását értik második jel alatt, de igazából több receptorból jövő jelek eredője határozza meg a kostimulátor hatást, mely nem csak aktiváló lehet. A harmadik jelet olyan faktorok közvetítik, melyek meghatározzák az effektor sejtek irányultságát. Ilyen pl. a T-limfocitákat Th1 irányba polarizáló IL-12 vagy a Th2 irányú elköteleződést segítő NotchL, a Th17 irányító IL-6 és TGF- $\beta$ <sup>34</sup>.

Amikor egyértelművé vált, hogy a DC-k minden típusú immunválasz (Th1, Th2, regulátor, Th17) kialakulását képesek irányítani, felmerült, hogy a kezdeti *imDC-tolerancia*, *maDC-immunogenitás* elképzelés nem állja meg a helyét, ez a modell ugyanis lineáris, tehát azt feltételezi, hogy a DC-k vagy „kikapcsolt”, vagy „bekapcsolt” állapotban vannak. Ez a két állapot a sok feltárt funkcióval nem összeegyeztethető. Több elmélet is létezik az ellentmondás feloldására, de egyik sem egyértelműen bizonyított. Nem valószínű, hogy a sokféle populáció mind különböző funkcióra specializált. Egy másik „átmeneti modell” elmélet szerint először minden

DC aktiválódásakor Th1 polarizálódva válik, majd ebből az állapotból alakulhat tovább Th2, Th17, stb. polarizálódva. A harmadik, és legvalószínűbb „rugalmas modell” szerint az érés egy lépésben zajlik, és ezalatt dől el, hogy a DC milyen típusú funkciót nyer. A három modellben közös pont, hogy többféle érett DC-t különít el, és ezek a T-sejt stimulációjában közvetített harmadik jel minőségében különböznek elsősorban<sup>34</sup>.

A legkevésbé tisztázott a *tolerogén DC-k* keletkezésének és szerepének a kérdése. A klasszikus elmélet szerint, a tolerancia kiváltása az imDC-k tulajdonsága. Ez a feltevés több okból sem állja meg valószínűleg a helyét, bár az eredmények *in vitro* vizsgálatokon alapulnak, melyek nem feltétlenül fednek át minden tekintetben az *in vivo* szituációval. Ha valóban az imDC-k közvetítik a toleranciát, akkor ebben az esetben a T-sejtek csak az első, TCR-en keresztüli szignált kapják. Ez valószínűleg nem elég az aktivációjukhoz, hiszen az imDC-ken kevés az MHC és adhéziós molekula, nem mobilisak és nem képesek stabil sejt-sejt kapcsolatok kialakítására a limfocitákkal. Mindezekből az következik, hogy a toleranciát kiváltó DC-knek is kell tudniuk közvetíteni legalább a második szignált, illetve az maDC-khez hasonló fenotípussal kell rendelkezniük. Mindezek figyelembe vételével, az imDC és maDC fogalmak inkább fenotípusnak felelnek meg, a funkciót illetően helyállóbb lenne a *tolerogén DC – immunogén DC* megkülönböztetés, ám ez még nem honosodott meg.

A DC-k szerteágazó funkcióit a 2. ábra szemlélteti, bemutatva, hogy az aktiválódó DC-k milyen sokféle válasz közvetítésére képesek.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
**Nature Reviews | Immunology**

## 2. ábra

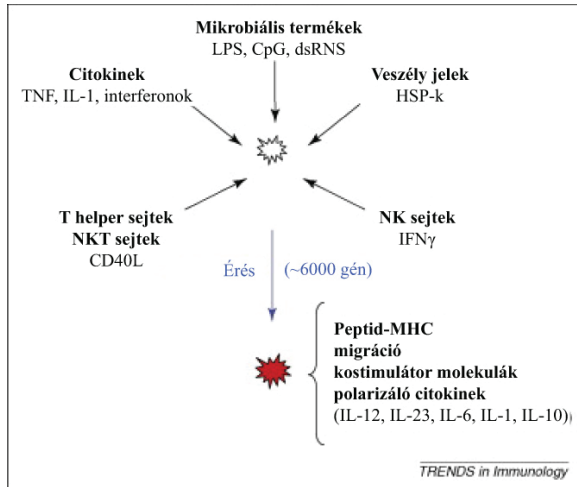
### *A dendritikus sejtek sokrétű funkciója*

*(Reis e Sousa, Nature Reviews Immunology, 2006)*

Ezt a nagyszámú kimeneteli lehetőséget a DC-k aktiválódásának körülményei határozzák meg. Nem ugyanolyan aktivációt eredményez, ha a sejt a periférián találkozik az antigénnel, felveszi azt, és további, a veleszületett immunrendszer elemeiből származó jelekkel (pl. citokinek) is találkozik, vagy ha a nyirokcsomóban találkozik az antigénnel, teljesen más körülmények között.

A sejtek közötti kommunikáció egy további formáját jelenti a szekretált membránvezikulákkal (pl. exosomák) történő kommunikáció. Az különböző összetételű exosomák szekrécióját sokféle sejttípus esetén leírták már, így dendritikus sejtek, makrofágok, B-sejtek, tumorsejtek, neutrofil granulociták esetén<sup>85</sup>. Ezek közül kutatócsoportunk makrofágok és B-sejtek C3 tartalmú exosomáit vizsgálta<sup>69</sup>. A szekretált mikrovezikuláknak az antigénprezentációban, citotoxikus válaszbán és immunszuppresszió kiváltásában is van szerepük<sup>85</sup>.

A 3. ábra összefoglalja, hogy milyen sokféle stimulus befolyásolja a DC-k aktivációját, ezek aránya, időbeni egymáshoz viszonyulása és időtartama összességében meghatározza a kialakuló választ<sup>35</sup>.



**3. ábra**

***Dendritikus sejteket aktiváló különböző faktorok és az aktiváció hatására bekövetkező változások***

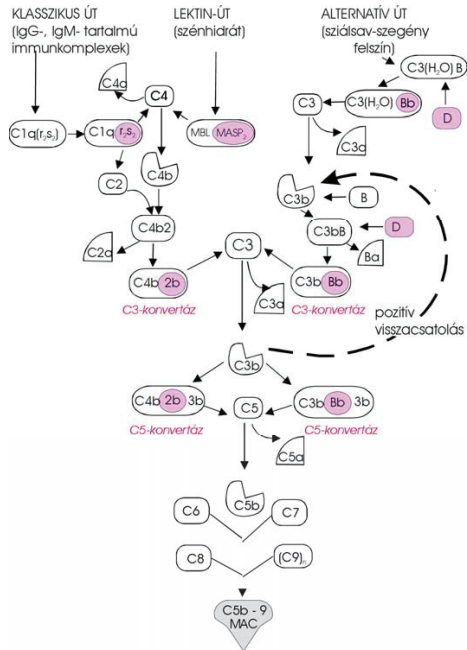
*(Macagno, Trends in Immunology, 2007)*



#### IV. A komplementrendszer

A veleszületett immunrendszer fő humorális komponense a komplementrendszer, mely a kaskád szolubilis fehérjéiből, ezek szabályozó faktoraiból és a komplement elemeket megkötő szabályozó receptorokból áll. Összefoglalva a komplementrendszer sokrétű részvételét az immunválaszban, elmondhatjuk, hogy különböző elemei révén részt vesz a mikroorganizmusok elleni védelemben, az immunkomplexek eliminálásában, az apoptotikus sejtek eltakarításában, valamint az adaptív immunválasz kialakulását is elősegíti, szabályozza. Egyik fontos funkciója az anafilatoxinok (C3a, C5a) generálása, melyek számos sejt kemotaxisában és aktivációjában fontos szerepet játszanak. Másik elengedhetetlen szerepe a fagocitózis hatékonyságának fokozása az aktiváló felszínen lerakódott különböző komplementfehérjék fragmentumainak segítségével (C1q, MBL, C3 fragmentumok). Ebben a két esetben a korai komplementkomponensek aktivációs termékei által valósul meg az effektor funkció, a késői elemek részvételével pedig megtörténhet a célsejt lízise is.

A komplementrendszer felépítését és sematikus működését szemlélteti a 4. ábra. Aktivációja három úton indulhat el, melyek a kulcsfontosságú C3 molekula hasításánál találkoznak. A klasszikus út tulajdonképpen a komplementrendszer adaptív vonatkozású ága, hiszen ezt az immunkomplexekhez kötődő C1q molekula indítja el, a lektin út ennek természetes megfelelője, melyet a C1q-hoz szerkezetileg nagyon hasonló MBL molekulák (illetve fikolinok) indítanak a patogén felszínre specifikus cukor oldalláncjaihoz kötődve. A harmadik, alternatív út a C3 molekula spontán hidrolízisével indul, mely hidrolizált formában képes patogének sztiálsavszegény felszínéhez kötődni, és a kaskádot továbbvinni.



4. ábra

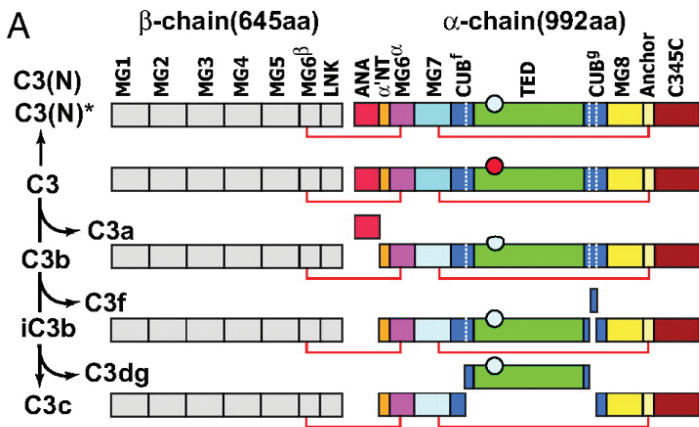
*A komplementkaszád és aktiválódásának három lehetséges útja  
(Gergely, Erdei, Immunbiológia, 2000)*

A komplementproteinek alapvetően két formában vannak jelen a szervezetben; egyrészt a szérumban, melyet a májsejtek termelnek, másrészt lokálisan a szövetekben, melyet epitelsejtek, makrofágok, dendritikus sejtek, stb. termelnek<sup>36,37</sup>. A komplementkomponensek szérumból a szövetek közötti térbe nem szivárognak, vagy csak kismértékben. Egy adott szövet, illetve sejttípus termelhet konstitutívan komplementkomponenseket, ennek mértéke gyulladásos citokinek és egyéb stimulusok hatására fokozódik<sup>38</sup>. A C3 központi komponens génje például olyan kötőhelyeket tartalmaz promoterében, mely ösztrogén, tiroxin, glükokortikoidok, IL-6 és IFN $\gamma$  általi bioszintézis szabályozást tesz lehetővé<sup>39</sup>.

Ezenkívül poszttranszlációs hatások is befolyásolhatják az aktuális lokális komplement szintet, azok a sejtek pedig, melyek migrációra képesek (pl. granulociták, monociták, makrofágok) egy „mozgó” komplement forrást jelentenek<sup>38</sup>. Az extrahepatikus komplement források fontosságát támasztja alá, hogy a C1 komplex a szérumban is szinte teljesen a monocitákból származik és dendritikus sejtekből (a hepatociták nem képesek a C1q komponens előállítására), a D faktor pedig főleg adipocita eredetű<sup>40</sup>.

#### **IV/1. A C3 szerkezete és aktivációja**

A C3 az  $\alpha 2$ -makroglobulin családba tartozó, 187 kDa tömegű, 1641 aminosav maradékból álló molekula, amelyet két ( $\alpha$  és  $\beta$ ), diszulfid hiddal kapcsolt lánc alkot. A molekula családra jellemző a tioészter csoport jelenléte, valamint a funkcionálisan fontos, 8 homológ *MG doménből* (MG, makroglobulin) álló mag, amely köré szerveződik a többi domén. A családba tartoznak még a névadó  $\alpha 2$ -makroglobulin mellett a C4 és C5 komplementfehérjék. A C3 összesen 13 szerkezeti alegységet tartalmaz, ezek közül egy (MG6) az  $\alpha$  és  $\beta$  lánc kialakításában egyaránt részt vesz<sup>41</sup>. A C3 planáris szerkezete, az egységek, láncok, hasítási helyek, és fragmentumok jelölésével látható az 5. ábrán.



5. ábra

A C3 domén szerkezete és hasítása során keletkező fragmentumok

(Janssen, Nature, 2005)

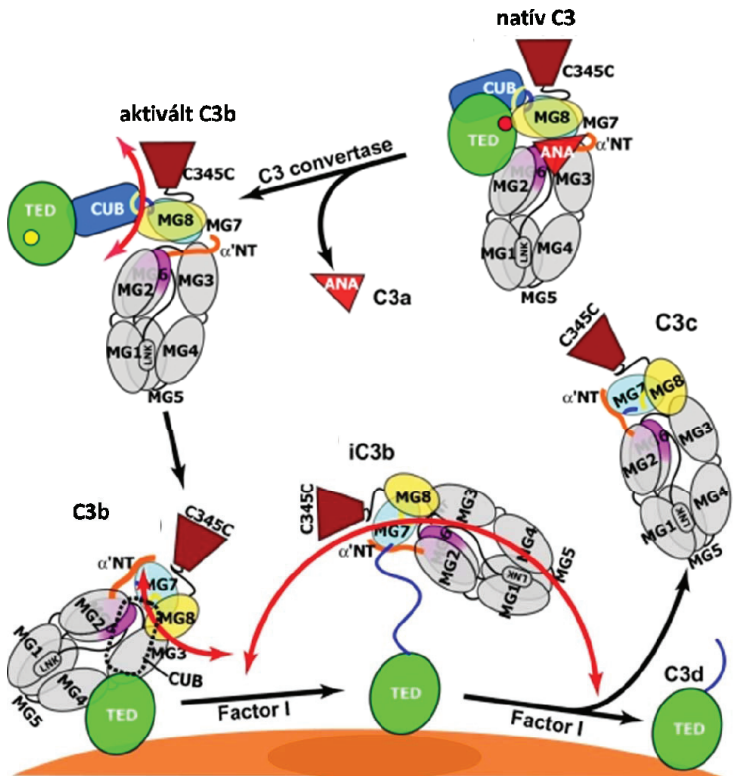
A C3 szerkezetének központi egységét az első 6 MG domén alkotta gyűrű jelenti, ezek az MG1–6 domének melyek közül a hatodik az  $\alpha$  és  $\beta$  lánc kialakításában is részt vesz. A  $\beta$  lánc az MG1–6 doméneken kívül még egy LNK nevű részt tartalmaz, mely „lefelé” nyúlik a molekulában, és ez a rész az MG1-hez kapcsolódik. Az  $\alpha$  láncban első doménje az ANA, amely az MG6-hoz kapcsolódik és ebből hasad ki a *C3a anafilatoxin*, a hasadás után ezt az N-terminális véget  $\alpha'$ NT-nek nevezik. Ebben a régióban négy savas jellegű aminosav oldallánc válik elérhetővé, mely a konvertáz kialakításában vesz részt, és a reguláló faktorok is ide kötődnek. Mivel ez a rész a natív C3-ban az ANA által védett állapotban van, a komplementregulátorok nem tudnak kötődni a teljes C3-hoz, illetve ugyanezért nem képes a natív C3 molekula konvertáz kialakítására sem. Ezután következik az MG6 domain  $\alpha$  lánc alkotta része, majd az MG7 és MG8. A soron következő CUB domén (CUB: Complement subcomponents C1r/C1s Uegf and Bone morphogenic protein-1) tartalmazza a majdani *iC3b* képződéskor kihaladó *C3f* fragmentumot. A molekula funkcionálisan fontos „lelkét”, vagyis a tioészter csoportot tartalmazó TED domain

következik ezután. Az  $\alpha$  lánc karboxi-terminális végén található a C345C domain, mely az MG7-tel képez molekulán belüli diszulfid-híd kötést.

A C3 aktivációjakor egymást követő proteolitikus hasítások konformáció változást eredményeznek. A TED doménben lévő tioészterkötés intaktságát a TED domén konformációja védi. Ezt a domént az MG2, MG8 és CUB domének tartják megfelelő helyzetben a natív molekulában. Első lépésben lehasad a 9 kDa tömegű C3a fragmentum, amely az MG8-on keresztül indirekt fejti ki hatását a TED doménre, ugyanis meggyengíti az utóbbi kettő kapcsolatát, ezáltal a TED domén elmozdulhat. Fontos megjegyezni, hogy a C3 spontán kismértékű hidrolíziséhez nem szükséges az ANA domén lehasítása. Az anafilatoxin képződésével egyidejűleg kialakul a 177 kDa-os C3b fragmentum és feltárul az eddig rejtett helyzetű, igen reaktív tioészter kötés, melyen keresztül a molekula az aktiváló felszínhez kovalensen képes kapcsolódni (ezen első hasítás után csak a C3 molekulák mintegy 10%-a kötődik az aktiváló felszínhez észter- vagy amid-kötés által, a maradék 90% vízzel reagálva *C3(H<sub>2</sub>O)-zé* alakul<sup>42</sup>). Első lépésben a tioészter tioláttá alakul (acilimidazol intermediert alkotnak olyan aminosavak, melyek a natív C3-ban messze találhatóak egymástól), mely hidroxil csoportokkal képes reagálni. A kovalens kötéshelyen kívül még a konformáció változás (a tioészter csoport 100Å-öt mozdul el az eredeti pozíciójához képest<sup>42</sup>) következtében létrejönnek olyan kötőfelszínek is a C3b molekulán, melyeken keresztül további funkciók valósulhatnak meg. A C3b aktiváló felszínhez való kötődése fontos választási pont. Amennyiben a C3b kialakítja a C5 konvertázt, akkor a kaszkád a MAC kialakulásához vezet. Abban az esetben viszont, ha az I faktor szolubilis vagy membránkötött kofaktorral újabb hasítást végez a C3b molekulán, kialakul az *iC3b* (inaktivált C3b), mely megváltoztatja a molekula funkcióit és a kaszkád továbbvitele lítikus irányba ekkor már nem lehetséges. Az *iC3b* kialakulásakor lehasad 2 kDa C3f fragmentum proteolízise két lépést igényel. Egy harmadik hasítási lépésben az *iC3b*-ből kihasad és a környezetbe diffundál a biológiailag inaktív, 135 kDa *C3c* fragmentum<sup>42</sup>. Ezt követően a célsejthez kötöttén a 40 kDa tömegű *C3dg* fragmentum marad, mely a teljes C3 molekulának már csupán 18%-át jelenti.

