

dc\_818\_13



**Komplementfehérjék szabályozó szerepe monociták,  
makrofágok és dendritikus sejtek funkcióiban**

MTA doktori értekezés

Dr. Bajtay Zsuzsanna

ELTE TTK Biológiai Intézet

Immunológiai Tanszék

2014.

**Tartalomjegyzék**

A leggyakrabban használt rövidítések jegyzéke	3
Köszönetnyilvánítás	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI HÁTTÉR	6
2.1 A komplementrendszer működése	6
2.2 Komplementreceptorok jelentősége az immunválasz során	9
2.3 Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek funkciói	
2.4 A C1q és az MBL komplementfehérje és receptoraik immunsejteken	17
2.5 A C3 komplementfehérje szerkezete, fragmentumai és ezek kovalens kötődése immunsejtekhez	20
2.6 A C3-fragmentumok kötődése immunsejtek $\beta_2$ -integrinjeihez	24
2.7 Komplementfehérjék szerepe a HIV fertőzés kialakulása során	28
3. CÉLKITŰZÉSEK	31
4. MÓDSZEREK	32
5. EREDMÉNYEK	34
5.1 A C1q és az MBL komplementfehérjék kötődése és hatása makrofágok és dendritikus sejtek érésére és funkcióira	34
5.2 C3b kovalens kapcsolódásának hatása makrofágok és dendritikus sejtek érésére és funkcióira	44
5.3 A C3bi $\beta_2$ -integrinekhez történő kötődésének hatása dendritikus sejtek érésére és működésére	57
5.4 Komplementfehérjék és komplementreceptorok szerepe makrofágok és dendritikus sejtek HIV-1 vírussal történő fertőződése során	68
6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	77
7. IRODALOMJEGYZÉK	83
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	91
8.1 A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények	91
8.2 A PhD fokozat megszerzése óta megjelent további saját közlemények	92

**A leggyakrabban használt rövidítések jegyzéke**

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Bvvs	birka vörösvértest
C1q,-r,-s	C1 komplex q, r, s alegységei
cC1qR	collagen C1q receptor
gC1qR	globular C1q receptor
C3	harmadik komplement komponens
C3a, C3b, iC3b, C3d(g)	a C3molekula enzimatiskus hasítása során keletkező fragmentumok
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Succinimydil-Esther
CR	komplementreceptor (Complement Receptor)
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CR1,-2,-3,-4	komplementreceptor 1, -2, -3, 4
DC	dendritikus sejt (Dendritic Cell)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FcR	Ig Fc-részt kötő receptor
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus
Ig	immunglobulin
LPS	lipopolysaccharide
imDC	éretlen dendritikus sejt (immature Dendritic Cell)
maDC	érett dendritikus sejt (mature Dendritic Cell)
MAC	Membrane Attack Complex
MBL	Mannose Binding Lectin
MDC	monocita eredetű dendritikus sejt (Monocyte derived Dendritic Cell)
M	makrofág
MM	monocita eredetű makrofág (Monocyte derived Macrophage)
Mo	monocita
MR	mannóz receptor
NHS	normál humán savó
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
PMSF	Phenyl Methyl Sulphonyl Fluorid
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PRR	Pattern-Recognition Receptor

## **Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt Prof. Erdei Anna tanszékvezetőnek szeretnék köszönetet mondani, akivel szerencsém volt együtt dolgozni attól a pillanattól kezdve, amikor szakdolgozóként a Tanszékre kerültem. Hálás vagyok, hogy az elmúlt évtizedekben megosztotta velem egyéni kutatási szemléletét, értékes tapasztalatait, ötleteit és főképp a barátságát.

Sokat köszönhetek Tanszékünk korábbi vezetőjének, Prof. Gergely János Tanár Úrnak, akinek előadásai indítottak el az immunológia felé. A mai napig kitüntetésnek érzem, hogy részesévé válhattam a Tanszékünk igazi közösségének. Köszönöm a Komplement-csoportban dolgozó kollégáim segítségét és közleményeink szerzőtársainak együttműködését. Köszönettel tartozom valamennyi PhD-s, szakdolgozó és TDK-s hallgatónak a friss gondolatokért, lendületükért és a laborban végzett kitartó munkájukért. Dr. Sándor Noéminek külön szeretnék köszönetet mondani, akivel sok éve dolgozunk együtt eredményesen. Köszönetemet szeretném kifejezni a Tanszék valamennyi tagjának azért a kivételesen jó hangulatért és segítőkészségért, ami a Tanszékünket a „gödi” idők óta folyamatosan jellemzi.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönet illeti a Családomat, Testvéreimet és különösen a gyerekeimet; Rékát, Pétert és Dávidot, akik jóindulatú támogatásukkal segítették megoldani a számomra örömet jelentő kutatómunkából esetenként rájuk háruló nehézségeket.

## 1. BEVEZETÉS

A komplementrendszer szabályozott működésének folyamatát, aktiválódásának lehetőségeit az elmúlt mintegy száz évben sikerült részleteiben feltárni. Így régóta ismert, hogy ennek ennek a testnedveinkben jelenlévő inaktív fehérjerendszernek egyik legfontosabb feladata a szervezetünkbe bejutó kórokozó azonnali eliminálása. Az aktiválódás lépésről-lépésre történik, mely folyamat során újabb és újabb komplementfehérjék válnak enzimatikusan aktívvá, lehetővé téve a kaszkád következő elemének a kialakulását. Az aktiválódás eredményeként kialakuló membránkárosító komplex számos kórokozó lízisét eredményezi, az immunválasz egyik leghatékonyabb effektor működét biztosítva ezáltal.

Ugyanakkor a komplementrendszer a patogén mikrobák eltakarítása mellett szabályozó szerepet is ellát. A felszabaduló anafilatoxikus peptidok (C3a, C5a) gyulladáskeltő hatása mellett fontos szerep jut a komplementaktiváció során az antigének illetve sejtek felszínéhez kötődő fehérjefragmentumoknak azon túl, hogy a kaszkád végigfutásához vezetnek. Ez annak köszönhető, hogy az antigénhez kötődött komplementfragmentumok egyben receptorok ligandumai is lehetnek, és így kapcsolatot teremtenek az antigén és a komplementreceptort hordozó immunsejtek között. A komplementreceptorok különböző fajtái sokféle immunsejt felszínén kifejeződnek, és számos funkciót elláthatnak. Így pl. közvetíthetnek fagocitózist, lehet kostimulátor aktivitásuk, kiválthatnak sejt differenciációt, továbbá szerepük lehet a sejtek adherenciájában.

A komplementkaszkád szigorúan ellenőrzött lépésekben történő aktiválódásának elengedhetetlen szerepe van az immunválasz hatékonyságának biztosításában, aminek jelentőségére az egyes komplementfehérjék öröklött hiányán alapuló komplementdeficiens állapotok hívják fel a figyelmet. Ezeknek az immunhiányos állapotoknak a súlyosságát egyrészt a rendszer kaszkádszerű működése magyarázza; bármelyik elem hiányozzon is, az a kaszkád leállítását, a működés kiesését eredményezi. Valamely komplementfehérje szelektív hiánya is súlyos következményekkel járhat, pl. a C1q hiányában nem megfelelő az apoptotikus sejtek eltakarítása, emiatt glomerulonefritisz, autoimmun betegség (SLE, Szisztémás *Lupusz Eritematózus*) alakulhat ki [1, 2]. Az MBL (Mannose Binding Lectin) öröklött hiányában megnövekszik a bakteriális, virális és gombás fertőzések előfordulása, elsősorban

kisgyermekkorban [3]. Az aktiválódás központi komponensének, a C3-nak a ritkán előforduló öröklött hiánya szintén súlyos fertőzésekhez vezet, de ma már az is ismert, hogy az immunsejtek érésének és működésének rendellenességei váltja ki, ami a deficiens egyén korai halálát okozza.

Saját kutatásaim középpontjában egyrészt a komplementrendszer működésének elindításában fontos C1q és MBL fehérjék, valamint a központi szerepet játszó C3 molekula immunsejtek működésére gyakorolt hatása áll. Az érdekel elsősorban, hogy a veleszületett immunrendszer egyik legfontosabb humorális elemének komponensei hogyan befolyásolják az adaptív immunrendszer működését, és miként szabályozzák az adaptív immunválasz megindításában nélkülözhetetlen dendritikus sejtek funkcióit.

A dolgozatban részletesen beszámolok azokról a vizsgálatokról, amelyekben a C1q és az MBL komplementfehérjék receptorainak megjelenését és immunsejtek működésére gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Bemutatom azokat az eredményeinket, melyek a C3 komplementfehérje fragmentumainak kovalens-fixációjának és receptor-közvetített kötődésének körülményeit, valamint a kötődés funkcionális hatását bizonyítják emberi dendritikus sejtek érésének, differenciálódásának folyamatában. Beszámolok továbbá azokról a kutatásainkról, amelyekben komplementfehérjék hatásását tanulmányoztuk az AIDS kialakulásáért felelős HIV-1 fertőzés során. Vizsgáltuk a fertőzés hatását monociták és makrofágok C3 termelésére, valamint az aktiválódás során keletkező C3-fragmentumok kötődésének következményeit dendritikus sejtek működésére. Tanulmányoztuk továbbá a dendritikus sejtek CR3 komplementreceptorának jelentőségét a fertőzés kialakulása során, a fagocitózis folyamatában. Végül bemutatom azokat az eredményeinket is, melyben a C5aR és a CR3 szerepét bizonyítottuk a HIV fertőzés során [4, 5].

## **2. IRODALMI HÁTTÉR**

### **2.1 A komplementrendszer működése**

A komplementrendszer a vérben és egyéb testnedvekben funkcionálisan inaktív formában jelenlévő fehérjerendszer. A több mint 40 komponensből álló kaszkárendszer aktivációja három úton; a klasszikus, a lektin-függő és az alternatív úton történhet (*1.ábra*). A komplementrendszer az immunrendszer legősibb és egyben

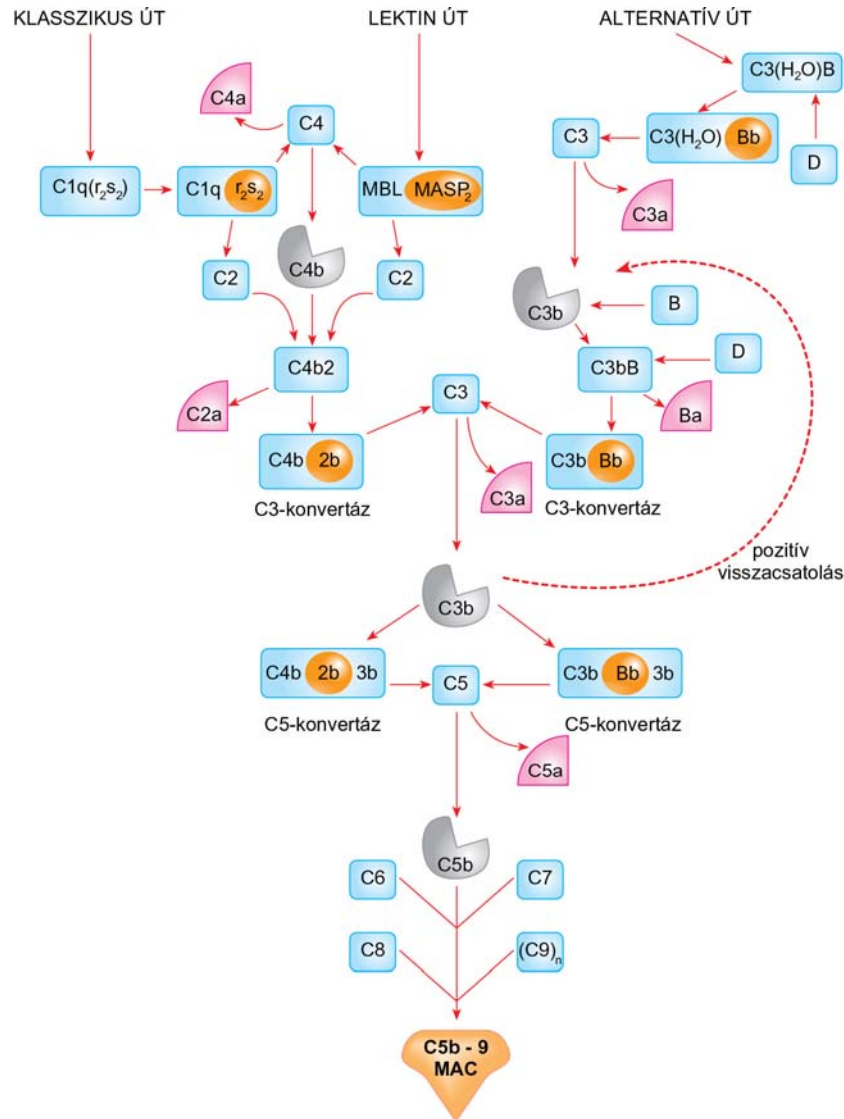
leghatékonyabb effektor-mechanizmusa, melynek egyes elemei az evolúció során már a tüskésbőrűekben megjelennek. Az antigén eltávolítása mellett számos komplementfehérje és azok receptorai (CR) szabályozó szerepet is betöltenek az immunsejtek - köztük a T- és a B-sejtek – működésében. Így a komplementrendszer működése számos pontjában összekötő kapocsként is szolgál a veleszületett és az adaptív immunrendszer között.

A *klasszikus út* aktivációját elindító C1 komponens  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokkal stabilizált makromolekula. A C1-komplexet három alegység alkotja: a C1q felismerő molekula és az enzimatis aktivitással rendelkező C1r és C1s dimerek [6]. A C1q aktiválódását elsősorban az immunkomplexben lévő IgG illetve IgM molekulákkal való kölcsönhatása váltja ki. Az antigénnel való kapcsolódás eredményeként lehetővé válik, hogy két (vagy több) Ig molekula Fc-része kölcsönhatásba lépjen a C1-komplex C1q-alegységének globuláris részeivel. Ezt követi a  $\text{C1r}_2\text{-C1s}_2$  alegységek enzimatis aktivitásához szükséges sztérikus átrendeződés, ami a kaszkád klasszikus aktivációját eredményezi. A C1s-nek két szubsztrátja van: a C2 és C4 molekula. E két komplementkomponens aktiválódása során kialakul a C4b- és C2b-fragmentumokból álló, a C3 molekula hasítására képes enzimkomplex, az aktív C4b2b\*, a klasszikus út C3-konvertáza. A C4 és a C2-molekulákból lehasadó C4a- és a C2a-peptidek a környezetbe diffundálnak és fontos biológiai aktivitásuk van. A C3 komponens aktiválódása eredményeként keletkező C3b-fragmentum a C3-konvertáz mellé kötődve létrehozza a klasszikus út C5-konvertáz enzimét (C4bC2bC3b\*). Ezután a C5 molekula hasításával a komplementrendszer aktiválódása közös útra terelődik, függetlenül attól, hogy milyen módon indult el a kaszkád.

A *lektin úton* történő aktiválást elsősorban a baktériumok falát alkotó szénhidrátok indítják el, melyek a szérumban jelenlévő mannózkötő lektinhez (MBL) kötődve aktiválják az azzal komplexet alkotó szerin-proteázokat (MASP). Az MBL-MASP komplex a C4 molekula hasítására képes. E lépés után a klasszikus útban folytatódik a lektin-függő aktiváció.

Az *alternatív utat* elsősorban olyan patogének aktiválják, melyek külső membránja szíálsavban szegény. Az ilyen felületek teszik lehetővé a szérumban kis mennyiségben mindig jelenlévő, a vízmolekulák által „autokatalízissal” aktivált C3(H<sub>2</sub>O) lekötődését. A  $\text{Mg}^{2+}$  ionok jelenlétében a C3(H<sub>2</sub>O)-hoz kötődő B-faktort a D-enzim aktiválja, aminek eredményeként kialakul a a C3 hasítására képes szolubilis

C3(H<sub>2</sub>O)Bb\* enzim. Ez az ún. „tick-over” mechanizmus vezet el ahhoz a pozitív visszacsatolási körhöz, amelyben a C3b mellé kötődő Bb-fragmentum kialakítja az alternatív út C3-konvertázát, a C3bBb\*-ot.



1.ábra A komplementrendszer aktiválódásának útjai.  
(Forrás: Immunológia Szerk: Erdei Anna, Medicina, 2012.)

Ezután a kaszkád közös úton folytatódik és a felszínre kötődő újabb komplementfehérjék a C5 molekula hasításakor keletkező C5b, majd a C6, C7, C8 molekulák és a C9-polimerizátum alakítja ki a C5b-9 *membránkárosító komplexet* (MAC). A komplex kialakulása során a C5b-C6 és -C7 kölcsönhatása olyan szerkezeti átalakulást eredményez, amely hidrofób régiók feltárulásához vezet, és lehetővé teszi, hogy a C5b67-komplex a célsejt membránjába süllyedjen, ami azonban nem elegendő a



sejtek lízishez. Ezután a C8 molekula a C5b67 komplexhez kapcsolódik és ennek következtében mintegy 10 nm átmérőjű pórus alakul ki a membránban, mely a magvatlan vörösvértest líziséhez elegendő. A hatékony lízishez feltétlenül szükséges a kaszkád utolsó lépése, melyben számos C9 molekula kapcsolódik a C5b678-komplexhez. Az így kialakuló MAC-ben 10-16 C9 fehérje polimerizálódik, ami egy 70-100 nm átmérőjű pórust hoz létre a membránban. Ennek következtében ionok és molekulák távoznak a célsejtből, ami magvas sejtek, illetve mikrobiális antigének komplement-mediált lízisét okozza.

Mivel a kaszkád számos pontján megsokszorozódik az aktív molekulák száma, rövid idő alatt sok biológiailag aktív fragmentum keletkezik. Ezért könnyen fékezhetetlenné válhat a reakció, amit azonban többféle szabályozó működés akadályoz. Ezek mellett a kóros komplementaktivációnak gátat szab az is, hogy a legtöbb komponens féléletideje nagyon rövid. A szervezet saját sejtjeinek védelmét a nemkívánatos homológ komplementaktivációval szemben számos regulátorfehérje biztosítja. A komplement regulátorfehérjék (CRP) közül némelyek szolubilisek, mások membránkötött molekulák. A család több tagjában kimutatható a jellegzetes SCR domén (*Short Consensus Repeat* vagy CCP: *Complement Control Protein*). Az SCR egységek kb. 60 aminosavból álló, két diszulfid-híddal stabilizált struktúrák, melyek aminosav sorrendje homológ. A CRP fehérjék a komplementaktiválódás különböző pontjait blokkolva képesek megakadályozni a kaszkád elszabadulását, a saját sejtek, szövetek károsítását.

## 2.2 Komplementreceptorok jelentősége az immunválasz során

A különböző *komplementreceptorok* számos immunsejt felszínén jelen vannak és sokoldalú biológiai működést látnak el (*1. táblázat*). Az antigén felszínéhez kovalensen kötődött C3b, C3d és iC3b fragmentumok ligandumai a *CR1*, *CR2*, *CR3* és *CR4* komplementreceptoroknak, és így az azokat hordozó sejtekhez kapcsolódva számos fontos sejtfunkciót szabályoznak.

A *CR1* (*CD35*) elsősorban C3b fragmentumokkal reagáló komplementreceptor, amely egyetlen polipeptid láncból áll [7]. B sejteken már korai fejlődési szakaszban megjelenik, follikuláris dendritikus sejteken (FDC) szerepe van a memória fenntartásában. Humán B limfociták esetében a CD35 inhibitor jelet közvetít [8]. A

monocitákon, makrofágokon és neutrofil granulocitákon kifejeződő CR1 a fagocitózisban játszik szerepet. Ember esetében a vérben lévő CR1 mintegy 90 %-ban a vörösvértesteken található; az eritrociták e receptorok közvetítésével kötik meg a komplementtel opsonizált immunkomplexet, amit azután a májba szállítanak, ahol a Kupffer-sejtek lebontják azokat. Mindemellett ez a sejtmembrán-fehérje a kaszkád működésének szabályozásában is részt vesz, fontos gátló szereppel is bír.

<i>Elnevezés (CD)</i>	<i>Receptor család</i>	<i>Legfontosabb ligandum</i>
<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>	Opiátreceptor	C3a
<b>C5aR</b> (CD88)	Opiátreceptor	C5a
<b>cC1qR</b> (CRT /CD91)	Kollektin receptor	C1q kollagén régió
<b>CR1g</b>	Ig superfamilia	C3b, iC3b
<b>MBLR</b>	?	MBL

1. táblázat Komplementreceptorok típusai, ligandumuk.

A *CR2-t* (CD21) szintén egyetlen polipeptid lánc alkotja, elsősorban B limfocitákon és FDC-n fejeződik ki. Hízósejtek esetében is kimutatták a CR1 és CR2 jelenlétét; mukóza-típusú hízósejteken mindkettő [9], míg a szeróza-típusú sejteken eredményünk szerint csak a CD21 expresszálódik [10]. A CR1 és a CR2 T és B limfocitákon egyaránt kifejeződik, és fontos regulációs hatással bír [11].

A heterodimér *CR3* és a *CR4* molekulák egyaránt a  $\beta_2$ -integrinek családjába tartoznak. A CR3 (CD11b/CD18) és ligandumai közötti reakció  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Mg}^{2+}$ -ionokat igényel. A CR4 receptor CD18 és CD11c láncból áll. A CR3 és CR4 a komplementfragmentumokkal opsonizált részecskék fagocitózisában játszik szerepet [12].

Nemrég azonosították az Ig-domént tartalmazó CR1g receptort, melynek fő liganduma szintén az iC3b aktivációs fragmentum. A CR1g elsősorban a máj Kupffer-

sejtjein fejeződik ki; e sejtek elsődleges C3 receptora, melynek legfontosabb szerepe a vérbe kerülő patogének gyors kiszűrése.

A komplementaktiváció során a C3 és a C5 molekula N-terminális végéről lehasadó, anafilatoxikus hatású C3a és C5a peptideket a *C3a* és a *C5a receptorok* (C3aR, C5aR-CD88) kötik meg, melyek a hét transzmembrán régiót tartalmazó opiátreceptorok családjába tartoznak. A két receptor szerkezete hasonló, de lényeges különbség van az extracelluláris ligandum-kötő részben.

Több C1q-kötő sejtmembrán struktúrát leírtak, köztük a kollagénszerű résszel reagáló *cC1qR*-t és a globuláris részt megkötő *gC1qR*-t. Mindkét receptor-típus megjelenik fagocitákon; a cC1qR-nak fontos szerepe a C1q-val opszonizált apoptotikus sejtek felvétele. Szintén kötődik az apoptotikus sejtekhez az MBL, ami kollagénszerű doménjével feltehetően egy C1qR-től eltérő receptorhoz kapcsolódik a fagocitákon [12].

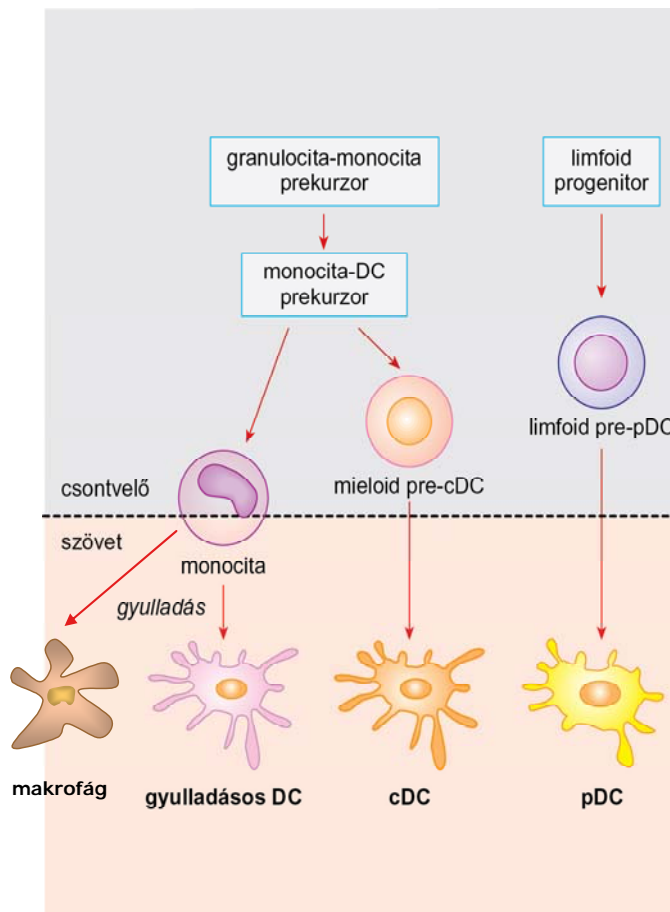
A kutatásaink középpontjában álló makrofágok és DC-k számos komplementreceptort fejeznek ki, amelyek az antigén feldolgozásában és a sejtaktivációs folyamatokban fontos szerepet játszanak.

### 2.3 Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek funkciói

A veleszületett immunrendszer sejtjei közül a monociták, a makrofágok, a neutrofil granulociták és a dendritikus sejtek *fagociták*, vagyis képesek különböző típusú és méretű partikulumok bekebelezésére. Közülük a makrofágokat és a neutrofileket elsődleges funkciójuk alapján *hivatásos fagocitáknak* is nevezzük. A monociták és az azokból differenciálódó makrofágok ún. mononukleáris fagociták. Ezek a mieloid eredetű sejtek az egyedfejlődés során először a szikzacskóban mutathatók ki. A fejlődés korai szakaszában megjelenik felszínükön a mieloid eredetű sejtekre jellemző CD11c marker, továbbá a makrofág kolónia stimuláló faktor-1 receptora (Csf-1R/M-CSFR) és a mannóz receptor (MR) [13].

A hemopoézis során a *dendritikus sejtek (DC)*, a *monociták (Mo)* és a *makrofágok (M)* differenciálódása szorosan összekapcsolódik (2. ábra). A hemopoetikus őssejtből (HSC) kiinduló mieloid és limfoid fejlődési útvonalon egyaránt kialakulnak DC-k. A mieloid fejlődési út során a mieloid progenitor sejtéből granulocita-monocita közös prekursor keletkezik a csontvelőben, amelyből az elkötelezett monocita-DC sejtek fejlődnek. A monocita-DC prekursorokból (MDP) kétféle DC keletkezik; egyrészt a

konvencionális DC (cDC), másrészt a gyulladási stimulus hatására monocitákból képződő gyulladási DC [14]. A cDC-k közé sorolhatók a migratórikus DC-k (Langerhans sejtek, a dermális DC-k, vér DC-k) valamint a szöveti DC-k (líp DC-k, a tímusz DC-k, a máj DC-k), ezek fő feladata az antigén felvétele, feldolgozása és prezentációja. A limfoid fejlődés során szintén kialakulnak DC-k, ezek a limfoid progenitorból keletkező pre-pDC-kből kialakuló plazmacitoid DC-k (pDC-k). A szöveti mikrokörnyezetben jelenlévő virális antigének hatására a pDC-k aktiválódnak, differenciálódnak, és nagy mennyiségben termelnek I. típusú IFN-okat. A csontvelői érést követően a mieloid és a limfoid pre-DC-k a vérkeringés útján a perifériás szövetekbe vándorolnak, ahol további differenciálódáson mennek keresztül.



2. ábra Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek érési folyamata  
(Forrás: Immunológia, Szerk: Erdei Anna, Medicina, 2012. alapján)

A makrofágok a monocitákból alakulnak ki és a perifériás szövetekben fejeződik be differenciálódásuk. Kisebb részük a vérerek falához tapadva, mint endotheliális makrofág mutatható ki. A szöveti makrofágok több típusa ismert; a máj Kupffer sejtjei, melyek a szervezet összes makrofágjának 90%-át képviselik, kulcsfontosságú szerepet töltenek be az antigének keringésből való kiszűrésében, a szervezet méregtelenítésében, továbbá számos fehérjét – köztük komplementfehérjéket, akut-fázis proteineket – állítanak elő. Szintén helyben maradó (szesszilis) makrofágok a kötőszövetek hisztiocitái, a vese mezangiális makrofágjai, a csontszövet oszteoklasztjai és az agyban található mikroglia sejtek. Egyes makrofágok nem maradnak a differenciálódás helyszínén, hanem vándorolnak a szervezetben. Ilyenek a hasüregben előforduló peritoneális makrofágok és a tüdőben kialakuló alveoláris makrofágok. A szövetekben előforduló nyugvó makrofágok mellett kimutathatók aktivált fenotípusú sejtek is, amelyek a szöveti stimulusok következtében gyorsan aktiválódnak. Ugyanakkor a nyugvó szöveti makrofágok is érzékenyen reagálnak a mikrokörnyezet veszélyt jelző szignáljaira, mint pl. LPS, különböző TLR-ligandumok, IFN $\gamma$ , IL-4 vagy IL-13.