A C3 molekula hasadásakor bekövetkező változásokat térszerkezeti formában a 6. ábra mutatja be, mely Nishida munkája nyomán vált ismertté. A munkacsoport a C3 aktiválódását nukleofil támadással idézte elő, ez a támadó ágens lehet pl. víz, vagy metil-amin. A kölcsönhatás következtében egy konformációs intermedier jön

létre (az ábrán C3b\*-al jelölve), mely vagy visszaalakul natív C3-má vagy 1-3 óra alatt irreverzibilisen átalakul C3b-vé. A C3b-ből iC3b-vé történő átalakulás során a CUB domén flexibilis összekötő elemmé alakul a C3c és a TED (C3d) között.



6. ábra

















A C3 hasítási termékei és kapcsolódásuk az aktiváló felszínhez  
(Nishida, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2006)

## IV/2. Komplementreceptorok és regulátorok

A komplementrendszer aktivációja erőteljesen károsító anyagok felszabadulásához vezet, folyamatai pontos szabályozást igényelnek. Ezek a kontrolláló folyamatok az antigén felszínén történő aktiváció során nem jelentősek, viszont a spontán, oldatban történő aktiváció (nincs célpont) és a saját felszínén való aktiváció (rossz célpont) elkerülésében elengedhetetlenek. A szabályozás három szinten valósul meg: a lerakódott C3b és C4b fragmentumok inaktiválása proteolitikus hasítás révén (I faktor, CD46, CR1, H faktor és C4BP által); a C3 és C5 konvertázok szétszerelése CD55, CR1, H faktor és C4BP révén, valamint a terminális MAC gátlása CD59-en keresztül.

A komplementrendszer aktivációja során keletkező fragmentumok különféle receptorokhoz kapcsolódva számos sejt működését képesek befolyásolni. A komplement receptorokat és ezek főbb ligandumait mutatja be a 7. ábra. Ezek közül a *CR1* és *CR2* főleg B-limfocitákon expresszálódik, az előbbi a BCR-en keresztüli aktivációt negatívan, míg az utóbbi pozitívan befolyásolja. A *CR3* nagy mennyiségben fejeződik ki makrofágok, neutrofil granulociták, dendritikus sejtek felszínén, a *CR4* főleg dendritikus sejtekre jellemző. A *CR3* (CD11b/CD18) és *CR4* (CD11c/CD18) a  $\beta 2$  integrinek családjába tartozik, fő ligandumaik az iC3b, C3b, fibrinogén, ICAM-1, feladatuk a sejtek közötti adhézió biztosítása és az opsonizált partikulumok fagocitózisa. A *C3aR* és *C5aR* az anafilatoxikus hatása C3a és C5a peptidet kötésére képes 7 transzmembrán régiót tartalmazó receptor. Előbbiről kimutatták, hogy dendritikus sejtek kemotaxisában és aktivációjában játszik szerepet<sup>43,44</sup>, de az általunk is használt monocita eredetű dendritikus sejteken nem expresszálódik<sup>45</sup>.

A C3-receptorok mellett a C1q komponenst kötő C1qR jelenléte ismert dendritikus sejteken<sup>46</sup>, viszont a legújabban leírt Ig domén szerkezetű C1qR-t csak makrofágokon mutatták ki<sup>47</sup>.

<b>Elnevezés</b> (CD)	<b>Receptor család</b>	<b>Ligandum</b>
<b>CR1</b> (CD35)	 SCR-receptor	 C3b, C4b
<b>CR2</b> (CD21)	 SCR-receptor	 C3d
<b>CR3</b> (CD11b/CD18)	 $\beta$ 2-integrin	 iC3b
<b>CR4</b> (CD11c/CD18)	 $\beta$ 2-integrin	 iC3b
<b>C3aR</b>	 Rodopszinszerű receptor	 C3a
<b>C5aR</b> (CD88)	 Rodopszinszerű receptor	 C5a
<b>C1qR</b> CD91/CRT	 Ig-domén receptor	 C1q
<b>CRlg</b>	 Ig-domén receptor	 C3b, iC3b

**7. ábra**  
**Komplementreceptorok és elsődleges ligandumaik**

### IV/3. Immunfolyamatok szabályozása a komplementrendszer elemei által

Az a tény, hogy a komplementrendszer képes befolyásolni a humorális immunválaszt kb. 30 éve vált ismertté, miután felfedezték, hogy a cirkuláló B-sejtek, illetve folliculáris dendritikus sejtek (FDC-k) felszínén kötött C3 van<sup>48,49</sup>. Szintén ekkor következtek a komplement adaptív immunválasz kialakulásának szempontjából elengedhetetlen szerepére, miután kiderült, hogy csökkent szérum C3 szint esetén károsodott az ellenanyagválasz, és az izotípusváltás is elmarad<sup>50</sup>. A B-sejtek a CR1 és CR2 komplementreceptorokat hordozzák felszínükön, melyek ellentétes funkciót látnak el. Míg a CR2, melynek liganduma a C3d, csökkenti a B-sejt aktiváció küszöbértékét<sup>51</sup>, addig a CR1, melynek liganduma a C3b, gátolja a B-sejt receptor általi aktivációt<sup>52</sup>. A CR1 és CR2 receptorok megtalálhatóak a csíráközpont kialakításában szerepet játszó FDC-k felszínén is, melyek ezeken keresztül a B-sejteknek megkötik az antigént.

A komplementrendszer aktivációjának alapvető eseménye a C3b fragmentum idegen vagy saját felszínhez való kötődése, mely felfogható egyfajta jelölésként. A



C3 fontos szerepét a vírusok elleni immunválasz kialakulásában is kimutatták, már viszonylag korán. Egér modell rendszerben influenza ellenes immunválaszt vizsgálva bizonyították, hogy a C3 komponens mind a CD4+, mind a CD8+ T-limfociták aktiválásában fontos szerepet játszik<sup>53</sup>. Ebben az esetben a hatást nem a CR2 közvetíti, hanem feltételezhetően az antigén bemutatásakor, az APC-vel történő kölcsönhatást erősíti a C3-fragmentum.

Fontos megemlíteni a komplement aktiváció során keletkező C3a és C5a anafilatoxinok hatását is, melyek direkt aktiválhatnak bizonyos sejteket (pl. hízósejteket, granulocitákat) azok C3aR-án és C5aR-án keresztül, illetve más sejteknek a citokin tremelését befolyásolják ugyanezekhez a receptorokhoz kötődve<sup>54</sup>.

Több adat utal arra, hogy a terminális komponenseknek sem csak a célsejt lízisét kiváltó pórus formálásában van szerepük, hanem szublítikus mennyiségű C5b-9 komplex gyulladáskeltő hatást vált ki<sup>55,56</sup>.

Meg kell említeni, a sok aktivációt elősegítő funkció mellett a komplement komponensek legkorábban leírt szerepét; az idegen és apoptotikus saját struktúrák opsonizációját, ezáltal a fagocitózis hatékonyságának növelését<sup>57-59</sup>. Ezekben a folyamatokban főleg a C1q, az MBL és az iC3b játszanak szerepet.

A legújabb kutatások a komplement szabályozó receptorok immunválasz szabályozásában betöltött szerepével foglalkoznak. Például a CD46-ról regulátor fehérje esetében kimutatták, hogy az indukálható regulátor T-limfociták differenciálódásában is lehet szerepe<sup>60</sup>.

## Célkitűzések

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján felállítható hipotézis szerint, az antigénprezentáló sejtek (B-limfociták és makrofágok) funkcióit a felszínükön kovalensen megkötött C3 fragmentumok szabályozzák. A dendritikus sejtek egyedülálló képessége, hogy naív T-limfocitákat képesek aktiválni, különösen indokoltá teszi, hogy a C3 ezen sejtekre gyakorolt esetleges szabályozó hatását vizsgáljuk. Célkitűzéseink a következők voltak:

- ❖ Humán MDC-k C3 termelő képességének tisztázása. Az esetlegesen termelt C3 mennyiségének meghatározása a sejtek felülűszójából ELISA technikával. MDC és MM kokultúrákban a C3 depozíció vizsgálata az egyes sejtpopulációkon nyugvó és gyulladáshoz vezető körülmények között áramlási citofluorimetriával.
- ❖ A MM-ok által termelt C3 funkcionális vizsgálata birka VVS fagocitózis tesztben áramlási citofluorimetriával.
- ❖ Az MDC-k C3 kötésének vizsgálata tisztított C3-mal áramlási citofluorimetriával.
- ❖ A kovalensen kötődött C3 további sorsának nyomon követése áramlási citofluorimetriával és konfokális mikroszkópiával
- ❖ A kovalensen kötődött C3 MDC-k funkcióira gyakorolt hatásának vizsgálata
  - C3 kezelt MDC-k fenotípusának elemzése CD83, CD86, MHCII és MR expressziójuk meghatározásával.
  - C3 kezelt MDC-k T-sejtaktiváló képességének meghatározása a T-sejtek proliferációjának vizsgálatával
  - C3 kezelt MDC-k citokintermelésének meghatározása sejtfelülűszóból ELISA technikával.
- ❖ A CR3 és CR4 komplementreceptorok funkcionális vizsgálata MDC-ken
  - A CR3 és CR4 expressziójának és ligandumkötésének vizsgálata áramlási citofluorimetriával
  - A CR3/CR4 stimuláció MDC-k fenotípusára gyakorolt hatásának vizsgálata
  - A CR3/CR4 stimuláció MDC-k T-sejt aktivációs képességeire és citokin termelésére gyakorolt hatásának vizsgálata

## Felhasznált anyagok és módszerek

### I. Oldatok, pufferek, anyagok

*C3 tisztításhoz induló „A” puffer*

a táblázatban szereplő anyagok vizes oldata, pH 7,3

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3mM
EDTA	6,5mM
ε-amino-kapronsav	33mM
NaCl	50mM

*C3 tisztításhoz elúciós „B” puffer*

az „A” pufferrel megegyező, kivéve hogy 50mM helyett 1M NaCl-ot tartalmaz

*PBS (phosphate buffered saline, fiziológias foszfát puffer)*

a táblázatban szereplő anyagok vizes oldata, pH 7,4

NaCl	8g/l
KCl	0.2g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1.4g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g/l

*SDS-PAGE futató puffer*

a táblázatban szereplő anyagok oldata

Tris/HCl (0.5 M pH 6.8)	3g/l
10% SDS	10ml/l
glicin	14,4g/l

*Western-blot puffer*

Megegyezik az SDS-PAGE futatópufferrel, de nem tartalmaz SDS-t

*SDS-PAGE redukáló 5x töménységű mintapuffer*

Tris/HCl (0.5 M pH 6.8)	1ml
10% SDS	1,6ml
glicerol	800µl
brómfenolkék	200µl
2-merkaptoetanol	

*Comassie Brilliant Blue festék differenciáló oldata*

ecetsav	70ml
metanol	250ml
desztillált víz	680ml

*A Comassie Brilliant Blue festék 0,25% festék a differenciáló oldatban*

*TBS 10x töménységű törzsoldat*

A táblázatban szereplő anyagok oldata 11-re

Tris	24,2g
NaCl	80,0g

*FACS puffer*

1% FCS és 0,1% Na-azid tartalmú PBS

*permeabilizáló FACS puffer*

1% FCS, 0,1% Na-azid és 0,2% szaponin tartalmú PBS

### TMB előhívó oldat ELISA-hoz

A táblázatban felsorolt anyagok táblázatban megadott arányú oldata

0,1 M Na-acetát pH 5,5	10ml
TMB	100µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20µl

### Anyagok

anyag neve	gyártó
CellGro szérumentes DC médium	CellGenix
Ficoll-Paque	Amersham
siRNS puffer	Qiagen
elektroporációs puffer	Biorad
polietilén-glikol (PEG)	Sigma
szója tripszin inhibitor (SBTI)	Fluka
jód-acetamid (IAM)	Sigma
fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF)	Sigma
nitro-fenil-guanidino-benzol (NPGB)	Sigma
ε-amino-kapronsav	Sigma
előre festett protein standard SDS-PAGE-hoz	Fermentas
rekombináns humán IL-4 (rhu IL-4)	PromoKine
rekombináns humán GM-CSF (rhuGM-CSF)	Novartis
metil-amin (MA)	Sigma
iC3b	Merck
szaponin	Fluka
karboxifluoreszcein-szukcinimid-észter (CFSE)	MolecularProbes
FITC-dextrán	Sigma
forbol-mirisztát-acetát (PMA)	Sigma
E-coli lipopoliszacharid (LPS)	Sigma

## Ellenanyagok

specifitás	származás	gyártó
a-hu-C3-HRPO	kecske	Cappel
a-hu-C3 F(ab) <sub>2</sub>	kecske	Cappel
a-hu-CD14-APC	egér	BD
a-hu-CD83	egér	Serotec
a-hu-CD86-biotin	egér	BD
a-hu-CD80-biotin	egér	BD
a-hu-MHCII-FITC	egér	BD
a-hu-MR-PE	egér	Immunotech
a-hu-CD40-biotin	egér	Serotec
a-mo-Alexa488	kecske	MolecularProbes
a-hu-CD11b-RPE	egér	Dako
a-hu-CD11c-Alexa647	egér	Serotec
a-hu-CD11b (TMG6-5)	egér	Dr. Andó István ajándéka
a-hu-iC3b	egér	Quidel
a-hu-C3c-FITC	nyúl	Dako
a-hu-LAMP1-PE	egér	Santa Cruz

## II. Módszerek

### *Intakt C3 tisztítása friss humán savóból*

A tisztított, intakt C3-at anioncserélő kromatográfiával nyerjük Basta és Hammer<sup>61</sup>. módszere szerint, frissen lefagyasztott és  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tárolt kevert humán savóból (KHS), melyet 50-100 egészséges véradó donor savójának egybegyűjtésével készítünk.

1 ml friss normál humán savóhoz 0,15g PEG<sub>3350</sub>-et, 0,2g SBTI-t, 0,2g IAM-ot, 10 $\mu$ l 200mM PMSF-et, 10 $\mu$ l 2,5mM NPGB-t adunk és fél órát inkubáljuk  $4^{\circ}\text{C}$ -n állandó keverés közben. A PEG kisózza a C3-at és más fehérjéket, utóbbiak proteázgátlók. Ezután  $4^{\circ}\text{C}$ -n 15 percig 15000g-n centrifugáljuk. A felüliszót elöntjük, a csapadékot 1 ml hideg „A” pufferben feloldjuk, és újra fél órát kevertetjük  $4^{\circ}\text{C}$ -n. Újra 15 percig centrifugáljuk 15000g-vel  $4^{\circ}\text{C}$ -n, hogy az esetleges szennyeződésekeltávolítsuk. 0,22 $\mu\text{m}$ -es szűrőn átszűrjük a mintát, mielőtt az oszlopra visszük.

A kisózott fehérjéket FPLC (fast protein liquid chromatography, Pharmacia) rendszerrel MonoQ HR 5/50 (Pharmacia-Amersham) anion cserélő oszlopon szeparáljuk. Minden puffert gáztalanítva, szobahőmérsékleten használunk a szeparáláshoz. A gép beállítási paraméterei: 0,5 ml/perc áramlási sebesség, 2cm/ml írási sebesség, 280nm detektálási hullámhossz.

Az oszlopot először ekvilibrálnuk 5ml „A”, 10 ml „B”, majd újra 5ml „A” pufferrel. A mintát felvisszük az oszlopra, és a nem kötődő fehérjéket lemoszuk 30 ml „A” pufferrel. Ezután emelkedő sógradienssel eluáljuk a kötődő fehérjéket, a C3 kb. 18% NaCl-nál eluálható az oszlopról.

0,5ml-es frakciókat szedünk, és tisztaságukat 7,5%-os poliakrilamid gélelektroforézissel, illetve Western blotlal ellenőrizzük. A preparátumok endotoxin tartalmát Limulus-teszt (Cambrex) segítségével határoztuk meg, ami <0,1EU/ml koncentráció volt, tehát endotoxin szennyeződés mentesnek tekinthető. A C3 molekula intaktságát hemolitikus teszttel igazoltuk. A tisztított C3-at PBS-el dializáljuk, sterilre szűrés után felhasználásig -70°C-on tároljuk.

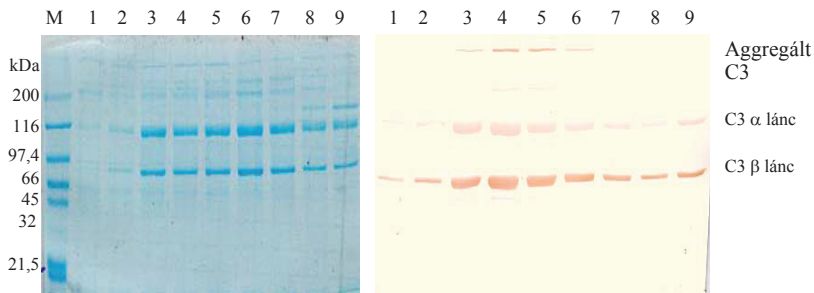
#### *SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot*

Az anion cserélő oszlopról eluált C3 frakciók tisztaságát és a bekonzentrált, steril, használatra kész C3 tisztaságát és intaktságát SDS-PAGE és Western blot módszerrel vizsgáljuk (8. ábra).

A C3-at 7,5%-os poliakrilamid gélben futtatjuk. A mintákat redukáló mintapufferben visszük fel a gélzsebekbe. Az elektroforézist BioRad Protean IV készülékben végezzük, 100V feszültséggel. Futtatás után a gélben a fehérjéket Comassie Brilliant Blue festékkel tesszük láthatóvá.

Western blot esetén a megfuttatott gélből a fehérjéket azonnal átblottoljuk nitrocellulóz membránra (Biorad) 200mA áramerősséggel 90 perc alatt. A membránt ezután 5% sovány tejpor tartalmú TBS-sel 1 órán át szobahőn blokkoljuk, majd anti-humán-C3-HRPO (Cappel) ellenanyaggal jelöljük. Az előhívást kemilumineszcencia módszerrel végezzük ECL oldattal (Pierce).

A fehérje frakciók molekulatömegét Fermentas mólsúly standard futtatásával határozzuk meg.