A monociták és a makrofágok rendelkeznek valamennyi fagocitára jellemző receptorral. A sejtmembránban és a citoplazmában jelenlévő TLR-ek, C-típusú lektin receptorok, mannóz-receptor (MR) számos patogén elsődleges receptorát jelentik. Az *opszonofagocitotikus receptorok*; vagyis az Fc $\gamma$ R-ok és a komplementreceptorok (CR1, CR3, C1qR, MBL-R, CR1g) az ellenanyaggal ill. komplementfehérjékkel bevont, *opszonizált* antigének felvételét biztosítják. Számos adhéziós molekula (pl. LFA-1, CR3) található a monociták és a makrofágok felszínén, ami lehetővé teszi kapcsolódásukat más sejtekhez és az extracelluláris mátrixhoz egyaránt.

*A makrofágok elsődleges feladata a kórokozók bekebelezése és eliminálása. A fagocitózis fontos effektor-mechanizmusa a veleszületett és az adaptív immunitásnak egyaránt; a kórokozók és az idegen anyagok eliminálásával a szervezet védelmét biztosítja. A makrofágok különösen érzékenyen reagálnak a gyulladási folyamatok különböző stimulusaira. Ezek a stimulusok eltérő mechanizmusok révén eltérő funkciókra specializált fenotípusok kialakulásához vezetnek. A makrofágok leghatékonyabb aktivátora az IFN- $\gamma$ , ami patogén jelenlétében gyulladási citokinek termelését és citotoxikus választ indukál (ún. *M1* makrofágok). Az IL-4 (IL-13) által stimulált makrofágok a sejtes törmelék eltakarításában, szövetek újraképzésében és a regenerációban játszanak szerepet (ún. *M2* makrofágok), [15].*

A fertőző, nem-saját elemeket a nem fertőző struktúráktól a veleszületett immunrendszer sejtjei; a monociták/makrofágok, a dendritikus sejtek, a granulociták (neutrofil, eozinofil és bazofil sejtek), a hízósejtek és a természetes ölüsejtek (Natural Killer, NK) képesek megkülönböztetni. Ezek a sejtek nem-klonálisan megjelenő receptorok közvetítésével olyan molekuláris mintázatokat ismernek fel, amelyek mikróbák felszínén jelennek meg, de a saját sejtekre nem jellemzők. Ezek a molekulák alkotják a patogénnel asszociált molekula mintázatot (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP), míg az ezek felismerésére képes receptorok az ún. (*Pattern Recognition Receptors*, PRR). Számos más patogénre jellemző molekula mellett ilyen a Gram<sup>-</sup> baktériumok falában található lipopoliszaharid (LPS). A szervezetben nap mint nap nagy mennyiségben keletkező apoptótikus sejtek eltakarítását elsősorban a makrofágok végzik, megakadályozva így a saját struktúrák által indukált autoimmun folyamatok kialakulását.

A makrofágok aktivációját követően felszínükön megnő a patogént felismerő receptorok, majd az MHC molekulák - főként az MHCII - mennyisége. A sejtek lizoszómái sokféle enzimet, antimikrobiális anyagot, reaktív oxigén- és nitrogén-tartalmú molekulát (ROI, RNI) raktároznak, ami a bekebelezett antigén lebontását biztosítja. A felvett patogén az endolizoszómában degradálódik, és ezzel párhuzamosan az antigénből származó peptidek az MHCII-molekulákhoz kapcsolódva bemutatásra kerülnek a sejt felszínén. Az aktivált sejtek citokinek és kemokinek termelésével további immunsejteket stimulálnak. A makrofágok a DC-vel és a B-sejtekkel együtt az ún. hivatásos antigénbemutató sejtek közé tartoznak.

Szervezetünkben a dendritikus sejtek (DC-k) a leukociták mintegy 1%-át teszik ki, és az egészséges szervezetben az agy kivételével valamennyi szervünkben kimutathatók [16, 17]. Nagy mennyiségben fordulnak elő a patogén támadásnak kitett helyeken, úgymint a légutak és a tápcsatorna nyálkahártyája továbbá a bőr és a bőr alatti területeken. Az éretlen DC-k (imDC-k) a környezetükből folyamatosan veszik fel pinocitózissal, receptor mediált endocitózissal és fagocitózissal az oldott részecskéket, partikulumokat, valamint a megváltozott vagy apoptótikus sejteket. Szöveti előfordulásuk, származásuk, aktiváltságuk, funkcionális tulajdonságaik alapján az egyik legheterogénebb sejtpopulációt jelentik.

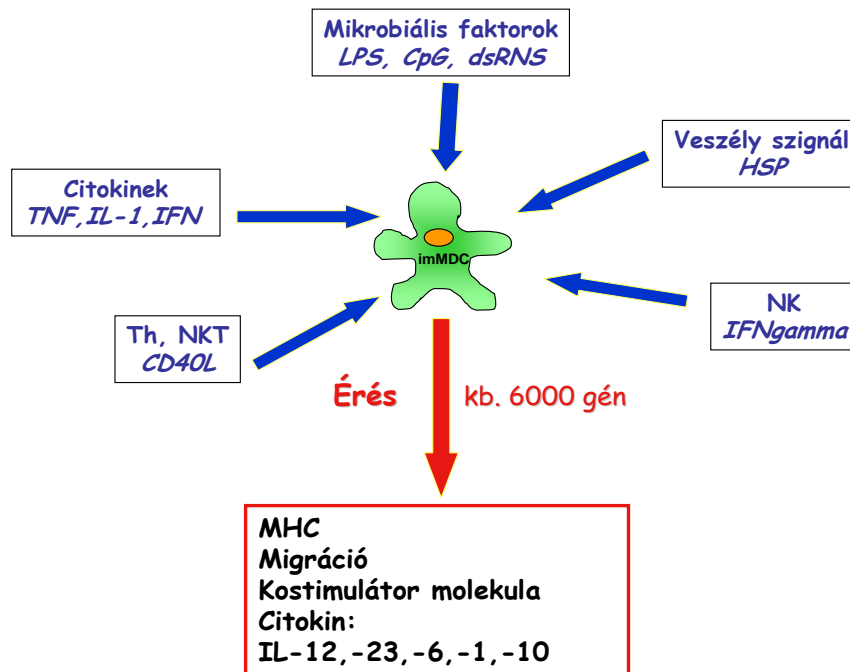
Jelenleg a leginkább elfogadott felosztás szerint a dendritikus sejtek három nagy csoportba sorolhatók; ezek a *pre-DC-k*, a *konvencionális DC-k* és a *gyulladásos DC-k* [14]. A *pre-DC-k* nem rendelkeznek érett DC morfológiával, kismértékben

osztódóképesek, funkcionális aktivitásuk közepes. Ide sorolhatók a monociták és a pDC-k. A *konvencionális DC-k (cDC-k)* rendelkeznek valamennyi DC-re jellemző morfológiai és funkcionális jeggyel. A cDC-k további csoportjai a *migratórikus DC-k* és a *limfoid szövetek rezidens DC-i*. A migratórikus DC-k a klasszikus DC-k megfelelői, vagyis folyamatos őrjáratot végeznek a perifériás szövetekben, a felvett antigént a nyirokcsomókba szállítják és antigént prezentálnak a T-sejteknek. A migratórikus DC-k jellemző típusai a Langerhans sejtek és a dermális DC-k. A limfoid szövetek rezidens DC-i nem migrálnak, hanem az adott nyirokszervben maradnak, ahol idegen és saját antigének bemutatását végzik, ilyen sejtek például a tímusz vagy a lép cDC-i. A DC-k harmadik csoportját alkotják a *gyulladásos DC-k*. Ezek a sejtek nyugvó, nem-gyulladásos körülmények között nincsenek jelen, de antigénstimulust követően nyomban megjelennek. Legjellemzőbb példa a gyulladásos DC típusra a TNF- és iNOS-termelő, ún. *TipDC*. Gyulladásos környezetben a monocitákból TipDC-k differenciálódnak.

A mieloid DC-k számos patogén eredetű anyag - pl. LPS - vagy gyulladásos folyamatokat befolyásoló citokinek - pl. TNF- $\alpha$  - hatására aktiválódnak és differenciálódnak. Az aktivációs stimulus hatására kialakuló érett dendritikus sejtek (maDC) a nyirokcsomóba vándorolnak. Az érés és az aktiváció több ezer gén átíródását stimulálja, ami a sejtek jelentős funkcionális átalakulásához vezet. Az maDC-k antigénfelvétele jelentős mértékben csökken, viszont fokozódik a felvett anyagok lebontása és az MHC molekulák szintézise [18]. Az antigénbemutató funkció során az érett DC-k feldolgozzák és MHC molekuláik segítségével prezentálják az antigénből származó peptideket. A nyirokcsomóban elsősorban naív T limfocitákat aktiválnak [16]. A felszínükön expresszált kostimulátor és adhéziós molekulák segítik a kapcsolat kialakítását az antigén-specifikus T-sejtekkel, citokinjeikkel is elősegítve azok aktiválását, effektor T-limfocitákká történő differenciálódását.

A DC-k rendkívül érzékenyen reagálnak a környezetből érkező veszély szignálokra (pl. HSP), mikrobiális faktorokra (pl. LPS, CpG, dsRNS), amit az tesz lehetővé, hogy számos PRR-t hordoznak felszínükön; mint pl. a scavenger-receptorok, a C-típusú lektin receptorok, vagy a Toll-like receptorok [16]. Emellett érzékelik az antigén által aktivált immunsejtekből származó jeleket is, mint pl.: CD40L, IFN $\gamma$ , gyulladásos citokinek. Az immunglobulinnal és a komplement-fragmentumokkal opsonizált partikulumok a DC-k felszínén FcR-ekkel és CR-ekkel létesítenek kapcsolatot. Az aktivációs stimulusok a DC-k érését idézik elő, aminek során több ezer gén íródik át. Az érett DC-ken megnő az MHC molekulák és a kostimulátorok

expressziója, változik a sejtek migrációs aktivitása és különféle citokineket termel a sejt (3. ábra), [19].



3. ábra A dendritikus sejtek aktivációját kiváltó stimulusok és azok hatásai

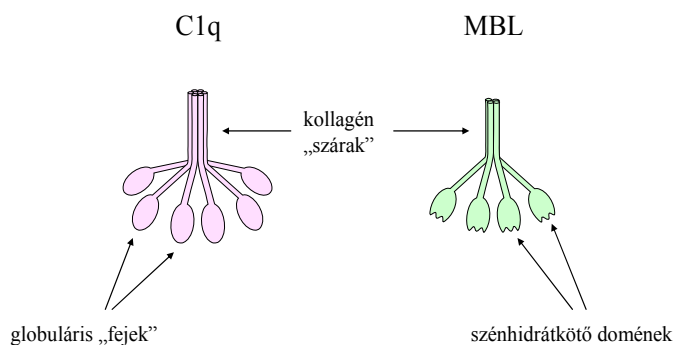
A DC-k által expresszált kostimulátor molekulák valamint a mikrokörnyezet citokin miliője és a T limfociták aktiváltsági állapota meghatározza a T-sejt válasz irányultságát. A DC-k az aktiváció módjától függően különböző citokineket termelnek, amelyek Th1 vagy Th2 irányú differenciálódást váltanak ki [20]. Ennélfogva az adott antigén a DC-k stimulálása révén meghatározza a kialakuló immunválasz típusát, mivel a termelődő IL-12 elsősorban Th1 választ, míg az IL-4 döntően Th2 választ indukál [14]. A DC-k fontos szerepet játszanak a tolerancia fenntartásában is; nyugvó körülmények között, nem gyulladós közegben regulátor szerepet töltenek be. Újabb kutatások eredményei azt mutatják, hogy bizonyos regulátor DC-k (DCreg) által közvetített jelek szükségesek az IL-10-et és TGF- $\beta$ -t nagy mennyiségben szekretáló Treg sejtek aktiválásához [21]. Kimutatták azt is, hogy immobilizált IgG Fc $\gamma$ RII közvetített módon DC differenciálódást indukál [22].



## 2.4 A C1q és az MBL komplementfehérje és receptoraik immunsejteken

Ismert, hogy az immunkomplexek a C1 molekula-komplex aktivációja révén a komplementkaszád klasszikus útját indítják el. Ugyanakkor számos patogén és az apoptotikus sejtek közvetlenül is képesek megkötni a C1q-t és így aktiválni a komplementrendszer [23, 24] A lektin utat az MBL molekula aktivációja indítja el. A komplementaktiválást a klasszikus, illetve a lektin úton elindító molekulakomplexek sok szempontból hasonlóak egymáshoz (4. ábra).

A C1q 460 kDa tömegű komplementfehérje, szérumkoncentrációja 70 µg/ml, szintézisében a májnak és a fagocitarendszer sejtjeinek van szerepe [25, 26]. A C1q molekula 18 polipeptidláncból épül fel, melyek hármásával (A-B-C láncok) 6 „köteggé” fonódnak össze [6]. A láncok N-terminális részén, egy rövid, a láncok kapcsolódásáért felelős cisztein tartalmú szakasz után kb. 130 aminosav hosszú kollagénszerű motívumokat (Gly-X-Y) tartalmazó ún. kollagén rész következik (cC1q). A polipeptidláncok C-terminális végein mintegy 80 aminosavból álló globuláris fejek találhatóak (gC1q domén), ezeken keresztül kötődik a C1q az Ig molekulák Fc doménjéhez. Az ezt követő sztérikus változások hatására megtörténik a C1-komplex aktiválása, az enzimatis aktivitású C1r és C1s alegységek közvetítésével [27].



4. ábra A C1q és az MBL molekula hasonlósága.

A C1q és MBL molekula hasonló szerkezeti elemeket tartalmaz; az N-terminális részt a kollagén szár alkotja, az C-terminális végen a C1q-ban Ig felismerő globuláris fejek, az MBL-ben szénhidrát felismerő globuláris domének találhatóak.

A C1q és az MBL molekulában egyaránt a kollagén-„szárakhoz” kapcsolódnak a szerin-észteráz aktivitású fehérjék: a C1r és a C1s, illetve a MASP1 és a MASP2 [28]. A C1q és az MBL-molekulák N-terminális, kollagén-szerű szakaszaik révén a különböző sejtek membránján kifejeződő receptorokhoz kötődhetnek. A C1-komplex aktiválódásának feltétele, hogy a C1q alegység globuláris „feji” része legalább két Ig-Fc részhez kapcsolódjon. Ezt legalább kettő, kellő közelségben lévő IgG, ill. egy IgM molekula teszi lehetővé, melyek konstans szakaszain az antigénhez való kötődést követően konformációváltozás történik. A komplexhez kötődő C1q molekulában olyan térszerkezeti változások történnek, melyek eredményeként a C1r-alegység aktiválódik. Ez az enzim a C1s komponenst aktiválja, melynek szubsztrátjai a C2 és C4 molekulák. A kaszkádot ebben a kezdeti fázisban a C1r- és a C1s komponensekkel kovalens komplexet alkotó C1Inh szabályozza. Az MBL-MASP komplex a kórokozók szénhidrát komponenseihez kötődik; ez a kölcsönhatás aktiválja a komplexet, melynek eredményeként szintén a C2 és a C4 komponensek hasítódnak C2a- és C2b-, valamint C4a- és C4b-fragmentumokra.

A több mint tíz tagból álló C1q fehérje-családba sorolt molekulákra (köztük pl. VIII- és X -kollagén, multimerin, precerebellin, EMILIN-1) jellemző a C-terminális gC1q domén jelenléte, és többségükben kimutatható a Gly-X-Y aminosav-szakaszokból álló kollagén domén [2].

Az MBL mint szolubilis PRR, a kollektinek (kollagén domént tartalmazó C-lektin) családjába tartozik más fehérjékkel együtt, mint pl. a Surfactant protein-A és -D (SP-A, SP-D) is. A kollektinek  $\text{Ca}^{2+}$ -függő szénhidrát-kötőhelyet is tartalmaznak (CRD) [29], és szerkezetükre jellemző a trimer, vagy multimer szerkezet, melyben az alegységeket az N-terminálisan található ciszteinek között létrejövő diszulfid-hidak kapcsolnak össze. Az N-terminális Gly-X-Y tripleteket tartalmazó kollagén-rész egy „nyaki” régióban folytatódik, amit a C-típusú szénhidrát domén (CRD) zár a C-terminálison [30]. Jóllehet a C1q strukturálisan homolog szerkezetű a kollektinokkal, mégsem soroljuk ebbe a családba mivel CRD domént nem tartalmaz. Az MBL-hez hasonló szerkezetűek a fikolinok, amelyek azonban a kollagén- és nyaki régió kívül fibrinogén-szerű domént is tartalmaznak a C-terminális végükön. Az MBL molekula CRD doménjével N-acetilglukózaminhoz, glukózhoz, fukózhoz és mannánhoz kapcsolódik a C3 és C4 atomok OH csoportjai révén [31]. Az MBL fontos szerepet játszik különböző patogének felismerésében, de képes apoptózison átesett sejtekhez kötődni, elősegítve azok fagocitózisát [32].

Az MBL szérumkoncentrációja nagy egyéni különbségeket mutat, ami az MBL-gén polimorfizmussal magyarázható. Az átlagos MBL szint 500 ng/ml, viszont a népesség mintegy 10 %-ban ez az érték nem éri el a 100 ng/ml koncentrációt, ami MBL deficienciát jelent [33]. Az alacsony MBL szint ezeknél az egyéneknél nagyobb kockázatot jelent a fertőző és autoimmun betegségekkel (pl. SLE) szemben. A C1q és az MBL egyaránt meghatározó szerepet játszik az apoptotikus sejtek feldolgozásában, ezért ezeknek a fehérjéknek az öröklött deficienciája autoimmun betegségek kialakulásához vezethet. Például az SLE kialakulásában a C1q deficiencia [34], valamint az MBL deficiencia [35, 36] egyaránt meghatározó szerepet játszik.

A C1 komplex ellenanyag-függő illetve ellenanyag-független aktivációja a C1r és C1s alegységek aktiválódásához majd disszociációjához vezet, miközben a C1q az aktivátor fészínhez kötve marad. A C1q is számos sejtípushoz képes kötődni, így dendritikus sejtekhez, neutrofil granulocitákhoz, monocitákhoz, limfocitákhoz, vérlemezkékhez és endotél sejtekhez [37, 38]. A kötődésért felelős domén, ill. domének azonosítása ellentmondásos eredményekhez vezetett. Számos lehetséges struktúra merült fel mint potenciális C1q receptor; köztük például a fagocitákon leírt fagocitotikus receptor (C1qRp), a cC1qR és gC1qR mellett [39]. A C1qRp sejtmembrán molekulát mint C1q- MBL- kollagén részt kötő receptort írták le, de későbbi vizsgálatok nem igazolták a molekula C1q-kötő képességét [40].

Jelenleg a legszélesebb körben elfogadott a kollagén C1q-receptor (cC1qR); a sejt felszíni kalretikulín CD91-el asszociált formája [41]. Ghebrehiwet és munkatársai beszámoltak a gC1q-doment felismerő gC1qR-ról is [42]. Kimutatták, hogy human monocita eredetű DC-k kétféle C1q-receptort fejtenek ki; gC1qR and cC1qR [42]. A tanulmány szerint a DC-k érése során mindkét receptor sejt felszínén mért mennyisége csökken [43]. Ebben a tanulmányban Nauta és munkatársai eredményeivel [44] szemben azt találták, hogy éretlen monocita eredetű DC-k nem fejtenek ki sem cC1qR-t, sem CD91-t.

A C1q és az MBL strukturális homológiája alapján (4.ábra). feltételezték, hogy a két fehérje ugyanahhoz a receptorhoz képesek kapcsolódni. Ezzel a feltételezéssel ellentétben humán monocitákon és monocitoid sejt vonalon végzett kereszt-gátlásos vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a két komplementfehérje különböző membránstruktúrához kötődik [45].

A komplementaktiváció során az antigénhez C1q és C3-eredetű fragmentumok kapcsolódnak, melyek az opsonizált antigént a különböző sejtek felszínén jelenlévő komplementreceptorokhoz irányítják. Így a C1q-val opsonizált apoptotikus sejtek a DC-k C1q-receptoraihoz kötődnek [23]. Ez a kölcsönhatás bekebelezéshez, a fagocita - pl. dendritikus sejt - éréséhez és aktiválódásához vezet. [12]. Továbbá igazolták azt is, hogy a C1qR ligandum-kötése az imMDC-k migrációját váltja ki, ami gyulladásos körülmények között a sejtek fertőzés helyszínére való mozgását segítheti elő [46]. Azt is kiderítették, hogy éretlen MDC-k jelentős mennyiségben szekretálnak C1q-t [25]. A C1q-val homológ szerkezetű MBL-ről kimutatták, hogy az apoptotikus sejtek feldolgozásának folyamatában meghatározó szerepe van [47].

## **2.5 A C3 komplementfehérje szerkezete, fragmentumai és ezek kovalens kötődése immunsejtekhez**

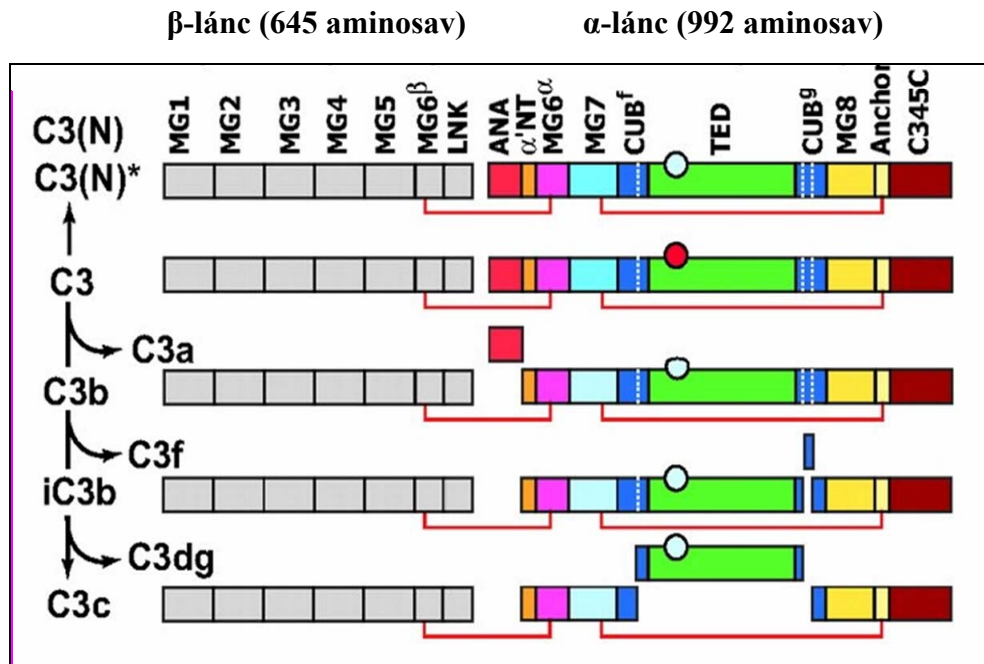
A C3 komplementfehérje a vérben 1.2–1.5mg /ml koncentrációban van jelen, egyben akut-fázis fehérje is. A különböző utakon aktiválódó komplementkaszád központi eseménye a C3 molekula C3-konvertáz általi hasítása. A proteolitikus úton keletkező C3b fragmentum az aktiváló felszínhez kovalensen kötődik, majd a további komponensek aktiválódása a kaszkád végigfutását és a membránkárosító komplex kialakulását eredményezi. A C3 aktiváció effektor működéseket is beindít; opsonikus fagocitózist indukál a C3b és további degradációs fragmentuma; a C3bi. A C3 hasítás utolsó terméke, a C3d illetve C3dg B-sejtek CR2-mediált aktiválásához vezethet. A hasítás első lépésében keletkező C3a-nak anafilatoxikus és kemotaktikus hatása van. A C3 molekula sokoldalú funkcióit biztosító különleges szerkezetét, limitált proteolízisét számos kutatócsoport vizsgálta (5.ábra). [48-51].

A komplementaktiváció káros következményeitől számos regulátorfehérje, többféle mechanizmus révén védi a saját sejteket. A C3b-hez kötődve a szolubilis H-faktor, a membrán-kötött CD55 (DAF, Decay Accelerating Factor) vagy a CR1 (CD35) a konvertáz komplex disszociációját okozzák. A H-faktor és a CD46 (MCP, Membrane Cofactor Protein) a C3b I faktor általi proteolitikus degradációját okozza, ami iC3b, C3c és C3dg fragmentumok kialakulásához vezet. Valamennyi komplementszabályozó fehérje felépítésében és több komplementreceptorban rövid ismétlődő alegységek; SCR domének vannak jelen.

A C3 szintézisét elsősorban a máj hepatocitái végzik, de ezen túl szinte valamennyi immunsejt képes szintetizálni ezt a komplementfehérjét [52]. A 19. kromoszómán található 42 kb nagyságú, 41 különböző exont tartalmazó génszakasz transzlációja során egy 5,2 kb érett mRNS keletkezik, melyből egyláncú fehérjeként íródik át a pro-C3 molekula. Ebből jön létre poszt-transzlációs módosítás eredményeként az  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncból álló, diszulfid-híddal összekapcsolt dimér forma. Ember esetében a C3 két polimorf formája ismert elektroforetikus mobilitás alapján: a C3S és a C3F, amelyek hemolitikus aktivitása hasonló. A C3S nagyobb gyakorisággal fordul elő, de földrajzi előfordulásukban különbség van [53].

A C3 molekula 13 doménből áll (5. ábra) [54]. A molekula szerkezeti vázát a  $\beta$ -lánc MG1-MG4 doménből álló gyűrűje, továbbá az MG5-MG6 és MG7-MG8 félgűrűk alkotják. A hatodik MG domén az  $\alpha$  és  $\beta$  lánc kialakításában is részt vesz. A  $\beta$ -lánc tartalmaz még egy, az MG6-ba beékelődött LNK (linker) domént, melyet követ a tetra-arginin, szekvencia, majd az anaphylatoxin (ANA) domén és az 'NT' szegmens, ami az MG6-ban folytatódik. A pro-C3 molekulából kihasad a 646–649 tetra-arginin, így jön létre a szekrécióra alkalmas, érett C3 molekula, amely  $\beta$ -láncból (1–645 aminosav) és  $\alpha$ -láncból (650–1641) áll [55]. A natív C3 molekula biológiailag inaktív. A C3 aktiválódása során egymást követő proteolitikus hasítások konformáció-változást okoznak a molekulában. A C3-konvertáz a molekula  $\alpha$ -láncát a 726-Arg és a 727-Ser között hasítja, eltávolítva az N-terminális végről az ANA domént (C3a). Így jön létre az új N-terminális; az  $\alpha$ 'NT-t, valamint a molekula két fragmentuma, a C3a és a C3b. Az ANA után következik az MG6 domain  $\alpha$  láncot alkotó része, majd az MG7 és MG8 domén. Az MG8 domént követő CUB domén (Complement subcomponents C1r/C1s Uegf and Bone morphogenic protein-1) tartalmazza a C3f fragmentumot, amely az iC3b képződéskor hasad ki az  $\alpha$ -láncból. A C3 aktiválódása során a C3b molekula jelentős konformáció-változáson megy keresztül, aminek következtében hozzáférhetővé válik a tioészter csoport, és így lehetővé válik a C3b molekula kovalens kötődése az aktiváló felszínen jelenlévő nukleofil csoportokhoz. A TED doménben lévő tioészter-kötés intaktságát a domén konformációja védi, és ezt a domént az MG2, MG8 és CUB domének tartják védett helyzetben a natív C3-ban. A TED (ThioEster Containing Domain) után következik a C-terminális végen a C345C domain, amely az MG7 doménnel kölcsönhatásban alakítja ki a molekulán belüli diszulfid-híd kötést. Az utolsó proteolitikus hasítás a CUB domén Arg-932 és Ser-933 között történik, ami a C3dg

fragmentum és a C3c fragmentum keletkezéséhez vezet, melyek közül az utóbbi, nagyobb fragmentum leválik az aktivátor felszínéről.

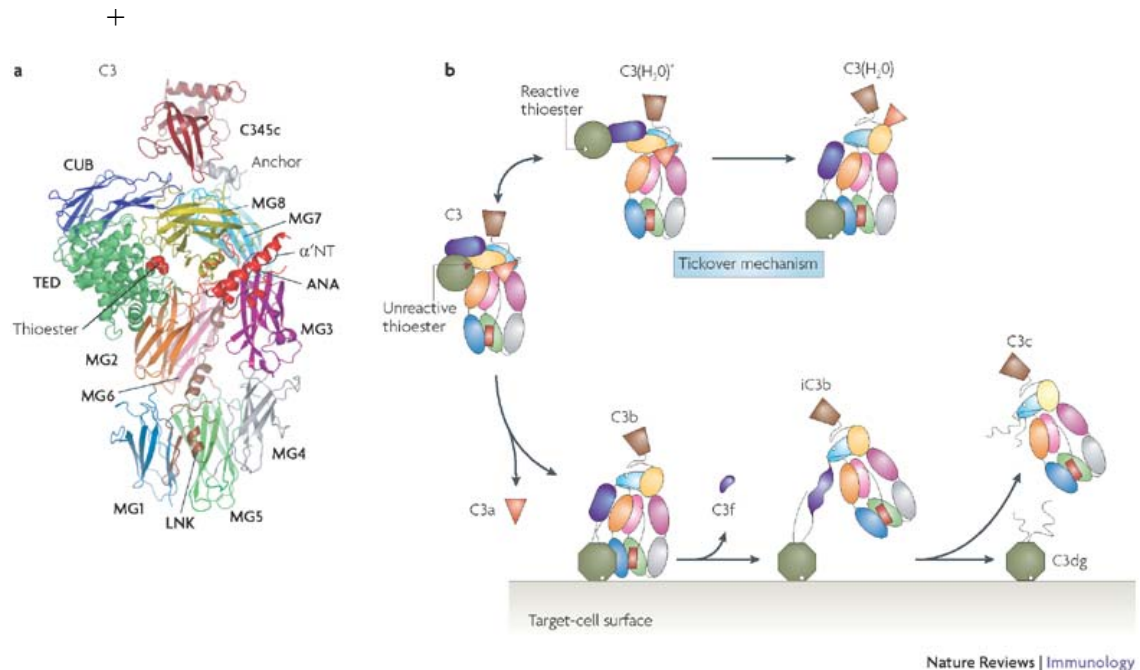


5.ábra A C3 komplementfehérje limitált proteolízise során keletkező fragmentumok. Az aktivált tioészter-csoportot piros kör jelzi a TED-doménben. Az aktiválódás során változatlan  $\beta$ -lánc doménjei szürke színűek. (Forrás: Nishida, Proc Natl Acad Sci, 2006.)

Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján ismertté váltak a C3 aktiválódását kísérő fimostrukturális és konformációs változások, amelyekkel a molekula sokoldalú biológiai funkciói magyarázhatók (6.ábra), [56]. A komplementaktiváció alternatív útjának elindításában kulcsszerepe van az ún. *Tick-over* mechanizmus során keletkező C3(H<sub>2</sub>O)-nak, melyről nem hasad le az ANA domén. A C3b-hez hasonló szerkezetű C3(H<sub>2</sub>O) képes megkötni a B faktort, kialakítva így az alternatív út C3-konvertáz enzimét [54, 57].

A C3 molekulából (187 kD) az ANA domén (9 kD) lehasítása után kialakuló C3b (180 kD) fragmentumok mintegy 10%-a kötődik csupán az aktiváló felszínhez észter- vagy amid-kötés által, a maradék 90% inaktiválódik. A korábban ismertetett konformáció-változás következtében újabb kötőhelyek alakulnak ki a C3b molekulában, és kialakulhat a C5 konvertáz, mely a kaskád folytatásához, majd a MAC kialakulásához vezet. Abban az esetben azonban, ha az I faktor hasítja a C3b molekulát, létrejön az iC3b (inaktivált C3b) fragmentum, ami a kaskád továbbvitelére már nem

alkalmas. Egy harmadik hasítási lépésben az iC3b-ből (178 kD) kiasad a C3c (137 kD) fragmentum, és az aktiváló felszínhez kötve marad a C3dg (40 kD) fragmentum. A C3 inaktiválását nukleofil reagenssel, pl. metil-amin (MA) elő lehet idézni, a C3-MA a továbbiakban kovalens kötődésre már nem képes.



6. ábra A C3 molekula szerkezete és konformációs változása aktiválódása során. (a) A C3 komplementfehérje térszerkezeti modellje az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -lánc 13 doménjének feltüntetésével. (b) A C3 kismértékű, spontán hidrolízise során  $C3(H_2O)$  alakul ki. A C3-konvertáz hasítása eredményeképpen C3a és C3b keletkezik, utóbbi szerkezete a  $C3(H_2O)$ -hoz hasonlít. A kovalensen kötött C3b további enzimatis hasítása a C3f és iC3b, végül C3c és C3dg fragmentum keletkezéséhez vezet.

(Forrás: Gros, Nat Rev Immunol. 2008.)

A komplementaktiváció során keletkező C3-fragmentumok megjelölik a targetet, amely azután az aktiválódó effektor reakciók révén kerül feldolgozásra, illetve eliminálásra fagocitózis vagy citotoxikus reakció során. A makrofágok számos komplementfehérjét, köztük C3-t is képesek előállítani [52, 58], továbbá a C3-fragmentumokkal opsonizálják a környezetükben lévő antigént („local opsonization”), ami azok hatékony fagocitózisához vezet [59]. Kimutatták, hogy az U937 monocitoid sejtek az általuk szekretált C3 molekulát elhasítják, és kovalensen megkötik [60]. A target felszínén kovalensen fixált C3-fragmentumok szerepét az ADCC reakció fokozása során szintén igazolták [61], továbbá bizonyították, hogy a C3-fragmentum által közvetített kapcsolat fokozza NK sejtek és limfociták citotoxikus reakcióját [62, 63]. A

C3 kovalens fixációját kimutatták a P815 egér mastocytomán is, és néhány egér sejtvonal esetében [64].

Számos kutató bizonyította a C3b kovalens kötődésének *in vivo* jelentőségét [49, 59, 65-67]. Humán B-sejteken bizonyították a CR2 szerepét az aktivált C3-fragmentum kovalens megkötésében [68, 69]. Mivel makrofágok, DC-k és eritrociták is képesek a C3-fragmentum kovalens kötésére, de nem expresszálnak CR2-t, ezek a sejtek más C3b-t fixáló struktúrát kell kifejezzenek. Bár az ismert, hogy a fragmentum az aktivátor felszínén lévő -NH<sub>2</sub> és -OH csoportok részvételével kialakított nukleofil „akceptor” molekulákhoz kötődik, ezeket ezidáig nem sikerült azonosítani. Eritrociták esetében a glycophorin fehérjét találták lehetséges akseptornak, amely felelős a C3b kovalens fixációjáért [70]. Di Renzo és munkatársai komplementreceptort nem expresszáló Lewis tüdő karcinóma sejtekkel végzett vizsgálataikban kimutatták, hogy C3 kovalensen kötődik a sejtekhez és internalizálódva sejtosztódást indukál [67, 71].

Az utóbbi időben a C3 molekula fontos szerepére derült fény a dendritikus sejtek *in vivo* kialakulása és funkciója során. Ghannam és munkatársai arról számoltak be, hogy az öröklött C3 deficiencia súlyos DC működési zavarral jár együtt [72]. Vizsgálataikban egyértelműen kimutatták, hogy jóllehet, a C3 deficiens beteg makrofágjai szintetizálják a C3-t, az nem kerül szekrécióra, hanem felhalmozódik a sejtek Golgi kompartmentumaiban. A betegekben a DC-k mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint egészséges emberekben. Az antigénbemutató sejtek prezentáló képessége súlyosan károsodott, a humorális immunválasz gyengült és memória B sejteket nem tudtak azonosítani. Saját kísérleteinkben azt bizonyítottuk, hogy ebben a folyamatban a C3 éretlen dendritikus sejtekhez való kötődése döntő fontosságú.

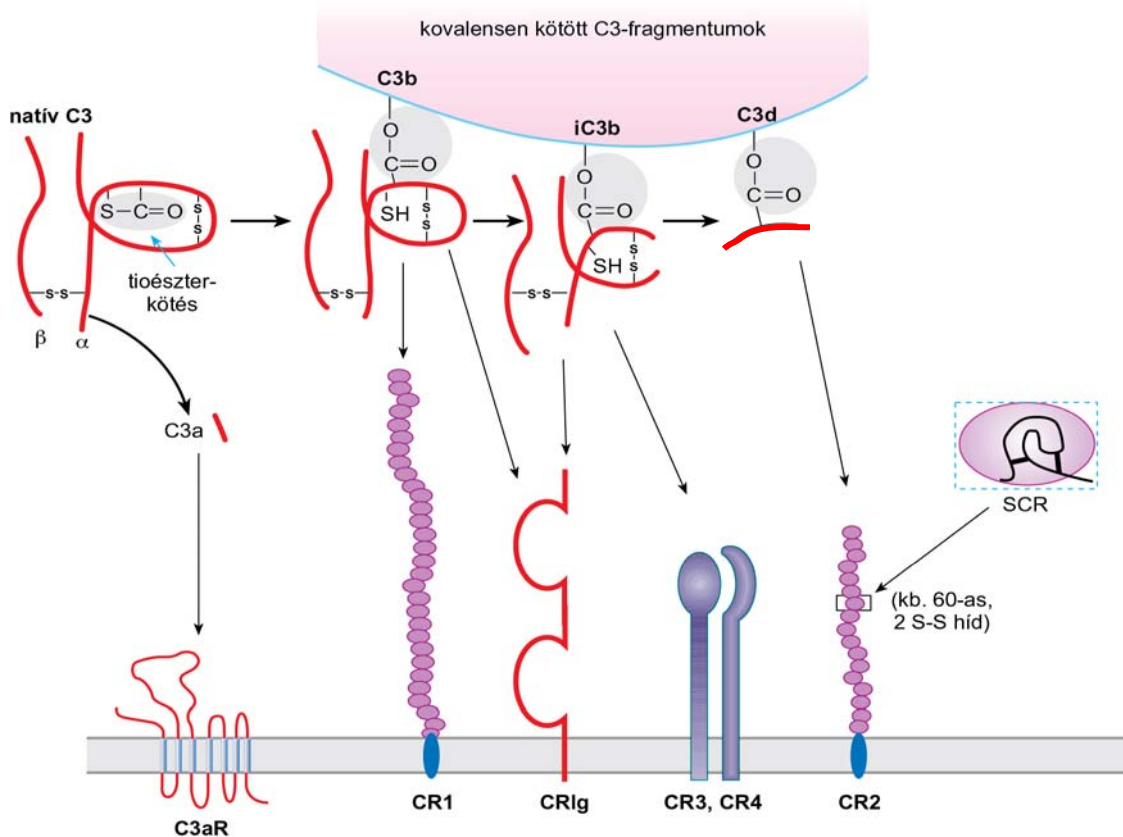
## 2.6 A C3-fragmentumok kötődése immunsejtek $\beta_2$ -integrinjeihez

A C3 molekulát a C3-konvertázok mellett más enzimek – pl. különböző sejt felszíni proteázok – is aktiválhatják. Az előzőekben részletesen leírt módon, az aktivátor felszínhez kötődött C3b további emésztése eredményeként először az iC3b jön létre, majd a további hasítás a C3c leválását eredményezi, míg a C3d illetve C3d(g) a felszínhez kötve marad (7. ábra, 1. táblázat). A hasítási fragmentumok a különböző sejteken kifejeződő CR-ekhez kötődhetnek. A C3b elsősorban a CR1-hez, az iC3b a CR3-hoz és CR4-hez egyaránt, míg a C3d és C3d(g) főként a CR2-vel reagál. A CR1 és



a CR2 az SCR-tartalmú fehérjék családjába tartozik, a CR3 és CR4 a  $\beta_2$ -integrinek közé sorolható, a C3aR az ópiát-receptor családba tartozik.

Az iC3b természetes liganduma a CR3 (CD11b/CD18,  $\alpha M\beta_2$ , Mac-1) és CR4 (CD11c/CD18,  $\alpha X\beta_2$ ) receptoroknak, melyek a leukocita specifikus  $\beta_2$ -integrinek közé, az integrin családba tartoznak.



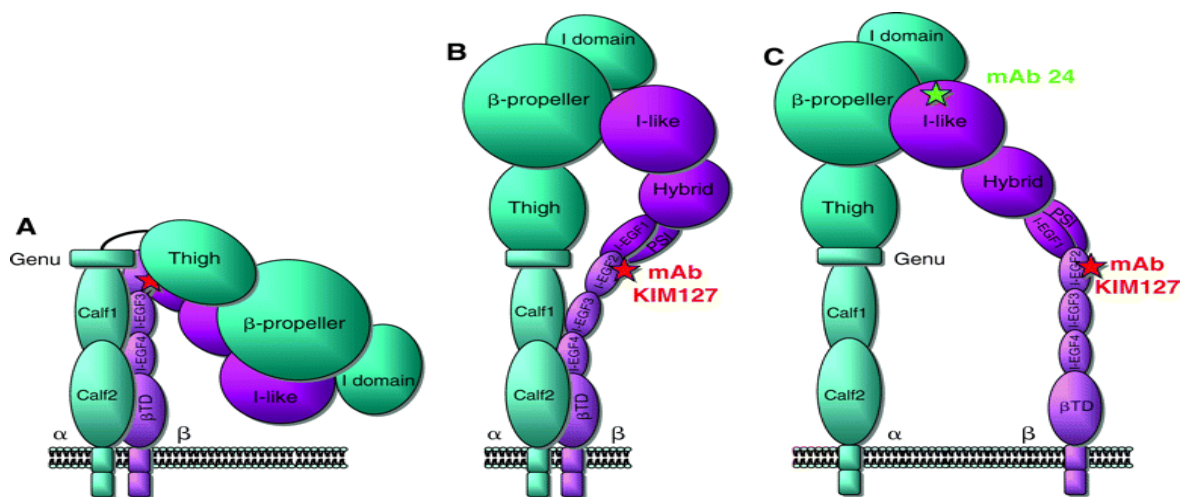
7. ábra A C3 komplementkomponens kovalens kötődése az antigénhez, a C3-fragmentumok kölcsönhatása C3-receptorokkal (Forrás: Immunológia, Szerk: Erdei Anna, Medicina, 2012.)

Az integrinek számos sejtfuncióban töltenek be fontos szerepet, amelyek összefüggésben vannak citoszkeletális átrendeződéssel. Ilyen funkciók az extracelluláris matrix alkotóihoz - pl. fibrinogén, fibronectin, vagy kollagén - történő adherencia és a *spreading*. Szerepet kapnak az integrinek az extracelluláris mátrix fehérjék fagocitózisa révén a szöveti átrendeződési folyamatokban is [73, 74]. Ugyanakkor az integrinek fontosak az immunológiai szinapszis kialakításában és a leukociták endotéliumon keresztül történő migrációjában is. A  $\beta_2$ -integrineknek a fagocitózis közvetítésében is meghatározó szerepük van a fejlődés magasabb fokán álló állatokban, ami elengedhetetlen a patogén vagy az apoptotikus sejt fagocitózisában.

Az integrin-közvetített fagocitózis jelensége már rovarokban is ismert. Jóllehet a gerinctelenekben az  $\alpha M\beta_2$  még nincs jelen, a *Drosophila melanogaster* haemocitáinak *E. coli* fagocitózisa gátolható RGD (Asp-Gly-Arg)-motívumot tartalmazó peptiddel - amely jól ismert liganduma az integrineknek -, vagy a humán  $\beta_3$ -integrin specifikus ellenanyaggal. Mindezek az adatok bizonyítják egy antimikrobiális  $\beta_3$ -szerű integrin jelenlétét már a *Drosophilában* is [75]. Az *Anopheles gambia* szúnyogban fedezték fel a BINT2 $\beta$  integrint; *knockout* rovarokban az *E. coli* fagocitózisa 70%-al csökkent [76]. A megfigyelés, hogy az integrinek emlősökben és rovarokban egyaránt részt vesznek a patogén eltávolításában arra utal, hogy ezek a receptorok már az evolúció korai szakaszában fagocitózisa szelektálódtak. Lehetséges, hogy emlősök esetében bizonyos integrinek szintén a fagocitózisa specializálódtak [77]. Az elsőként felfedezett fagocitózist indukáló integrin a CR3 volt, ami komplementtel opsonizált mikrobák vagy apoptotikus sejtek legfontosabb receptora [78, 79]. A  $\beta_2$ -integrinek meghatározó szerepét az antimikrobiális védelemben jól illusztrálja, hogy a Leukocita Adhézió Deficiencia I betegségben (LADI) szenvedő páciensek, a funkcióképtelen  $\beta_2$ -integrinjeik miatt különösen érzékenyek a bakteriális fertőzésekre [80, 81].

A veleszületett és az adaptív immunrendszer effektor fázisában egyaránt kulcsfontosságú szerepe van a fagocitózisa az antigén feldogozásában [78]. A folyamat során az antigén és receptor zippzár-szerű kapcsolódása után, citoskeletális aktin átrendeződéssel kerül felvételre és degradációra a fagocita által bekebelezendő idegen anyag [82].

A  $\beta_2$ -integrinek aktiválódásuk során jelentős konformáció-változáson mennek keresztül, ami befolyásolja ligandumkötő képességüket (8.ábra), [83]. Az integrinek családjába tartozó  $\beta_2$ -integrinek a membránban horgonyzott, nem kovalensen kapcsolt  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncból felépülő, heterodimer glikoproteinek. Az  $\alpha$ -lánc az extracelluláris N-terminális régióban tartalmazza a ligandum-kötésért felelős I domént és a  $\beta$ -propeller domént. Ezeket követi a Thigh, a Calf1 és a Calf2 domén. A  $\beta$ -lánc szintén tartalmaz N-terminálisan ligandum kötő, I-szerű domént, ezt követi a ciszteinben gazdag PSI (plexin-semaphorin-integrin) domén, a Hybrid domén, és négy EGF-szerű domén, végül a  $\beta$ -tail domén ( $\beta$ TD). Aktivációs stimulus hiányában a  $\beta_2$ -integrinek hajlított, inaktív konformációban vannak (8.A ábra), melyben a ligandumkötő I domén a membránra hajlik, ennek következtében a molekula ligandumot nem köt.



Hajlított, inaktív

Nyújtott, közepes aktivitású

Nyújtott, nyitott, nagy affinitású

8.ábra A  $\beta_2$ - integrinek három lehetséges konformációja (Forrás: Evans, J. Cell. Sci. 2009.)

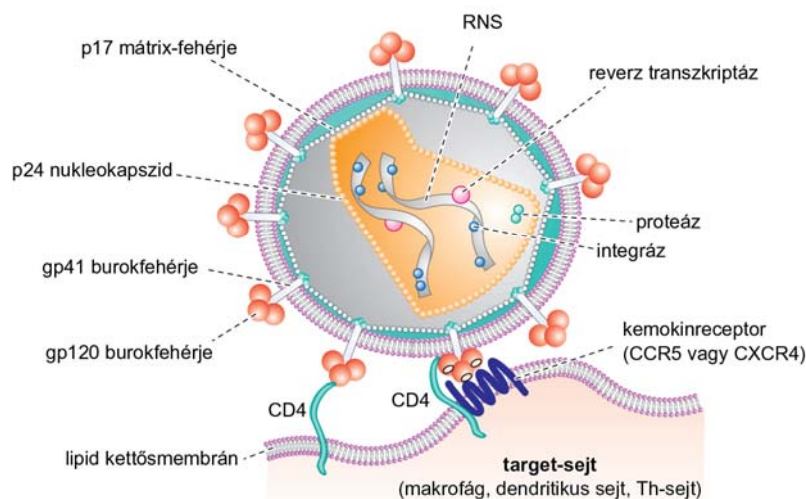
A sejt belsejéből induló - *inside-out* - aktiváció következtében a molekula kinyílik, az I-domén hozzáférhetővé válik a ligandum számára, és ez a nyújtott konformáció közepes affinitású ligandum-kötést biztosít (ezt a konformációt a KIM127 monoklonális ellenanyag ismeri fel) (8.B ábra). A nyújtott, nyitott konformációban a Hybrid domén kifordulásának köszönhetően az  $\alpha$ - és  $\beta$ - lánc membránközeli doménjei eltávolodnak egymástól (8.C ábra), és az I domének ligandumhoz való affinitása megnő, kialakul a nagy affinitású kötőhely. Ezt a konformációt a mAb 24 ellenanyag ismeri fel.

Az CR3-közvetített fagocitózis vizsgálata során kiderült, hogy az integrinek működése nem izolált, hanem koreceptorok részvétele szükséges a teljes aktivációhoz. Ezt az aktivációs folyamatot magyarázza az „*inside-out*” illetve az „*outside-in*” hipotézis [77]. Az *outside-in* szignál úton aktiváló receptorok a ligandum megkötése által aktiválják az integrineket, aminek eredményeképp megváltozik azok extracelluláris konformációja, és így kialakulhat a nagy affinitású ligandum-kötőhely (8.ábra). Az *outside-in* szignál számos sejtfunkciót aktivál; vezethet apoptózishoz, citotoxikus reakcióhoz, proliferációhoz, citokintermeléshez és különböző génaktivációs folyamatokhoz [84, 85]. Az *inside-out* aktiváció az extracelluláris stimulusra kialakuló intracelluláris válaszként fogható fel. A CR3 által közvetített fagocitózis extracelluláris stimulációt igényel, amit kemokinek, citokinek (pl. TNF- $\alpha$ ) vagy bakteriális anyagok (LPS) válthatnak ki [78]. Az *inside-out* szignalizáció általánosan elfogadott aktivátorai a

Rap1 G-protein, továbbá a talin, ami az integrin  $\beta_2$ -alegység citoplazmatikus doménjének NPXY motívumához kapcsolódik [86-88]. Érdekességként jegyzem meg, hogy a Rap1 aktivátora az LPS is, ami egyértelműen bizonyítja a PRR és integrinek közötti együttműködést az antigén felismerésében és felvételében. A következő lépésben az aktivált integrin extracelluláris doménjéhez kötődő ligandum *outside-in* szignál utat aktivál, ami citoplazmatikus fehérjék (vinculin, paxillin és actin) és szignálfehérjék (p130Cas, FAK, Rho kináz GTPases) átrendeződését és aktivációját váltja ki. Ezek a folyamatok vezetnek azután az aktin citoskeletális átrendeződéséhez és az adhézió fokozásához. Ellentétben az Fc- és egyéb fagocitotikus receptorokkal, a CR3 RhoA közvetítésével váltja ki az aktin-polimerizációt és a fagocitózist [89].

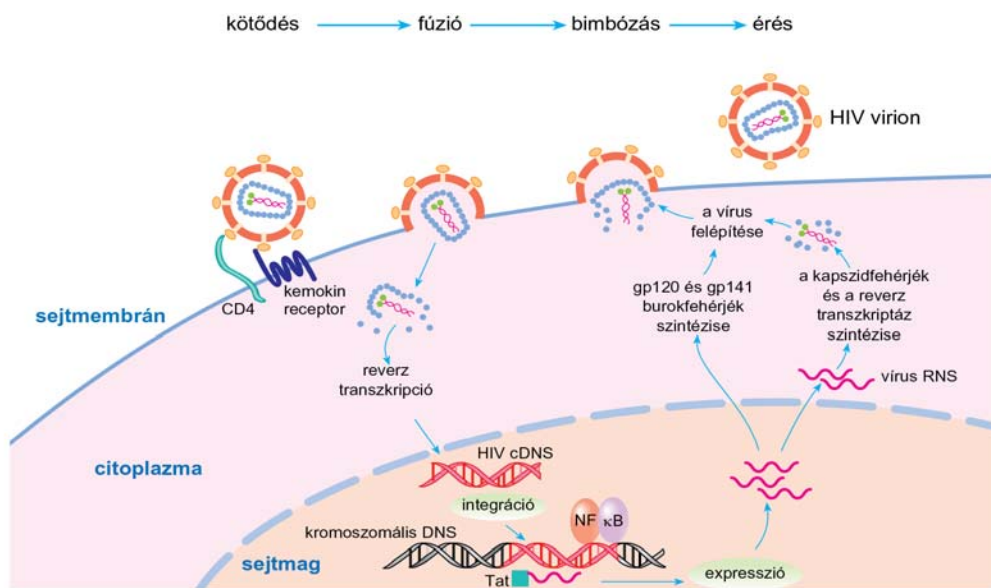
## 2.7. Komplementfehérjék szerepe a HIV fertőzés kialakulása során

A HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) a retrovírusok közé, a lentivírusok családjába tartozik. Hosszú lefolyású, látens fertőzést okoz, ami halálos kimenetelű. A HIV-fertőzés a lappangási periódust követően gyors lefolyású, citopátiás elváltozásokkal járó AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) betegséggé alakul. A HIV vírus két típusa ismert - HIV-1, HIV-2 -, melyek közül a *HIV-1* terjedt el erősebben.



9. ábra. A HIV felépítése és kötődése a target sejthez (Forrás: Immunológia, Szerk: Erdei Anna, Medicina, 2012.)

A HIV-1 a retrovírusokra jellemző szerkezettel rendelkezik (9. ábra). Az ikozahedrális külső burkon belül, a nukleokapszidban található a két + szálú RNS genom. A HIV célsejthez való kötődése a trimer gp120/gp41 burokfehérjék (*env komplex*) közvetítésével történik. A gp120 sejtfelszíni CD4-hez történő kapcsolódása sztérikus változásokat indukál a gp120-ban, ami lehetővé teszi a targetsejt *kemokin receptor*ához (CCR5/CXCR4), mint koreceptorhoz való kapcsolódást. A kötődés következtében feltáruló gp41 fúziós fehérje a gazdasejt membránjával való fúziót idézi elő.



10. ábra. A HIV fertőzés folyamata (Forrás: *Immunológia Szerk: Erdei Anna, Medicina, 2012.*)

A membránfúziót követően a HIV nukleokapszidja bejut a targetsejtbe, és annak citoplazmájában a nukleokapszid fehérjék megemésztődnek, ezáltal hozzáférhetővé válik a virális RNS (10. ábra). A vírus RNS genomjáról a reverz transzkriptáz enzim segítségével először az RNS-DNS heteroduplex készül el, majd az RNS szál lebontása után duplaszálú DNS íródik át. A duplaszálú, virális DNS a sejtmagba kerül, ahol vírus eredetű integráz enzim segítségével provírusként beépül a gazdasejt genomjába. Ebben a latens állapotban a virális gének nem működnek, a virális fehérjék nem jelennek meg a sejt felszínén, és így a HIV rejtve marad az immunrendszer elől. A latensen fertőzött sejt aktiválása a vírusgenom átírásához és fertőző vírusok képződéséhez vezet, amelyek azután egészséges sejteket fertőznek meg. A *primer fertőzés* kialakulása, vagyis a fertőzőképes vírusok átadása leggyakrabban vírus-hordozó sejtek közvetítésével valósul

meg az emberek között, elsősorban szexuális úton. A HIV fertőzés során a nyálkahártyák környezetében található dendritikus sejtek és a makrofágok a fertőzés első célpontjai, amit az ezen sejtek fertőzését okozó *M-tropikus (R5)* típusú HIV-1 vált ki [90]. A DC-k továbbítani tudják a fertőző vírusokat, az elsődleges célpontot jelentő Th-sejteknek a klasszikus produktív infekció során, eközben a vírus *M+T* majd *T-tropikus* típusú transzformálódik [91]. A lappangási időszak alatt a beteg tünetmentes, de képes a fertőzés továbbadására. Ebben a periódusban a fertőzött szervezetben aktív adaptív immunválasz detektálható; magas vírusfehérje-specifikus ellenanyag koncentráció és fokozott HIV-specifikus CTL válasz mutatható ki. Az AIDS a vírusfertőzést követő, 2-10 éves időszak után mutatkozik meg, kialakulása a vérben mért T-sejt szám kritikus érték alá zuhanásával ( $200/\text{mm}^3$ ) hozható kapcsolatba. A betegség első tünetei az opportunista fertőzésekkel szembeni fokozott érzékenységben nyilvánulnak meg. Az AIDS előrehaladtával vírusos, bakteriális és gombás fertőzések alakulnak ki, fokozódik a rákos megbetegedések veszélye (pl. Kaposi szarkóma). A HIV-fertőzés kezelés nélkül a szimptomák megjelenésétől számított 2-3 éven belül a beteg halálához vezet.

Az antigénprezentáló sejtek normális működését bizonyos kórokozók képesek saját hasznukra fordítani. Így a HIV-1 a fertőzés egész szervezetben való szétszórására használja fel a makrofágokat és a dendritikus sejteket [92]. A veleszületett immunválasz fő komponense, a komplementrendszer effektor működése, valamint opszonizációs működése meghatározó szerepet játszik a patogén mikrobák fagocitózisában és eliminációjában. A HIV képes aktiválni a komplementkaszád mindhárom útvonalát [93-95].

Leírták, hogy a HIV bár kisebb mértékben, de ellenanyag hiányában is képes a C1q komplementfehérje megkötésére [94]. Mások eredményei szerint viszont a HIV csak specifikus ellenanyag jelenlétében vált ki komplementaktivációt [95, 96]. A gp120 és gp41 burokfehérjék kölcsönhatása az MBL-el a lektin úton aktiválja a komplementkaszádot [93]. HIV-fertőzött egyénekben igazolták, hogy a vírus az alternatív úton is aktiválja a komplementrendszert [97].

A komplementrendszer aktivációja következtében a vírusrészecskékre komplementfehérje-fragmentumok rakódnak le, és ennek közvetítésével a vírus CR-on keresztül is bejut a monocitákba [98]. A vírushoz kovalensen kötődött C3 fragmentumokkal történő opszonizáció növeli a humán limfociták, monociták és makrofágok CR1, CR2, CR3 és CR4 receptoraival történő kölcsönhatást [98-100]. A

CR3-al ellentétes hatásról számoltak be a DC-k DC-SIGN (ICAM-3-grabbing nonintegrin) membránfehérjéje esetében, amely molekula több mikroba mellett a HIV megkötésére is képes, majd anélkül hogy a DC megfertőződné, továbbítja a fertőzőképes vírust T limfocitáknak, a *transz-infekciónak* nevezett folyamatban [101]. Korábbi tanulmányokban beszámoltak arról, hogy monociták HIV-fertőződését gátolta a sejtek anti-CR3 kezelése [102, 103], továbbá perifériás mononukleáris sejtek fertőződését részlegesen gátolta a CR3-specifikus ellenanyag [104].