**8. ábra**  
**Egy reprezentatív C3 preparálás SDS-PAGE gélképe (bal) és**  
**Western-blotja (jobb)**

#### *NHS és C3 metilamin kezelése*

A C3 molekula kovalens kötődése különböző felszínekhez, az intakt C3 molekulában rejtett helyzetű, igen reaktív tioészter kötésen keresztül történik. Ezt a csoportot MA oldatos kezeléssel reakcióképtelenné tehetjük, így a metilammal kezelt C3 kovalens módon nem, csak receptoron keresztüli képes kötődni a továbbiakban.

A MA 67,5%-os vizes oldatából 100ml humán savóhoz 1ml-t adunk (C3 esetén a koncentrációnak megfelelő arányban), és 37°C-n 2,5 órán át inkubáljuk. Ezután háromszor, 12 órán át dializáljuk PBS-sel szemben, mert a metilamin erősen toxikus.

#### *Monocita eredetű dendritikus sejtek (MDC) és makrofágok (MM) előállítás*

A monocitákat egészséges véradó donoroktól származó buffy-coatból nyertük Freundlich módszere szerint szeparálva<sup>62</sup>:

A buffy coatot Falcon csövekbe töltjük, és fékezés nélkül, 18°C-n 1400rpm-en 12 percig centrifugáljuk. A legfelül található plazmát leszívjuk a perifériás mononukleáris sejtek (PMNS) határrétegéig és 4°C-n tartjuk felhasználásig. A PMNS határréteget összegyűjtjük, negyed térfogatnyi PBS-sel hígítjuk, és óvatosan



15 ml Ficoll-Paque (Amersham) oldatra 25 ml vért rétegezzünk. Fégezés nélkül 40 percig centrifugáljuk 18°C-n, majd a Ficoll tetejéről összegyűjtjük a PMNS-t. Ez a monocitákon kívül tartalmazza még a limfocitákat is. Ezekből a sejtektől a monocitákat adherenciára való képességük alapján választjuk el a következők szerint:

A PMNS-t háromszor mossuk PBS-sel, a mosások közötti centrifugálások: 4°C, 1400 rpm, 10 perc. A harmadik mosás után a sejteket 50 ml hideg, 1 ml humán savóval kiegészített CellGro DC médiumban alaposan felfuszpendáljuk. A PBMC szuszpenziót 5 db, előzőleg 2%-os zselatin filmmel fedett, majd a donor autológ plazmájával fél óráig inkubált Petri csészére tesszük és 37°C-os termosztátban 45 percig inkubáljuk. A monociták kitapadását mikroszkóppal ellenőrizzük. A nem kitapadt sejteket 37°C-os médiummal történő négy-ötzöri lemosással eltávolítjuk.

Az adherens sejteket 6mM EDTA tartalmú, PBS-sel kétszeresére hígított médiumban inkubáljuk 5-10 percig 37°C-os CO<sub>2</sub> termosztátban. Mikroszkópban ellenőrizzük, hogy a sejtek elváltak-e az aljzattól. Ezután a Petrikről a monocitákat Falcon csöbe gyűjtjük és 2-3-szor mossuk médiummal. A mosások közötti centrifugálások: 1200rpm, 10 perc, 4°C.

A monociták tisztaságát áramlási citofluorimetriás méréssel ellenőrizzük CD14 pozitivitásuk alapján. A preparátumban a limfocita szennyezés mértékét CD19 (B-sejt) és CD3 (T-sejt) markerek mérésével határozzuk meg. A T-limfocita szennyezést minden esetben 10%-nál kevesebbnek találtuk. A monocitákat 10<sup>6</sup>sejt/ml koncentrációban, 40 ng/ml rhuGM-CSF és 1000U/ml rhuIL-4 jelenlétében 5 nap alatt éretlen MDC-kké (imMDC) differenciáltatjuk Romani és Sallusto módszere alapján<sup>63,64</sup>. A differenciáltatás során a citokineket (GM-CSF és IL-4) 2 naponta pótoljuk. Monocita eredetű makrofágok (MM) differenciáltatásához a monocitákat 10<sup>6</sup>sejt/ml koncentrációban 40ng/ml rhuGM-CSF jelenlétében tenyésztjük szintén 5 napig. A MM-okat esetenként 20ng/ml PMA-val aktiváltuk.

A differenciáltatások sikerességét áramlási citofluorimetriával követjük nyomon, az imMDCK jellemzői sejtfelszíni molekuláinak mennyiségi meghatározásával: CD14-, CD83-, CD86<sup>lo</sup>. A MMk jellemzői membránfehérjéi: CD14+ és MHCII+.

### *Áramlási citofluorimetria*

Az áramlási citofluorimetriás méréseket mind Beckton Dickinson FACS Calibur citofluoriméteren CellQuest Pro software alkalmazásával végezzük. Az adatokat FCSExpress software-rel értékeljük ki.

A sejtek jelölésére a táblázatban felsorolt ellenanyagokat használjuk, a gyártó által javasolt koncentrációban. A jelölendő sejteket FACS pufferrel mossuk, majd sötétben, jégen jelöljük 20 percig az adott ellenanyaggal, ezután újra mossuk FACS pufferrel. Intracelluláris jelölés esetén a sejteket első lépésben 2% formaldehid tartalmú FACS pufferrel 10 percig szobahőn fixáljuk, majd ezt követően 0,2% szaponin tartalmú FACS pufferrel permeabilizáljuk. Ezután a jelölés az előbb leírtak szerint zajlik, de végig szaponinos FACS pufferben dolgozunk. A mérések kiértékelése során a statisztikai számításokhoz az adott fluoreszcens csatornában mért jel intenzitásának középértékeit hasonlítottuk össze az egyes mintákban (MFI-mean fluorescence intensity)

### *Konfokális lézerpásztaó mikroszkópia*

A konfokális mikroszkópos méréseket Olympus IX81 mikroszkóppal végeztük Fluowiev500 software alkalmazásával. A minták előkészítése megegyezik az áramlási citofluorimetria előkészítésével. Az alkalmazott ellenanyagok szintén megtalálhatók a táblázatban. A képeket 60x nagyítású objektívvel, plusz digitális nagyítással készítettük.

### *C3 kötődés vizsgálata imMDCk felszínéhez*

Az 5 napos imMDC-ket  $10^6$  sejt/ml koncentrációban kezeljük fél óráig  $37^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben intakt C3-al, az eredmények fejezetben megadott koncentrációkban, 10x hígított KHS-sel, MA-C3-al vagy MA-KHS-sel. A kezelés médiumban történik Eppendorf csövekben. A fél óra letelte után a sejteket 3x mossuk médiummal, hogy a nem kötődő fehérjéket eltávolítsuk. Ezután a sejteket az áramlási citofluorimetria részben leírtak szerint jelöljük. A sejtek által esetlegesen expresszált vagy szekretált proteázgátlók szerepét vizsgáltuk olyan kötődési kísérletekben, ahol az imMDC-ket először 1 órán át kezeltük  $37^{\circ}\text{C}$ -n 1mM PMSF-el PBS-ben, majd 3x kimostuk a

proteázgátlót, majd közvetlenül ezután végeztük a C3 kezelést és vizsgáltuk annak kötődését. Ez a PMSF koncentráció ilyen körülmények között nem károsítja a sejteket. Azokban a kísérletekben, amelyekben a CR3 szerepét vizsgáltuk a C3 sejt felszíni megkötésében, szintén előkezeltük a sejteket. Ebben az esetben a TMG6–5 CD11b (Dr. Andó István ajándéka, SZBK) ligandumkötőhely specifikus ellenanyaggal 100µg/ml koncentrációban jégen inkubáltuk a sejteket, hogy a receptor esetleges internalizálódását megakadályozzuk, és kötőképességét blokkoljuk. Háromszori mosás után C3 kezelést alkalmaztunk, majd vizsgáltuk a fehérje kötődését a sejtekhez.

#### *imMDC-k kezelése*

A C3 kezelés hatásának vizsgálata során tanulmányoztuk a MDCK fenotípusára és különböző funkcióira (T-sejt aktiválás, citokin termelés) gyakorolt hatást. Ehhez az 5 napos imMDC-ket különböző módokon kezeltük, majd további 2 napig tenyésztettük őket és a 7. napon végeztük a fenotípus és funkciók vizsgálatát. Éretlen DC kontrollként („negatív kontroll”) a sejtek nem kaptak semmilyen kezelést, így imMDC fenotípusúak és funkciójuk maradtak. Érett DC kontrollokat („pozitív kontroll”) 100ng/ml LPS kezeléssel állítottunk elő, ezeket maMDC jelöli a továbbiakban. Kétféle C3 kezelést alkalmaztunk. Egyrészt natív C3 kezelés jelöléssel a sejteket a „C3 kötődés vizsgálata” részben fentebb leírtaknak megfelelően kezeltük Eppendorf csőben, majd visszatettük a kultúrába. Ebben az esetben a C3 a MDC-k számára intakt módon hozzáférhető, így lehetőségük van azt a felszínükön kovalensen megkötni, ezen felül még CR3 és CR4 komplementreceptoraiokon keresztül is megköthetik az esetlegesen kialakult C3-fragmentumokat. Immobilizált C3 kezelésként jelöljük azokat a mintákat, ahol a C3-mal a sejtenyésztő edényt előinkubáltuk. Ebben az esetben az edényt inkubáltuk az adott koncentrációjú C3-mal 1 órát 37°C-on, majd lemostuk a nem kötődő fehérjéket, és erre a felszínre tettünk az egyébként kezeletlen imMDC-ket. Ebben az esetben a sejtek csak komplementreceptoraiakkal képesek a C3-at megkötni, mivel annak kovalens kötésért felelős tioészter-csoportja már reagált a műanyag felszínnel. A natív és az immobilizált C3-mal való kezelés közti lényeges különbség, hogy míg az első esetben van lehetőség a C3 sejtekhez való kovalens kötődésére, addig a második

esetben nincs. A komplementreceptor közvetített hatás mindkét esetben megvalósulhat.

#### *MDC-k allogén T-sejt aktiváló képességének meghatározása*

A T-sejtek osztódását áramlási citofluorimetriás mérésel határoztuk meg. Az allogén eredetű T-limfocitákat 0,5 $\mu$ M CFSE-vel töltöttük fel a gyártó utasításainak megfelelően, mely a sejtekbe jutva erős fluoreszcenciát mutat 480nm-es hullámhosszon. Ezután a különbözőképpen kezelt MDC-eket és a T-limfocitákat U aljú 96 lyukú sejtenyészítő lemezen inkubáltuk 4 napig az előkísérletekben optimálisnak talált MDC:T-sejt arányban, mely 1:10. A 4 nap letelte után áramlási citofluorimetriával határoztuk meg az osztódó T-sejtek számát, melyekben a festék kihígult.

#### *Citokin mérése ELISA módszerrel sejtenyészlet felülúszóból*

A különbözőképpen kezelt MDC-k által termelt citokinek mennyiségét szendvics ELISA-val határoztuk meg. A sejtekről a kezelés után – az előkísérletekben optimálisnak talált – 24 órával vettünk felülúszót, és határoztuk meg belőle a sejtek által termelt TNF- $\alpha$ , IL-6 illetve IL-8 koncentrációját. A TNF- $\alpha$  és az IL-6 esetében az R&D Systems duoset rendszerét alkalmaztuk, míg az IL-8 mennyiségét a BenderMedsystems Instant ELISA kitjével állapítottuk meg.

#### *MDC-k és MM-k C3 termelésének meghatározása*

A különböző sejtek által termelt C3 mennyiségét ELISA-val határoztuk meg. Ehhez kecske-anti-human-C3 F(ab')<sub>2</sub> ellenanyag-fragmentummal fedtük a mikrotitráló lemezt, majd erre tettük a sejtek felülúszóját, ezután pedig anti-human-C3-HRPO ellenanyaggal (kecske IgG) és TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peroxidáz szubsztráttal detektáltuk a C3 jelet. Standardként ismert koncentrációjú tisztított humán C3-at használtunk.

## *MDC – MM kokultúrák*

Azonos donorból differenciáltatott 5 napos MM-kat és MDC-eket tettünk közös kultúrába 24 órára, majd vizsgáltuk a sejtfelszínükön található C3 mennyiségét áramlási citofluorimetriával.

## *Birka vörös véresejt (BVVS) fagocitózis*

Birka vörös véresejteket feltöltöttünk 5 $\mu$ M CFSE-vel, majd inkubáltunk PMA-val aktivált (opszonizált BVVS) illetve inaktivált MM-k (BVVS) jelenlétében egy éjszakán át, Heidolph Titramax 100 rázógépen keverve, annak érdekében, hogy a BVVS makrofágok általi fagocitózist elkerüljük. Ezután a BVVS-eket az azonos donorból származó MDC-khez adva vizsgáltuk a fagocitózis mértékét áramlási citofluorimetriával. Az MDC-k által bekebelezett BVVS-ek fluoreszcens jelét detektáltuk, a csak sejtfelszínen megkötött BVVS-ek fluoreszcenciáját tripánkék oldattal kioltottuk.

## *CR3 expresszió csökkentése RNS silencing technikával*

Az MDC-k által expresszált CR3 komplementreceptor mennyiségét CD11b specifikus siRNS-ek bejuttatásával csökkentettük. Ehhez a Quiagen predesigned ITGAM\_5 siRNS-t használtuk.

Szekvenciája: Sense: CCGCCAUCAUCUACGGAAAdTdT, Antisense: UUCCGUAAGAUGAUGGCGGdCdA. Negatív kontrollként Qiagen AllStar negative control siRNS-t használtunk, mely semmilyen humán mRNS-t nem ismer fel. Szekvenciája szintén megtalálható a gyártó honlapján ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) A sejtekbe az RNS-t Steinkasserer módszerével jutattuk be<sup>65</sup>, módosításként a transzfekcióhoz Biorad Transfection buffert használtunk. A sejteket 2x transzfektáltuk a differenciáltatás során az optimális hatás eléréséhez, először a frissen izolált monocitákat 20 $\mu$ g siRNS-sel, majd a differenciáltatás második napján újra 20 $\mu$ g siRNS-sel. A receptor expresszió csenyesítésének sikerességét áramlási citofluorimetriával ellenőriztük.

*C3 tartalmú nanopartikulumok kimutatása natív C3 kezelt MDC-k felülűszójából*

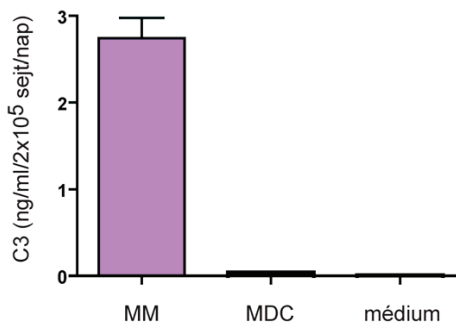
A natív C3 kezelés után a MDC-eket különböző ideig inkubáltuk friss médiumban, a felülűszót ultracentrifugálással ülepitettük, és C3 tartalmát ELISA módszerrel mértük Papp Krisztián módszere szerint<sup>69</sup>.

# EREDMÉNYEK

## I. C3 kötődése dendritikus sejtekhez

### I/1. Humán MDC-k nem termelnek C3-at

Az irodalom nem egységes a dendritikus sejtek C3 termelő képességét illetően, ezért fontosnak tartottuk első lépésben ezt tisztázni kísérleti rendszerünkben. Egér csontvelői DC-k irodalmi adatok alapján képesek C3-at termelni<sup>44,66</sup>, humán DC-k esetében viszont ezt csak mRNS szinten mutatták ki, a szekretált fehérjét nem vizsgálták<sup>67</sup>. Makrofágokról mindkét fajban egyértelműen elfogadott, hogy termelnek C3-at<sup>40</sup>, ezért egyazon donorból MM-ot és MDC-et differenciáltattunk, és a sejtek felülúsójának C3 tartalmát vizsgáltuk a differenciáció során. Eredményeink alapján emberi MDC-k nem termelnek C3-at, a mért mennyiség a sejteket nem tartalmazó médium kontrollal azonos, ezzel ellentétben a MM-k nagy mennyiségben szekretálnak C3-t:  $2 \times 10^5$  MM  $2,74 \pm 0,17$  ng/ml C3-at termel naponta (9. ábra).



9. ábra

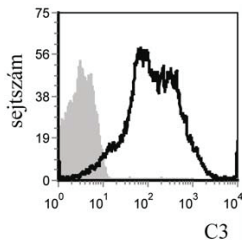
*Humán MM-ok és MDC-k C3 termelése*

*5 független kísérletből számolt átlag és szórása*

## I/2. A makrofágok által termelt C3 funkcionális vizsgálata

A C3 komplementfehérje elsődleges funkciója a különféle antigének, patogének opsonizációja, és ezáltal azok fagocitózisának elősegítése. Mi ezen funkció vizsgálatával jellemeztük a makrofágok által termelt C3 aktivitását, illetve a következő részben leírt MM-MDC kokultúra kísérletünkben a fiziológias körülményekhez közeli szituációt reprezentáltunk.

Rendszerünkben birka vörösvérsejteket opsonizáltattunk PMA-val aktivált MM-ok jelenlétében, majd áramlási citofluorimetriával ellenőriztük a C3 fragmentumok deposícióját (10. ábra). Ehhez poliklonális nyúl anti-C3c-FITC ellenanyagot használtunk, negatív kontrollként az antitest nem opsonizált BVVS-ekhez való kötődését ábrázoltuk.



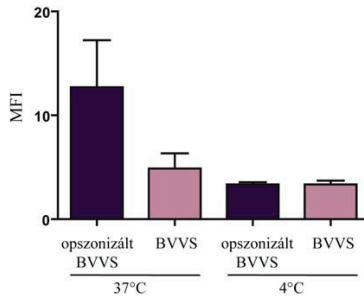
**10. ábra**

***C3 deposíció kimutatása anti-C3c-FITC-el az aktivált MM-ok által opsonizált BVVS-eken***

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 3 független kísérletből*

Következő kísérletünkben fluoreszcens festékkel feltöltött BVVS-eket opsonizáltattunk ugyanilyen módon az aktivált MM-okkal, majd ezeket ugyanazon donorból differenciáltott MDC-khez adtuk. A fagocitózis mértékét áramlási citofluorimetriával határoztuk meg. A 11. ábrán látható, hogy a MM-ok által opsonizált BVVS-eket jóval hatékonyabban veszik fel az MDC-k, mint a nem opsonizáltakat. Abszolút kontrollként a sejtek 4°C-n történő fagocitózisát mértük.