A vírus komplement-mediált lízissel szembeni érzékenységét a vírus membránszerkezete, összetétele határozza meg, *in vitro* vizsgálatokkal igazolták, hogy a vírus membránjába beépült komplementszabályozó fehérjék, a CD46, CD55, és CD59 a komplement-mediált lízissel szemben rezisztenssé teszik a vírust [105, 106].

A fentiekben röviden ismertett eredmények egyértelműen igazolják a komplementrendszer és a makrofágok valamint a dendritikus sejtek szerepét a HIV-fertőzés során.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

**Kutatásaink célja a komplementrendszer és az immunsejtek – elsősorban a monociták/makrofágok és a dendritikus sejtek – korábban nem ismert kapcsolatainak feltárása.** Célkitűzéseink az alábbi négy téma köré csoportosíthatók.

1. Célul tűztük, hogy tisztázzuk, mely immunsejtek képesek megkötni a C1q és az MBL komplementfehérjéket, illetve van-e kapcsolat a C1q és MBL kötőhelyek között. Vizsgáltuk azt is, hogy a C1q illetve az MBL kötődésének milyen hatása van humán makrofágok és dendritikus sejtek funkcióira. Vizsgáltuk a C1q és az MBL molekula kötődését éretlen és érett emberi MDC-khez. Tisztázni kívántuk a C1q és az MBL kötődésének hatását emberi dendritikus sejtek működésére.

2. Célunk volt kideríteni, hogy a C3 molekula kovalens megkötésére képesek-e az MDC-k? Ha igen, ennek milyen hatása van a sejtek differenciálódására, aktivációjára, működésére, esetleg más sejtekkel való kölcsönhatásukra.

3. Célunk volt tisztázni, hogy változik-e a CR3 és a CR4 expressziója az MDC-k differenciálódása során és megállapítani, hogy van-e a két receptornak elkülöníthető specifikus funkciója. Mivel korábban minden CR4 funkciót elemző kísérletet egereken végeztek, és ismert, hogy az egér komplementrendszerének működése, receptorainak

kifejeződése és funkciója sok esetben jelentősen eltér az emberétől, mi a CR3 és CR4 expressziójában és funkciójában megmutatkozó különbséget humán rendszerben vizsgáltuk.

4. Vizsgálatainkkal célunk volt kideríteni, hogy befolyásolja-e a makrofágok HIV-el való kölcsönhatása a sejtek C3 szintézisét valamint gyulladási citokin termelését. Terveztük annak vizsgálatát is, hogy a DC-k komplementreceptorai milyen szerepet játszanak a komplementfragmentummal opsonizált HIV partikulummal történő kölcsönhatásban. Munkánkban azt is vizsgáltuk, hogy a fertőzés hogyan befolyásolja ezeknek a sejteknek a funkcióját és komplementfehérje-szintézisét, továbbá azt, hogy a komplementreceptoroknak milyen szerepük van a fertőzés továbbításában.

#### 4. MÓDSZEREK

A disszertáció alapjául szolgáló cikkekben megtalálható minden módszer részletes leírása, ezért a következőkben csak a munka során kiemelten fontos módszerek rövid leírására szorítkoztam.

##### *Emberi monociták izolálása vérből*

Az alább ismertetett monocita izolálási eljárás Freundlich módszerének továbbfejlesztett változata [107]. A petri csészéket 5 ml, 2%-os, bidesztillált vízben 80 °C-on feloldott zselatinoldattal 2 órán keresztül, 37°C-on inkubáljuk. A zselatint ezután leszívjuk, a petri csészéket a steril fülkében, tető nélkül, 30 percig szárítjuk. A buffy-coat-ot 50 ml-es, kónuszos műanyag csőben centrifugáljuk 1400 rpm fordulattal, 10 percig, 18 °C-on, fékezés nélkül. Műanyag csövekbe gyűjtjük a centrifugálást követően a csövek felső részében elvált savót, illetve a határreteget alkotó perifériás mononukleáris sejteket (PMNS). A sejtszuspenziót Ficoll-oldatra rétegezzük, majd centrifugáljuk 1600 rpm fordulattal, 35 percig, 18 °C-on, fékezés nélkül. Összegyűjtjük a határreteget alkotó PMNS-eket, majd kétszer mossuk PBS-sel, 1400 rpm és 1200 rpm fordulattal, 10 percig, 4 °C-on.

A savót kétszer centrifugáljuk, 10 perc, 3000 rpm, a centrifugálások között tiszta csőbe töltve, mivel ezzel a lépéssel célunk a trombociták és a zsír eltávolítása. A zselatinnal kezelt petri csészéket 10 ml PBS-sel lemossuk, utána 10 ml lecentrifugált savóval, 30 percen át, CO<sub>2</sub>-termosztátban inkubáljuk. Az inkubálási idő leteltével a petri csészékről a savót eltávolítjuk és 10 ml PBS-sel, kétszer mossuk.



A PMNS szuszpenziót  $4-8 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban, 5 % kevert humán savóval (KHS) kiegészített kultúra médiumban vesszük fel. A sejtsuszpenziót 10 ml-ként a petri csészékbe osztjuk, majd 40 percig, CO<sub>2</sub>-termosztátban, 37 °C-on inkubáljuk. Ezalatt a Mo adherálnak a zselatinnal fedett műanyag felszínre. Az inkubációt követően a nem tapadt sejteket 10 ml 37°C-os RPMI-al, 5-6-szor ismételt mosással eltávolítjuk, a mosások között rázó asztalon felrázva a petri csészéket. A Mo felválasztását 5 ml 5 mM EDTA oldattal, kb. 10 percig 37°C-on, CO<sub>2</sub> termosztátban inkubálva végezzük. A sejtsuszpenziót műanyag csőbe szívjuk és kétszer mossuk PBS-el 1400 rpm, majd 1200 rpm fordulattal, 10 percig. A módszer segítségével mintegy 90-95%-ban tiszta Mo kultúra állítható elő, szennyezésként granulociták és limfociták fordulnak elő.

*Monocita eredetű dendritikus sejtek (MDC) és makrofágok (MM) előállítása*

A monocitákat  $10^6$  sejt/ml koncentrációban, 40 ng/ml rhuGM-CSF és 1000 U/ml rhuIL-4 jelenlétében 5 nap alatt éretlen MDC-kké (imMDC) differenciáltatjuk [108, 109]. A differenciáltatás során a citokineket (GM-CSF és IL-4) 2 naponta pótoljuk.

Monocita eredetű makrofágok (MM) differenciáltatásához a monocitákat  $10^6$  sejt/ml koncentrációban 40 ng/ml rhuGM-CSF jelenlétében tenyésztjük 5 napig. A MM-okat esetenként 20 ng/ml PMA-val aktiváltuk.

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

*HIV-1 preparálás, p24 ELISA*

Az 92UG037 (A/A altípus) M-tropikus HIV-1 primer izolátumot egészséges donorok véréből izolált PBMC-ben növesztettük. A vírust ultracentrifugálással izoláltuk (20000 rpm), majd felhasználásig -80°C-on tároltuk. A HIV-1 mennyiségét a p24 nukleokapszid fehérje mennyiségének meghatározásával, a korábban kifejlesztett ELISA módszerrel állapítottuk meg [103].

*Opszonizált HIV-1 előállítása*

A következő opszonizált vírus preparátumokat alkalmaztuk:

HIV(IgG) : HIV-1-t (1 µg/ml p24), anti-HIV IgG-vel (10 µg/ml) inkubáltuk, amit HIV<sup>+</sup> egyének vérszérumából tisztítottuk.

HIV(IgG+C): HIV-1-t (1 µg/ml p24), anti-HIV IgG-vel (10 µg/ml) és 10-szeresére hígított friss normál humán savóval inkubáltuk.

HIV(IgG+C+EDTA) : HIV-1-t (1 µg/ml p24), anti-HIV IgG-vel (10 µg/ml), 10-szeresére hígított friss normál humán savóval és 20 mM EDTÁ-val inkubáltuk.

Az opszonizált vírust ultracentrifugálással mostuk (20000 rpm). Az opszonizáció hatékonyságát ELISA teszttel ellenőriztük. Az opszonizált vírust anti-huIgG, vagy anti-huC3c/C3d fedett felszínen inkubáltuk. A nem kötődött vírust lemostuk. A HIV(IgG) erősen kötődött anti-huIgG coat-hoz, a HIV(IgG+C) az anti-huIgG coat-hoz alig, de az anti huC3c/C3d fedett felszínhez erősen, mivel a klasszikus komplementaktiváció során nagy mennyiségben rakódott felszínére C3-fragmentum. A kötődött HIV-1-t lizáltuk és koncentrációját p24 ELISA tesztben meghatároztuk, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk.

## **5. EREDMÉNYEK**

### **5. 1. A C1q és az MBL komplementfehérjék kötődése és hatása makrofágok és dendritikus sejtek érésére és funkcióira**

A szervezetünkben keringő immunkomplexek a komplementrendszer aktiválása eredményeképpen C1q és MBL komplementfehérjéket is tartalmaznak. Az is bizonyított, hogy apoptotikus sejtek és patogének is képesek közvetlenül megkötni felszínükön C1q-t és MBL-t [23, 24, 110]. A C1q-val vagy MBL-el megjelölt antigén – patogén mikroba vagy apoptotikus sejt -, a komplementfehérjék receptorait kifejező sejtekkel, például fagocitákkal kerül kölcsönhatásba. A C1q molekula elsősorban IgG- vagy IgM-tartalmú immunkomplexhez kapcsolódik globuláris egységeivel, az MBL molekula viszont CRD doménje segítségével különböző mikrobák szénhidrát csoportjait ismeri fel [111]. Mind a C1q mind az MBL molekula tartalmaz az N-terminális részen egy kollagén-régiót, ami az aktivált, ligandumhoz kötődő molekulát C1q-receptorhoz köti. A C1q és az MBL struktúráisan homológ molekulák, és szerkezeti hasonlóságuk alapján korábban feltételezték, hogy a két komplementfehérje azonos receptorhoz kapcsolódik. A kötődésért felelős domén/domének azonosítása azonban sok esetben ellentmondásos eredményekhez vezetett.

Az aktivátor felszínéhez kötött C1q a kollagén doménjének közvetítésével számos sejttípushoz – monocita, dendritikus sejt, neutrofil granulocita, limfocita,

endotél-sejt, trombocita - képes kapcsolódni [41]. A kollagén-C1q receptor (cC1qR) azonosítását számos kutatás célozta [37, 38]. Jelenleg, a leginkább elfogadott C1q receptor a sejt felszíni kalretikulin CD91-el asszociált komplexe [41].

Kevésbé jellemzett a kollektinek immunsejtekhez kötődése, de azt kimutatták hogy mandulából tisztított cC1qR-hoz MBL és SP-A is kötődik [112, 113]. Leírták azt is, hogy monociták esetében a C1q gátolta az MBL-el vagy SP-A-val fedett partikulumok kötődését [114], fordított esetben részleges gátlásról számoltak be [115]. Ez arra utalt, hogy a C1q és MBL-kötő struktúrák nem tekinthetők azonosnak.

A C1q receptorok funkciójának tanulmányozása során kiderült, hogy az apoptotikus sejtek C1q-val történő opsonizációja a humán DC-k C1q-receptoraihoz irányítja azokat [23], a C1qR ligandum-kötése az imMDC-k migrációját váltotta ki, ami gyulladásos körülmények között a sejtek fertőzés helyszínére való vonzását segítheti elő [46]. Emberi MDC-kkel végzett vizsgálatok igazolták, hogy a sejteken a cC1qR mellett egy másik C1q-receptor is megjelenik; ez a globuláris résszel kölcsönhatásba lépő gC1qR [43]. A tanulmány szerint az MDC-k érése során mindkét receptor sejt felszínen mért mennyisége csökken, míg mások vizsgálatai szerint imMDC-ken cC1qR/CD91 komplex nem mutatható ki [110].

A DC-k a szervezet számára veszélyt jelentő stimuluszokra gyorsan aktiválódnak. Az aktiváció eredményeképpen kialakuló maDC-k, mint antigénbemutató sejtek a naív T-sejtek leghatékonyabb aktivátorai. Az aktivációs stimulustól és a citokin miliótól függően IL-12 jelenlétében Th1, míg IL-4 hatására Th2 differenciálódás zajlik le. Ennélfogva a DC-k kulcsszerepet játszanak az immunválasz irányának befolyásolásában. Ismert hogy az immunkomplex a C1-komplex segítségével klasszikus úton aktiválja a komplementrendszer, másrészt számos patogén, apoptotikus sejt közvetlenül kötődik a C1q-hoz és ellenanyag hiányában is komplementaktivációt vált ki [23, 24]. A szervezetünkben keringő immunkomplexek IgG-t C1q-t és C3-eredetű fragmentumokat egyaránt tartalmaznak. Így az antigén FcR- vagy CR-hoz is kötődhetnek, amely receptorok fagocitózist indukálnak és ezzel párhuzamosan DC aktivációt, DC érést indukálnak. Nemrég igazolták, hogy szilárd fázishoz kötött IgG hatására a DC-k FcγRII-közvetített érése zajlik le [22]. A CR-mediált DC aktiválódás részleteit korábban nem tanulmányozták.

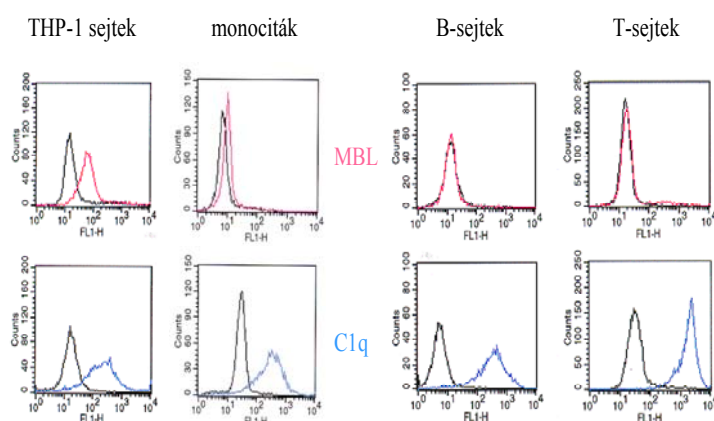
*Célkitűzés*

Célul tűztük ki, hogy tisztázzuk; mely immunsejtek képesek megkötni a C1q és az MBL molekulákat, illetve van-e kapcsolat a C1q és MBL kötőhelyek között. Vizsgálni kívántuk azt is, hogy a C1q illetve MBL kötődésének milyen hatása van humán makrofágok és dendritikus sejtek funkcióira. Továbbá, tanulmányoztuk a C1q és az MBL kötődésének hatását emberi dendritikus sejtek működésére.

*Eredmények*

Korábbi vizsgálatokban intenzíven tanulmányozták a C1q kötődési tulajdonságait, viszont a hasonló szerkezetű MBL kötődését nem. Tisztázni kívántuk, hogy különböző immunsejt típusok C1q- és MBL-kötő képességében van-e különbség normál ionerőn vagy a fiziológiához hasonló körülmények között. Citofluorimetriás kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a C1q limfoid és mieloid sejtekhez egyaránt jól kötődött, viszont az MBL elsősorban mieloid eredetű sejtekhez - monocitoid THP-1, vérből frissen izolált normál humán monocita - kapcsolódott (11. ábra) és hasonló kötődést mutattunk ki U937 humán monocitoid sejt vonal valamint P388D1 eger makrofág sejt vonal esetében is.

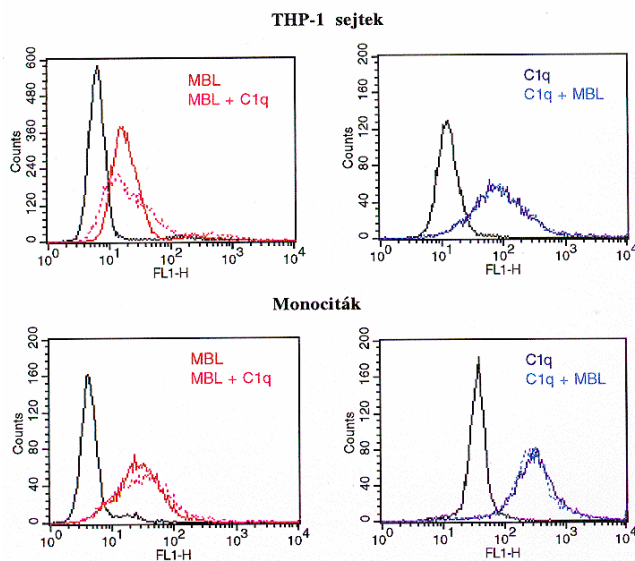
Megvizsgáltuk emberi monocita eredetű makrofágokon az MBL kötődését, a megkötött fehérje mennyiségében jelentős donor függést találtunk, ami a differenciáció előrehaladtával csökkent. A kötődött MBL mennyisége mannóz-kezelés hatására nem csökkent, ami arra utal, hogy az MBL nem lektin aktivitása révén, vagyis nem a CRD doménjei közvetítésével kapcsolódik a sejt felszínhez.



11. ábra

*MBL és C1q kötődés kimutatása THP-1 humán monocitoid sejteken, normál monocitákon, B- és T-sejteken citofluorimetriás vizsgálattal. (Egy reprezentatív kísérlet eredménye öt független kísérletből)*

Korábban felmerült, hogy a két komplementfehérje szerkezeti hasonlósága miatt azonos receptorhoz kötődhet. Tisztázni kívántuk, van-e versengés a két komplementfehérje között a kötőhelyekért. Kísérleteinkben a C1q (30 µg/ml) és az MBL (30 µg/ml) kötődését külön-külön, valamint együttesen alkalmazva is megvizsgáltuk THP-1 sejtekhez és normál humán monocitákhoz (12.ábra). Eredményünk szerint a két komplementfehérje nem befolyásolta szignifikánsan egymás kötődését egyik sejtípus esetében sem, ami arra utal, hogy az MBL és a C1q molekula különböző receptorhoz kapcsolódik monocita/makrofág sejtek felszínén.



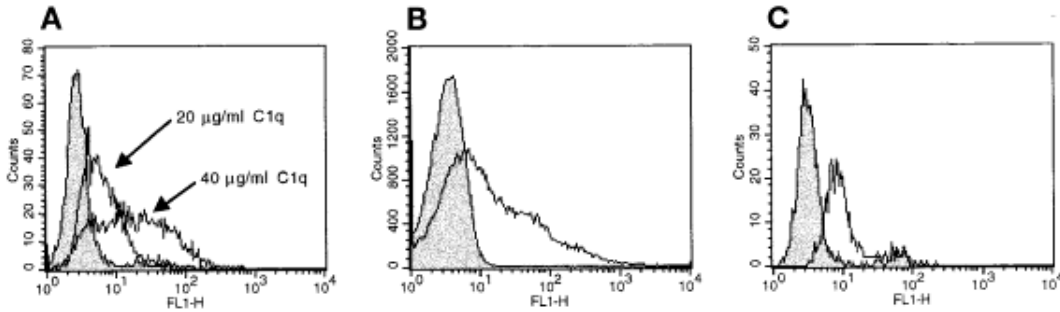
12. ábra

*MBL-el és C1q-val külön-külön, illetve MBL-C1q ekvimoláris keverékével inkubáltunk THP-1 sejteket és humán monocitákat, majd meghatároztuk a kötődött fehérjéket (MBL: piros, C1q: kék, MBL+C1q: szaggatott vonal) citofluorimetriával. (Egy reprezentatív kísérlet eredménye öt független kísérletből.)*

Néhány tanulmányban korábban beszámoltak arról, hogy a C1q kötődése alacsony ionerőn szignifikánsan megnő [37, 111], ezért megvizsgáltuk, hogy ilyen körülmények között, 5% glukóz tartalmú 5mM barbiturát puffert alkalmazva változik-e az MBL kötődésének mértéke THP-1 sejteken. Eredményünk szerint a közeg ionerejének megváltoztatása nem befolyásolta az MBL kötődését.

A régebben leírt lokális opszonizáció jelensége szerint az aktivált makrofágokból megnövekedett mennyiségben felszabaduló C3 a közvetlen környezetben lévő sejteket és mikrobákat opszonizálja, aminek hatása van a celluláris immunválaszra [59, 60, 116, 117]. Megvizsgáltuk, hogy a C1q-val történő aktiváció vajon fokozza-e a makrofágok C3 termelését és azok lokális opszonizáló képességét. Abban az esetben, ha az U937 humán monocitoid sejteket C1q-val aktiváltuk, fixált C3-fragmentumokat detektáltunk az aktivált sejtek felszínén, valamint az aktivált fagocitákkal együtt inkubált birkavörösvérsejtek (mint antigén) felszínén is. Az így opszonizált antigént a

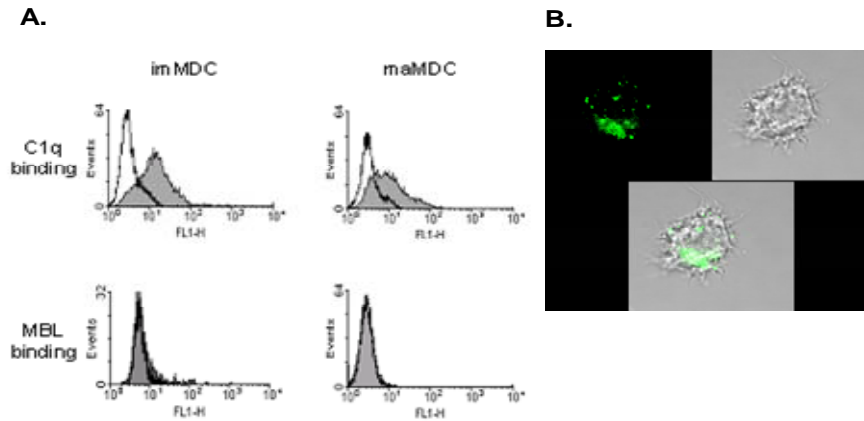
fagocitákhoz adva, fokozott mértékű fagocitózist mutattunk ki (13. ábra), ami anti-C3 F(ab')<sub>2</sub> ellenanyaggal gátolható volt. A C1q által kiváltott aktivációnak fiziológiásan szerepe lehet a lokális opszonizációban, vagyis a makrofágok által fokozott mennyiségben szekretált C3 opszonizálva az antigént, fokozza azok fagociták általi felvételét.



13. ábra. C1q kezelés hatása U937 sejtek lokális C3 opszonizációjára. (A) Különböző koncentrációjú C1q-val kezelt U937 sejtek felszínéhez kötődött C3 kimutatása citofluorimetriával. (B) Fixált C3 kimutatása C1q aktivált U937 sejtek környezetében inkubált birka vörösvértesteken. (C) FITC-jelzett birka vörösvértest fagocitózisa C1q jelenlétében aktivált U937 sejtek által. A kísérletekben kontrollként nem aktivált U937 sejteket használtunk. (Egy reprezentatív kísérlet eredménye öt független kísérletből.)

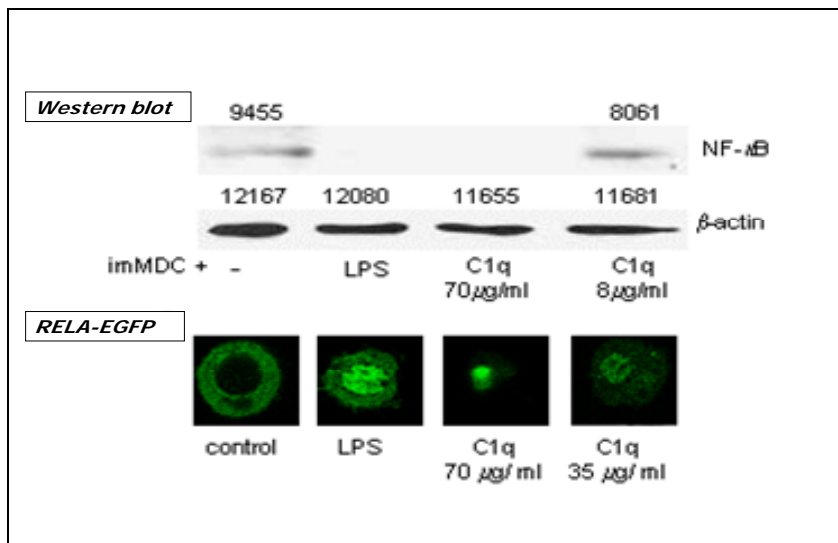
A C1q esetében vizsgálták korábban a kötődés néhány funkcionális következményét, viszont a kollektinekett ebből a szempontból nem tanulmányozták. Monocitoid U937 és THP-1 sejtvonalakat, valamint normál makrofágokat immobilizált C1q vagy MBL jelenlétében tenyésztettünk. Mértük az egyik fontos makrofág-eredetű gyulladási citokin, a TNF- $\alpha$  szekrécióját. A C1q dózis-függő módon fokozta normál humán monociták TNF- $\alpha$  termelését. Hasonló citokin termelés fokozást detektáltunk in vitro differenciáltatott humán makrofágok, valamint U937 és THP-1 monocitoid sejtek esetében. Az MBL kezelés nem befolyásolta ezeknek a sejteknek a TNF- $\alpha$  szekrécióját. Mások eredményei szerint a C1q növeli endotél sejtek gyulladási citokin termelését [118]. Mindezek az adatok alátámasztják, hogy a C1q szerepet játszhat az akut-fázis reakció szabályozásában.

Tanulmányoztuk a C1q és az MBL kötődésének hatását emberi MDC-k esetében. Eredményünk szerint a C1q molekula kötődik az éretlen és érett emberi MDC-khez, azonban az MBL kötődését MDC-khez nem tudtuk kimutatni (14. ábra).



14. ábra C1q és MBL kötődése humán im- és maMDC-khez. (A) C1q és MBL kötődés citofluorimetriás vizsgálata. (B) Kötődött C1q kimutatása imMDC-k felszínén konfokális lézer scanning mikroszkópos felvétel (60x). (Egy reprezentatív vizsgálat eredménye hét független kísérletből.)

Az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktiválódása a DC-kben szerepet játszik az MHC molekulák és számos kostimulátor molekula, valamint citokin expressziójában. A C1q-val aktivált MDC-kben dózis-függő NF- $\kappa$ B magi transzlokációt mutattuk ki (15. ábra).

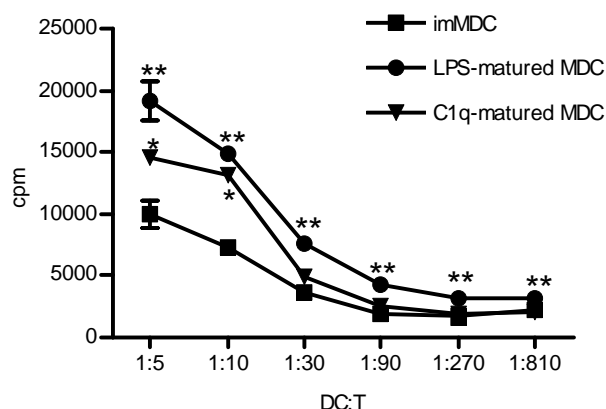


15. ábra C1q által kiváltott NF- $\kappa$ B transzlokáció imMDC-kben. (A) Kontroll, LPS- és C1q-kezelt imMDC-k Western blot vizsgálata.  $5 \times 10^5$  imMDC-t inkubáltunk 35 és 8  $\mu$ g/ml C1-val, illetve pozitív kontrollként LPS-el. Mosást követően a sejteket lizáltuk, a mintát centrifugáltuk, majd a felüliszót futtattuk (10 % SDS-PAGE) és blottoltuk. A blottot NF- $\kappa$ B p50-specifikus ellenanyaggal, HRPO-konjugált másodlagos ellenanyaggal kezeltük és ECL technikával vizualizáltuk. Belső kontrollként aktin próbát alkalmaztunk. A számok a denzitás értékeket jelölik. (B) NF- $\kappa$ B transzlokáció kimutatása CLM módszerrel. ImMDC-keket p65 (RELA) cDNS-EGFP-t tartalmazó plazmiddal transzfektáltuk, ezután a sejteket LPS-el illetve C1q-val kezeltük és 1 óra múlva vizsgáltuk az NF- $\kappa$ B sejtmagba történő transzlokációját. (Egy reprezentatív vizsgálat eredménye három független kísérletből.)

Vizsgáltuk a C1q hatását az MDC-k differenciálódására. Az imMDC-eket C1q-val fedett felszínen tenyésztettük, majd meghatároztuk a CD80, CD83, CD86, MHCII és CCR7 molekulák sejtfelszíni expresszióját. Valamennyi esetben szignifikáns expresszió fokozódást mutattunk ki.

Ismert, hogy az maDC-k hatékony aktivátorai a T limfocitáknak, ezért indokoltnak tartottuk megvizsgálni a C1q-aktivált MDC-k allogén T-sejt aktiváló képességét. Kísérleteinkben a C1q kezelés hatására az MDC-k T-sejt aktiváló képessége szignifikánsan nőtt a kontroll MDC-kkel összehasonlítva (16. ábra).