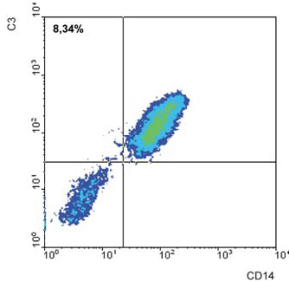
11. ábra

**MDC-k BVVS fagocitózisa**

5 független kísérletből számított átlag és szórása

**I/3. MDC-k képesek az aktivált MM-ok által termelt C3-at felszínükön fixálni**

Régóta ismert, hogy makrofágok az általuk termelt C3-at a felszínükön képesek kovalens módon megkötni. Mivel *in vivo* makrofágok és dendritikus sejtek a szervezetben egymás környezetében találhatóak, kíváncsiak voltunk, hogy ezt a helyzetet modellezve, a C3 kötés az egyes sejtípusok által hogyan valósul meg. Azonos donortól származó MM-okat és MDC-eket közös kultúrába tettünk 24 órára. Ebben a rendszerben, figyelembe véve, hogy a DC-k C3 termelését korábbi kísérletünkben kizártuk, a C3 csak a MM-októl származhat. Kétféle beállítást használtunk; egyrészt „nyugvó” makrofágokat és MDC-eket tenyésztettünk együtt, másrészt egy gyulladós helyzetet modellezve aktivált (PMA-kezelt) makrofágokkal inkubáltuk együtt a MDC-eket. A 24 óra elteltével a kokultúra sejteinek felszínén fixált C3-at áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk. A MDC-eket és MM-okat CD14 marker használatával különítettük el, ezt ugyanis a szakirodalom szerint csak az utóbbiak expresszálják felszínükön, viszont az MDC-k nem. (Az irodalmi adatokkal egyező saját kísérleti eredményünket itt nem mutatjuk be.) A 12. ábrán a nyugvó körülmények között megfigyelhető állapot látható. A CD14<sup>+</sup> makrofágok az irodalmi adatoknak megfelelően hordoznak C3-at a felszínükön, míg a CD14<sup>-</sup> MDC-k nem.

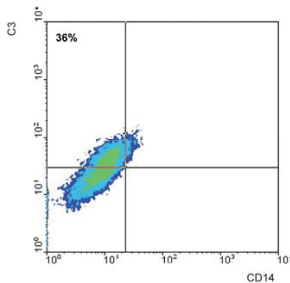


**12. ábra**

***C3 detektálása MDC/nyugvó MM kokultúrában  
(MDC: CD14-, MM: CD14+)***

*Egy reprezentatív mérés eredménye 5 független kísérletből, a CD14- C3+ populáció aránya 8,34%*

A 13. ábrán az aktivációs stimulust kapott makrofág hatását láthatjuk. Az aktiváció megnöveli a MM-ok C3 termelését, és ebben az esetben látható, hogy a komplementfehérje megjelenik a MDC-k felszínéhez kötötten is. A dot-ploton láthatóan hiányzik a CD14+ makrofág populáció. Ezek a sejtek aktiváció hatására erősen kitapadnak a tenyésztőedény aljához, így a mintákba a citofluorimetriás mérés előkészítése során ezek a kitapadt sejtek bele sem kerülnek.

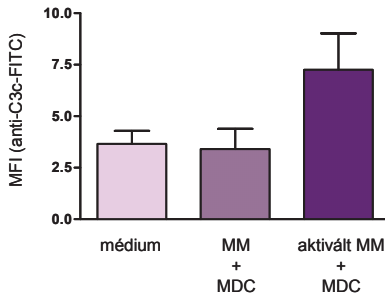


**13. ábra**

***C3 detektálása MDC aktivált MM kokultúrában  
(MDC: CD14-, MM: CD14+)***

*Egy reprezentatív mérés eredménye 5 független kísérletből, a CD14- C3+ populáció aránya 36%*

A 14. ábrán a fenti kísérletek eredménye látható összesítve, itt a CD14- MDC sejtpopuláción mérhető C3 kötődés van megadva MFI értékben. Kontrollként a makrofágok nélkül, csak médiumban inkubált MDC-khez aspecifikusan kötődő C3 detektáló ellenanyag MFI értékeit tüntettük fel.



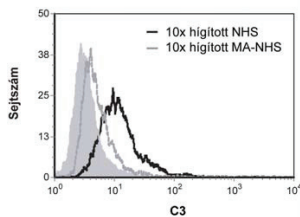
**14. ábra**

*MDC-k csak az aktivált makrofágok által termelt C3-at fixálják  
5 független kísérletből számított átlag és szórása*

#### I/4. C3 komplementfehérje MDC-khez való kötődésének *in vitro* vizsgálata

Miután tisztáztuk, hogy MDC-k képesek a C3-at felszínükön megkötni, kíváncsiak voltunk a fixálás módjára is. A MDC-k a CR3 és CR4 komplementreceptorokat fejezik ki felszínükön és ezeken keresztül elsősorban iC3b fragmentumokat képesek megkötni, nagyságrendekkel kisebb mértékben C3b-t is. Makrofágokról régóra ismert, hogy a felszínükön kovalensen képesek fixálni a C3-at. Ezt kutatócsoportunk is kimutatta, továbbá azt is, hogy ez a jelenség a szintén hivatásos APC-nek számító B-sejteknél is megfigyelhető<sup>68,69</sup>. Ezen adatok ismeretében adódott a kérdés, hogy a dendritikus sejtek is ilyen módon kötik-e felszínükön a C3 fragmentumokat? A kétféle – receptor mediált és kovalens – kötődés lehetőségét többféle kísérletben vizsgáltuk.

Elsőként normál humán szérumot (NHS) használtunk komplement forrásként és a C3 depozíciót áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk. A 15. ábrán látható, hogy a savókezelés hatására jelentős mennyiségű C3 fragmentum kötődött a sejtek felszínéhez. Abban az esetben, ha MA-kezelt NHS-t alkalmaztunk, vagyis megakadályoztuk a C3b kovalens kötődését; akkor kötődést alig detektáltunk.



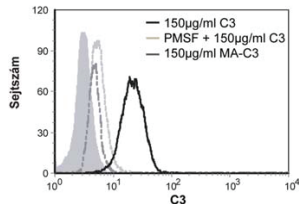
15. ábra

#### *C3 kötődése MDC-khez NHS és MA-NHS forrásból*

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

Mivel a C3 egyes aktivációs termékei, fragmentumai ellen megbízható specifikus ellenanyagok nem elérhetőek, így csak megközelítőleg tudjuk megmondani, mely fragmentum található a sejtek felszínén. A detektáláshoz használt ellenanyag a C3c fragmentumot ismeri fel, de a teljes, intakt molekulán belül is. Mivel ez a fragmentum szolubilis, így azt biztosan állíthatjuk, hogy a kötődő

fragmentum egy előző hasítási termék, tehát vagy C3b, vagy iC3b. A szérumból mért kötődésnél, bár a C3-at a leginkább „fiziológiás” formájában használjuk, nem zárhatjuk ki a jelenlevő teljes, ép komplementrendszer részvételét a depozíció létrejöttében, így a kötődést ellenőriztük tisztított C3-at alkalmazva is. A 16. ábrán látható, hogy a tisztított C3 is erősen kötődik a sejtekhez. Ebben az esetben nem kerülnek kívülről proteázok a rendszerbe, amelyek a C3 aktivációját, ezáltal kovalens kötődését okozhatják, így feltételezhető, hogy a MDC-k termelnek vagy expresszálnak felszínükön proteázokat, melyek a C3-at hasítják, és ezáltal lehetővé teszik, hogy az kovalensen a sejt felszínéhez kötődjön, ezt további kísérletekben vizsgáltuk. Ehhez proteázgátlóval (PMSF) inkubáltuk a sejteket a natív C3 kezelés előtt<sup>70</sup>. A C3 jel ekkor erőteljesen csökkent, így bizonyítottuk, hogy a sejt proteázai teszik lehetővé a kovalens kapcsolódást (16. ábra).



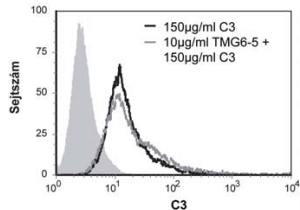
**16. ábra**

***C3 kötődése MDC-khez, és annak változása PMSF proteázgátló előkezelést követően, illetve MA-C3 forrásból***

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

A CR3 és CR4 komplementreceptorok nagymértékben hasonlítanak egymáshoz, ligandumspecifitásuk is átfedő, főképpen iC3b-t és kis mértékben C3b-t kötnek. Megvizsgáltuk, hogy a két receptor mennyire vesz részt a C3 sejtfelszíni fixálásában, ezért teszteltük a metil-amin (MA) kezelt NHS és C3 kötődését. A MA tönkreteszi a C3 tioészter kötését, és az intakt molekulát a C3a anafilatoxin lehasítása nélkül C3b szerkezetűvé alakítja át<sup>42</sup>. A 17. ábrán látszik, hogy a MA-NHS-ből származó MA-C3 alig kötődik a sejtekhez, ugyanez látszik, amikor tisztított formában alkalmazzuk a MA-C3-at (17. ábra). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a natív C3 kötődése valószínűleg nem, vagy legfeljebb nagyon kis mértékben tulajdonítható a receptoroknak. A CR3 szerepét a komplement fragmentum megkötésében még egy módon kizártuk, mivel rendelkezésünkre állt egy a CR3  $\alpha$

láncának ligandumkötőhelyére specifikus TMG6-5 (Dr. Andó István ajándéka) monoklonális ellenanyag. Ezzel előinkubáltuk a sejteket a natív C3 kezelés előtt, így blokkoltuk a receptort. A C3 jelben nem tapasztaltunk csökkenést, így ez a kísérlet is alátámasztja a kovalens kötődést.

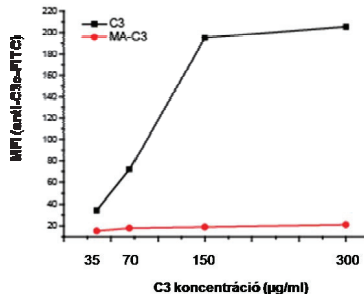


17. ábra

**C3 kötődése MDC-khez TMG6-5-tel történő CR3 blokkolást követően**

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

Megvizsgáltuk a sejtek C3 kötését emelkedő dózisu C3 és MA-C3 kezeléseket alkalmazva is. Látható, hogy a C3 dóziszfüggő módon kötődik a sejtek felszínéhez, míg a MA-C3 depozíciója még magas dózisos mellett is nagyon kismértékű. Ezen mérés alapján választottuk ki az optimális 150 µg/ml koncentrációjú C3 kezelést, amit a további kísérleteinkben alkalmaztunk (18. ábra).



18. ábra

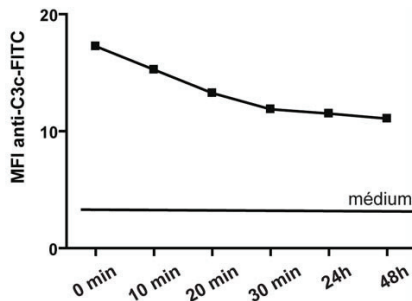
**C3 és MA-C3 dóziszfüggő kötődése MDC-khez**

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

## I/5. A MDC-k felszínéhez kötődött C3 fragmentumok sorsa

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a makrofágok és B-sejtek a kovalens módon fixált C3-at exosomák formájában leadják környezetükbe<sup>69</sup>. Az exosomák 50-100 nm nagyságú vezikulumok, melyek feltételezhetően a sejtek közötti kommunikációban töltenek be szerepet. Ezek alapján mi is megvizsgáltuk, mi történik a MDC-k felszínén kötött C3-mal.

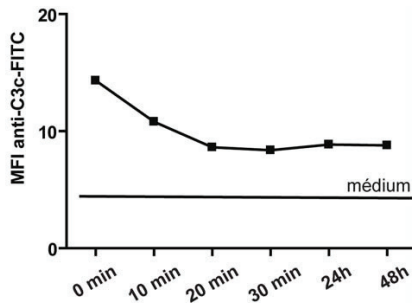
A sejteket natív C3 kezelés után különböző ideig inkubáltuk 37°C-n, majd egyik esetben a felszínen maradt komplementfehérjét mutattuk ki (19. ábra), másik esetben pedig a sejteken és sejtekben lévő együttesen (20. ábra), ezek után a mintákat áramlási citofluorimetriával elemeztük. Kontrollnak tekintettük a C3 nélkül, csak médiumban inkubált MDC-ken mért háttér jelet. A 20. ábrán látható, hogy a kovalensen kötődött C3 bekerül a MDC-kbe. Mivel a teljes C3-at mérő kísérlet esetében is tapasztalható egy kezdeti jelcsökkenés, ez azt jelentheti, hogy a fehérje részben lebomlik a sejten. Ezt erősítik konfokális mikroszkópiás vizsgálataink is (lásd később). Rendkívül érdekes, hogy még a C3 kezelést követően 2 nappal is mérhető mennyiségű C3 található a sejtek felszínén. Ennek szerepét a későbbiekben vizsgáltuk.



19. ábra

*Extracelluláris C3mennyisége C3 kezelést követően MDC-ken*

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*



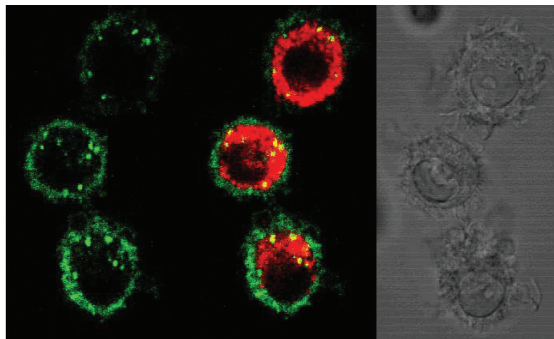
20. ábra

**Extra- és intracelluláris C3 mennyisége C3 kezelt MDC-ken**

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

Az internalizációs kísérlet alapján kiválasztott C3 kezelés utáni harmincadik percben megvizsgáltuk a sejteket konfokális mikroszkóppal (21. ábra). A detergenssel feltárt mintákban jelöltük a C3-at (anti-humán C3c-FITC, zöld) és a lizoszómákat (anti-humán LAMP1-PE, piros). A C3 erős jelölődést mutat mind a sejtek felszínén, mind a sejtek belsejében. A felszínen hozzávetőlegesen egyenletes jelölődést tapasztaltunk, viszont a sejtekben láthatóan vezikulumokban gyűlik össze a komplementfehérje. Ezek a vezikulumok kisebb részben lizoszóma asszociáltak (sárga), nagyobb részük viszont nem az (zöld). Annak megállapítása, hogy a kétféle vezikuláris felhalmozódás hogyan és miért különül el, és milyen tényezők határozzák meg irányításukat, további vizsgálatokat igényel.





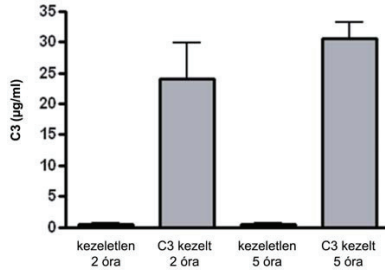
**21. ábra**

***C3 internalizációja MDC-k által,***

***Konfokális mikroszkópos felvétel***

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

Ezen kísérleti eredményeink szerint a C3, a makrofágokhoz és a B-sejtekhez hasonló módon, kapcsolódik az MDC-k felszínéhez. Mivel korábbi vizsgálatok kiderítették, hogy a kovalensen megkötött C3b megjelenik makrofágok és B-sejtek által termelt exosomák felszínén, ezért megvizsgáltuk, hogy C3 kezelést követően az MDC eredetű exosomákon kimutatható-e C3. Ehhez a natív C3 kezelés után a sejteket különböző ideig inkubáltuk, a felülúszót ultracentrifugálással ülepítettük, és C3 tartalmát ELISA módszerrel mértük<sup>69</sup>. Az 22. ábrán látható, hogy a C3 kezelt MDC-k által termelt nanopartikulumokon megjelenik a C3 molekula. Annak bizonyítása, hogy a kapott jel valóban exosomákon jelenlévő C3-tól származik, további kísérleteket igényel, ezen jelenleg Paréj Katalin dolgozik.



**22. ábra**

*A MDC-k felszínéhez kötődő C3 megjelenik a sejtek által termelt nanopartikulumok felszínén  
3 független kísérlet átlaga és szórása*

## II. A C3 hatása MDC-k fenotípusára

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján, a C1q komplementfehérje erősen befolyásolja a MDC-k fenotípusát, így érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a kötődött C3 fragmentumok gyakorolnak-e bármilyen hatást a MDC-k fenotípusára és/vagy funkcióikra. A fenotípusos változások az 1. táblázatban láthatóak összefoglalva. A megadott eredmények; az egyes sejtfelszíni markerek citofluorimetriával mért átlagértékei és szórásaik 5 független kísérlet alapján számolva. Negatív kontrollként imMDC-ket használtunk, melyek a CD83 érési markert és a CD80 és CD86 kostimulátor molekulákat alacsonyan expresszálják. MHCII már ezeken a sejteken is nagy mennyiségben jelen van, MR szintén, ez utóbbi az imMDC-k antigén felvevő funkciójával van összhangban. Pozitív kontrolljaink az LPS jelenlétében teljesen éretté vált maMDC-k voltak. Ezeken a sejteken a CD83, CD80, CD86 és MHCII sejtfelszíni mennyisége szignifikánsan megnövekszik az imMDC-khez képest, míg a MR mennyisége szintén szignifikáns módon csökken. Ezek a változások jelzik az érett DC-k antigénprezentáló funkciójának aktiválódását is. A C3 hatását kétféle beállításban vizsgáltuk; alkalmaztunk egyrészt natív C3 kezelést, amely esetben a kovalens kötődésre lehetőség van, míg a másik beállításban C3-mal fedett sejtenyészttő lemezen inkubáltuk a MDC-ket. A táblázat adataiból látható, hogy csak a natív C3 kezelés okoz változást a MDC-k fenotípusában: a CD83, CD86 és MHCII molekulák expressziója szignifikánsan fokozódik. Meg kell említeni, hogy az expresszió emelkedése egyik marker esetében sem éri el az LPS-sel stimulált maMDC-két, illetve hogy a CD80 és MR molekulákra a kezelés nem volt hatással. Az immobilizált C3 felszínen tenyésztett MDC-k fenotípusában semmilyen változást nem tudtunk detektálni.