Az NF- $\kappa$ B transzlokációs és T-sejt proliferációs eredmények alapján érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a C1q kezelés befolyásolja-e az MDC-k IL-12 citokin termelő képességét. Azt tapasztaltuk, hogy a C1q kezelés az MDC-k IL-12p70 termelését mintegy 20-szorosára növelte ( $\sim 2$ pg/ml $\rightarrow 40$  pg/ml), ami az LPS-stimulált sejtek citokin termelésének ( $\sim 220$  pg/ml) kb. 20 %-a.



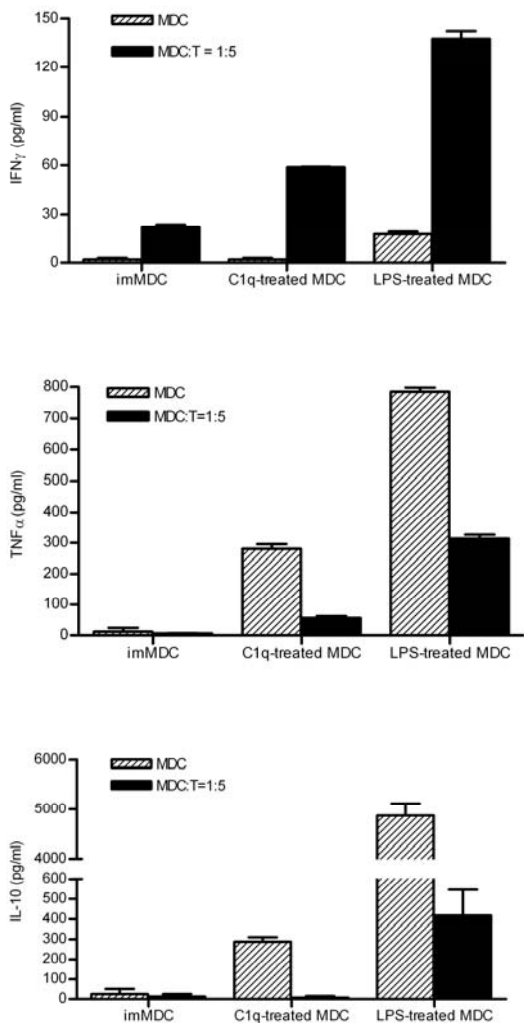
16. ábra C1q-kezelt MDC-k allogén T-sejt aktiváló képessége C1q-, LPS-kezelt és kontroll MDC-eket allogén T-sejtekkel különböző DC:T összetételben kokultúrában tartottunk, majd négy nap múlva  $^3$ H-timidin beépülés mérésével jellemeztük a T-sejtek proliferációját. Az eredményt cpm  $\pm$  SD ábrázoltuk, három párhuzamos minta átlagából számítva. (Egy reprezentatív minta eredménye négy független kísérletből.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

A továbbiakban a C1q-aktivált MDC és allogén T-sejt kokultúrák felülúszójából meghatároztuk az IFN- $\gamma$ , a TNF- $\alpha$  és az IL-10 mennyiségét (17. ábra). A C1q-kezelt MDC-k, hasonlóan az imMDC-khez nem termeltek IFN- $\gamma$ -t, viszont a sejtekkel



kokultúrában tartott T limfociták IFN- $\gamma$  termelése 2-3-szorosára nőtt. Ez a fokozódás feltehetően az IL-12 által stimulált Th1-sejteknek köszönhető. A C1q-kezelt MDC-k nagy mennyiségben szekretáltak TNF- $\alpha$ -t a kontroll sejtekkel összevetve. Az MDC:T kokultúrákban mért viszonylag alacsony TNF- $\alpha$  szint feltehetően annak következménye, hogy a T-sejtek felhasználták azt. Hasonló jelenséget tapasztaltunk az LPS-aktivált MDC:T kokultúrák esetében is. Érdekes módon az IL-12 termelését gátló IL-10 mennyisége szintén nőtt az MDC-k C1q kezelését követően, de ennek szintje nem érte el az LPS-aktivált MDC-k által termelt mennyiséget.



17.ábra

C1q kezelés hatása IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , és IL-10 termelésre MDC kultúrában és MDC-allogén T kokultúrában. Kontroll, C1q-kezelt és LPS-kezelt MDC által (csíkozott oszlop), valamint ezeknek a sejteknek a T-sejtekkel készített kokultúráinak IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  és IL-10 szekrécióját mutatja az ábra. A citokinek koncentrációját a felülűszókból ELSA technikával határoztuk meg, pg/ml +/- SD ábrázolva. (Egy reprezentatív eredmény öt független kísérletből.)

*Összegzés*

A C1q- és MBL-felismerő struktúrák fontos szerepet játszanak az antigén feldolgozás a során. Míg a C1q-kötő struktúrák szerkezetének és funkcionak vizsgálatával számos kutatásban foglalkoztak [37-39, 42, 111, 113], addig a C1q-hoz hasonló szerkezetű lektinek, mint pl. az MBL receptoráról és szerepéről jóvel kevesebben tudunk. Míg a C1q működése elsősorban az adaptív immunválaszhoz kapcsolódik, addig az MBL a veleszületett immunválasz során tölt be sokoldalú szerepet, mint mintázatfelismerő molekula [28, 119].

Malhotra és munkatársai bizonyították, hogy a mandulából szeparált limfociták detergens lizátumából izolált cC1qR nemcsak C1q-t, hanem kollektinek - MBL, SP-A és conglutinin - is megköt [113]. Ugyanakkor, alacsony ionerejű puffer közeget használva az MBL-el vagy konglutinin kollektinokkal történő inkubáció csak részben gátolta a C1q kötődését. Ez és mások hasonló eredményei arra utaltak, hogy az MBL- és a C1q-kötő receptorok nem azonosak [114]. A két komplementfehérje kötődését és a kötődés következményeit célzó vizsgálatainkkal ezeket az ellentmondásokat kívántuk feloldani [45-saját]. Mieloid és limfoid eredetű sejteken egyaránt megvizsgálva a komplementfehérjék kötődését azt találtuk, hogy az MBL-kötő struktúrák korlátozottabb előfordulást mutatnak. Az MBL kötődését THP-1, U937 humán monocitoid sejteken valamint kisebb mértékben normál humán monocitákon és makrofágokon mutattuk ki (*11. ábra*). Az emberi MBL kötődött egér P388D1 makrofág sejt vonal sejtjeihez is, ami arra engedett következtetni, hogy a két fajban az MBL-kötő receptorok azonos, vagy nagyon hasonló szerkezetűek. Az említett sejt típusok C1q-kötő képességét szintén megerősítettük, de míg a C1q emberi limfocitákhoz kötődött, az MBL nem (*11. ábra*). Mások eredményei szerint, a C1q kötődése alacsony ionerőn fokozódott [41, 111, 113], saját adataink szerint az MBL kötődését ez nem befolyásolta. C1q és MBL ekvimoláris keverékéből történő kötődési, kompetíciós kísérleteink eredménye azt bizonyította, hogy a két fehérje receptora makrofágokon különböző (*12. ábra*).

A kötődési vizsgálatainkkal összhangban, úgy találtuk, hogy a C1q-nak és az MBL-nek funkcionálisan is eltérő szerepe van. Mások eredményei szerint, a C1q endotél sejteken növelte az IL-8, az IL-6 és az MCP-1 termelést [118]. A C1q jelenlétében tenyésztett MDC-k citokin termelését vizsgálva megállapítottuk, hogy fokozott mértékben szekretálták a TNF- $\alpha$ , az IL-6, az IL-12 és az IL-10 citokineket (*17.*

*ábra*), az MBL ezt nem befolyásolta. Tanulmányoztuk a C1q-kezelt MDC-k allogén T-sejt aktiváló képességét. Megállapítottuk, hogy a C1q-kezelt MDC-k szignifikáns módon fokozták a T-sejtek proliferációját (*16. ábra*). Továbbá, fokozott IFN- $\gamma$  szintet mértünk a kokultúrák felülúszójából, ami Th1 típusú immunválaszra utal.

Szintén szelektív fokozást mutattunk ki a makrofágok által termelt másik komplementfehérje, a C3 esetében. A C1q által aktivált monocitoid sejtek fokozott C3 szekréciójuk révén, a környezetükben lévő antigént hatékonyan opsonizálták, ami hozzájárult azok fokozott fagocitózisához (*13. ábra*). Ezzel ellentétben, az MBL molekula, amely a veleszületett immunrendszer fontos eleme, a fentiektől eltérő sejt-közvetített működésekben játszhat szerepet.

A DC-ket számos stimulus aktiválhatja - így nemrég számoltak be arról, hogy bizonyos szérumfehérjék, pl. a fibrinogén, szintén kiválthatnak sejtaktivációt [120]. Eredményeink szerint, egy másik szérumfehérje, a C1q szintén befolyásolja a DC-k differenciálódását, fenotípusos és funkcionális változást előidézve. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy DC-k fiziológias környezetében, a testnedvekben lévő szérumfehérjék szabályozzák a DC-k működését, továbbá az *in vivo* jelenlévő immunkomplexek szintén tartalmaznak megkötött szérumfehérjéket. Kísérleti rendszerünkben a műanyag felszínen immobilizált C1q alkalmazásával, az immunkomplexben lévő C1q hatását modelleztük. Eredményeink szerint, az imMDC-k és maMDC-k egyaránt megkötik a C1q-t, a kötés mértéke a sejtek érése során kismértékben csökken. A C1q-hoz hasonló szerkezetű MBL-t viszont nem kötődik az imMDC-khez és ez nem változik a sejtek differenciálódása során (*17. ábra*). Az imMDC-ket a C1q-fedett felszínen tenyésztve a sejtek érését detektáltuk; a CD83, CD86, MHCII és CCR7 molekulák expressziója fokozódott és ennek mértéke összevethető volt az LPS aktiváció hatásával.

Számos eredmény alátámasztja, hogy az NF- $\kappa$ B fontos szabályozója a DC-k funkcióinak, így például az antigénbemutató folyamatának [121-123]. Eredményeink szerint az imMDC-ket immobilizált C1q felszínen tenyésztve, fokozódik az NF- $\kappa$ B magi transzlokációja és a sejtek IL-12, TNF- $\alpha$  és IL-10 szekréciója megnő. Az IL-10 autokrin módon szabályozza a DC-ket; csökkenti a kostimulátor molekulák expresszióját, az IL-12 termelést, vagyis gátolja a Th1 differenciálódást és tolerancia kialakulásához vezet [124, 125]. Az imMDC-ket IL-10 neutralizáló ellenanyaggal kezelve fokozódott a sejtek CD80, CD83, CD86 és MHCII expressziója, a TNF- $\alpha$  és IL-12 termelése,

valamint nőtt Th1 aktiváló képességük [124]. Leírták, hogy nyugvó körülmények között az IL-10 termelő makrofágok felelősek elsősorban az apoptotikus sejtek fagocitózisáért [126], továbbá azt is, hogy az IL-10 gátolja a monociták DC-kké differenciálódását és aktivációs stimulus indukálta érésüket [127]. Saját eredményeinket másokéval összevetve arra következtettünk, hogy az MDC populációban IL-10 termelő regulátor DC-k is jelen lehetnek [110].

Eredményeink a C1q komplementfehérje egy eddig nem ismert funkciójára hívja fel a figyelmet [45-saját, 128-saját]. A DC-k aktiválása a C1q által az adaptív immunválasz fokozásához, T-sejt toleranciához is vezethet, attól függően, hogy az adott szöveti környezetben milyen egyéb faktorok vannak jelen. Beszámoltak arról is, hogy az imMDC-k funkcionálisan aktív C1q-t termelnek, amelynek mennyisége meghaladja a makrofágok által előállított fehérje mennyiségét [25, 43]. Kimutatták hogy a DC-k az általuk termelt C1q-t képesek megkötni, ami befolyásolja a sejtek érési folyamatát.

A C1q öröklött hiánya jelentősen megnöveli az autoimmun betegségek – RA, SLE - kialakulásának az esélyét. Eredményeink ezt alátámasztják annyiban, hogy ha a DC-k szabályozásában fontos szerepet játszó szérumpfész, a C1q hiányzik, az károsan befolyásolhatja a kialakuló immunválaszt. A C1q jelenléte az immunkomplexekben, illetve a opsonizált apoptotikus sejtek felszínén az immunválasz aktiválása és regulációja révén befolyásolhatja az autoimmun folyamatokat.

## **5.2 C3b kovalens kapcsolódásának hatása makrofágok és dendritikus sejtek érésére és funkcióira**

A komplementaktiválódás során az antigén felszínéhez kovalensen kötődő C3b-nek központi szerepe van, mivel alegységét képezi a C3- és C5-konvertáznak így a kaszkád továbbfutását eredményezi, valamint az antigént megjelölve opsonikus fagocitózist tesz lehetővé [49, 65, 66].

Kísérleteinkben a komplementaktiválódás során kulcsfontosságú szerepet betöltő C3 komplementfehérje sejtműködésre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az immunválasz kialakulása során különösen fontos szerepe van az immunsejtek között kialakuló kölcsönhatásoknak. A komplementkaszkádban kulcsfontosságú C3 fehérje sokoldalú funkció között az adhézión folyamatokban betöltött szerepét számos kutatócsoport, köztük a miénk is részletesen vizsgálta [129]. A kovalens kötődést a C3d

fragmentumban, a cisztein -SH és glutamil -COOH csoport között létrejövő tioészter csoport teszi lehetővé, ami a molekula aktivációjával válik hozzáférhetővé. A C3 eredetű fragmentumok megkötésére számos immunsejt képes [117, 130-131, 132-saját]. U937 monocitoid sejtekről kimutatták, hogy szekretálják és kovalensen meg is kötik a C3-at [60].

A C3-fragmentum megjelöli a targetet, amely azután az aktiválódó effektor reakciók révén kerül feldolgozásra fagocitózis vagy citotoxikus reakció során. A makrofágok számos komplementfehérjét, köztük C3-t is képesek előállítani [52, 58], továbbá opozonizálják a környezetükben lévő antigént, ami azok hatékony fagocitózisához vezet [59]. A target felszínén kovalensen fixált C3-fragmentumok szerepét az ADCC reakció fokozását igazolták [61]. A C3-fragmentum által közvetített kapcsolat fokozta NK sejtek és limfociták citotoxikus reakcióját [62, 63]. C3-deficiens tengerimalacokkal végzett kísérletekben bizonyították a C3 szerepét peritoneális makrofágok fokozott T-sejt aktiváló képességében [133]. A C3 kovalens fixációját mutatták még ki a P815 egér mastocytoma sejteken és néhány egér sejt vonal sejtjein pl. A20 B limfóma sejteken [64]. Munkacsoportunk kimutatta, hogy az aktivált egér makrofágok szérumban keletkező aktivált C3b-t képesek megkötni a felszínükön, és a komplement-fragmentum több óra elteltével is kimutatható a sejt felszínén [117, 130-132]. Korábban bizonyítottuk, hogy makrofágok és B limfociták kovalensen fixálják a C3b-t felszínükön, és ez fokozza antigénbemutató képességüket [132-134]. Egér modell rendszerben végzett kísérleteinkben azt mutattuk ki, hogy a komplementrendszer alternatív aktivációja következtében keletkeznek a kovalensen kötődő fragmentumok. Megvizsgálva a makrofágok antigénbemutató képességét azt találtuk, hogy a friss szérummal kezelt makrofágok fokozott mértékben aktiválták az antigén specifikus T-sejteket, a T-sejtek CR1/CR2-specifikus ellenanyaggal történő kezelésével azonban ez a hatás megszűnt. Eredményeink szerint az APC által kovalensen fixált C3 fragmentum az antigénprezentáció során a T limfociták CR1/CR2 receptorával kölcsönhatásban váltja ki a proliferáció fokozást, ami egy újabb, korábban nem ismert kapcsolódási pontra hívja fel a figyelmet a veleszületett és az adaptív immunrendszer között [132-saját].

A C3 szerepe az antigénprezentációban meghatározza a germinális centrumban zajló sejt működéseket az FDC, makrofág, T és B limfociták kölcsönhatását a C3-fragmentumok által, ami megmagyarázza azt, hogy C3-deficiens állatokban miért károsodik súlyosan a B-sejt mediált humorális immunválasz [135].

Egér C3 KO modellrendszerben leírták, hogy a makrofágok és DC-k antigén bemutató működése gátolt. A C3 szerepét a DC-k differenciálódásában bizonyítja, hogy ez a működés C3 deficiens emberekben súlyosan károsodik [72].

Számos kutató bizonyította a C3b kovalens fixálásának *in vivo* jelentőségét [49, 60, 65-67, 129-131, 134, 136]. B-sejteken sikerült igazolni, hogy a C3-fragmentum kovalens kötőhelye a CR2 [69]. Mivel makrofágok, DC-k és eritrociták nem expresszálnak CR2-t, ezek a sejtek más C3b-t fixáló struktúrát kell kifejezzenek. Ismert, hogy a C3b-fragmentum az aktivátor felszínén lévő -NH<sub>2</sub> és -OH csoportokhoz kötődik kovalensen. A nukleofil jellegű „akceptor” molekulákat azonban ezeken a sejteken ezidáig nem sikerült azonosítani. Eritrociták esetében a glycophorin fehérjét találták lehetséges akceptor helynek, amely felelős a C3b kovalens fixációjáért [70]. A humán mieloid P39 sejtvonal vizsgálata során 40, 60 és 90 kD molekulásúlyú fehérjét azonosítottak mint potenciális C3-kötő struktúrát [137, 138].

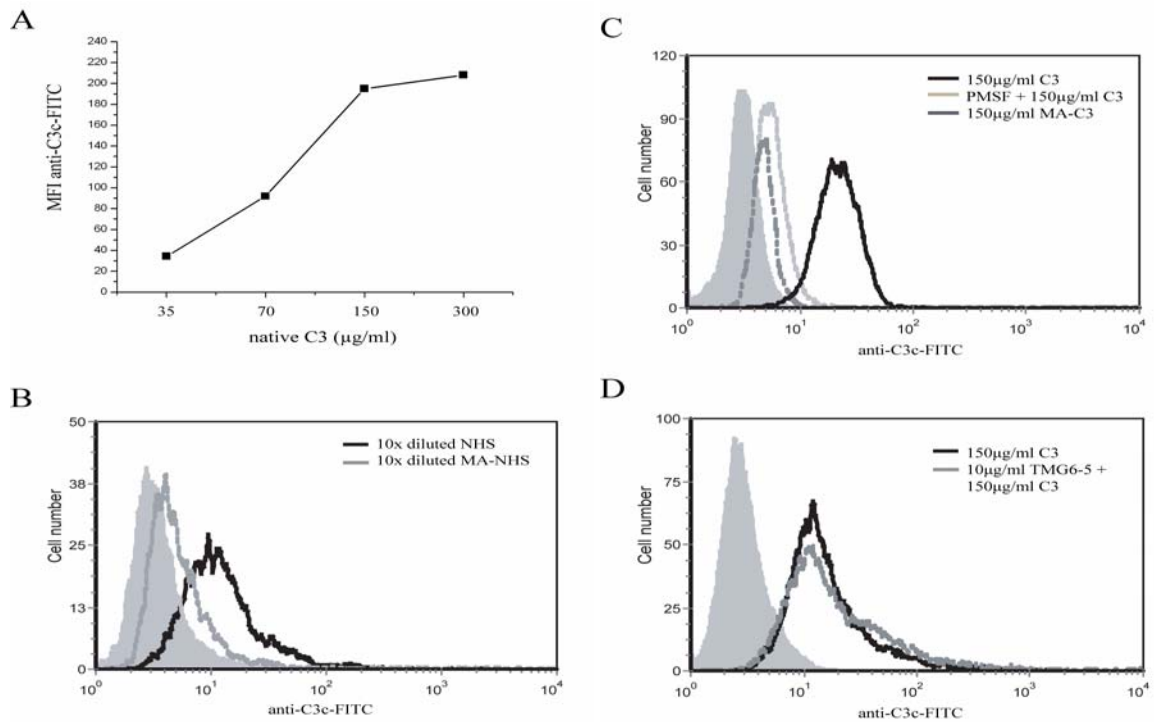
#### *Célkitűzés*

Célunk volt megvizsgálni, hogy a C3 kovalens megkötésére képesek-e az MDC-k? Ha igen, ennek milyen hatása van a sejtek differenciálódására, aktivációjára, működésére, esetleg más sejtekkel való kölcsönhatásukra.

#### *Eredmények*

A C3-fragmentumok kötődését imMDC-khez citofluorimetria segítségével jellemeztük. Szérumból izolált, natív C3-al kezelve a sejteket, citofluorimetriás vizsgálattal koncentráció-függő kötődést detektáltunk az imMDC-k felszínén (*18.A ábra*). Szignifikáns C3 kötődést mutattunk ki abban az esetben is, ha sejteket NHS-el kezeltük, mint fiziológias komplement-forrással. A metilaminnal (MA) való előkezelés tönkreteszi a molekula kovalens kötőhelyét, így az a továbbiakban kovalens módon nem, csak receptorokhoz képes kapcsolódni. Eredményeink szerint a MA-kezelt NHS-ből alig kötődött C3 a sejtekhez, ami arra utal, hogy a C3 fragmentumai túlnyomórészt kovalens módon kötődtek a sejtekhez (*18.B ábra*). Az imMDC-eket PMSF-el előkezelve a C3 kötődés visszaszorulását tapasztaltuk, vagyis a C3 hasításában szerepet játszanak a sejtek által szekretált enzimek (*18.C ábra*). A C3 kötődés módjának jellemzésére az imMDC-eket előkezeltek a CR3 ligandum-kötő helyével specifikusan reagáló monoklonális ellenanyaggal (anti-CD11b, TMG6-5). *A TMG6-5 ellenanyagért Dr. Andó Istvánnak (MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont) tartozunk köszönettel.* A TMG6-5-el történő előkezelés alig változtatott a natív C3 kapcsolódásának mértékén, ami szintén megerősíti

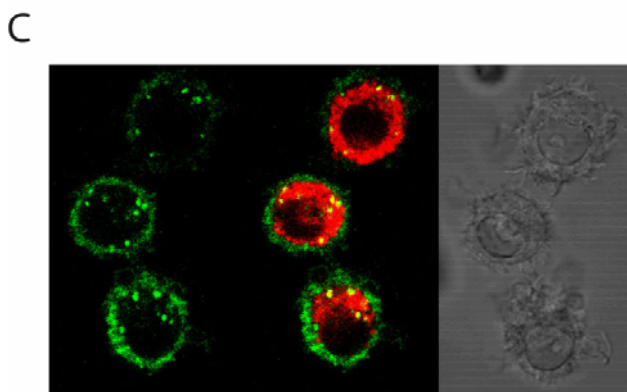
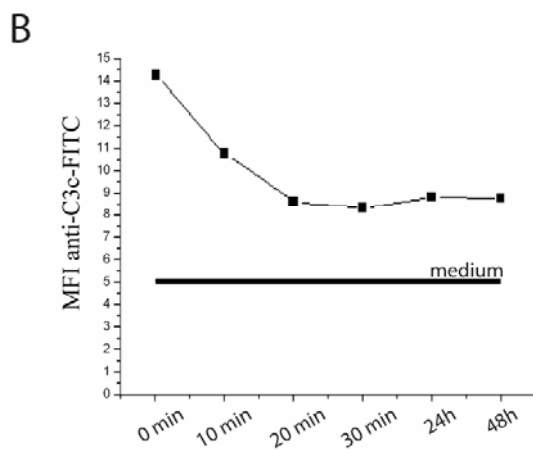
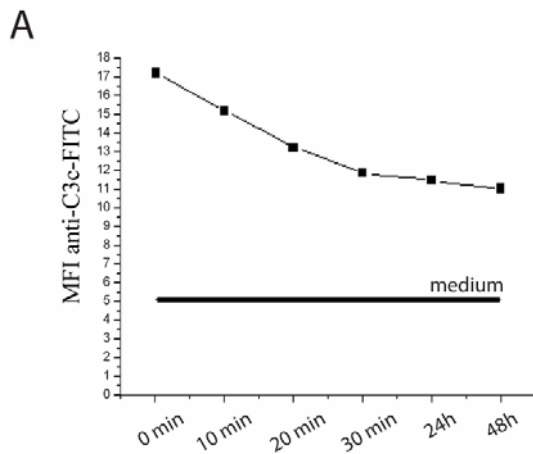
azt, hogy a C3b elsősorban kovalens módon kötődik az imMDC-khez kísérleti rendszerünkben (18.D ábra).



18.ábra. C3b kovalens kötődésének kimutatása MDC-khez. Az imMDC-ket a következők szerint kezeltük, majd mértük a kötődött C3-fragmentumokat anti-C3c-FITC-el, citofluorimetriával (A) különböző koncentrációjú tisztított natív C3 (B) 10x hígítású normál humán savó (NHS), mint komplement forrás, illetve metilamin-kezelt normál humán savó 10x hígítása (MA-NHS) (C) tisztított natív natív C3, MA-C3 és PMSF+C3 (D) TMG6-5 (anti-CD11b) ellenanyag+natív C3. (Egy reprezentatív eredmény öt független kísérletből, MFI adatok)

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a kovalensen megkötött C3-fragmentumnak mi a további sorsa. Az imMDC-ket tisztított, natív C3-al kezeltük, majd a sejtfelszínen fixált komplement-fargmentumokat citofluorimetriával mutattuk ki. Eredményeink szerint a imMDC felszínén fixált C3-fragmentum gyorsan internalizálódik (a kezelést követő 30 percen belül), de fixált fragmentumok még 24-48 óra múlva is detektálhatók a sejteken (19.A ábra). Az intra – és extracelluláris C3-t együttesen mérve azt találtuk, hogy az első 20 percben bekövetkezett gyors csökkenés után a szintje azonos maradt (19.B ábra). Az internalizált C3-t konfokális mikroszkóppal is kimutattuk natív C3-al inkubálás és permeabilizálás után (19.C ábra). Amint az a képen jól látható, a C3-fragmentumok

egyaránt jelen vannak a sejtfelszínen és intracellulárisan, LAMP-1 lizoszómális fehérjével asszociált módon.



19. ábra.

*Kovalensen imMDC-khez kötődött C3-fragmentumok internalizációja. (A) Kovalensen kötött C3-fragmentumok kimutatása imMDC-k sejtfelszínén a C3 kezelést követően. Az MFI értékek az anti-C3c-FITC jelölés eredményét mutatják, kontrollként médiumban tartott sejteket használtunk.*

*(B) Az extra- és intracelluláris C3-fragmentum detektálása C3 kezelést követően. Kontrollként médiumban tartott sejteket használtunk.*

*(C) 37°C-on, 30 percig natív C3-al kezelt imMDC-k konfokális mikroszkópos vizsgálata. A kezelés után a sejteket permeabilizáltuk és jelöltük anti-C3c-FITC-el (zöld) és anti-LAMP-1-PE-el (vörös). Bal oldali kép az anti-C3c-FITC jelölés, a középső a kettős jelölés, a jobb oldali a fénymikroszkópos felvétel (60× objektív és digitális nagyítás). Egy reprezentatív eredmény öt független kísérletből.*



Ismert, hogy az aktivációs stimulus hatással van a DC-k éréseire. Megvizsgáltuk, hogy a C3 fixáció befolyásolja-e az imMDC-k érést, ezért a natív C3-al történő kezelés után mértük a érési markerek expressziójának változását (II.táblázat).

	imMDC	maMDC	natív C3-kezelt MDC	Immobilizált C3-kezelt MDC
<b>CD83</b>	5,79 +/- 0,35	13,34 +/- 2,21 ***	<b>7,38 +/- 0,41 **</b>	4,57 +/- 0,71
<b>CD80</b>	5,28 +/- 1,18	8,07 +/- 0,79 *	<b>6,44 +/- 0,75</b>	4,61 +/- 0,89
<b>CD86</b>	10,08 +/- 1,46	30,88 +/- 6,35 ***	<b>25,98 +/- 2,01 ***</b>	9,1 +/- 2,00
<b>MHCII</b>	89,30 +/- 25,42	142,34 +/- 20,1 *	<b>137,21 +/- 11,3 *</b>	95,42 +/- 13,5
<b>MR</b>	25,49 +/- 4,98	15,81 +/- 1,87 *	<b>22,49 +/- 4,4</b>	29,68 +/- 0,99

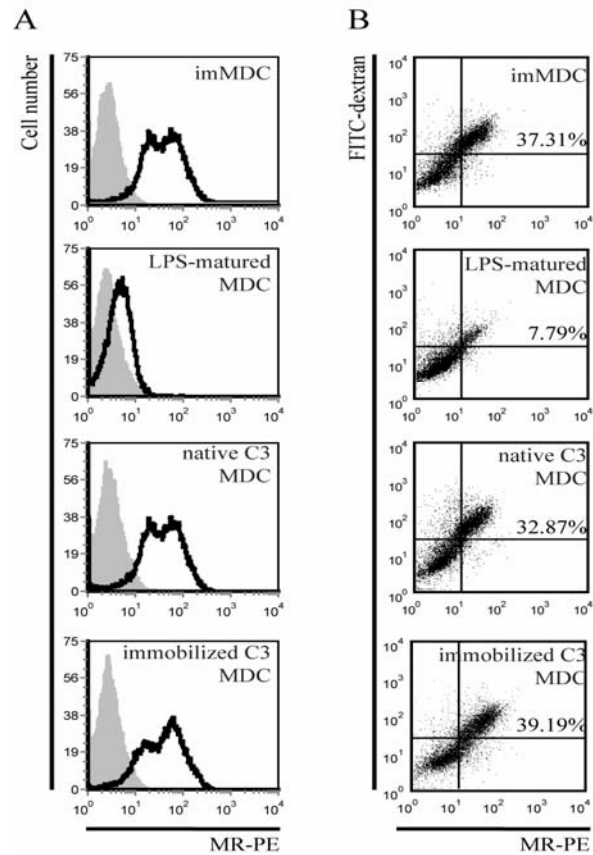
II. táblázat Natív és immobilizált C3 kezelés hatása MDC-k éréseire.