A natív C3 kezelés tehát a MDC-k fenotípusát az érett DC-kre jellemző irányba mozdítja el, de nem minden molekulára fejt ki hatását, és nem mondhatjuk a kialakult MDC-kre hogy egyértelműen érett fenotípusúak lennének.

	<i>imMDC</i>	<i>maMDC</i>	<i>natív C3 kezelt MDC</i>	<i>immobilizált C3-on tenyésztett MDC</i>
<b>CD83</b>	5.79 +/- 0.35	13.34 +/- 2.21 ***	7.38 +/- 0.41 **	4.57 +/- 0.71
<b>CD80</b>	5.28 +/- 1.18	8.07 +/- 0.79 *	6.44 +/- 0.75	4.61 +/- 0.89
<b>CD86</b>	10.08 +/- 1.46	30.88 +/- 6.35 ***	25.98 +/- 2.01 ***	9.1 +/- 2.00
<b>MHCH</b>	89.30 +/- 25.42	142.34 +/- 20.1 *	137.21 +/- 11.3 *	95.42 +/- 13.5
<b>MR</b>	25.49 +/- 4.98	15.81 +/- 1.87 *	22.49 +/- 4.4	29.68 +/- 0.99

### ***1. táblázat***

#### ***MDC-k egyes markereinek expressziós változása C3 kezelés hatására***

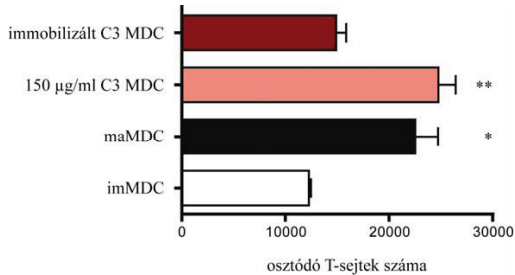
*3 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével*

*szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$*

### III. A C3 szerepe MDC-k és T-sejtek kapcsolatában

#### III/1. C3 kezelt MDC-k hatása allogén T-sejtek osztódására

A dendritikus sejtek legfontosabb funkciója a naív T-limfociták aktiválása, és egyéb T-sejtes immunválaszok irányítása. A C3 részvétele ezen folyamatokban egyre intenzívebben kutatott téma és az irodalmi adatok alapján elengedhetetlen szerepet játszik az immunválasz kialakításában. Elsőként megvizsgáltuk, hogy a fenotípusos változásokat kiváltó kezelések hogyan hatnak a MDC-k T-sejt aktiváló képességére. Natív és immobilizált C3 kezelt MDC-kból és allogén T-sejtekből kokultúrákat készítettünk az Anyag és módszer fejezetben leírt módon. Előző adatainkkal összhangban, a 23. ábrán látható, hogy a natív C3-mal kezelt MDC-k hatékony aktivátorai a T-sejteknek, fokozzák azok osztódásának. Érdemes megemlíteni, hogy ez a fokozó hatás eléri, sőt, sok esetben meg is haladja az LPS jelenlétében teljesen éretté vált maMDC-k által kiváltott T-sejt proliferáció mértékét. Ez azért meglepő, mert a natív C3 kezelés a T-sejt aktivációban szerepet játszó molekulák (pl. CD80, CD86, MHCII) expresszióját nem emelte az LPS kezelt maMDC-k esetében mért szintre, így azt várhatnánk, hogy T-sejt stimuláló képességük is el fog maradni azokétól. Az ellentmondást feloldhatja az a megfigyelésünk, hogy, bár a proliferációs vizsgálat összeállításakor a natív C3 kezelt MDC-k már 48 órával a kezelés után vannak, de még ekkor is hordoznak felszínükön C3 fragmentumokat. Ezen fragmentumok szerepét a sejtek közötti kölcsönhatásban a következő kísérleteinkben vizsgáltuk meg.



**23. ábra**

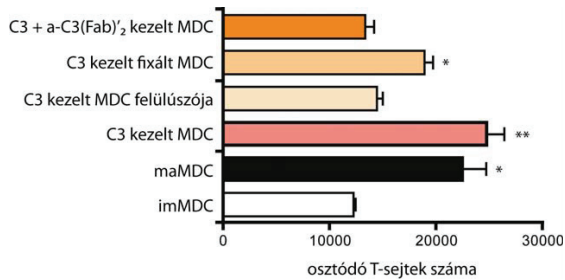
***Natív és immobilizált C3 jelenlétében tenyésztett MDC-k allogén T-sejt stimuláló képessége***

*3 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével*

*szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$*

Egyre több adat utal arra, hogy a T-sejteken is található különböző komplementreceptorok (pl. CR1, CR3, CD46), így a C3 ezekhez kapcsolódva közvetíthet további jeleket a T-limfociták felé<sup>71</sup>. Azt, hogy a MDC-k felszínén jelenlévő komplement protein közvetlenül vesz részt a T-sejtekkel való kölcsönhatás kialakításában, több módon is bizonyítottuk. A mérések eredménye az 24. ábrán látható. Kontroll kísérletet végeztünk annak eldöntésére, hogy esetleg a natív C3 kezelt MDC-k valamilyen szolubilis faktor (pl. citokinek, stb.) révén aktiválnák a limfocitákat. A C3-al kezelt MDC-k felülúszóját imMDC-khez adva nem fokozódott az imMDC-k T-sejt stimuláló képessége, így ezt a lehetőséget kizártuk. További kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a C3 kezelés után még 48 órával is jelenlévő C3 fragmentumok milyen szerepet töltenek be a fokozott T-sejt osztódás kiváltásában. Ehhez a MDC-eket fixáltuk a C3 kezelés után azonnal, így tehát felszínükön nagy mennyiségű komplement fehérjét hordoztak, viszont a kostimulátor molekulák aktiváló hatása itt nem érvényesülhetett. A fixált sejteken a komplementfehérje fragmentumok jelenlétét citofluorimetriásan ellenőriztük. Eredményeink alapján az ilyen módon fixált MDC-k szignifikánsan fokozták a T-sejtek proliferációját az imMDC-khez képest. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az MDC-ken fixált C3 által a T-limfociták felé közvetített jel rendkívül erős és valószínűleg eddig fel nem tárt hatásmechanizmussal rendelkezik. Végül, bizonyítottuk azt is, hogy a C3-fragmentum váltja ki a DC-k funkcionális megváltozását, ugyanis ha egyidejűleg a

C3 kezeléssel, anti-C3 F(ab')<sub>2</sub> ellenanyag-fragmentumok hozzáadásával blokkoljuk a C3-közvetített aktivációt (így a C3-at a MDC-k nem képesek megkötni), a tapasztalt stimuláló hatás elmaradt. Összefoglalva, a C3 kezelés hatásáról a DC-k T-sejt stimuláló funkciójára elmondhatjuk, hogy azt a hatást, amit a natív C3 kezel MDC-k kostimulátor molekula expresszió fokozódásuk révén kiváltani képesek, nagymértékben túllépi maga a C3-fragmentum sejtkölcsönhatást közvetítő működése, mintegy újabb kostimulátor szerepet betöltve.



24. ábra

***A natív C3-mal történő különböző kezelések hatása az MDC-k által kiváltott allogén T-sejt osztódására***

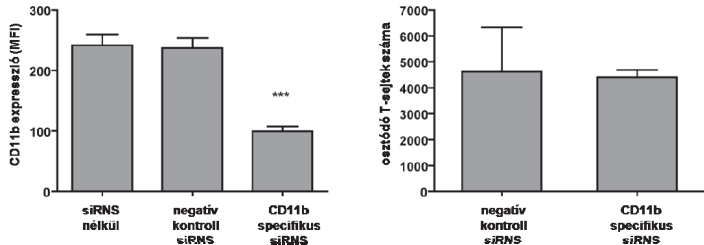
*3 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével*

*szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$*

**III/2. A CR3 szerepe a natív C3 kezelt MDC-k allogén T-sejt aktivációjában**

A dendritikus sejtek legfontosabb komplementreceptora a CR3 (CD11b/CD18), melynek a szakirodalomban leginkább tolerogén funkciót tulajdonít. Ennek ellenére a receptor részvételét a kovalensen kötött C3 általi jelátvitelben szeretnénk volna kizárni. Ezekben a kísérleteinkben RNS silencing technikával csökkentettük a CD11b, ezáltal a CR3 mennyiségét az MDC-k sejtfelszínén (25. ábra bal oldal). A negatív kontroll siRNS láthatóan nem befolyásolja a receptor expressziójának mértékét. Ezután a kontroll, és a csökkent CR3-at hordozó imMDC-kezteltük natív C3-mal, majd mértük az általuk kiváltott allogén T-sejt osztódás mértékét. A 25. ábrán látható, hogy a szignifikánsan kevesebb CR3-at expresszáló sejtek natív C3-mal kezelve ugyanolyan hatékony aktivátorai az allogén T-sejteknek,

mint a kontroll, vagyis CR3-at normál mennyiségben kifejező, natív C3 kezelt MDC-k (25. ábra jobb oldal).



25. ábra

*A CD11b expressziójának szignifikáns csökkentése RNS silencing technikával (bal oldal)*

*Különböző mennyiségű CR3-at hordozó, natív C3-mal kezelt MDC-k által kiváltott allogenT-sejt stimuláció*

*3 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével*

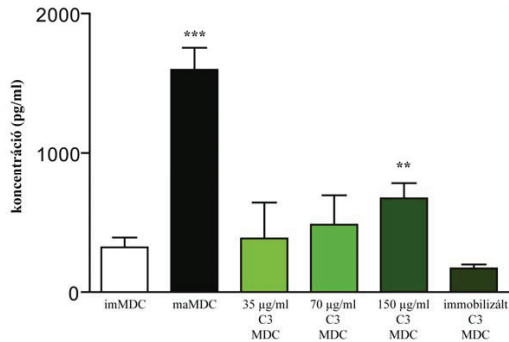
*szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$*

### III/3. A C3 hatása MDC-k gyulladási citokin termelésére

A dendritikus sejtek fontos funkciója, hogy nem csak a T-limfociták osztódását képesek kiváltani, hanem különféle citokinek révén differenciációjukat is befolyásolják. Mivel eredményeink alapján a natív C3 kezelés erősen fokozta a MDC-k T-sejt stimuló képességét, kíváncsiak voltunk, hogy az ehhez kapcsolódó citokin termelésükre van-e bármilyen hatással.

Elsőként a gyulladás korai szakaszában és  $T_H1$  irányú polarizációban fontos IL-6 és TNF- $\alpha$  mennyiségét vizsgáltuk. A natív C3 kezelés mindkét citokin szekrécióját dóziszfüggő módon fokozta. Már alacsonyabb C3 koncentrációk esetén is emelkedett a két interleukin szekréciója, 150  $\mu\text{g/ml}$  C3 esetén pedig mindkét citokin szekréciója szignifikánsan különbözött az imMDC-khez képest. Abban az esetben, ha immobilizált C3 jelenlétében tartottuk a sejteket, semmilyen változást nem tapasztaltunk (26. és 27. ábra).



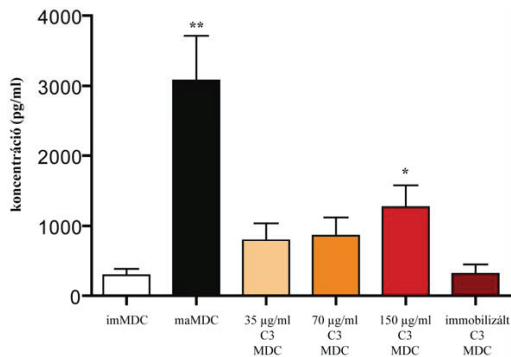


**26. ábra**

**Natív C3 kezelés hatása MDC-k IL-6 termelésére**

5 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével

szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$



**27. ábra**

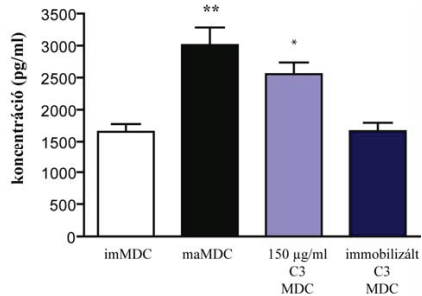
**Natív C3 kezelés hatása MDC-k TNF-α termelésére**

5 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével

szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$

A gyulladásos folyamatokat szabályozó citokinek sorában meghatározó szerepet játszik az IL-8 citokin. Erős kemotaktikus hatása miatt a gyulladás helyszínére toboroz sokféle immunsejtet (pl. neutrofil granulociták). A 28. ábrán

bemutatott eredményeink szerint a natív C3 kezelés szignifikánsan fokozta a MDC-k IL-8 szekréciónak, az immobilizált C3-on történő tenyésztés viszont ez esetben sem volt semmilyen hatással a sejtekre.



**28. ábra**

***Natív C3 kezelés hatása MDC-k IL-8 termelésére***

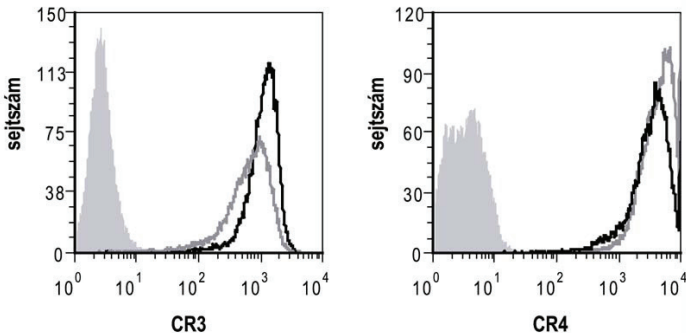
*5 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével*

*szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$*

## IV. Komplementreceptorok funkciójának vizsgálata MDC-ken

### IV/1. A receptorok ligandumkötő képességének vizsgálata

A C3 különféle sejtek felszínéhez történő kovalens kötődési képessége régóta ismert, viszont a sejt felszíni struktúra, mely ezt közvetíti nem azonosított. A MDC-k felszínéhez kovalensen kötődött C3 fragmentumok az előzőekben bemutatott kísérleteink alapján aktiváló hatással rendelkeznek. Ehhez a leginkább feltételezhető partnerek a DC-k felszínén jelen levő CR3 és CR4 komplementreceptorok lehetnek (29. ábra), melyek a  $\beta 2$  integrinek családjába tartoznak. Az integrinek működéséről ismert, hogy nyugvó állapotban inaktív konformációt vesznek fel, melyet egy máshonnan érkező jel lendít át aktív, ligandumkötésre képes állapotba (inside-out signaling)<sup>72</sup>.



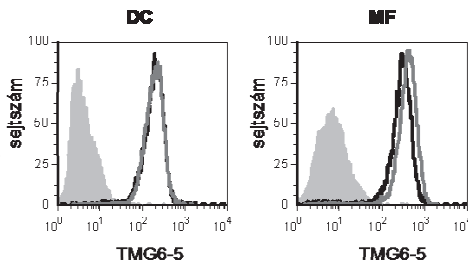
29. ábra

*CR3 és CR4 expresszió imMDC-ken (fekete hisztogram) és maMDC-ken (szürke hisztogram)*

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

Ezen jellemzők miatt fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy az integrinek milyen konformációs állapotban találhatóak a sejtek felszínén. Irodalmi adatok

alapján  $Mg^{++}$  hozzáadásával aktív térszerkezeti állapotba hozhatók az ilyen típusú receptorok<sup>105</sup>, így első lépésben ezzel a módszerrel vizsgáltuk a MDC-eket. Ezen mérésünk során is a TMG6-5 ellenanyagot használtuk fel, mely a CR3 ligandumkötőhelyére specifikus, így feltételezhetően, ha a receptor aktiválható a  $Mg^{++}$  ionnal, akkor az ellenanyag kötődése is fokozódik. A 30. ábrán látható, hogy a  $Mg^{++}$  előkezelés nem növelte a CR3 jelet (MFI értékek: 181,68 és 179,45), tehát valószínűsíthető, hogy a receptor konstitutív módon aktív formában van jelen a MDC-k felszínén. Megvizsgáltuk MM-ok esetében is a CR3 receptort, esetükben érdekes módon a  $Mg^{++}$  előkezeléssel kis mértékben növelni tudtuk a TMG6-5 kötődését (MFI értékek: 263,93 és 378,64) (30. ábra).



30. ábra

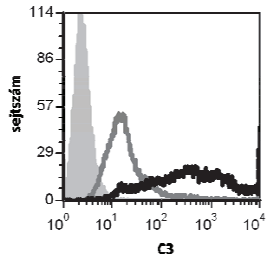
***$Mg^{++}$  hatása a CR3 ligandumkötőhely specifikus TMG6-5 monoklonális ellenanyag kapcsolódására MDC-ken és MM-kon***

*A fekete hisztogramok az ellenanyag alap kötődését mutatják, a szürke hisztogramok az 5mM  $Mg^{++}$ -al való aktiválás utáni kötődést*

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 3 független kísérletből*

Következő kísérleteinkben a két receptor legfontosabb, közös természetes ligandumának, az iC3b-nek a kötődését is tanulmányoztuk. Mivel ez a fiziológiás liganduma a CR3-nak és CR4-nek, az ezzel végzett kísérletek sokkal informatívabbak a receptorok fiziológiás funkcióját illetően. Erőteljes iC3b jelet kaptunk a sejteken, így ezen vizsgálat alapján is elmondható, hogy a receptorok aktívak a MDC-k felszínén (31. ábra). Szembetűnő, mind az áramlási citofluorimetriás adatok, mind a mikroszkópos képek esetében, hogy ugyanolyan koncentrációjú iC3b (fekete vonal) mennyivel erősebben kötődik a sejtekhez, mint a

natív C3 (szürke vonal). Ez is utal a kétféle kötődés jellegének drasztikus különbségére.