Három független kísérlet citofluorimetriás vizsgálat alapján számolt MFI +/- sd.

(\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ).

Az imMDC-k különböző C3-fragmentumokat kötő komplementreceptorokat is kifejeznek, így a komplementfehérje ezekhez is kapcsolódhat a kovalens fixáció mellett. Tisztított natív C3-al történő kezelés mellett műnyag-felületen immobilizált C3 jelenlétében is inkubáltuk a sejteket, mivel ebben az utóbbi esetben a felszínhez kovalensen kapcsolódó C3-fragmentumok CR3/CR4 mediált módon kapcsolódhatnak a sejtekhez. Két nap múlva megvizsgálva a sejtek fenotípusos változását azt tapasztaltuk, hogy a kovalensen kötődő C3-fragmentum erősen fokozta a CD83, CD86 és MHCII expressziót, viszont a CD80 és a MR mennyisége nem változott szignifikánsan. Ezzel szemben az immobilizált C3 egyik marker expresszióját sem befolyásolta.

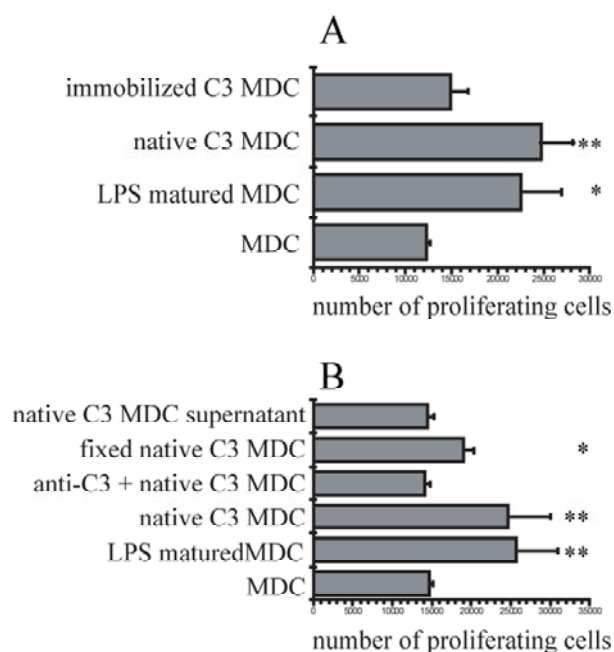
Az imMDC intenzív antigénfelvételében fontos szerepe van a sejtek MR-nak. Ennek mennyisége patogén (vagy LPS) stimulus hatására szignifikánsan csökken. Kísérletünkben a MR-k mennyiségét nem befolyásolta sem a natív, sem az immobilizált C3-al történő kezelés, ezért FITC-dextrán fagocitózis teszttel megvizsgáltuk, hogy a MR-k funkcionálisan aktívak maradnak-e. Amint eredményeink mutatják, a MR aktivitását a C3-kezelés nem befolyásolta (20.ábra).



20. ábra MR expressziója és funkcionális aktivitása C3-kezelt imMDC-ken. (A) MR expresszió kontroll, LPS-kezelt, natív C3-kezelt és immobilizált C3-al kezelt imMDC-ken. A detektálást anti-MR-PE ellenanyaggal történt, a szürke kitöltött oszlopok az izotípus kontrollt mutatják. (B) A MR funkcionális vizsgálata az előbbi kezeléseket után, FITC-dextrán fagocitózis citofluorimetriás vizsgálatával. (Egy reprezentatív eredmény öt független kísérletből.)

Előző vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a natív C3 kezelés hatására fokozódott az imMDC-k CD83, CD86 és MHCII expressziója, ezért tanulmányoztuk az aktivált sejtek allogén T-sejt proliferációt kiváltó hatását. A 21.A ábrán bemutatott eredményeink szerint, a natív C3-mal kezelt MDC-k T-sejt aktiváló képessége összevethető volt az LPS-stimulált maMDC-k hatásával. A stimuláció magyarázatául szolgálhat az a megfigyelés, hogy a Th-sejtek bizonyos populációján kifejeződik CR1 [139], ami a DC-ken fixált C3-t megkötve stabilizálja a két sejt kölcsönhatását, lehetővé téve az fokozott aktivációt. Hogy megvizsgáljuk a C3 híd-képző funkcióját a két sejt típus között, az MDC-eket közvetlenül a natív C3 kezelés után fixáltuk, hogy a kostimulátor molekulák aktiváló hatását kizárjuk. Ebben az esetben is tapasztaltunk

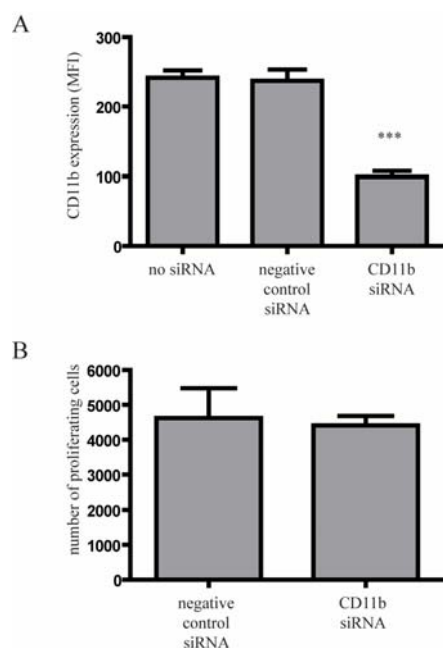
proliferáció növekedést (21.B ábra). Akkor viszont, ha a kovalensen kötődést anti-C3 ellenanyaggal gátoltuk, vagy az MDC-ket immobilizált C3-al kezeltük, a T-sejt aktiváció elmaradt (21.B ábra). Megvizsgáltuk azt is, hogy az T-sejt aktivációt nem az MDC-k által termelt citokinek okozzák-e. Mértük a T-sejtek proliferációs képességét a natív C3-al kezelt MDC-k felülúszójának hozzáadásával, de aktivációt ekkor sem tapasztaltunk (21. B ábra).



21. ábra. Kovalensen fixált C3 hatása MDC-k allogén T-sejt proliferációjára (A) Az MDC-ket immobilizált C3-al natív C3-al kezeltük, pozitív kontrollként LPS-kezelt MDC-ket használtunk. 1:5 DC:T arányánál, öt nap múlva mértük a T-sejtek proliferációját. (B) A natív C3-al kezelt MDC felülúszójával, natív C3 kezelés után 1 % formaldehiddel fixált MDC-vel, natív C3 kezelt MDC-khez anti-human C3 F(ab')<sub>2</sub> adva, natív C3 kezelt MDC-k és LPS aktivált MDC jeleltében inkubáltuk az allogén T-sejteket, 1:5 DC:T arányánál. Öt nap múlva mértük a T-sejtek proliferációját. Az osztódó sejtek számát CFSE jelöléses módszerrel, citofluorimetriával állapítottuk meg.

(Három független kísérletből számolt átlagot±SD mutatunk be. Student's t-test \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .)

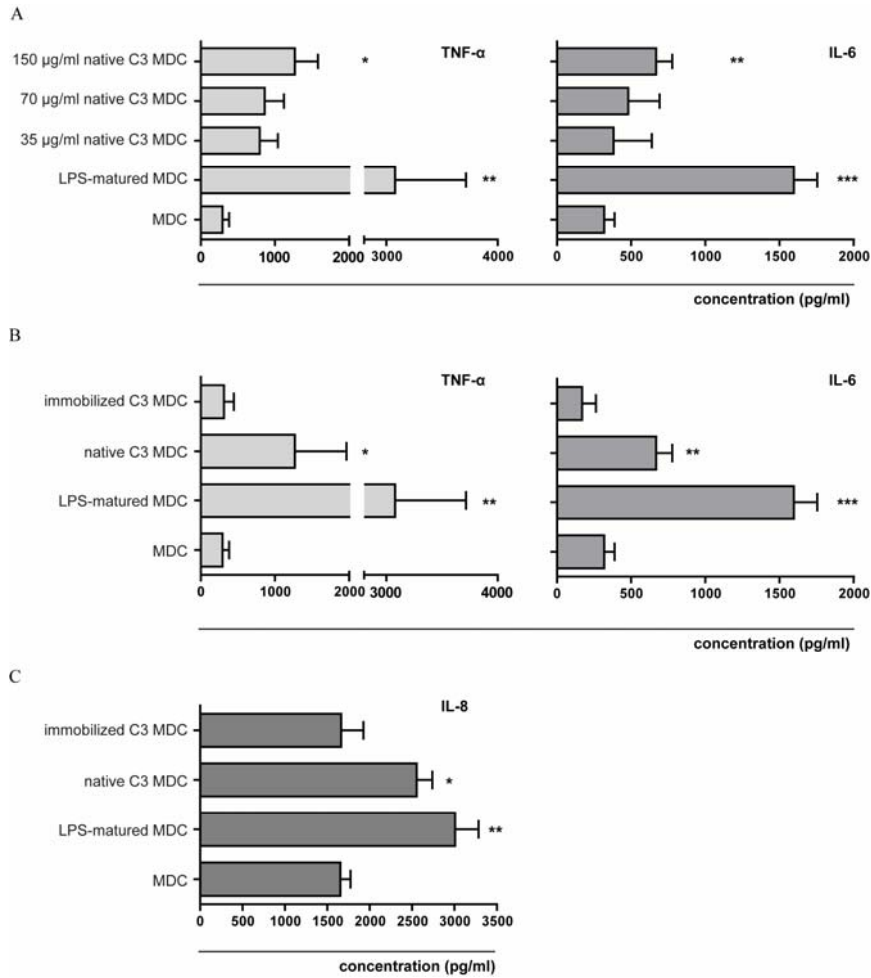
Ellenőriztük azt is, hogy a T-sejt aktiváció nem függ-e az MDC-k CR3 receptorától. Az MDC-k CD11b géncsökkentésével szignifikánsan csökkentettük a CR3 mennyiségét a sejteken (22. A ábra), majd vizsgáltuk a T-sejt aktiváló hatásukat A 22. B ábrán látható eredmény szerint nem találtunk különbséget a géncsökkentett MDC-k aktiváló képességében. Ez arra utal, hogy az MDC-k CR3 receptora nem vesz részt a T-sejt stimulációban.



22. ábra. CD11b géncsendesített MDC-k allogén T-sejt aktivációja (A) Kezeletlen, kontroll siRNS kezelt és CD11b specifikus siRNS transzfektált MDC-eket állítottunk elő. Az ábra a citofluorimetriával mért CD11b expressziót mutatja be, anti-hu CD11b-RPE jelöléssel. (B) Az allogén T-sejteket natív C3 kezelt kontroll siRNA és natív C3 kezelt CD11b specifikus siRNA transzfektált MDC-kkel inkubáltuk. Az osztódó sejtek számát CFSE jelöléses módszerrel, citofluorimetriával állapítottuk meg.

(Három független kísérletből számolt átlagot $\pm$ SD mutatunk be. Student's t-test \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

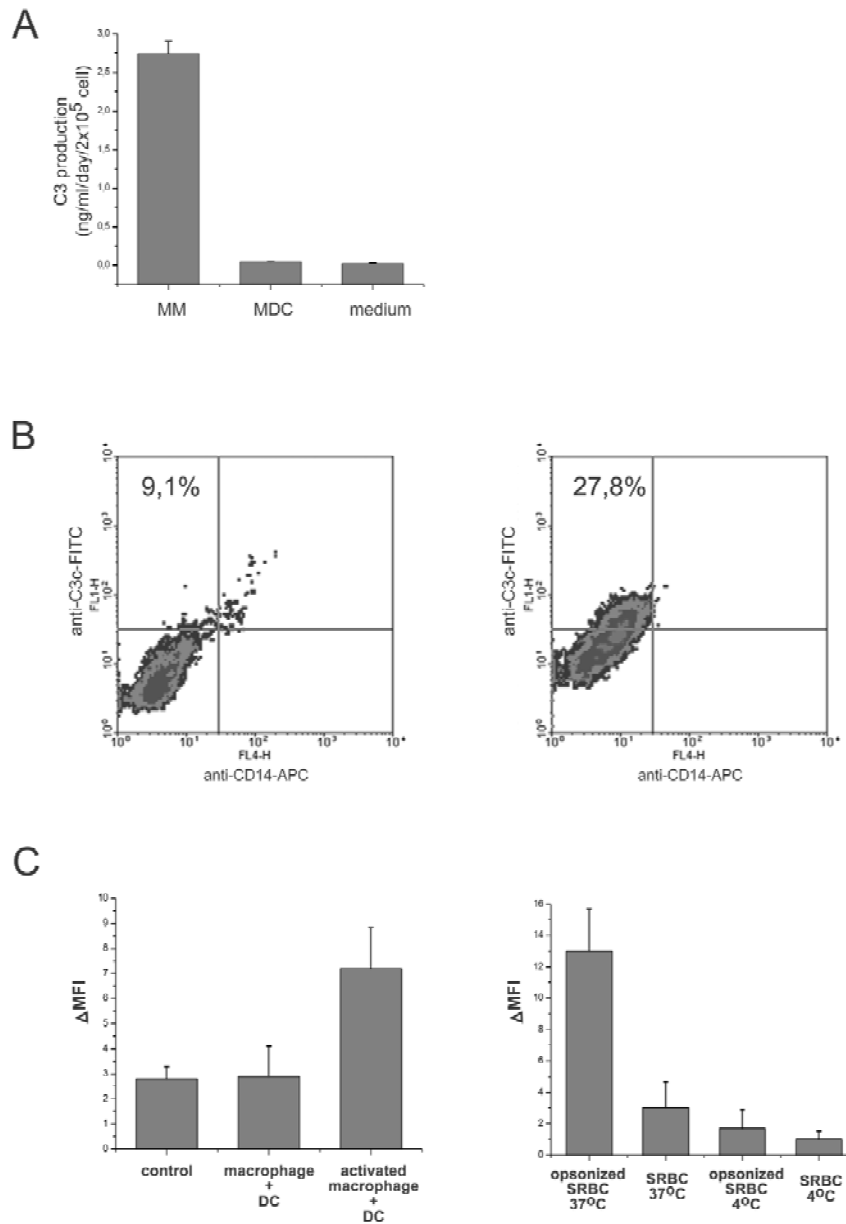
A DC-k aktiváció hatására számos gyulladási citokint állítanak elő. Mivel kimutattuk, hogy kovalensen fixált C3 hatására megváltozik az MDC-k fenotípusa és T-sejt stimuláló képessége, indokolt volt megvizsgálni, hogy változik-e az aktiváció során a gyulladási citokin termelésük. A natív C3-al történő kezelés után a sejtek 24 órás felülúszójából mértük az IL-6, a TNF- $\alpha$  és az IL-8 mennyiségét. Eredményeink szerint a C3b kovalens megkötése fokozta a sejtek IL-6 és TNF- $\alpha$  és IL-8 szekrécióját. (23.A és 23.C ábra), ezzel ellentétben az immobilizált C3 nem befolyásolta azt. A pozitív kontrollként használt LPS kezelésről ismert, hogy fokozza ezen citokineknek a bioszintézisét. Továbbá, a natív C3 kezelés NF- $\kappa$ B transzlokációt is eredményezett az MDC-kben.



23. ábra Kovalensen kötődött C3 hatása MDC-k; TNF- $\alpha$  (A,B), IL-6 (A,B) és IL-8 (C) szekréciója. A natív C3-al, immobilizált C3-al vagy LPS-el kezelt MDC-k 24 órás felülszűrésből ELISA módszerrel határoztuk meg a termelt citokin mennyiségét. (Öt független kísérletből számolt átlagot $\pm$ SD mutatunk be. Student's t-test. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.005; \*\*\* $p$ <0.001.)

Tanulmányozni kívántuk a folyamat fiziológias jelentőségét, és ezért az MDC-eket együtt inkubáltuk az azonos donorból differenciáltatott, monocita eredetű makrofágokkal (MM) (24. ábra). Jóllehet mások kimutattak C3mRNS-t human MDC kultúrában, de ezekben a közleményekben szekretált proteinről nem számolnak be [140]. Kísérleti rendszerünkben a makrofágok nagy mennyiségben szekretálják a C3 komplementfehérjét, viszont MDC-k esetében C3 szekréciót nem tapasztaltunk (24.A ábra). Abban az esetben, ha a MM-kat aktiváltuk PMA-val, a kokultúrában tartott MDC-k felszínén detektálni tudtuk a megkötődött makrofág-eredetű C3 fragmentumokat (24.B ábra). Az aktivált MM-kkal együtt inkubált birkavörösvértest antigén felszínén szintén azonosítottuk a C3 fragmentumokat, vagyis lokális opsonizáció zajlott le. Az ilyen

módon, makrofágok segítségével opsonizált antigént jóval hatékonyabban tudták felvenni a MDC-k (24.C ábra).



24. ábra MM-k és MDC-k C3 termelése, a C3 sejtekhez kötődése és opsonizáló hatása (A) MM-k és MDC-k által szekretált C3 kimutatása szendvics ELISA módszerrel. (B) MF eredetű C3 kötődésének kimutatása CD14<sup>+</sup> MDC-khez, nem aktivált MM-kkal (bal oldal) és aktivált MM-kkal (jobb oldal) inkubálva (C) bal oldal: Sejtekhez kötődött C3 mennyiségének citofluorimetriás meghatározása imMDC-ken, nem aktivált és aktivált MM kokulturákban, jobb oldal: MM jelenlétében opsonizált illetve nem opsonizált birka vörösvértest (SRBC) fagocitózisa imMDC-k által 4 °C és 37 °C. (Öt független kísérletből számolt átlagot±SD mutatunk be, citofluorimetriás mérés.)

*Összegzés*

Bizonyítottuk, hogy a tisztított, hemolitikusan aktív C3-al, illetve a humán savóval kezelt MDC-k képesek dóziszfüggő módon, kovalensen fixálni felszínükön a C3b fragmentumokat (*18. ábra*). A metilaminnal kezelt, vagyis kovalens fixációra már nem képes C3 (MA-C3) kötődése imMDC-khez szignifikánsan csökkent, ami arra utal, hogy a C3 elsősorban kovalensen kötődik a sejtekhez. Az imMDC-keket PMSF-el előkezelve a C3 kötődés csökkenését eredményezte, tehát a C3 hasításában szerepet játszottak a sejtek által szekretált enzimek (*18.A-C ábra*). Mivel az MDC-k nagy mennyiségben fejezik ki CR3 komplementreceptort, ellenőriztük ennek szerepét a C3-fragmentumok megkötésében. A CR3 ligandumkötőhelyére specifikus ellenanyaggal (TMG6-5) előinkubálva a sejteket, a C3 depozíciót nem sikerült visszaszorítani. Ez szintén azt támasztja alá, hogy a natív C3 túlnyomórészt kovalens módon fixálódik az imMDC-k sejt felszínén (*18.D ábra*). Vizsgáltuk a C3-fragmentum további sorsát, citofluorimetriával nyomonkövetve a megkötött fragmentumot. Eredményeink szerint az imMDC-k sejt felszínén fixált C3-fragmentum gyors internalizációja következik be, ami 10 perccel a kezelés után már megfigyelhető, ugyanakkor még 24-48 óra múlva is detektálhatók C3-fragmentumok a sejt felszínen. (*19.A ábra*). Konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálataink szerint is a C3b gyors internalizációja mutatható ki, és a 30 perces kezelés után C3-fragmentumok detektálhatók intracellulárisan LAMP-1 lizoszómális fehérjével asszociált módon (*19.C ábra*).

Megvizsgáltuk a natív C3 kezelés hatását az MDC-k fenotípusos változására, és azt találtuk, hogy szignifikánsan nőtt a CD80, CD83, CD86 és MHCII sejt felszíni mennyisége, ami a sejtek differenciálódását jelzi (*II. táblázat*). Ezek a változások az érett MDC-k antigénprezentáló funkciójának aktiválódását mutatják. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a natív C3-mal kezelt MDC-k hatékony aktivátorai az allogén T-sejteknek, fokozzák azok osztódását. Abban az esetben, ha a MDC-keket immobilizált C3-al kezeltük, vagyis a C3b kovalens kapcsolódására a sejtekhez nem volt lehetőség, a T-sejt aktiváció elmaradt (*21.A ábra*). Ellenőriztük azt is, hogy a T-sejt aktiváció nem függ-e az MDC-k CR3 receptoron keresztül történő aktivációjától. Ennek vizsgálatára az im MDC-k CD11b géncsendesítésével szignifikánsan csökkentettük a CR3 mennyiségét a sejtek felszínén (*22.A ábra*), majd vizsgáltuk T-sejt aktiváló hatásukat. A *22. B ábrán* látható eredmény szerint, nem találtunk

különbséget a géncsendesített MDC-k allogén T-sejt aktiváló képességében. Ez arra utal, hogy az MDC-k CR3 receptora nem vesz részt a T-sejt stimulációban. Megvizsgáltuk azt is, hogy a T-sejt aktivációt nem az MDC-k által termelt citokinek váltják-e ki, ezért mértük a natív C3-al aktivált MDC-k felülúszójának allogén T-sejtekre gyakorolt hatását; nem kaptunk változást a T-sejtek proliferációjában (*21.B ábra*). Tehát, a T-sejtek aktivációját nem az aktivált MDC-kből származó citokinek közvetítik. Korábbi kutatásokban beszámoltak arról, hogy egyes Th populációkon kifejeződik a CR1 [139], és ennek köszönhetően a C3b fragmentum hídát képezhet a DC- és a T-sejt között. Ennek a kérdésnek a tisztázására az MDC-eket közvetlenül a natív C3 kezelés után fixáltuk, így a kostimulátor molekulák által kiváltott aktiváló hatást kizártuk. Ebben az esetben is tapasztaltunk szignifikáns proliferáció növekedést, ami arra engedett következtetni, hogy az MDC-k felszínén kovalensen fixált C3-fragmentum a T-sejtek komplementreceptora közvetítésével vált ki az aktivációt (*21.B ábra*). Abban az esetben, ha a fixált C3-t hordozó MDC-k T-sejtekkel való kötődését anti-C3 ellenanyag kezeléssel gátoltuk, a T-sejt proliferáció fokozódás elmaradt (*21.B ábra*).

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a C3b kovalens fixációja befolyásolja-e az MDC-k gyulladási citokin termelését. Eredményeink szerint a C3-fragmentum kovalens kötődése fokozta a sejtek IL-6, TNF- $\alpha$  és IL-8 szekrécióját, ezzel ellentétben az immobilizált C3 kezelés egyik citokin szekrécióját sem befolyásolta (*23.A,C ábra*).

A szöveti környezetben a dendritikus sejtek és a makrofágok együttesen fordulnak elő, így lehetőség nyílik közvetlen kölcsönhatásukra. Gyulladásos stimulus következtében a C3, mint akut-fázis fehérje megnövekedett mennyiségben van jelen a vérszérumban. A C3 közvetített folyamatok *in vivo* jelentőségét vizsgálni kívántuk gyulladási szituációt modellező körülmények között, az MM és MDC kölcsönhatása során. A vizsgálatainkban a C3-at nem termelő MDC-eket, a C3-at szekretáló (*24.A ábra*) MM-ok jelenlétében tenyésztettük. Abban az esetben, ha a makrofágokat PMA-val aktiváltuk és kokultúrába helyeztük az MDC-ekkel, az MDC-k felszínén detektálni tudtuk a megnövekedett mennyiségben fixált MM-eredetű C3-fragmentumokat (*24.B ábra*). Az aktivált makrofágok környezetében inkubált birkavörösvértest felszínén szintén azonosítottuk a megkötött C3-fragmentumokat, vagyis lokális opsonizáció



zajlott le. Az ilyen módon, MM által termelt C3-al opszonizált antigént jóval hatékonyabban tudták felvenni az MDC-k, mint a nem opszonizáltat (24.C ábra).

A C3 öröklött hiánya homozigóta formában súlyos, étellel összeegyeztethetetlen állapot kialakulásához vezet, ami ismétlődő, gennykeltő baktériumok által kiváltott szövődményes fertőzéseket és a beteg korai halálát okozza [141]. A C3 deficiens betegekben komoly MDC differenciálódási zavart írtak le [72]. A vizsgálatokban kimutatták, hogy jóllehet, a C3 deficiens egyén makrofágjai szintetizálnak C3-at, az nem kerül szekrécióra, hanem a sejtek Golgi kompartmentumaiban felhalmozódik. A betegekben a DC-k mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint egészséges emberekben. Az antigénbemutató sejtek prezentáló képessége súlyosan károsodott, a humorális immunválasz gyengült és memória B-sejteket nem tudtak kimutatni a betegekben. Eredményeink összhangban állnak a C3 deficiens betegekben leírt eltérésekkel és egyben magyarázatul is szolgálnak azokra. Kísérleti eredményeink szerint ugyanis, a szervezet számára veszélyt jelentő ingerek hatására aktiválódott makrofágok C3 termelése fokozódik, és ennek a lokálisan – pl. a nyirokcsomóban – termelődött C3-nak fontos szerepe van immunfolyamatok szabályozásában. Itt ugyanis a makrofágok és a DC-k együtt fordulnak elő, és a makrofágok által, gyulladásszerű stimulusra fokozott mennyiségben termelt C3-t a DC-k enzimjeikkel elhasítják, majd a keletkező komplement-fragmentumot kovalensen fixálják felszínükön. Ilyen módon a C3 molekula hatékony eszköze lehet a DC-k és makrofágok közti kommunikációnak. C3 hiányában a DC-k differenciálódása és működése súlyosan károsodik, ami a limfociták nem kielégítő aktivációját és az immunválasz többi elemének funkció kiesését idézi elő. Vizsgálati eredményeink - Ghannam megfigyeléseivel összhangban - meggyőzően bizonyítják, hogy az antigénbemutató DC-k, a környezetükben jelenlévő C3 hatására, T limfociták aktiválására alkalmas sejtekké érnek [164-saját].

### **5.3. A iC3b $\beta_2$ -integrinokhoz kötődésének hatása dendritikus sejtek érésére és működésére**

A szervezetünkben keringő antigén-antitest komplexekre a komplementaktiváció eredményeképpen C3-eredetű fragmentumok rakódnak le. Ennek köszönhetően az opszonizált antigén a C3-fragmentumokat megkötő CR-okat

kifejező sejtekkel is kölcsönhatásba kerül, köztük a fagocitákkal. A periférián őrzősejtet végző éretlen DC-k felismerik az antigént és bekebelezik azt. Ezt követően a sejtek a nyirokcsomóba vándorolnak, aktiválódnak és differenciálódnak. Az érett DC-k azután a nyirokcsomóban kostimulátor molekulákat expresszálnak és bemutatják a feldolgozott antigént a naív Th-sejteknek. Az aktivált DC-kból származó citokinek meghatározzák a Th limfociták differenciálódását, polarizációját.

A antigén felszínén kovalensen fixált C3-fragmentumok: a C3b, az iC3b, a C3c és a C3d(g), ligandumai a CR1, CR2, CR3 és CR4 receptoroknak (7. ábra, I.táblázat), [11, 12, 142-144]. A CR3 és CR4 a mieloid sejteken fordul elő; a neutrofil granulociták, a monociták, a makrofágok, és a dendritikus sejtek felszínén. A CR3 (CD11b/CD18) és a CR4 (CD11c/CD18) a  $\beta_2$ -integrin családba tartoznak, eltérő  $\alpha$  és azonos  $\beta$  láncokból álló heterodimer molekulák, amelyek extracelluláris doménje 87%-os homológiát mutat. Mindkét receptor elsődleges természetes liganduma az iC3b fragmentum [145, 146]. Az integrinek fontos szerepet töltenek be a sejtadhéziós folyamatokban, az immunológiai szinapszis létrehozásában, az endotéliumon keresztül történő sejt migrációban valamint az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódásban. A patogének, az apoptotikus sejtek, a fertőzött és a tumorosan elfajult sejtek fagocitózisában elengedhetetlen a CR3 részvétele [4, 77, 147, 148]. Kimutatták, hogy az iC3b-vel opsonizált apoptotikus sejtek kölcsönhatása a DC-k CR3 molekuláival tolerogén DC fenotípus kialakulását eredményezi [149-151]. A komplementreceptorok közül a CR3 volt az elsőként azonosított, fagocitózist közvetítő receptor [152]. A komplementfehérjék és dendritikus sejtek kapcsolatát vizsgáló munkákban [140] a DC-k komplement-opsonizált antigént felismerő CR3 és CR4 receptorainak összehasonlító, részletes vizsgálatával nem foglalkoztak.

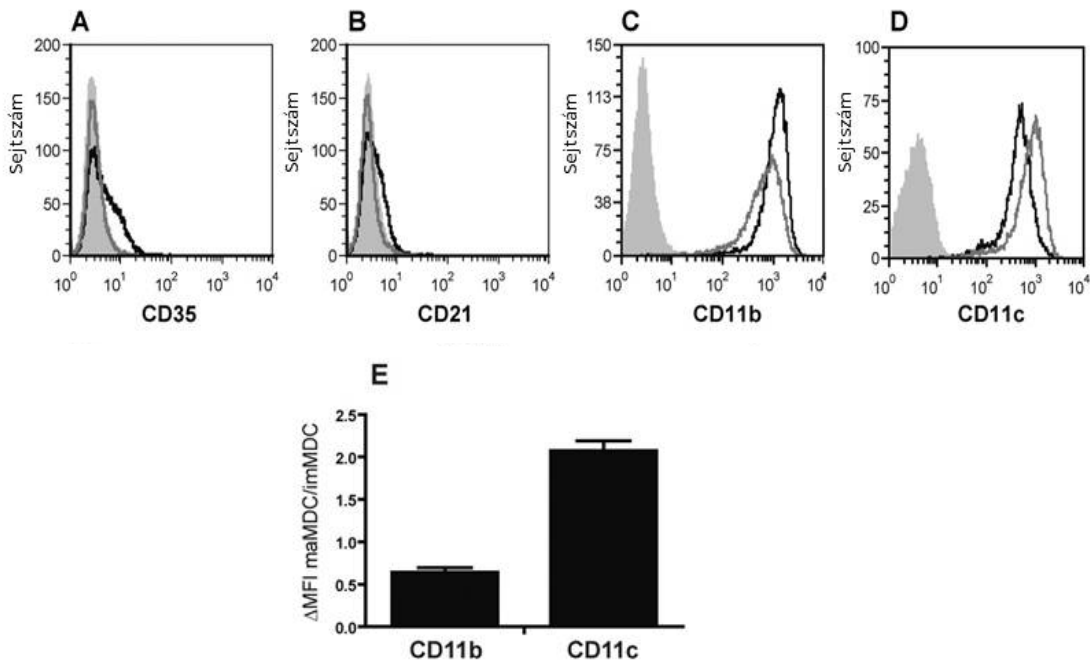
#### *Célkitűzés*

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a CR3 és CR4 expresszióját a sejtek differenciálódása során és megállapítsuk van-e a két receptornak elkülöníthető specifikus funkciója. Mivel korábban minden CR4 funkciót elemző kísérletet egereken végeztek, a CR3 és CR4 expressziójában és funkciójában megmutatkozó különbséget mi emberi rendszerben vizsgáltuk. Kísérleteinket megnehezítette, hogy a két receptor együtt fejeződik ki a makrofágok és a dendritikus sejtek sejtmembránjában, ligandumspecificitásuk átfedő, és a humán CR4 ligandumkötőhelyére specifikus ellenanyagok nem voltak korábban elérhetők. Ezen

problémák kiküszöbölésére létrehoztunk egy siRNS technikán alapuló rendszert, és így olyan humán monocita eredetű dendritikus sejteket tudunk differenciáltatni, melyek döntően vagy csak CR3 vagy csak CR4 receptort hordoztak. Ez a módszer lehetővé tette, hogy a ligandum kötődésének hatását egymástól függetlenül elemezzük.

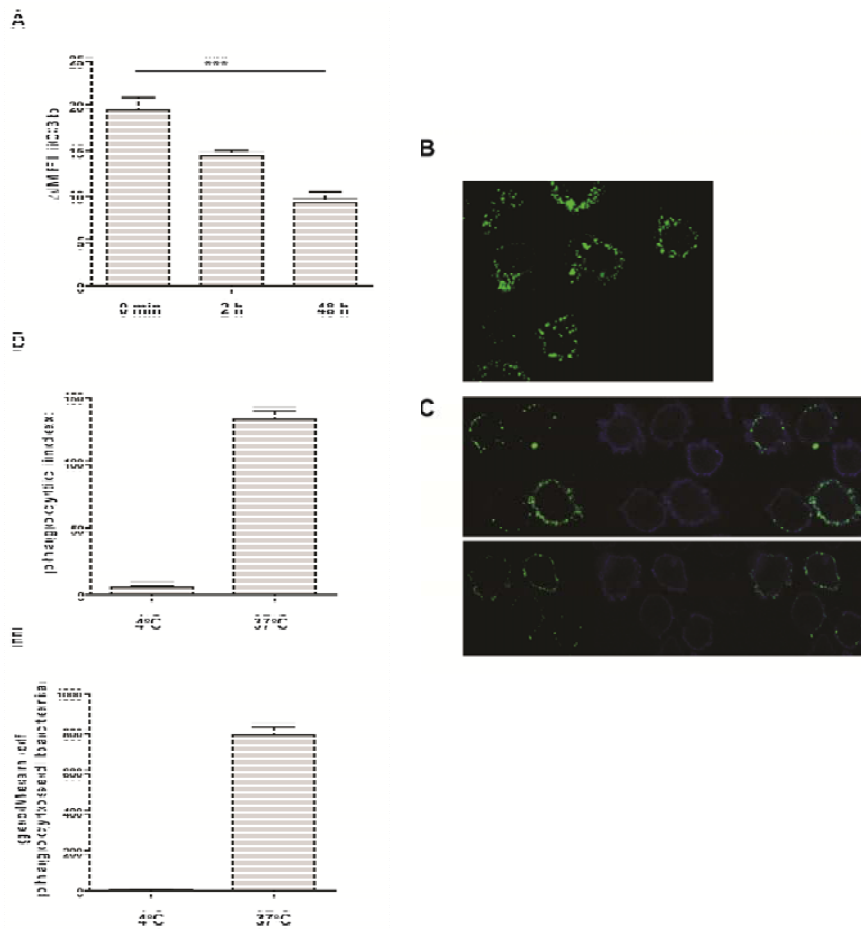
### Eredmények

Mivel korábbi kísérletekben az MDC-k komplementreceptor expressziójának kimutatása hiányos volt [103, 143], ezért megvizsgáltuk ezeknek a receptoroknak a jelenlétét és mennyiségi változását a sejtek differenciálódása során. Kimutattuk, hogy az imMDC-k kis mértékű CR1 expressziója az érés során megszűnik (25.A ábra). CR2-t sem imMDC-ken, sem maMDC-ken nem detektáltunk (25.B ábra). CR3-at és CR4-et konstitutív módon kifejeznek a sejtek, és LPS-indukálta érésük során a CR3 szint kb. 65 %-ra csökken, a CR4 mennyisége viszont mintegy duplálára nő (25.C,D,E ábra).



25. ábra Komplementreceptorok kimutatása citofluorimetriával im- és maMDC-ken. (A) CD35-CR1, (B) CD21-CR2, (C) CD11b-CR3  $\alpha$ -lánc és (D) CD11c-CR4  $\alpha$ -lánc sejtfelszíni expressziója imMDC-ken és maMDC-ken. A fekete hisztogram az imMDC, a szürke az maMDC, míg a szürkével kitöltött az izotípus kontrollt mutatja. (Egy reprezentatív  $\Delta$ MFI eredmény öt független kísérletből.) (E) az MDC-k érése során a CD11b mennyisége csökkent, míg a CD11c expressziója nőtt. A változást a következőképpen fejezzük ki: CD11b maMDC  $\Delta$ MFI / CD11b imMDC  $\Delta$ MFI illetve CD11c maMDC  $\Delta$ MFI / CD11c imMDC  $\Delta$ MFI. (Az ábrán öt független kísérlet átlaga  $\pm$  SD látható.)

Vizsgáltuk a sejtekhez kötődött iC3b további sorsát. Ebből a célból az iC3b kötődését 4°C-on tartott sejteken mértük, majd 37°C-on folytatva az inkubációt követtük a ligandum internalizációját. Azt tapasztaltuk, hogy 2 óra után a sejt felszínen szignifikánsan csökkent a megkötött ligandum mennyisége (26.A ábra). Konfokális mikroszkópos vizsgálattal bizonyítottuk, hogy két óra inkubálás után az iC3b ligandum internalizálódott a sejtekbe (26.B ábra). Azt is kimutattuk, hogy az iC3b kolokalizációt mutatott a CD11b-vel és a CD11c-vel (26.C ábra).



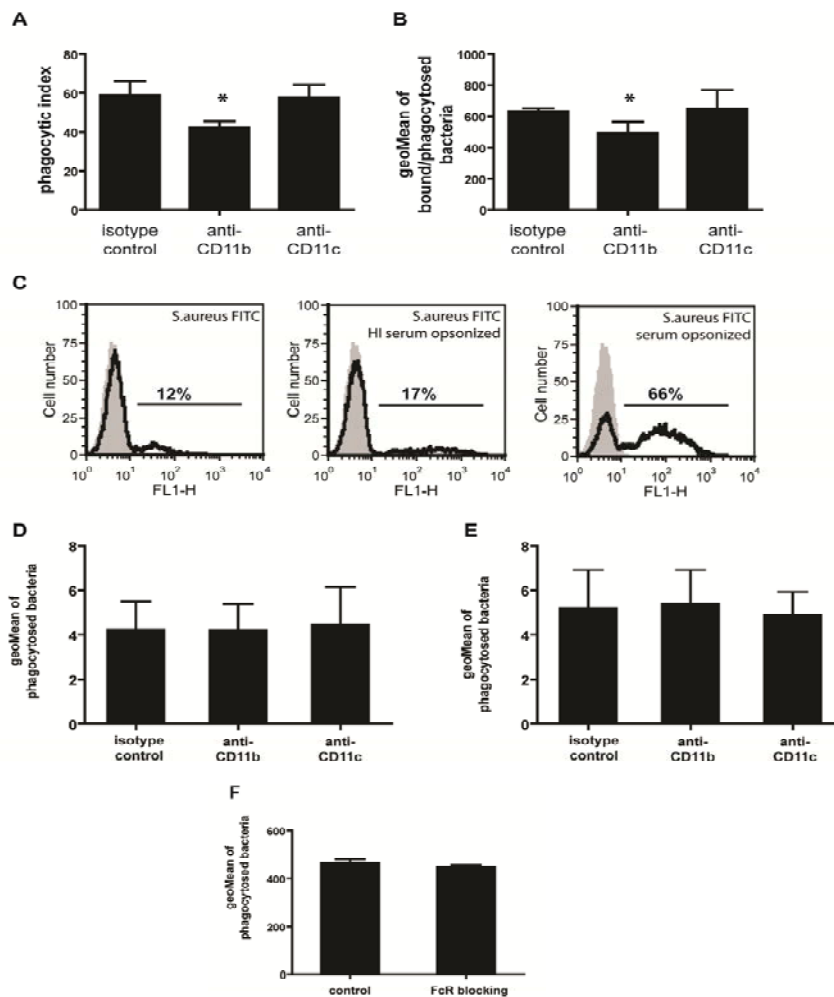
26. Ábra iC3b és iC3b-vel opsonizált baktérium kötődése imMDC-khez. (A) imMDC-eket 50 mg/ml iC3b-vel kezeltünk 4°C-on, majd mostuk és tovább inkubáltuk 37°C-on. Citofluorimetriával mértük a jelzett időpontokban a kötődött iC3b mennyiségét. (Három független kísérlet  $\Delta\text{MFI} \pm \text{SD}$  értékeket mutatunk be.  $***p = 0.0004$ ) (B) imMDC-eket 50 mg/ml iC3b-vel kezeltünk 37°C-on, 2 órán át, majd fixáltuk, permeabilizáltuk és anti-iC3b + anti-mouse IgG-Alexa488-vel jelöltük. Konfokális mikroszkópos eredmény, 60× objektív és további digital nagyítással. (Egy reprezentatív eredmény öt független kísérletből.) (C) imMDC-eket 50 mg/ml iC3b-vel kezeltünk 4°C-on, mostuk, majd kettős jelölést alkalmaztunk; (felső kép) iC3b-re és CD11b-re (anti-iC3b + anti-egér IgG-Alexa488 és anti CD11b-biotin, illetve (alsó kép), iC3b-re és CD11c-re (anti-CD11c-biotin + -Alexa647- sztreptavidin). A felső képen az iC3b (zöld) CD11b (kék) valamint

*az átfedő kép látható. Az alsó képen az iC3b (zöld), a CD11c (kék) és az átfedő kép látható. Konfokális mikroszkópos eredmény, 60× objektív és további digital nagyítással. (Egy reprezentatív eredmény három független kísérletből.) (D) imMDC-ket komplement-opszonizált élesztővel inkubáltunk DC:élesztő = 1:5 arányban, majd fagocitózis indexet határoztunk meg, a nem opszonizált élesztő fagocitotikus indexével korrigáltunk. (Három független kísérlet eredményének átlaga ± SD) (E) imMDC-ket komplement-opszonizált, FITC-jelzett Staphylococcus aureus-szal 4°C-on vagy 37°C-on, 2 órán át inkubáltunk. A fagocitózist citofluorimetriával mértük. A nem opszonizált baktérium fagocitózis értékekkel korrigáltunk. (Három kísérlet átlagából számolt MFI ± SD.)*

Az integrinek ligandum-kötéséhez azok aktív konformációja szükséges [84]. Az imMDC-ket iC3b-vel inkubáltuk és citofluorimetriával erős kötődést mértük. Abban az esetben, ha  $Mg^{2+}$ -t adtunk a sejtekhez - amiről ismert, hogy az integrinek aktív konformációjának kialakulását segíti [153] -, a ligandum kötődés mértéke nem változott. Ez arra utal, hogy a CR3 és a CR4 aktív konformációban van jelen az imMDC-k membránjában.

Ezután tisztázni kívántuk a CR3 és a CR4 szerepét az iC3b-vel opszonizált patogén – élesztő (*Sacharomices cerevisiae*) és baktérium (*Staphylococcus aureus*) fagocitózisában. Mindkét mikroba esetében leírták, hogy szérum jelenlétében iC3b-t fixálnak felszínükön [119]. Kimutattuk, hogy az imMDC-k mind a iC3b-opszonizált élesztőt (26.D ábra), mind az iC3b-opszonizált *S. aureus*-t (26.E ábra) hatékonyan fagocitálták 37°C-on. Abból a célból, hogy tisztázzuk, a fagocitózisban milyen szerepe van a CR3-nak és a CR4-nek, a sejteket az opszonizált antigén hozzáadása előtt kezeltük anti-CD11b-vel vagy anti-CD11c-vel (27.A,B ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az anti-CD11c előkezelés nem befolyásolta a fagocitózist, viszont az anti-CD11b-vel előkezelve a sejteket a baktérium és az élesztő fagocitózisa egyaránt szignifikánsan csökkent (27.A,B ábra), ami a CR3 kitüntetett szerepére utal az opszonizált antigén felvételében. A komplementfehérje szerepét az opszonikus fagocitózisban alátámasztja az is, hogy a baktérium hőinaktivált humán savóval történő előkezelése után a fagocitózis fokozódása elmaradt (27.C ábra). Ismert, hogy az opszonizált antigén felvétele és feldolgozása során a komplement- és Fc-receptorok között kooperáció alakul ki [131, 148]. Annak érdekében, hogy tisztázzuk, vajon a CD11b-specifikus ellenanyaggal történő gátlás befolyásolja-e az FcR vagy PRR mediált fagocitózist, összehasonlítottuk a nem-opszonizált és a hőinaktivált humán savóval opszonizált baktérium felvételét. Ebben az esetben ugyanis, ha IgG-vel opszonizáció történik, az FcR közvetített fagocitózist tesz lehetővé. Amint az a 27.C ábrán látható, az imMDC-k 12 %-a fagocitált nem opszonizált

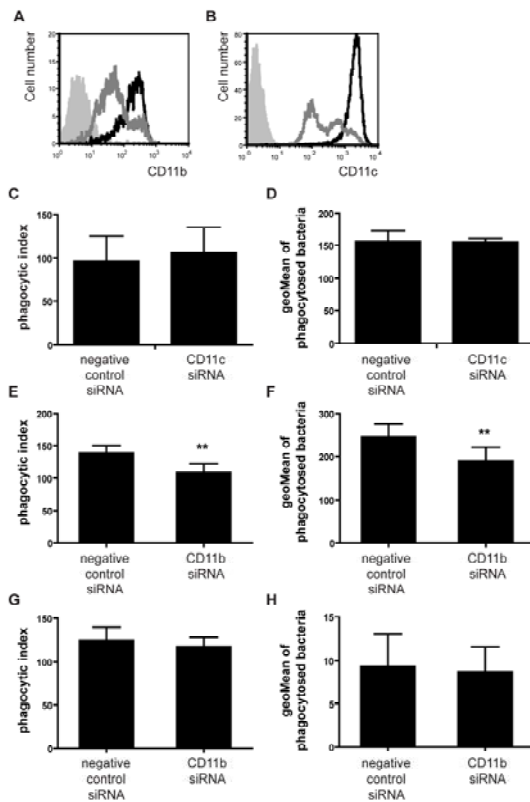
baktériumot, míg a hőinaktivált humán savóval opsonizált baktériumot fagocitáló sejtek száma csekély mértékben nőtt (17 %). A friss humán savóban opsonizált baktériumokat az imMDC-k 66%-a bekebelezte (27.C ábra). Az FcR-ok esetleges fagocitózist fokozó hatását további kísérletben is ellenőriztük, az imMDC komplement- és Fc-receptorainak ellenanyaggal történő gátlása mellett. Mivel a baktérium fagocitózisában ezt követően különbséget nem mértünk, megállapítottuk, hogy a CR3 és CR4 nem befolyásolja az FcR illetve a PRR mediált fagocitózist (27.D,E ábra), továbbá az FcR-ok blokkolása sem (27.F ábra).



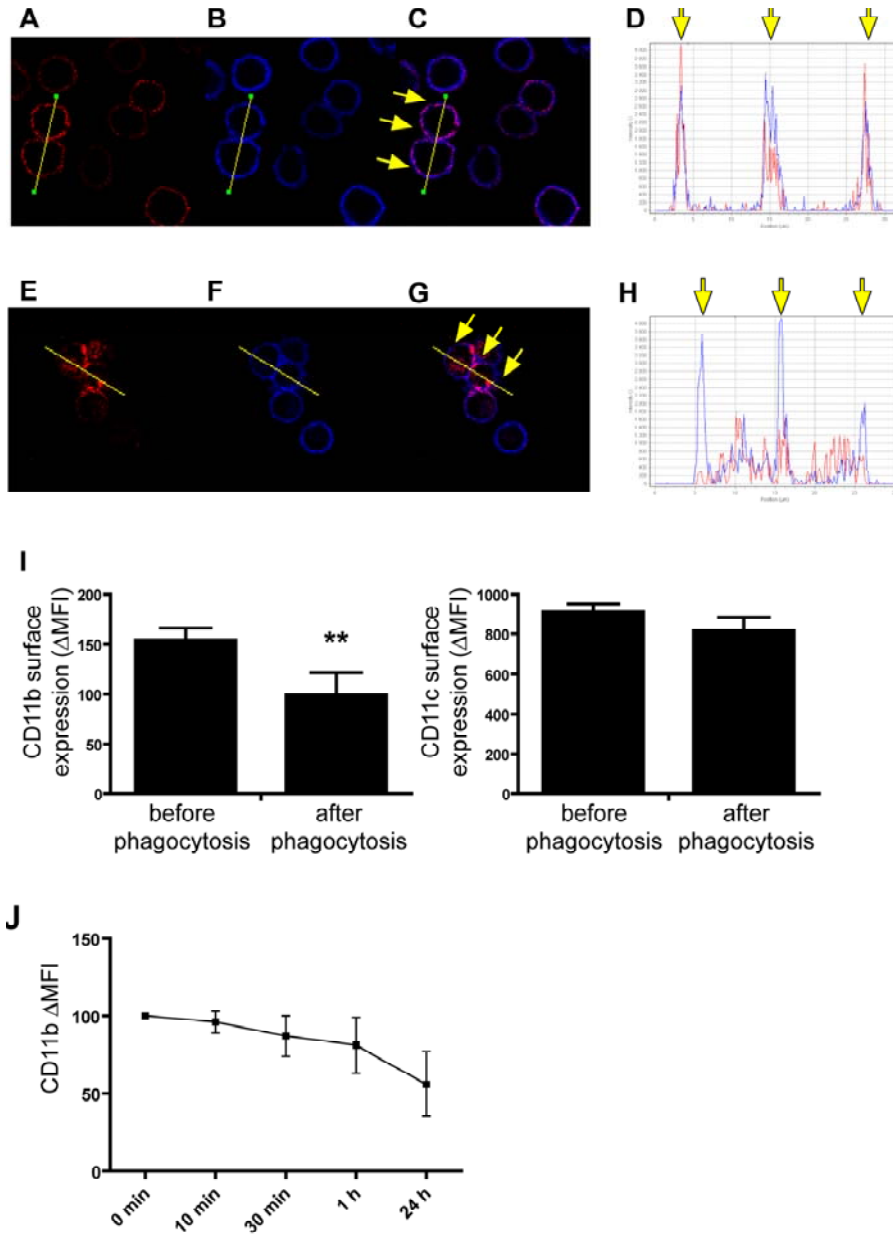
27. ábra imMDC CR3 és CR4 szerepének vizsgálata *iC3b* opsonizált élesztő és baktérium fagocitózisában (A) imMDC-ket anti-CD11b-vel és anti-CD11c-vel előkezeltünk majd vizsgáltuk *iC3b*-opsonizált élesztő fagocitózist és meghatároztuk a fagocitózis indexet. (Négy független kísérlet átlaga  $\pm$  SD,  $*p = 0,0329$ ) (B) imMDCs-ket (A) szerint kezeltük, majd *iC3b* opsonizált, FITC-jelzett *Staphylococcus aureus*-szal inkubáltuk és citofluorimetriával jellemeztük a fagocitózist. (Négy független kísérletben mért MFI átlaga látható  $\pm$  SD,  $*p = 0,0387$ ) (C) Kontroll, hőinaktivált savóval és friss humán savóval inkubált, FITC-jelzett *Staphylococcus aureus* fagocitózisa imMDC-k által. A fagocitózist citofluorimetriával jellemeztük, a szürke hisztogram az

autofluoreszcenciát mutatja. (Egy reprezentatív eredmény öt független kísérletből.) (D) és (E) imMDC-ket (A) szerint kezeltük nem opszonizált (D) vagy hőinaktivált savóban opszonizált (E), FITC-jelölt *Staphylococcus aureus*-szal. Citofluorimetriával jellemeztük a fagocitózist. (Négy független kísérletben mért MFI átlaga látható  $\pm$  SD) (F) Kontroll és FcR blokkoló ellenanyaggal előkezelt imMDC-k iC3b-opszonizált, FITC-jelölt *Staphylococcus aureus* fagocitózisa, citofluorimetriás mérés. (Három független kísérletben mért MFI átlaga látható  $\pm$  SD).

A komplementreceptorok funkciójának további vizsgálata céljából elvégeztük a CD11b és CD11c gének csendesítését az imMDC-k siRNS kezelésével, ami szignifikáns, mintegy 70 %-os csökkenést eredményezett a receptorok sejtfelszíni mennyiségében (28.A ábra). A kísérlet megerősítette az ellenanyag-gátlással kapott megfigyelésünket, vagyis a CD11b csendesítés szignifikánsan gátolta mindkét patogén fagocitózist (28.E,F ábra), míg a CD11c csendesítésnek nem volt hatása (28.C,D ábra). Tehát, eredményünk a CD11b kitüntetett szerepét bizonyította.



28. ábra. CD11b és CD11c RNS csendesített imMDC-k iC3b-opszonizált élesztő és baktérium fagocitózisa. A fagocitózis vizsgálatot a 27. ábrán ismertetett módon végeztük és citofluorimetriával mértük (C-H). (A) és (B) CD11b és CD11c RNS-csendesített MDC-k citofluorimetriás vizsgálata. Szürke betöltött hisztogram az izotípus kontroll, fekete a negatívkontroll siRNS-sel, szürke a CD11b siRNS-sel transzfektált MDC-k CD11b expressziója. (Egy reprezentatív eredmény öt független kísérletből.) (C) iC3b opszonizált élesztő (D) és iC3b opszonizált baktérium fagocitózisa, kontroll és CD11c siRNA transzfektált imMDC-k által. (Öt független kísérlet MFI átlaga látható  $\pm$  SD) (E) iC3b opszonizált élesztő és (F) iC3b opszonizált baktérium fagocitózisa, kontroll és CD11b siRNA transzfektált imMDC-k által. CD11b RNS csendesített imMDC-k (G) élesztő és (H) baktérium fagocitózisa E-H; (Öt független kísérlet MFI átlaga látható  $\pm$  SD,  $p = 0.0065$  (E) és  $p = 0.0012$  (F)).



29. ábra CR3 és CR4 nyomkövetése iC3b opsonizált baktérium felvétele során imMDC-kben. (A-D) Jelöltük az imMDC-ken: a CD11b-t (A) anti-CD11b-biotin+streptavidin-Alexa546 (vörös) és a CD11c-t (B) anti-CD11c-Alexa647 (kék). Az átfedő kép a (C) ábrán látható. (D) A két jelölt receptorlánc fluoreszcencia intenzitás histogramja a sárga nyíllal jelölt metszet mentén; a sejtek találkozási pontjainál mindkét receptor kimutatható. (E)–(H) az imMDC-ket (A–D) szerint jelöltük, majd a iC3b opsoizált *Staphylococcus aureus*-t adtuk a sejtekhez. A kezelés következtében a CD11b eltűnt sejtfelszínről, a citoplazmába internalizálódott, a CD11c viszont a sejtmembránban maradt: (E–G–H). (I) CD11b expresszió kimutatása imMDC-ken iC3b-opszonizált fagocitózist követően, citofluorimetriás vizsgálat. (Három független kísérlet átlagos MFI  $\pm$  SD adatai,  $**p = 0.0052$ ) (J) Az imMDCs-ket TMG6-5, anti-CD11b ellenanyaggal kezeltük 30 percig jégen, majd lemostuk a nem kötődött ellenanyagot és 37 °C-on inkubáltuk tovább a sejteket. A jelzett időpontokban mértük a sejtfelszíni CD11b mennyiségét citofluoriméterrel. (Három független kísérlet átlagos MFI  $\pm$  SD adatai.)



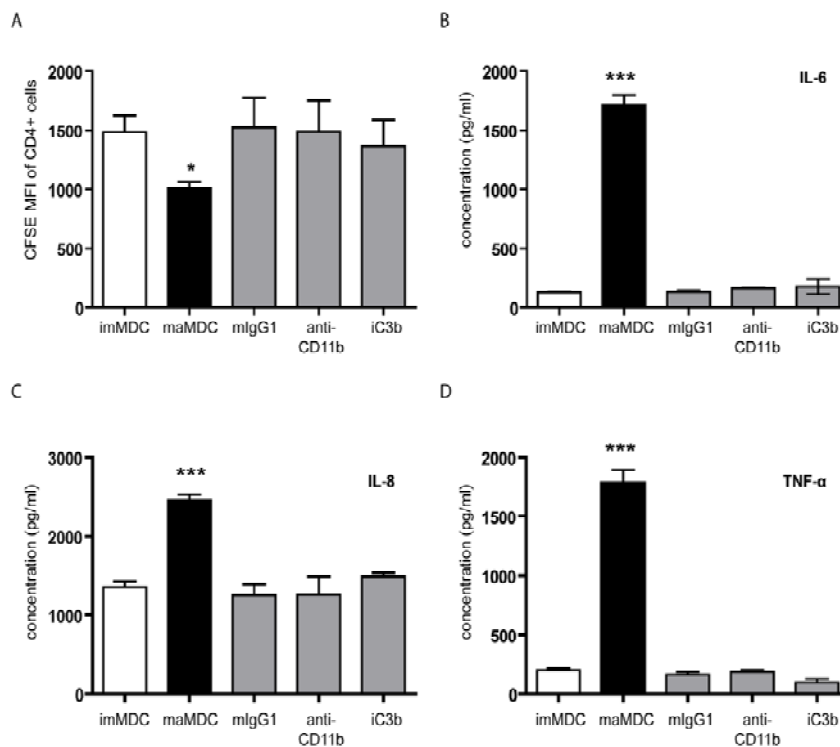
Tovább tanulmányozva a CR3 és a CR4 szerepét a iC3b-opszonizált élesztő és baktérium fevételében, konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a receptorok mozgását. Megfigyeltük a receptorok eloszlását az iC3b ligandum nélkül és annak jelenlétében (29. ábra). A mikroszkópos vizsgálat bizonyította a CR3 és a CR4 kolokalizációját a sejtmembránban (29.E-D ábra). iC3b-vel opszonizált baktérium jelenlétében szinte valamennyi CD11b molekula internalizálódott, míg a CD11c a felszínen maradt (29.E-H ábra). Konfokális mikroszkópos eredményeinket citofluorimetriával is megerősítettük; az iC3b-vel opszonizált baktérium fagocitózisát követően a CD11b sejtfelszíni mennyisége szignifikánsan csökkent, viszont a CD11c mennyisége nem változott (29.I ábra). A CD11b sejtfelszíni mennyiségének változását CD11b-specifikus ellenanyaggal történő kezelés után is megvizsgáltuk, és ebben az esetben is sejtfelszíni csökkenést detektáltunk a kezelést követő 24 órás intervallumban (29.J ábra). Továbbá, azt is megállapítottuk, hogy a CD11b és CD11c kolokalizációja a iC3b-opszonizált fagocitózis során csökkent (29.E-H ábra).