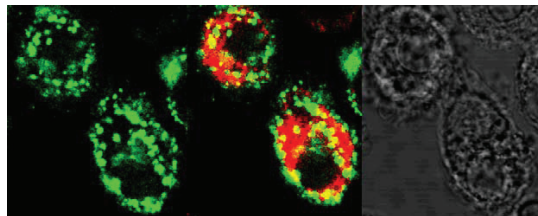
**31. ábra**

***Natív C3 és iC3b kötődése MDC-khez***

*A fekete histogram az iC3b kötődését mutatja, a szürke histogram az azonos koncentrációjú natív C3 kötődését.*

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 3 független kísérletből*

A MDC-ket 30 perccel az iC3b kezelést követően konfokális mikroszkóppal is megvizsgáltuk, ugyanúgy, mint a natív C3 kezelt sejtek esetében (I/5. Fejezet). A detergenssel feltárt mintákban jelöltük a C3-at (zöld) és a lizoszómákat (piros). A 32. ábrán látható sejtek nagy mennyiségű iC3b tartalmú vezikulumot internalizáltak, melyek ugyanúgy, mint a kovalensen kötött C3 esetében, részben lizoszóma asszociáltak. Az iC3b kezelés esetén mindkét receptort célozzuk, így ha a CR3 és CR4 eltérő transzport folyamatokat indukál, előfordulhat, hogy a bekebelezett iC3b-t más-más útra irányítják.



**32. ábra**

***Az iC3b kötődése és internalizációja MDC-ken, konfokális mikroszkópos vizsgálat***

*Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből*

## IV/2. A CR3 és CR4 receptorok funkcionális vizsgálata

A korábban felvetett kérdésünk tisztázására, miszerint a CR3 és CR4 receptorok közvetítenek-e a kovalensen kötődött C3-hoz hasonló stimulust, elvégeztük a funkcionális tesztek iC3b kezelés esetén is. Eredményeink alapján az iC3b kezelés nem változtatja meg az MDC-k funkcióját szignifikánsan az imMDC-khez képest. Mivel ebben az esetben a két receptort egyszerre stimuláljuk, így nem tudunk különbséget tenni külön a CR3-ra és CR4-re vonatkozó funkciókat illetően. A receptorok elkülönített vizsgálatát ellenanyaggal történő stimulációval végeztük első lépésben. Ehhez a CR3 esetén a ligandumkötőhely specifikus TMG6-5, a CR4 esetében pedig egy anti-CD11c ellenanyagot használtunk, kontrollként megfelelő izotípusú ellenanyaggal történő kezelést alkalmaztunk. A 2. táblázatban látható, hogy egyik, a komplementreceptorokat célzó kezelés sem hatott a sejtek fenotípusára. Az MHCII, MR és CD40 szintje is csak az LPS jelenlétében teljesen éretté vált maMDC-k esetén változott szignifikáns mértékben az imMDC-khez képest.

	<i>imMDC</i>	<i>maMDC</i>	<i>izotípus kontroll</i>	<i>CD11b</i>	<i>CD11c</i>	<i>iC3b</i>
<b>MHCII</b>	293.95 +/- 61.08	456.61 +/- 51.35 *	317.46 +/- 34.53	265.65 +/- 61.2	346.47 +/- 37.79	288.73 +/- 40.23
<b>MR</b>	44.97 +/- 2.87	32.26 +/- 1.6 **	44.57 +/- 3.83	45.02 +/- 5.11	40.76 +/- 10.16	45.84 +/- 3.46
<b>CD40</b>	204.42 +/- 14.18	294.42 +/- 24.84 *	217.42 +/- 15.79	236.45 +/- 23.18	230.53 +/- 17	224.6 +/- 18.61

### 2. táblázat

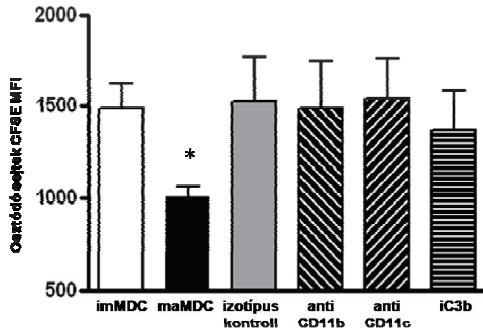
#### *MDC-k egyes markereinek változása különböző CR3 és CR4 stimuláció hatására*

*3 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével*

*szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$*

Ugyanilyen eredményre jutottunk a CR3, illetve CR4 stimulált MDC-k T-sejt aktiváló képességét és citokin termelését vizsgálva. A 33. ábrán a fluoreszcens festékekkel feltöltött allogén T-limfociták proliferációját láthatjuk. Az osztódáskor

megfeleződik a limfocitákban a festék, így a MFI érték csökkenése fokozottabb proliferációt jelent. Egyedül az iC3b kezelés okozott kis mértékű emelkedést a MDC-k T-sejt stimuláló képességében, de ez nem volt szignifikáns.



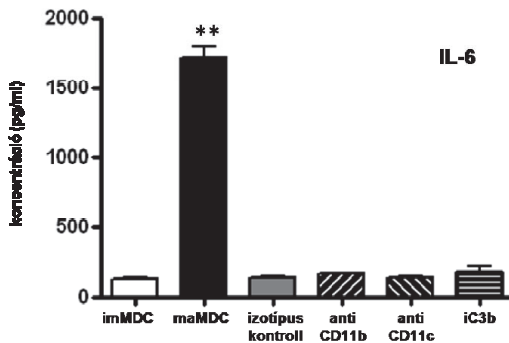
33. ábra

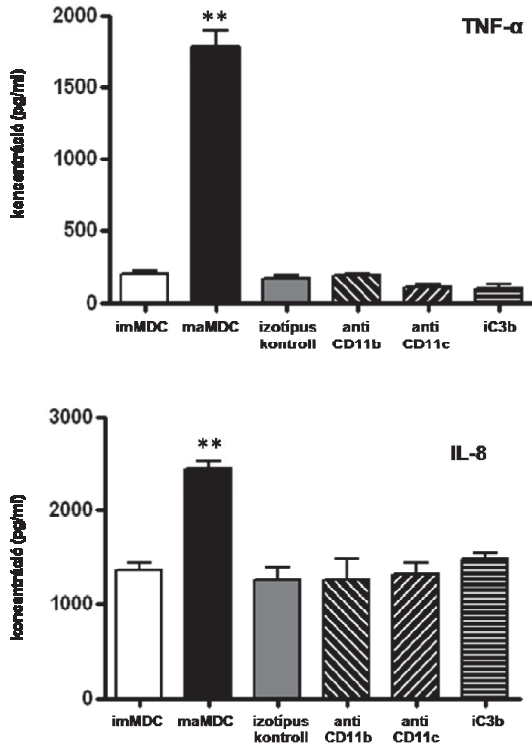
**CR3- és CR4- stimulált MDC-k allogén T-sejt aktiváló képessége**

3 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével

szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$

Megvizsgáltuk ugyanezen kezelések hatását az MDC-k felülúszójából mért IL-6, TNF- $\alpha$  és IL-8 termelésére is, de ezekben az esetekben sem találtunk szignifikáns eltérést (34. ábra).





34. ábra

CR3- és CR4- stimulált MDC-k IL-6, TNF- $\alpha$  és IL-8 citokin termelése  
 3 független kísérletből számolt átlagértékek a szórások feltüntetésével  
 szignifikanciák: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$



## DISZKUSSZIÓ

Napjainkban már nem kérdéses, hogy a komplementrendszer egyes elemei képesek befolyásolni különböző immunsejtek funkcióit, ezáltal az immunválaszt. Legkorábban ezt B-sejtek esetében ismerték fel<sup>48,50,73,74</sup>, majd később nyilvánvalóvá vált, hogy T-sejtek primer és szekunder aktivációjában is elengedhetetlen a szerepe<sup>53</sup>. A C3 humorális immunválaszban betöltött funkciója két mechanizmussal magyarázható: C3 hiányában, egyrészt, a CR1 és CR2 komplementreceptorok által közvetített jelek szűnnek meg, melyek a B-sejtek aktivációja szempontjából meghatározóak, másrészt, a FDC-eken való antigén megtartás is károsodik, így a stimulált B-limfociták differenciációja sem normális mértékű. T-sejtek esetén a CR1 és CR2 receptorok manipulálásával nem tudták a C3 deficienciához hasonló károsodásokat előidézni, így valószínűsíthető volt, hogy a C3 hiánya a két limfocita típusra másképpen hat. C3 nélkül az APC-k antigénfelvétele nem optimális mértékű, C3a és C5a fragmentumok sem képződnek és ezek hiányában közvetve okoznak elégtelen T-sejt aktivációt<sup>54</sup>. A komplementrendszer T-sejtek aktivációjában betöltött pontos szerepét csak pár éve kezdték vizsgálni<sup>71</sup>.

Fontos immunfolyamatok, úgymint az antigén felismerése, bemutatása és az immunválasz indukciója olyan környezetben zajlik, ahol a szérumban komplementfehérjék nincsenek jelen. Ez a tény rávilágít a szövetekben lokálisan termelt komplementkomponensek fontosságára<sup>40,75</sup>. Sokféle sejt képes komplementelemek szintézisére. A C3 esetében a fő lokális forrást a makrofágok jelentik<sup>37,40</sup>, de neutrofil granulociták is termelhetnek C3-at bizonyos stimulusokra<sup>76</sup>. Az szakirodalom abban nem egységes, hogy a dendritikus sejtek vajon képesek-e C3, illetve más komplementfehérje bioszintézisére. Az erre vonatkozó vizsgálatok főleg microarray technikával, illetve a különféle komplementkomponensek mRNS-ek kimutatásával történt. Kooten és munkatársai C1q, C2, C5 és D-faktor gének expresszióját azonosították, de vizsgálataik szerint a C3 gén nem aktív humán MDC-k esetén<sup>77</sup>. Reis e Sousa csoportja mRNS szinten vizsgálta a komplementfehérjék expresszióját humán MDC-kben. A C3, C5, C9, H faktor, I faktor, B faktor és properdin mRNS jelenlétét mutatták ki, bár ezek közül csak a C5, H faktor, B faktor és properdin mRNS mennyisége meggyőző<sup>67,77</sup>. Szükséges megemlíteni, hogy az *in vitro* differenciált MDC-k médiumát több munkacsoport – így az előbb említett

is –, szérummal egészíti ki, ennek köszönhetően, valamennyi komplementfehérje jelen van a tápközegben<sup>44,66,67</sup>. Továbbá, nem szérummentes körülmények között számban lehetnek jelen a GM-CSF hatására differenciálódó makrofágok, amelyek komplementfehérje szintézise befolyásolhatja az előbbi kísérleti eredményeket. Mi, kísérleti rendszerünkben a sejteket szérum-mentes médiumban tartottuk, így a közeg komplementfehérjei nem befolyásolhatták eredményeinket. Az MDC-k C3 szekrécióját vizsgálva megállapítottuk, hogy a humán MDC-k nem szekretálnak C3-at, míg az *in vitro* előállított MM-ok – összhangban mások eredményeivel –, igen. Ezt követően beállítottunk egy kísérleti rendszert, melyben a fiziológiához hasonló szituációt modelleztünk, hiszen a szövetekben makrofágok és dendritikus sejtek egymás közvetlen környezetében fordulnak elő. Mivel kísérleteinket és a sejtek tenyésztését végig szérum-mentes médiumban végeztük, így esetünkben a C3 forrást csak a MM-ok jelenthették. Eredményeink szerint a dendritikus sejtek képesek az aktivált makrofágok által termelt C3-at felszínükön megkötni. A makrofágok aktivációja, C3 termelésüket fokozza a nyugalmi állapothoz képest. Ezt azért fontos hangsúlyozni, mert további kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy míg nyugalmi állapotban a DC-k C3 kötése csekély, addig az aktivált MM-ból származó nagy mennyiségű C3 kötődése a DC-khez azokban gyulladáshoz irányuló funkcionális változásokat idéz elő. Ha ez a C3 koncentrációja által megvalósuló „szabályozás” nem működne, az az immunhomeosztázis kisiklásához vezethetne. Eredményeink tükrében valószínű, hogy a C3 koncentrációjának meg kell haladnia egy kritikus küszöbértéket bizonyos folyamatok, így a dendritikus sejtek aktivációjának a bekapcsolásához.

A C3 molekula bizonyos immunsejtekhez való kovalens kötődése régóta ismert. Kutatócsoportunk az 1980-as évek elején leírta, hogy a B-sejtek 57%-a kötött C3-at hordoz, míg nyugvó T-sejtek nem<sup>78</sup>. ConA-val történő stimuláció hatására T-limfociták is képessé válhatnak a C3 fixálására<sup>79</sup>, mivel aktivált sejteken megnő bizonyos proteázok expressziója<sup>80-82</sup>. Az aktivált C3b elméletileg bármilyen nukleofil csoporthoz képes kapcsolódni, ehhez képest meglepő módon a C3-nak a sejtek felszínén jelenlevő kovalens kötő struktúrái telíthetőek<sup>78</sup>. Kísérleteinkben ugyanezen eredményekre jutottunk DC-k esetében. Sejtjeink a natív, tisztított C3-at dózisfüggő módon, és bizonyítottan kovalensen fixálják felszínükön. A csak komplementreceptorokhoz kötődni képes MA-C3 esetében semmilyen koncentrációnál nem kaptunk jelentős kötődést. Ellenőriztük a CR3-on keresztüli

kötődést lehetőségét egy további kísérletben is. Az ezen receptor ligandumkötőhelyére specifikus monoklonális ellenanyaggal inkubáltuk a sejteket a natív C3 kezelés előtt, de a C3 depozícióját a sejteken nem sikerült visszaszorítani, így ezzel a módszerrel is alátámasztottuk a C3 kovalens fixálását. A felszínhez kapcsolódó C3 fragmentumok mennyiségét erősen vissza tudtuk szorítani, ha a natív C3 kezelés előtt a sejteket szerin-észteráz gátlóval inkubáltuk, ami arra utal, hogy a fehérje aktiválásban, a kovalens kötődés létrejöttében a sejtek által termelt proteázoknak van elsősorban szerepük. Érdekes megemlíteni, hogy az irodalmi adatok alapján a dendritikus sejtek expresszálhatják az alternatív út elindulásában szerepet játszó B faktor, D faktor és properdin molekulákat, ami szintén magyarázhatja a DC-k által saját felszínükön indukált C3 aktivációt<sup>67,77</sup>. Sajnos, a kovalensen kötődő C3b akzeptort a sejtek felszínén máig nem sikerült azonosítani, jöllehet a kovalensen kötődött C3b funkcionális hatásairól más munkacsoportok is beszámolnak. A 3LL tumorsejtvonal esetében leírták, hogy felszínén kovalensen köti meg a C3 molekulát. Ez a sejtvonal sem komplementreceptorokat nem expresszál, sem C3-at nem termel<sup>83</sup>. Eredményeinkkel összhangban a 3LL sejtek a komplementfehérjéjt 15 perc alatt internalizálják, és ennek hatására megindul a sejtek aktivációja. Longo munkacsoportja 2005-ben bizonyította, hogy az internalizációt nem a sejtek aktin citoskeletonja vagy mikrotubulus rendszere közvetíti, illetve hogy az aktivációs folyamat a proein kináz C molekula által valósul meg, melyet a sejtekbe jutott C3 aktivál<sup>84</sup>.

A C3b kovalens kötődését tanulmányozó munkákban korábban nem vizsgálták a sejtek felszínéhez kapcsolódott C3 további sorsát. Kutatócsoportunk egér makrofágok és B-sejtek esetében kimutatta, hogy az ilyen módon fixált C3-at a sejtek exosomák formájában adják le a környezetükbe<sup>69</sup>. Az exosomák a sejtekből exocitózissal kikerülő multivezikuláris testekből (multivesicular body, MVB) származnak<sup>85</sup>. Kettős lipidmembránnal burkoltak, méretük 30-100 nm. Dendritikus sejt eredetű exosomákon adhéziós molekulák (köztük a CR3), MHC molekulák, kostimulátorok fordulnak elő legnagyobb számban, így elsősorban az antigénprezentációs és gyulladásos folyamatokban tulajdonítanak ezeknek szerepet<sup>85</sup>. Számos más mikrovezikulum is lefűződhet különféle sejtekről<sup>85</sup>. Ezeknek az eltérő méretű és formátumú lefűződő vezikulumoknak szerepük lehet a sejtek közötti kommunikációban fiziológias és patológiás esetekben is<sup>86</sup>. A 3LL tumorsejt esetében is igazolták, hogy a kovalensen kötött és internalizált C3-at később leadják a sejtek<sup>84</sup>.

Miután megállapítottuk, hogy a humán MDC-k hasonlóan kötik a C3-at a felszínükön, megvizsgáltuk azt is, hogy mi történik ezek után a fehérjével. A natív C3 kezelést követő 48 órában mértük a sejteken és sejtekben lévő extra- és intracelluláris C3-fragmentum mennyiségét. A kezelést követően az első fél órában mind a felszíni, mind a teljes C3-fragmentum mennyisége csökken, így elmondható, hogy a fehérje bekerül a sejtekbe, és ott részben lebomlik. Ezt konfokális mikroszkópos vizsgálattal is alátámasztottuk. Érdekes eredmény, hogy mind a sejteken, mind a sejtekben még a kezelés után még 48 órával is található C3 komplementfehérje-fragmentum. Vizsgálataink szerint ennek a DC-k antigénprezentáló képességének fokozásában jelettős szerepe van. Ez megerősíti kutatócsoportunk korábbi eredményeit, melyek szerint a szérummal kezelt egér makrofágok, és B-sejtek a felszínükön kovalens C3-at hordoznak, és ezek a sejtek hatékonyabban prezentálják az OVA modell antigént a T-sejteknek<sup>68</sup>. A kovalensen kötődött C3b erősen kapcsolódik az aktiváló felszínhez, korábban kimutattuk, hogy C3b-t hordozó limfociták 3 napig megtartják a kezdeti C3 mennyiséget felszínükön<sup>78,87</sup>. Kísérleteink alapján a kezelt sejtek felülcsúszójában, a nanopartikulumokat tartalmazó frakcióban megjelenik a C3 molekula. Az hogy a komplementfehérje, a makrofágokhoz és B-sejtekhez hasonló módon<sup>69</sup> az exosomák felszínén található, további bizonyítást igényel.

A dendritikus sejtek funkcionális változása általában jól jellemezhető sejt felszíni markereik expressziójának megváltozásával. Legtöbbször CD83 érési markert, T-sejt stimulációban szerepet játszó kostimulátorokat (CD80, CD86, CD40) és MHCII, illetve a fagocitótikus funkcióval összefüggő molekulákat (pl. MR) vizsgálunk. Rendszerünkben a natív C3-mal kezelt MDC-k esetében szignifikánsan megnőtt a CD83, CD86 és MHCII molekulák expressziója, így az LPS jelenlétében teljesen éretté vált maMDC-khez hasonló fenotípust nyertek, viszont különböztek is ezektől abban, hogy a kezelés a CD80 és MR molekulákra nem volt hatással. Abban az esetben, mikor az MDC-k csak komplementreceptoraiakon keresztül kapcsolódhattak a tenyésztőedényen lévő C3-fedett felszínhez, ezek a fenotípusos változások elmaradtak, a sejtek az imMDC-kkel megegyező fenotípusúak maradtak. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a kovalensen kötődött C3b a dendritikus sejteket elmozdítja az antigénprezentáló funkció felé, de ez csak bizonyos molekulákat érint, így valószínűleg valamilyen speciális, eddig nem azonosított jelpálya aktiválódhat.

A DC-k fő feladata a T-limfociták aktivációja, ezért vizsgáltuk, hogy a C3 hogyan vesz részt ebben a folyamatban. A C3 immunfolyamatok szabályozásában betöltött szerepét számos, C3 géniütiött egér modellen végzett vizsgálat támasztja alá. Igazolták, hogy C3 hiányos állatban helyrehozható a károsodott ellenanyagválasz, ha a vad típusú mieloid sejteket transzplantálnak az állatokba, így bizonyították a lokálisan termelt C3 elengedhetetlen szerepét a megfelelő immunválasz kialakításában<sup>88</sup>. Peng és munkatársai azt vizsgálták, hogy a C3 hiány mely sejtek funkcióját károsítva okozza az immunválasz defektusát. Mivel korábbi irodalmi adatok alapján C3<sup>-/-</sup> állatokban nemcsak a humorális, de a celluláris immunválasz is sérült, úgy gondolták, hogy a célsejteket az antigénprezentáló sejtek között kell keresni. Kimutatták, hogy egerek esetében a makrofágok és DC-k hasonló mennyiségű C3-at termelnek, 2x10<sup>5</sup> sejt 3 nap alatt kb. 100-200 ng/ml-t. LPS hatására a C3 szekréciója mindkét sejt esetében fokozódik. Allogén T-sejtek *in vitro* és *in vivo* aktivációját elemezve megállapították, hogy a C3<sup>-/-</sup> DC-k csökkent IL-12 termelésük által a T<sub>h</sub> sejtek polarizációt T<sub>h</sub>2 (fokozott IL-4 termelés) és T<sub>reg</sub> (fokozott IL-10 termelés és Foxp3 expresszió) irányba tolják el<sup>66</sup>. Ezen eredmények összhangban vannak azzal, hogy rendszerünkben a C3 kezelés fokozta a MDC-k T-sejt stimuláló képességét és gyulladáshoz vezető citokin termelését (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8).

Zhou és munkacsoportja C3<sup>-/-</sup> és WT csontvelői eredetű makrofágok funkcionális vizsgálatát elvégezve hasonló eredményre jutott<sup>89</sup>. Megvizsgálták azt is, hogy ennek hátterében a kutatócsoportunk által korábban leírt mechanizmus áll-e, mely szerint makrofágok az általuk termelt C3-at kovalensen fixálják felszínükön. Nem sikerült sem a WT, sem a C3<sup>-/-</sup> sejteken C3 jelet mérniük, így azt a következtetést vonták le, hogy az ilyen módon fixált C3 nem játszik szerepet a T-sejt aktivációs folyamatokban. Ez a kijelentés ebben a formában nem teljesen helytálló, hiszen kísérletükben nyugvó makrofágokon vizsgálata történt. Ebben az esetben, ha a kapott eredményeikkel ellentétben, a nem aktivált makrofág indukálta volna a T-sejtek aktivációját, az súlyos autoimmun folyamatokhoz vezetne. Csoportunk több sejttípuson – makrofág, B-sejt, dendritikus sejt – is megvizsgálta a kovalensen fixált C3 által közvetített funkciókat. T-sejt stimulációt előidéző hatást mindhárom sejttípus esetén akkor kaptunk, amikor fokozott C3 termeléssel jellemezhető (gyulladást modellező) kísérleti körülményeket alkalmaztunk, tehát eredményeink nem mondanak ellent az általuk kapottaknak. Ugyanis, Zhou és munkacsoportja megállapította, hogy nyugalmi állapotban a makrofágok felszínén jelenlevő C3

mennyiség nem játszik szerepet az immunfolyamatok indukciójában, míg munkacsoportunk eredményei szerint gyulladásos körülmények között, a magasabb C3 szint bizonyos immunfolyamatok elindulását indukálja.

A géniütiött egereken végzett vizsgálatok és a humán dendritikus sejtek működése között nem lehet tökéletes párhuzamot vonni. Egyrészt, a kutatócsoport eredményei szerint az egér DC-k termelnek C3-at, míg humán DC-k nem, másrészt az egér és humán dendritikus sejt populációk egymásnak való megfeleltetése sem egyszerű. Ezek alapján mindenképpen indokolt a C3 humán DC-k funkcióiban betöltött szerepét vizsgálni. A C3 teljes hiánya igen súlyos kórképet idéz elő. A C3 deficiens betegekben az állandóan visszatérő lázkeltő fertőzések az esetek túnyomó részében az egyén halálához vezetnek<sup>90</sup>. Ez a magyarázata annak, hogy mindössze egyetlen publikáció jelent meg ebben a témában. Ghannam és munkatársai egy teljes C3 hiánnyal megszületett ikerpár egyik életben maradt tagját és csak az egyik kromoszómán hibás C3 gént hordozó szüleit vizsgálták<sup>91</sup>. Méréseik alapján a gyermek C3 szintje és CH50 értéke a detektálási küszöb alatt volt, de a defektus egyéb komplement fehérjéit nem érintette. A szülők esetében mindkét érték a normális fele volt. A homozigóta beteg perifériás mononukleáris sejtjeit elemezve megállapították, hogy azok nem képesek antigénprezentáló funkciót ellátni, bár normális stimulátor sejtekre megfelelően reagálnak. Tehát a C3 hiány, egyértelműen az antigén bemutatásban okoz defektust. Mivel allogén stimulációs rendszerben vizsgálták a sejteket, így az antigén felvételének és feldolgozásának esetleges károsodásáról nem kapunk információt. Tanulmányozták, hogy a beteg monocitáiból differenciáltatott dendritikus sejtek is károsodtak-e. Már a differenciálódás mértéke is minimálisnak találták az egészséges kontroll donorok monocitáihoz képest, melyek 90%-ban alakultak MDC-vé, ellentétben a beteg sejtjei, amelyek csak 27%-ban értek MDC-kké. Ezen adatok erősen alátámasztják a C3 fontos szerepét nemcsak az immunválasz kialakításában és irányításában, hanem az immunsejtek megfelelő fejlődésének szabályozásában is.

Kísérleteinkkel alátámasztottuk, hogy a C3 a DC-k felszínéhez kovalensen kapcsolódva elősegíti azok T-sejt stimulációját. Bizonyítottuk, hogy az aktiváció kiváltásáért nemcsak a C3 által a DC-kben előidézett változások (fokozott kostimulátor és MHCII expresszió) felelősek, hanem önmagában a sejtek felszínéhez kapcsolódó C3 képes közvetlenül a T-sejtek aktivációját kiváltani. Egyre több vizsgálat tárgyát képezik a T-sejteken expresszáló komplementreceptorok és azok

funkciói. A CR1 a T-sejtek 10-15%-án fejeződik ki, és valószínűleg regulátor funkcióval bír, úgy mint B-sejtek esetén<sup>52</sup>. A CR2 jelenlétét T-sejtvonalakon mutatták ki, primer T-limfocitákon<sup>71,93</sup>. A  $\beta 2$  integrinek családjába tartozó CR3-at és CR4-et a T-sejtek 2-10%-a expresszálja<sup>71,92,93</sup>. Ezen kívül, újabban a CD46, CD55 és CD59 komplement reguláló receptorok szerepét is leírták a T-sejtek funkcionális szabályozásában<sup>60,94</sup>. Ezen irodalmi adatok alapján valószínűleg a DC-k felszínéhez kovalensen kötődött C3 a T-sejteken jelenlévő komplementreceptorokhoz kapcsolódva stabilizálhatja a két sejt kapcsolatát, és jelátviteli folyamatokat is beindíthat a limfocitákban. A T-sejtek osztódásának serkentése csak az egyik lépés a DC-k általi T-sejt aktivációban; a termelt citokinek révén a stimulált limfociták differenciációját is befolyásolják, irányítják. A natív C3-al kezelt MDC-k fokozott IL-6, TNF- $\alpha$  és IL-8 termelését mutattuk ki, ezek a citokinek mind szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok szabályozásában. Vizsgálataink szerint, az MDC-k aktiválása natív C3-al, dóziszfüggő módon emelte ezen citokinek szekrécióját.

A kovalensen a MDC-khez kapcsolódó C3 által a sejtek funkcióiban okozott változások arra engednek következtetni, hogy a már kötődött C3 második lépésben kapcsolódhat valamilyen receptorral a sejteken, mely beindítja az aktivációhoz szükséges jelátviteli folyamatokat. A sejtek felszínén jelenlévő fragmentumok pontos azonosítása nehézségekbe ütközik, mivel nem állnak rendelkezésre olyan megbízható monoklonális ellenanyagok, melyek specifikusan azonosítani képesek azokat. Mi, kísérleteinkben a C3c fragmentumot felismerő antitestet használtunk. Ez a fragmentum szolubilis, így elmondhatjuk, hogy ha ezzel az ellenanyaggal jelet kapunk, akkor az azonosított fragmentum C3b vagy iC3b lehet. Ezek alapján a legvalószínűbb receptorok, melyek a natív C3 kötődés aktiváló jeleit közvetítik, a dendritikus sejteken igen nagy mennyiségben expresszálódó CR3 (CD11b/CD18) és CR4 (CD11c/CD18) lehetnek. Ezek mellett érdemes megemlíteni, hogy a kovalensen kötődött C3 fragmentumok gátolják az Fc $\gamma$  receptorok funkcióit, így ezek sem figyelmen kívül hagyhatók, mint lehetséges akceptor helyek<sup>87,95,96</sup>. A CR3 és CR4 receptor funkcióját DC-ken több kutatócsoport is vizsgálta. Általában C3-fragmentumokkal opszonizált partikulumok hatását elemzik, illetve más kísérletekben ellenanyagok segítségével stimulálják a CR3 receptort. Hiányosságuk, hogy amennyiben iC3b ligandumot használnak, abban az esetben nem különíthetők el a CR3 és CR4 közvetített hatások, amennyiben pedig ellenanyaggal stimulálják a receptort, valószínűleg a fiziológiás szituációtól erősen eltérő hatásokat vizsgálnak.

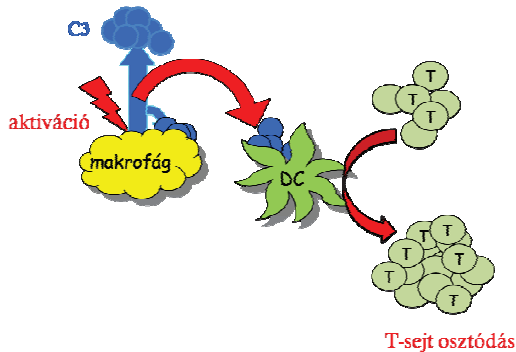
A legtöbb kísérlet során arra az eredményre jutottak, hogy a CR3 szerepe dendritikus sejteken valószínűleg inkább a tolerogén válasz kialakítása. Az apoptotikus sejtek aktiválják a komplementrendszer, és felszínükön többek között iC3b rakódik le, ezáltal képesek a CR3 és CR4 receptorokhoz kapcsolódni<sup>97</sup>. Ezek mellett más olyan struktúrák is találhatóak felszínükön, melyek felismerésüket, fagocitózisukat és a tolerogén válasz kialakítását közvetítik (pl. foszfatidil-szerin). Felvételüket főleg az  $\alpha V\beta 5$  integrint mediálja<sup>98</sup>, bár nem zárható ki, hogy a CR3 is részt vesz ebben a folyamatban<sup>99</sup>. Az apoptotikus sejtek által kiváltott toleranciát viszont elsősorban a CR3 közvetíti; gátolja az IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  és IL-12 szekrécióját<sup>98-101</sup>, és fokozza a TGF- $\beta$  termelést<sup>98,100,101</sup>. Természetes veszélyhelyzetet szimuláló kísérleti beállításoknál ez a gátló hatás felülíródik<sup>98</sup>. Behrens munkacsoportja legújabban leírta, hogy bár az iC3b-vel opsonizált apoptotikus sejtek kapcsolódnak a dendritikus sejtek CR3 receptoraihoz, ez nem befolyásolja sem az apoptotikus sejtek fagocitózisát, sem az általuk kiváltott tolerogén választ<sup>100</sup>. Ezzel szemben, Sohn és Verbovetski munkacsoportja a tolerancia kiváltásáért az iC3b kapcsolódást teszi felelőssé<sup>101-103</sup>.

Kísérleteink során az irodalmi adatokkal összeegyeztethető eredményekre jutottunk. Tisztított iC3b-t használva bizonyítottuk, hogy az kötődik a MDC-khez, tehát a CR3 és CR4 integrinek ligandumkötésre képes konformációban vannak jelen a sejteken. Érdekes eredmény, hogy makrofágokat vizsgálva azt találtuk, hogy a CR3 ligandumkötése fokozható  $Mg^{++}$  ionnal, ami arra utal, hogy a receptor esetleg más formában, talán kicsit más funkcióval expresszálódik a két APC típuson. Hasonlóan a natív C3 kezeléshez, az iC3b is hamar bekerül a sejtekbe, ám sem fenotípusukra nem hat, sem T-sejt stimuláló képességüket, sem gyulladási citokin termelésüket nem fokozza. Mivel ezekben a kísérletekben a két komplementreceptort egyszerre céloztuk, elvégeztük a méréseket az integrinek  $\alpha$  láncára specifikus ellenanyagokkal is. A CD11b-specifikus TMG6-5 monoklonális ellenanyag a CR3 ligandumkötőhelyét ismeri fel, így modellezhető vele a CR3 stimuláció. CD11c specifikus ellenanyagunkról ilyen adatok nem álltak rendelkezésre, így nem lehetünk biztosak benne, hogy a kezelésünk mennyire volt fiziológiás jellegű. A CR3 vagy CR4 önmagában történő stimulációja nem volt hatással a sejtek funkcióira. További vizsgálatokat tervezünk, melyekben RNS silencing technikát alkalmazva erősen csökkentjük a CD11b illetve CD11c expresszióját MDC-kben, majd vizsgáljuk iC3b, illetve iC3b opsonizált partikulumok hatását a sejtek fenotípusára és működésére.



Ez a megközelítés lehetővé teszi, hogy természetes ligandumokat alkalmazva, a receptorok funkcióját szeparálva elemezzük.

Kísérleteink és az irodalmi adatok alapján a C3 lokális immunfolyamatokban betöltött lehetséges funkcióját a 35. ábra szemlélteti. A szövetekben a C3 forrást főleg makrofágok jelentik, melyek C3 szekréciója veszély jel hatására fokozódik. Ez az emelkedett C3 szint szükséges ahhoz, hogy a dendritikus sejtek a komplement fehérjét felszínükön kovalensen megkössék, és ezáltal funkcionális változáson menjenek keresztül. Ezen változások hatására megnő T-sejt stimuláló képességük, és gyulladási citokin termelésük is. Összefoglalva, eredményink arra mutatnak rá, hogy a C3 komplementfehérje lokális koncentrációjának szabályozásán keresztül az immunfolyamatok komplex szabályozása valósul meg.



## Összefoglalás

A különféle komplementelemek (fehérjék, receptorok, regulátorok) több szinten hatnak az immunválaszra. Munkánkban arra kerestük a választ, hogy a C3 hiányában fellépő súlyos defektusok a T-sejtes immunválaszban milyen mechanizmussal magyarázhatóak.

Bizonyítottuk, hogy a DC-k képesek az aktivált makrofágokból származó nagy mennyiségű C3-at megkötni a felszínükön. Tisztított C3-mal *in vitro* vizsgáltuk a kötődés körülményeit, és megállapítottuk, hogy a sejtek kovalensen fixálják a komplement fehérjét felszínükön. Ezek után a C3 bekerül a sejtekbe, de felszínükön még 48 óra leteltével is kimutathatóak C3 fragmentumok. Bizonyítottuk, hogy ezek közvetlenül teremtenek kapcsolatot a DC-k és a T-sejtek között, és így akár a sejtkapcsolat stabilizálásán, akár aktivációs jelpályák beindítása által elősegítik a T-limfociták osztódását. A natív C3 kezelés hatására a DC-k fenotípusa is az mDC-khez hasonlóná válik, nő CD83, CD86 és MHCII expressziójuk. A fokozott T-sejt aktiváló képesség mellett a DC-k IL-6, TNF- $\alpha$  és IL-8 termelése is emelkedik, melyek mind a gyulladással kapcsolatos válasz kialakítására utalnak. Ugyanezeket a kísérleteket elvégeztük olyan beállításban is, amikor a DC-k csak komplementreceptoraihoz keresztül férhettek hozzá a C3-hoz, ám ebben az esetben minden előbb leírt hatás elmaradt, így kijelenthetjük, hogy az előidézett funkcionális változásokért a kovalensen fixált C3 felelős.

A kovalensen kötött C3 erőteljes változásokat okoz a DC-k működésében, mely mindenképpen valamilyen jelátvitelt feltételez. Mivel az akceptorok struktúrája azonosíthatatlan, így a legkézenfekvőbb jelátvivő partnerekként a CR3 és CR4 receptorokat tekintettük. A két receptort mind közös ligandumukkal (iC3b-vel), mind specifikus ellenanyagokkal stimuláltuk, de azok semmilyen hatással nem voltak sem a DC-k fenotípusára, sem T-sejt aktiváló képességükre, sem citokintermelésükre.

Összefoglalva a C3 lokális koncentrációjának szabályozása a gyulladással kapcsolatos válasz egy újfajta kommunikációs lehetőségét jelenti makrofágok és dendritikus sejtek között.

## Summary

It is well accepted that different complement elements (proteins, receptors and regulators) are able to modulate immune responses at different levels. It is also known for long that in the absence of component C3, the T-cell mediated immune response is severely damaged. Our goal was to discover the underlying mechanism.

We proved, that DCs are able to fix C3 produced by activated macrophages in large amounts. Studying the characteristics of the interaction of C3 with MDCs, using purified native C3, we found that the cells are able to fix the complement protein covalently on their surface. We have shown that a certain amount of C3 enters the cells, but interestingly the complement protein can be detected on the cell surface even 48 hours after the treatment. This could not be due to C3 production, since DCs do not produce this protein. We found, that the C3-fragments form a bridge between the DCs and T-cells and this interaction results in the stimulation of T-lymphocyte proliferation either by stabilizing the link between the two celltypes, or by stimulating intracellular signaling in T-cells. We have found that after treatment with native C3, the phenotype of the MDCs changes to a mature one, with increased expression of CD83, CD86 and MHCII. Beside the elevated T-cell stimulatory capacity, their cytokine production (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8) is also upregulated. All these events contribute to the development of a proinflammatory immune response. Parallel to these investigations we performed experiments using inactive C3, when MDCs can interact with the complement protein only via complement receptors CR3 and CR4. Binding of C3-fragments via these integrins however had effect neither on the phenotype nor on the functional activity of MDCs, pointing to the exclusive role of covalently fixed C3 fragments. The distinct role of covalently fixed C3-fragments is strongly supported by our results obtained with MDCs where CD11b expression was downregulated by siRNA.

Summarizing our findings we can conclude, that the local production of C3 in secondary lymphoid organs ensures a new type of communication between macrophages and dendritic cells during the inflammatory response, which might be crucial for the initiation of the adaptive immune response.

## Irodalom

1. Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161 (2002).
2. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767-811 (2000).
3. Figdor, C. G., van, K. Y. & Adema, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 77-84 (2002).
4. Robinson, M. J., Sancho, D., Slack, E. C., LeibundGut-Landmann, S. & Reis e Sousa Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat. Immunol.* **7**, 1258-1265 (2006).
5. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145 (2001).
6. Joffre, O., Nolte, M. A., Sporri, R. & Reis e Sousa Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 234-247 (2009).
7. Mariathasan, S. & Monack, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 31-40 (2007).
8. Sansonetti, P. J. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat. Immunol.* **7**, 1237-1242 (2006).
9. Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19-30 (2007).
10. Coquerelle, C. & Moser, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol. Rev.* **234**, 317-334 (2010).
11. Rutella, S., Danese, S. & Leone, G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* **108**, 1435-1440 (2006).
12. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685-711 (2003).
13. Idoyaga, J., Suda, N., Suda, K., Park, C. G. & Steinman, R. M. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 1524-1529 (2009).
14. Liu, K. & Nussenzweig, M. C. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* **234**, 45-54 (2010).
15. Wu, L. & Liu, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* **26**, 741-750 (2007).

16. Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. & Akashi, K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**, 3333-3341 (2001).
17. Wu, L. *et al.* Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* **98**, 3376-3382 (2001).
18. Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. **19**, 59-70 (2003).
19. Shortman, K. & Heath, W. R. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* **234**, 18-31 (2010).
20. Romani, N., Clausen, B. E. & Stoitzner, P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* **234**, 120-141 (2010).
21. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833-844 (2009).
22. Caux, C., zutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. & Banchereau, J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-261 (1992).
23. Caux, C. *et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* **184**, 695-706 (1996).
24. Caux, C. *et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* **90**, 1458-1470 (1997).
25. Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**, 480-483 (1998).
26. Gilliet, M. *et al.* The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **195**, 953-958 (2002).
27. Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L. & Manz, M. G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**, 305-313 (2003).
28. Naik, S. H. *et al.* Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol.* **174**, 6592-6597 (2005).

29. Naik, S. H. *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* **8**, 1217-1226 (2007).
30. Onai, N. *et al.* Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* **8**, 1207-1216 (2007).
31. Waskow, C. *et al.* The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* **9**, 676-683 (2008).
32. Strobl, H., Riedl, E., Bello-Fernandez, C. & Knapp, W. Epidermal Langerhans cell development and differentiation. *Immunobiology* **198**, 588-605 (1998).
33. Villadangos, J. A., Schnorrer, P. & Wilson, N. S. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol. Rev.* **207**, 191-205 (2005).
34. Reis e Sousa Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 476-483 (2006).
35. Macagno, A., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.* **28**, 227-233 (2007).
36. Alper, C. A., Johnson, A. M., Birtch, A. G. & Moore, F. D. Human C3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science* **163**, 286-288 (1969).
37. Colten, H. R., Strunk, R. C., Perlmutter, D. H. & Cole, F. S. Regulation of complement protein biosynthesis in mononuclear phagocytes. *Ciba Found. Symp.* **118**, 141-154 (1986).
38. Andrews, P. A., Zhou, W. & Sacks, S. H. Tissue synthesis of complement as an immune regulator. *Mol. Med. Today* **1**, 202-207 (1995).
39. Vik, D. P. *et al.* Structural features of the human C3 gene: intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence. *Biochemistry* **30**, 1080-1085 (1991).
40. Morgan, B. P. & Gasque, P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why?. *Clin. Exp. Immunol.* **107**, 1-7 (1997).
41. Janssen, B. J. & Gros, P. Structural insights into the central complement component C3. *Mol. Immunol.* **44**, 3-10 (2007).
42. Nishida, N., Walz, T. & Springer, T. A. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 19737-19742 (2006).

43. Gutzmer, R. *et al.* Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. *Immunology* **111**, 435-443 (2004).
44. Peng, Q. *et al.* Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood* **111**, 2452-2461 (2008).
45. 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).
46. 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).
47. Helmy, K. Y. *et al.* CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* **124**, 915-927 (2006).
48. Nussenzweig, V. Complement-Receptor Lymphocytes. *Am. J. Pathol.* **65**, 479-480 (1971).
49. Papamichail, M. *et al.* Complement dependence of localisation of aggregated IgG in germinal centres. *Scand. J. Immunol.* **4**, 343-347 (1975).
50. Pepys, M. B. Role of complement in the induction of immunological responses. *Transplant. Rev.* **32**, 93-120 (1976).
51. Carter, R. H., Spycher, M. O., Ng, Y. C., Hoffman, R. & Fearon, D. T. Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J. Immunol.* **141**, 457-463 (1988).
52. Jozsi, M., Prechl, J., Bajtay, Z. & Erdei, A. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. *J. Immunol.* **168**, 2782-2788 (2002).
53. Kopf, M., Abel, B., Gallimore, A., Carroll, M. & Bachmann, M. F. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat. Med.* **8**, 373-378 (2002).
54. Carroll, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 981-986 (2004).
55. Dobrina, A. *et al.* Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Blood* **99**, 185-192 (2002).
56. Tedesco, F. *et al.* The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J. Exp. Med.* **185**, 1619-1627 (1997).

57. Nauta, A. J. *et al.* Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1726-1736 (2002).
58. Nauta, A. J., Daha, M. R., van, K. C. & Roos, A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.* **24**, 148-154 (2003).
59. Nauta, A. J. *et al.* Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 3044-3050 (2004).
60. Kemper, C. *et al.* Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* **421**, 388-392 (2003).
61. Basta, M. & Hammer, C. H. A rapid FPLC method for purification of the third component of human and guinea pig complement. *J. Immunol. Methods* **142**, 39-44 (1991).
62. Freundlich, B. & Avdalovic, N. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes. *J. Immunol. Methods* **62**, 31-37 (1983).
63. Romani, N. *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* **180**, 83-93 (1994).
64. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. 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**, 1109-1118 (1994).
65. Prechtel, A. T., Turza, N. M., Theodoridis, A. A., Kummer, M. & Steinkasserer, A. Small interfering RNA (siRNA) delivery into monocyte-derived dendritic cells by electroporation. *J. Immunol. Methods* **311**, 139-152 (2006).
66. 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).
67. 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).
68. Kerekes, K., Prechl, J., Bajtay, Z., Jozsi, M. & Erdei, A. A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells. *Int. Immunol.* **10**, 1923-1930 (1998).
69. Papp, K. *et al.* B lymphocytes and macrophages release cell membrane deposited C3-fragments on exosomes with T cell response-enhancing capacity. *Mol. Immunol.* **45**, 2343-2351 (2008).



70. Fabry, Z., Erdei, A. & Gergely, J. A possible self-regulating mechanism mediated by C3b-acceptor-bound C3b generated by stimulated macrophages. *Scand. J. Immunol.* **22**, 549-555 (1985).
71. Kemper, C. & Atkinson, J. P. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 9-18 (2007).
72. Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. & Springer, T. A. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**, 599-11 (2002).
73. Carroll, M. C. The complement system in B cell regulation. *Mol. Immunol.* **41**, 141-146 (2004).
74. Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C. & Fearon, D. T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* **271**, 348-350 (1996).
75. Morgan, B. P., Marchbank, K. J., Longhi, M. P., Harris, C. L. & Gallimore, A. M. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol. Lett.* **97**, 171-179 (2005).
76. Botto, M., Lissandrini, D., Sorio, C. & Walport, M. J. Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* **149**, 1348-1355 (1992).
77. van, K. C. *et al.* Complement production and regulation by dendritic cells: molecular switches between tolerance and immunity. *Mol. Immunol.* **45**, 4064-4072 (2008).
78. 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).
79. Erdei, A., Benczur, M., Fabry, Z., Dierich, M. P. & Gergely, J. C3 cleaved by membrane proteases binds to C3b acceptors expressed on concanavalin A-stimulated human lymphocytes and enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Scand. J. Immunol.* **20**, 125-131 (1984).
80. Grayzel, A. I., Hatcher, V. B. & Lazarus, G. S. Protease activity of normal and PHA stimulated human lymphocytes. *Cell Immunol.* **18**, 210-219 (1975).
81. Lavie, G., Zucker-Franklin, D. & Franklin, E. C. Degradation of serum amyloid A protein by surface-associated enzymes of human blood monocytes. *J. Exp. Med.* **148**, 1020-1031 (1978).
82. Nilsson, E. K. & Nilsson, B. Phosphorylation of complement component C3 after synthesis in U937 cells by a putative protein kinase, casein kinase 2, which is regulated by CD11b: evidence that membrane-bound proteases preferentially cleave phosphorylated C3. *Biochem. J.* **328** ( Pt 2), 625-633 (1997).

83. di, R. L. *et al.* C3 molecules internalize and enhance the growth of Lewis lung carcinoma cells. *Immunobiology* **200**, 92-105 (1999).
84. Longo, A. *et al.* C3-induced 3LL cell proliferation is mediated by C kinase. *J. Cell Biochem.* **94**, 635-644 (2005).
85. Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581-593 (2009).
86. Cocucci, E., Racchetti, G. & Meldolesi, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* **19**, 43-51 (2009).
87. Fabry, Z., Erdei, A. & Gergely, J. C3b acceptors on macrophages: inhibition of Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis by acceptor-bound C3b. *Immunol. Lett.* **6**, 287-291 (1983).
88. Fischer, M. B., Ma, M., Hsu, N. C. & Carroll, M. C. Local synthesis of C3 within the splenic lymphoid compartment can reconstitute the impaired immune response in C3-deficient mice. *J. Immunol.* **160**, 2619-2625 (1998).
89. Zhou, W. *et al.* Macrophages from C3-deficient mice have impaired potency to stimulate alloreactive T cells. *Blood* **107**, 2461-2469 (2006).
90. Ulbrich, A. G. *et al.* Hereditary human complement C3 deficiency owing to reduced levels of C3 mRNA. *Scand. J. Immunol.* **53**, 622-626 (2001).
91. 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).
92. Wagner, C. *et al.* The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1173-1180 (2001).
93. Wagner, C. & Hansch, G. M. Receptors for complement C3 on T-lymphocytes: relics of evolution or functional molecules?. *Mol. Immunol.* **43**, 22-30 (2006).
94. Longhi, M. P., Harris, C. L., Morgan, B. P. & Gallimore, A. Holding T cells in check--a new role for complement regulators?. *Trends Immunol.* **27**, 102-108 (2006).
95. Erdei, A., Bajtay, Z., Fabry, Z., Sim, R. B. & Gergely, J. Appearance of acceptor-bound C3b on HLA-DR positive macrophages and on stimulated U937 cells; inhibition of Fc gamma-receptors by the covalently fixed C3 fragments. *Mol. Immunol.* **25**, 295-303 (1988).
96. Gergely, J., Bajtay, Z., Erdei, A. & Fabry, Z. Functional cooperation of C3b-acceptors, Fc gamma-receptors and cell-surface proteases on macrophages. *Immunol. Lett.* **11**, 141-146 (1985).

97. Fishelson, Z., Attali, G. & Mevorach, D. Complement and apoptosis. *Mol. Immunol.* **38**, 207-219 (2001).
98. Skoberne, M. *et al.* The apoptotic-cell receptor CR3, but not alphavbeta5, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function. *Blood* **108**, 947-955 (2006).
99. Morelli, A. E. *et al.* Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* **101**, 611-620 (2003).
100. Behrens, E. M. *et al.* Complement receptor 3 ligation of dendritic cells suppresses their stimulatory capacity. *J. Immunol.* **178**, 6268-6279 (2007).
101. Sohn, J. H. *et al.* Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat. Med.* **9**, 206-212 (2003).
102. Schmidt, J., Klempf, C., Buchler, M. W. & Marten, A. Release of iC3b from apoptotic tumor cells induces tolerance by binding to immature dendritic cells in vitro and in vivo. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 31-38 (2006).
103. Verbovetski, I. *et al.* Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J. Exp. Med.* **196**, 1553-1561 (2002).
104. Romani N. , Clausen B. E., Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* **234**, 120-141 (2010).
105. Varga G. *et al.* Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Blood* **109**, 661-669 (2007).

## Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények

Noémi Sándor, Domonkos Pap, József Prechl, Anna Erdei, Zsuzsa Bajtay: „**A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes**”. Molecular Immunology 2009. 47(2-3):438-48. (IF:3,742)

Zsuzsa Bajtay, Eszter Csomor, Noémi Sándor, Anna Erdei: „**Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells**”. Immunology Letters 2006. 104(1-2):46-52. (IF:2,35)

Noémi Sándor, Katalin Kristóf, Katalin Paréj, Anna Erdei, Zsuzsa Bajtay: „**The different role of complement CR3 and CR4 in regulation of dendritic cell functions**”. Közlésre elküldve.

## Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Anna Erdei, Andrea Isaák, Katalin Török, Noémi Sándor, Mariann Kremlitzka, József Prechl, Zsuzsa Bajtay: „**Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions**”. Molecular Immunology 2009. 47(2-3):438-48. (IF:3,742)

Eszter Csomor, Zsuzsa Bajtay, Noémi Sándor, Katalin Kristóf, Gerard J Arlaud, Steffen Thiel, Anna Erdei: „**Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells**”. Molecular Immunology 2007. 44(13):3389-97. (IF:3,742)

Katalin Kristóf, Krisztina Madách, Noémi Sándor, Zsolt Iványi, Anna Erdei, János Gál, Zsuzsa Bajtay: „**Molecular mimicry between pathogens and self reduces severity but lengthens recovery of pneumonia induced sepsis**”. Közlésre elküldve.

## Referált folyóiratban megjelent konferencia absztrakt

Eszter Csomor, Zsuzsa Bajtay, Noémi Sándor, Nicole Thielens, Steffen Thiel, Gerard Arlaud, Anna Erdei: „**Immobilized C1q induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells**”. FEBS Journal 2005 272(1): 288-289 (IF 3,03)

### Nemzetközi konferencián való részvétel

- 2005.06.06. FEBS-IUBMB Congress, 2005, Immobilized C1q induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells  
E. Csomor, Z. Bajtay, N. Sándor, S. Thiel, G.J. Arlaud, A. Erdei
- 2006.09.06-09. 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology  
*The effect of C1q on the maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells*  
E. Csomor, Zs. Bajtay, N. Sándor, S. Thiel, G.J. Arlaud, MR Daha, C van Kooten, A. Erdei  
  
*Role of complement component C3 in the differentiation and function of human dendritic cells*  
Zs. Bajtay, N. Sándor, A. Erdei
- 2007.08.21-25. 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology  
*Role of complement component C3 in the differentiation and function of human dendritic cells*  
Zs. Bajtay, N. Sándor, A. Erdei
- 2007.09.15-19. 14th Symposium on Signals and signal processing in the immune system

*Role of complement component C3 in the differentiation and function of human dendritic cells*

Zs. Bajtay, N. Sándor, A. Erdei

- 2008.09.18-20. 22<sup>nd</sup> EMDS meeting  
*Role of complement component C3 in the differentiation and function of human dendritic cells*  
N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei
- 2009.09.2-6. 15th Symposium on Signals and signal processing in the immune system  
*A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes*  
N. Sándor, A. Erdei, Zs. Bajtay
- 2009.09.13-16. 17<sup>th</sup> European Congress of Immunology  
*A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes*  
N. Sándor, A. Erdei, Zs. Bajtay

### **Hazai konferencián való részvétel:**

- 2005.10.19-21. XXXV. Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése  
*Role of C3 in the differentiation of dendritic cells*  
Zs. Bajtay, N. Sándor, E. Csomor, A. Erdei
- 2007.10.17-19. XXXVI. Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése  
*Role of complement component C3 in the differentiation and function of human dendritic cells*  
N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei
- 2008.10.29-31. XXXVII. Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése  
*Role of complement component C3 in the differentiation and function of human dendritic cells*  
N. Sándor, A. Erdei, Zs. Bajtay

2009.10.29-30.

XXXVIII. Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése

*Egy új, komplement közvetített kapcsolat dendritikus sejtek,  
makrofágok és T-sejtek között*

Sándor Noémi, Pap Domonkos, Prechl József, Erdei Anna,  
Bajtay Zsuzsa

## **Köszönetnyilvánítás**

Elsőként témavezetőmnek, Bajtay Zsuzsának köszönöm a sok elméleti és gyakorlati segítséget, hogy minden elképzelésemet megvalósíthattam és előteremtette a munka feltételeit. Erdei Annának, az Immunológia Tanszék vezetőjének, hogy a tanszéken dolgozhattam, és neki is köszönöm a sok segítséget, tanácsot. A tanszék dolgozói közül elsősorban a „sejtes” labornak köszönöm a jó hangulatot, és az elméleti és gyakorlati segítséget, Csomor Eszternek, Isaák Andreának, Péterfy Hajnának, Terényi Nórának, Papp Krisztiánnak, Szekeres Zsuzsának, Prechl Józsefnek, Pacsinak, Mártinak, Papának. Nem utolsó sorban pedig családomnak és barátaimnak is köszönöm az elmúlt években a támogatást.