Megvizsgáltuk, hogy a komplement-mediált fagocitózisban meghatározó szerepet játszó CR3 stimuláció hatással van-e az imMDC-k differenciációjára. A sejteket anti-CD11b ellenanyaggal vagy iC3b-vel kezeltük, majd citofluorimetriával mértük a sejtfelszíni marker molekulák expresszójának változását. Eredményünk szerint a kezelésekre hatására az MHCII, a MR, a CD40, a CD83 és a CD86 mennyisége nem változott és hasonló eredményeket kaptunk az izotípus kontrollal történő kezelés esetében is (III. táblázat). Összhangban mások korábbi eredményeivel a CR3 általi stimuláció nem befolyásolta a sejtek fenotípusát [149, 151, 154-157].

	<b>imMDC</b>	<b>maMDC</b>	<b>isotype</b>	<b>anti-CD11b</b>	<b>iC3b</b>
<b>MHCII</b>	293.9 +/- 61.1	456.6 +/- 51.4 ***	317.5 +/- 34.5	265.65 +/- 61.2	288.7 +/- 40.2
<b>MR</b>	44.9 +/- 2.9	32.3 +/- 1.6 ***	44.6 +/- 3.8	45.0 +/- 5.1	45.8 +/- 3.5
<b>CD40</b>	204.4 +/- 14.2	294.4 +/- 24.8 ***	217.4 +/- 15.8	226.5 +/- 23.2	224.6 +/- 18.61
<b>CD83</b>	8.1 +/- 0.5	25.9 +/- 2.3 ***	7.53 +/- 0.76	7.3 +/- 0.7	7.1 +/- 0.8
<b>CD86</b>	50.4 +/- 3.0	138.4 +/- 58.3 **	49.65 +/- 12.08	47.2 +/- 10.2	39.2 +/- 7.9

III. táblázat. CR3 stimuláció hatása imMDC-k differenciálódására. ImMDC-keket iC3b-vel és a CD11b iC3b ligandum kötőhelyére specifikus TMG6-5 ellenanyaggal kezeltük, majd két nap múlva a mértük a sejtfelszíni markerek mennyiségét citofluorimetriával. Negatív kontrollként kezeletlen imMDC-keket, izotípus kontroll kezelt imMDC-keket, pozitív kontrollként LPS-kezelt MDC-keket használtunk. (Öt független kísérletből számolt  $\Delta$ MF1 +/- SD, p értékek: maMDC MHCII: 0,0019; maMDC MR: <0,0001; maMDC CD40: 0,0001, maMDC CD83: <0,0001; maMDC CD86: 0,0098.)

Tanulmányoztuk azt is, hogy az imMDC-ket CR3-on keresztül aktiválva változik-e a sejtek citokin szekréciója és T-sejt aktiváló képessége. A CD11b-specifikus ellenanyaggal vagy iC3b-vel kezelt imMDC-ket allogén T-sejtekkel kokultúrába helyeztük, majd mértük a sejtek proliferációs képességét. Azt találtuk, hogy sem a anti-CD11b kezelés, sem az iC3b kezelés nem változtatta meg az MDC-k allogén T-sejt aktiváló képességét (30.A ábra). Mértük az anti-CD11b és iC3b kezelés hatását az imMDC-k által termelt IL-8, IL-6 and TNF- $\alpha$  citokin termelő képességére is; változást egyik esetben sem tapasztaltunk (30.B-D ábra).



30. ábra CR3 stimuláció hatása MDC-k allogén T-sejt aktiválására és citokin termelésére. (A) Az anti-CD11b-vel vagy iC3b-vel kezelt MDC-ket CFSE-vel feltöltött allogén T-sejtekkel (DC:T-sejt arány 1:5) kokultúrába tettük és a CFSE MFI értékek meghatározásával jellemeztük az anti-CD4-Alexa647 pozitív Th sejtek proliferációját citofluorimetriával. Negatív kontrollként kezeletlen imMDC-ket, izotípus kontroll kezelt imMDC-ket, pozitív kontrollként LPS-kezelt MDC-ket használtunk. (Öt független kísérlet átlagos MFI  $\pm$  SD adatai, \* $p = 0.0271$ ) (B)–(D) Az (A) szerint kezelt MDC-k 24 óras felülcszóiából IL-6, IL-8 és TNF- $\alpha$  koncentrációt határoztunk meg ELISA technikával. (Öt független kísérlet átlagos koncentráció adatai  $\pm$  SD, \*\*\* $p < 0.0001$ .)

## Összegzés

Számos kutatás eredménye igazolja, hogy komplement aktivációs termékek számottevően befolyásolják a kialakuló adaptív immunválaszt [158-160]. Azzal kapcsolatban is ismertek adatok, hogy a komplement-opszonizált antigén komplementreceptor - cC1qR, CR3, és CR4 – mediált felvétele szerepet játszhat a perifériás tolerancia kialakításában [110, 150, 151, 155, 156, 161]. Ebben a folyamatban a DC-k fontos szerepet töltenek be. A C3 aktivációs fragmentumait megkötő CR3 és CR4 integrinekről leírták, hogy számos sejtműködést befolyásolnak, így pl. a adherenciához, spreading és fagocitózis folyamatokhoz szükséges citoszkeletális átrendeződésben is meghatározó szerepük van. Az MDC-k esetében leírták, hogy CR3-t és CR-4-t expresszálnak, de CR1-t (CD35) és CR2-t (CD21) nem [4-saját, 103, 143].

A CD11c, a CR4  $\alpha$  lánc általánosan elfogadott mieloid sejt marker. Ugyanakkor a CR4 pontos funkcióit nem vizsgálták, annak ellenére, hogy fagocitotikus receptorként tartják számon a CR3-al mutatott szerkezeti hasonlósága miatt. A sejtfunkció vizsgálatok alapján, a CD11b tűnt elsődleges receptornak a citoszkeletális átrendeződés, az adherencia és *spreading* folyamatokban bizonyított szerepe alapján [162]. Monociták és neutrofil granulociták részletes vizsgálata során arról is beszámoltak, hogy funkcionálisan több formája mutatható ki a CR3-nak ezekben a sejtekben; egyik formájuk az iC3b-opszonizált partikulum megkötéséért felelős, míg mások a fagocitózisban vesznek részt, további receptorokkal együttműködve [163].

Korábbi eredményünk szerint, az MDC-k – ellentétben az MM-kkal –, nem termelnek C3-t, de képesek az exogén C3 kovalens fixálására, továbbá a C3-fragmentummal való kölcsönhatás kiváltja a MDC-k differenciálódását és fokozza T-sejt aktiváló képességüket (24A és 21.A ábra) [164].

Jelen munkánkban kimutattuk, hogy ha MDC-eket kezeltünk a CD11b-hez kapcsolódó iC3b ligandummal, vagy a CD11b iC3b ligandum kötőhelyére specifikus TMG6-5 ellenanyaggal, a kezelést követő 10 perc múlva a receptor internalizációja következett be (26.A ábra). Ugyanakkor, a CR3-iC3b kötődés nem okozott változást az MDC-k fenotípusában (III. táblázat), nem fokozta a sejtek gyulladási citokin-termelését és nem aktiválta az allogén T-sejteket (30.A-D ábra). Ez a megfigyelés annak fényében is érdekes, hogy több közlemény is beszámol arról, hogy a CR3, mint gátló típusú receptor, toleranciát képes indukálni [149, 150, 153, 157, 165]. Kísérleti rendszerünkben megállapítottuk, hogy a CD11b gátlása szignifikánsan csökkentette az iC3b-vel

opszonizált gomba és baktérium fagocitózist, viszont a CR4 gátlás nem váltott ki ilyen hatást (27.A,B ábra). Ezeket az eredményeinket a CD11b és CD11c RNS-csökkentési kísérleteinkkel megerősítettük (28. ábra). Mások eredményeivel összhangban [162], arra következtetésre jutottunk, hogy a két receptor regulációjában lényeges különbség van, mivel a CD11c/CD18 az aktivációs stimulusra kevésbé érzékenyen reagál mint a CD11b/CD18. Kísérleteinkkel egyértelműen igazoltuk, hogy a CR3 és a CR4, jóllehet egyaránt fontos az iC3b-opszonizált partikulum felismerése és felvétele során, az antigén CD11c-hez kapcsolódása nem elegendő a fagocitózis kiváltásához. A fagocitózis indukálásában a CD11b-nek elsődleges szerepe van [166-saját].

Eredményeink, mások eredményeivel összhangban rámutatnak arra, hogy a DC-k mikrokörnyezete döntő hatással van a sejtek aktivációjára, differenciációjára. A kovalensen kapcsolódó C3b és a receptorhoz kötődő iC3b-opszonizált kórokozó teljesen eltérő hatást gyakorol a DC-kre. Az opszonizált patogénnel a DC-k CR3 és CR4 receptorai egyaránt kölcsönhatásba lépnek, de ennek következménye eltérő. A CR3 stimulációja nem vált ki differenciálódást, de a patogén felvételében kulcsszerepet tölt be. A DC-k CR4-e önmagában nem képes fagocitózist indukálni. Úgy tűnik, a kölcsönhatások komplex hálózata áll fenn a DC-k komplementkötő struktúrái között, ami döntően befolyásolja a sejt stimulációra adott választ.

#### **5.4. Komplementfehérjék és komplementreceptorok szerepe makrofágok és dendritikus sejtek HIV-1 vírussal történő fertőződése során**

A HIV-1 szexuális úton történő átadásában fontos szerepet tulajdonítanak a monocitáknak, makrofágoknak és dendritikus sejteknek. A monociták és makrofágok a HIV-1 fertőzés kialakulása és a szervezetben való terjedése során, mint vírus rezervoárok, fontos szerepet játszanak [167]. A produktív fertőzés kialakulásában és az AIDS patomechanizmusában is felmerült a szervezet saját fehérjéinek, pl. a komplementfehérjéknek a szerepe. A komplementaktiváció során keletkező anafilatoxinok; a C3a, a C4a, és C5a fontos szabályozó funkciót töltenek be a fertőzés során. A C5a, a legjobban jellemzett anafilatoxin, befolyásolja a gyulladás lezajlását, kemotaxist indukál, fokozza az sejtadhéziót, stimulálja az oxidatív metabolizmust, lizoszómális enzimek, citokinek és hisztamin felszabadulást vált ki [168, 169]. A C5a nagy affinitású receptorát a C5aR-t számos sejttípus kifejezi; pl. mieloid és limfoid

sejtek, endotél sejtek [170-174]. A komplementaktiváció szerepét vizsgálva a HIV-1 fertőzés során, a közlemények egymással ellentétes hatásokról számoltak be; vagyis a komplementaktivációnak a vírus eliminációjában és a fertőzés terjedésében egyaránt szerepet tulajdonítottak [95, 104].

A fertőzés helyszínén jelenlévő aktivált monociták és makrofágok több komplementfehérjét, így C3-at is nagy mennyiségben szekretálnak. A HIV-1 fertőzés korai stádiumában, amikor az adaptív immunválasz hiányában specifikus ellenanyag még nem termelődik, a komplementfehérjével való opszonizáció különösen fontos a kórokozó eliminálásában. A C3-al opszonizált vírus komplementreceptort hordozó monocitákhoz, makrofágokhoz, dendritikus sejtekhez és folliculáris dendritikus sejtekhez kapcsolódik, amelyek szétszórják a szervezetben a kórokozót [104, 175]. Leírták, hogy a HIV-1 szérum kezelést követően fokozott mértékben kötődik komplementreceptort kifejező sejtekhez [104]. Gyulladásos citokinek; TNF- $\alpha$ , IL-6 fokozott szintéziséről számolnak be a HIV-1 fertőzés során, amely citokinek lokális komplementfehérje szintézist befolyásoló hatása ismert [176].

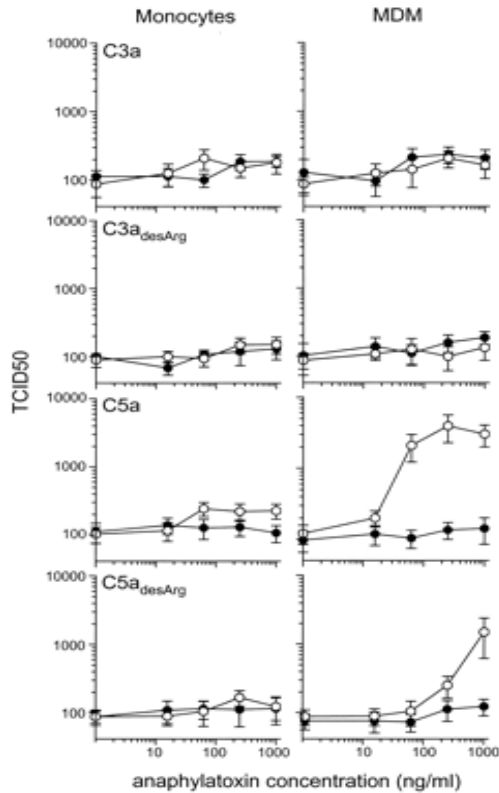
#### *Célkitűzés*

Tisztázni akartuk, hogy a C3a, C5a anafilatoxinok befolyásolják-e a monociták és MM-k HIV-1 fertőzés iránti érzékenységet. Célunk volt kideríteni, hogy a makrofágok HIV-1-el való kölcsönhatása befolyásolja-e a sejtek C3-szintézisét, valamint gyulladásos citokin termelését. Tisztázni szeretnénk volna, hogy a DC-k komplementreceptorai szerepet játszanak-e komplement-fragmentumokkal opszonizált HIV-1 partikulum felvételében és feldolgozásában, továbbá, hogy az opszonizáció befolyásolja-e a sejtek produktív infekcióját.

#### *Eredmények*

Monocitákat és *in vitro* differenciáltatott makrofágokat különböző koncentrációjú C3a-val és C5a-val kezeltünk, majd HIV-1-el (BaL, M-tropikus) fertőztünk és kultúrában tartottunk két napon át. Vizsgáltuk a HIV-1 fertőzést követően alkalmazott C3a és C5a kezelés hatását is (31. ábra). A MM produktív infekcióját erősen fokozta a C5a; 10 ng/ml-nél nagyobb koncentrációkban. 100 ng/ml koncentrációjú C5a kezelés kb. 40-szeresére növelte a HIV-1 MM-k fertőzését, míg a C5a<sub>desArg</sub> kisebb mértékű fokozást váltott ki. Abban az esetben, ha a HIV-1 fertőzés után adtuk a sejtekhez a C5a-t,

vagy C5a<sub>desArg</sub>-t, nem befolyásolta a fertőzést. A C3a és C3a<sub>desArg</sub> kezelésnek nem volt hatása makrofágok fertőzésére. Monociták esetében egyik anafilatoxinnal való kezelés sem okozott változást a fertőzésben.

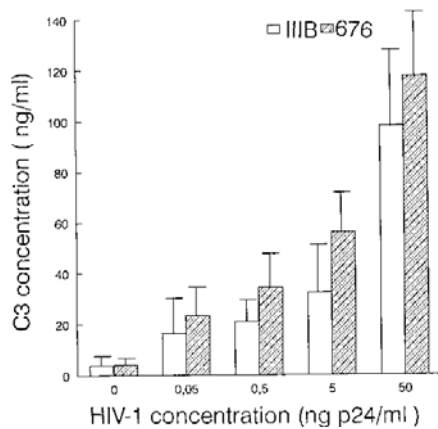


31. ábra

C3a és C5a kezelés hatása monociták (bal) és Mo-eredetű makrofágok (MDM) (jobb) HIV-1 (Ba-L, R5-típus) fertőzésére.

(○) A sejteket a C3a vagy C5a kezelés után 48 órával HIV-1-el fertőztük, (●) a sejteket HIV-1-el fertőztük, majd C3a illetve C5a jelenlétében inkubáltuk. A fertőzés mértékét a 7. napon mértük és meghatároztuk és a TCID<sub>50</sub> értékeket. (TCID<sub>50</sub> = a sejtek 50%-ának fertőzését okozó vírus koncentráció reciproka, 1 TCID<sub>50</sub> = 56–121 pg/ml p24.) (Négy független kísérlet ± SD adatok.)

Következő kísérleteinkben a HIV-1 fertőzés C3-szekrécióna gyakorolt hatását vizsgáltuk makrofágokon. Eredményeink szerint mind az M-tropikus, mind a T-tropikus HIV dózis-függő módon fokozta a MM-k C3 termelését, de az M-tropikus hatás erősebbnek bizonyult (32. ábra), a fokozás mértékét mintegy 20-szorosnak találtuk a kontroll sejtekkel összevetve. Hasonló eredményt figyeltünk meg abban az esetben is, ha a HIV-partikulumokat előzetesen hőinaktiváltuk, vagy rekombináns gp160-al (gp120+gp41) kezeltük a sejteket. Az eredmények arra utalnak, hogy a HIV-1 indukálta C3 fokozáshoz nem volt szükséges produktív infekció, hőinaktivált vírus illetve rekombináns burokfehérje is kiváltotta az aktivációt.



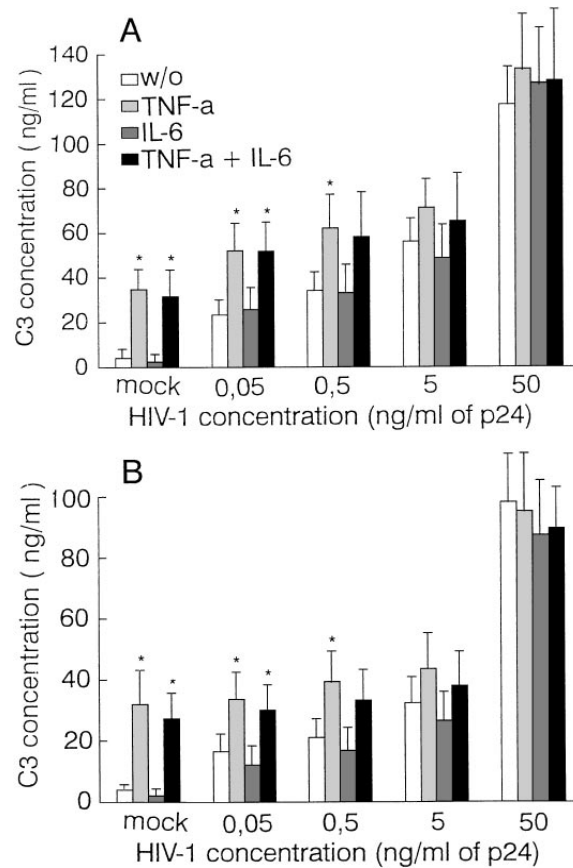
32. ábra

*HIV-1 fertőzés hatása humán makrofágok C3 szekréciójára.*

*Humán monocitákat különböző koncentrációjú M-tropikus 676 és T-tropikus IIB HIV-1 fertőztünk, majd a sejt kultúra felülszójából a 7. napon mértük az makrofágok által termelt C3 mennyiségét ELISA módszerrel.*

*(Négy független kísérlet átlaga  $\pm$  SD.)*

Ismert, hogy HIV-fertőzés következtében a monociták fokozott mennyiségben szekretálnak TNF- $\alpha$ -t és IL-6-ot [176]. Ismert az is, hogy a TNF- $\alpha$  több sejttípus, így makrofágok esetében is növeli azok C3 szintézisét, továbbá az IL-6 kostimulátor hatásáról is beszámoltak [58]. Ezért, megvizsgáltuk e két citokin hatását makrofágok HIV-1 (M-tropikus 676 és T-tropikus IIB) indukálta C3 szekréciójára. Eredményeink azt mutatják, hogy a TNF- $\alpha$  önmagában alkalmazva fokozza a C3 termelését, jó összhangban mások adataival, akik egér makrofágokat vizsgáltak [71]. A TNF- $\alpha$  kezelést HIV-fertőzéssel együtt alkalmazva, alacsonyabb vírus-koncentráció (0,5 ng/ml alatt) esetében C3 növekedést tapasztaltunk, mindkét HIV típus esetében (33.A,B ábra). Az IL-6 kezelés nem befolyásolta a sejtek C3 szekrécióját.



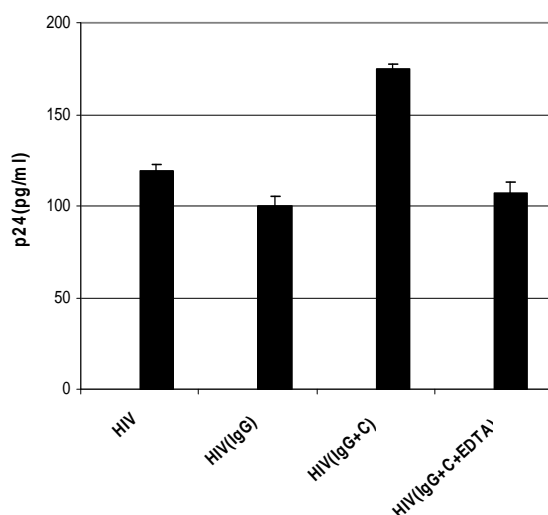
33. ábra. Makrofágok C3 termelése 676 és IIIB HIV-1 fertőzés hatására, TNF- $\alpha$  és IL-6 hozzáadása mellett. A humán makrofágokat különböző koncentrációjú HIV-1-el fertőztünk. A sejtekhez TNF- $\alpha$ -t, IL-6-ot vagy a keveréküket adtuk, majd mértük a sejtek által szerketált C3-t ELISA technikával. (Hat független kísérlet átlaga  $\pm$ SD, \*P= 0.01.)

Saját és mások adatai alapján ismert, hogy a makrofágok és a monocitoid U937 sejtek az általuk termelt C3-t képesek elhasítani és kovalensen fixálni membránjukon [60, 117]. Kísérleti rendszerünkben M-tropikus 676 HIV-1-el kezelt MM esetében nem tudtunk kovalensen sejthez kötődött C3-fragmentumokat kimutatni. Abban az esetben azonban, ha a sejteket 10-szeresére hígított normál humán szérummal vagy tisztított natív humán C3-al kezeltük, jelentős C3 depozíciót figyeltünk meg. A C3 fixálódását a proteáz inhibitor  $\alpha$ 1-antitripszin kezelés gátolta, ami arra utal, hogy a makrofágok által termelt enzimeknek szerepe van a C3 proteolitikus hasításában.

A következő vizsgálatokban az MDC-k komplementreceptor mediált HIV-1 fertőzését tanulmányoztuk. Saját méréseink mások eredményeivel egybehangzóan azt mutatták, hogy MDC-k mind CR3-t mind CR4-t nagy mennyiségben expresszálják sejt felszínükön, viszont CD35 és CD21 expressziójukat nem tudtuk kimutatni (25. ábra) [166]. A C3-fragmentumokkal történő opsonizáció hatását megvizsgáltuk a HIV-1 (92UG037, M-tropikus) imMDC-hez történő kötődése során. A nem opsonizált



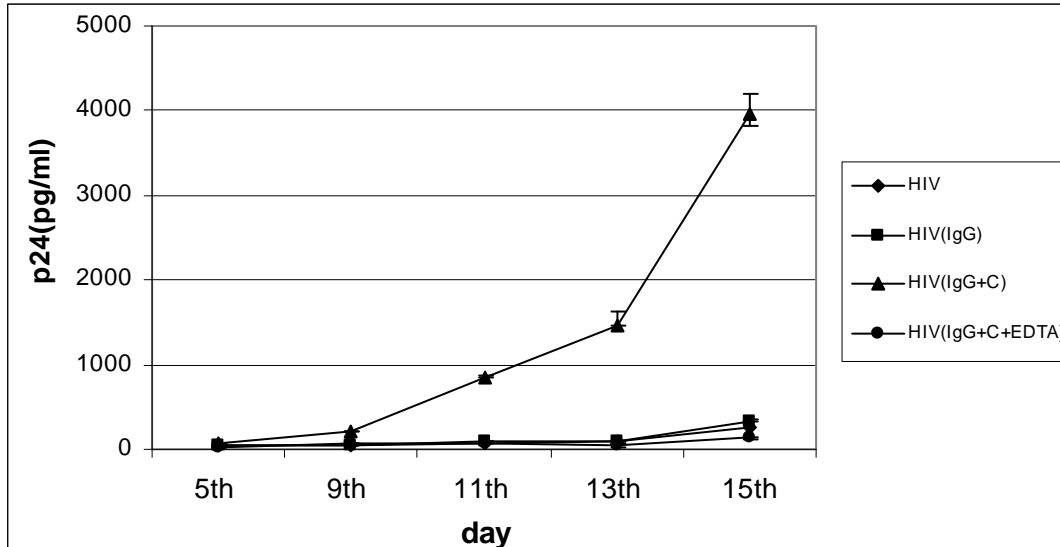
kontrollhoz képest, a HIV-1 specifikus IgG-vel opsonizált vírus; HIV(IgG) kötődésében nem találtunk különbséget. A HIV-1-specifikus IgG jelenlétében, normál humán savóban opsonizált vírus (HIV(IgG+C)) esetében mintegy 30 %-os kötődés fokozást detektáltunk (34. ábra). Abban az esetben, ha az opsonizációt a komplementaktivációt gátló EDTA jelenlétében végeztük, szintén nem változott a kötődés mértéke. Az eredmény igazolta, hogy a HIV(IgG) immunkomplex által kiváltott komplementaktiváció és az azt követő komplement-opsonizáció okozta a vírus kötődés fokozást, amit a komplement-gátló EDTA jelenléte megakadályozott.



34. ábra

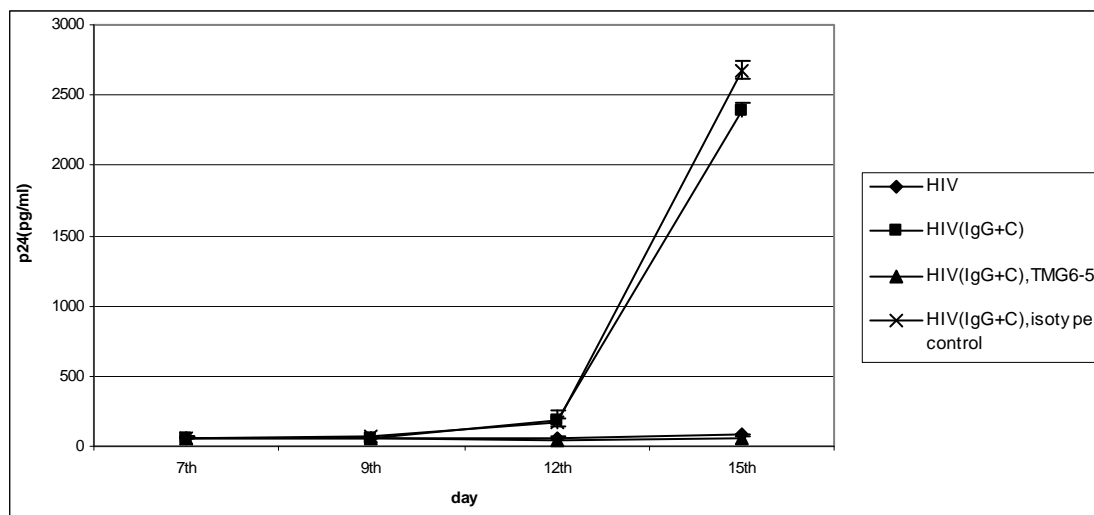
*Opsonizált és nem opsonizált HIV-1 kötődése imMDC-hez*  
*Humán imMDC-ket, HIV(IgG), HIV(IgG+C) és HIV(IgG+C+EDTA) preparátumokkal kezeltünk 1 órán át, 37°C-on. A nem kötődött vírust mosással eltávolítottuk, a sejteket lizáltuk és a meghatároztuk a kötődött vírus mennyiségét p24 ELISA tesztben. (Hat független kísérlet eredményének átlaga  $\pm$ SD.)*

Megvizsgáltuk az opsonizáció hatását a MDC-k produktív HIV-1 fertőzésére. Az imMDC-ket HIV, HIV(IgG), HIV(IgG+C) és HIV(IgG+C+EDTA) preparátumokkal kezeltük, majd másnaponta meghatároztuk a sejtek felülúszójából a fertőzőképes vírus mennyiségét. Megfigyelésünk szerint a C3-mal opsonizált HIV-1 nagyságrenddel hatékonyabb volt az MDC-k produktív infekciójának kiváltásában, összevetve a nem opsonizált illetve az IgG-vel opsonizált HIV-el. Elmaradt a fokozott produktív fertőzés abban az esetben is, ha a komplementtel történő opsonizációt EDTÁ-val megakadályoztuk (35. ábra).



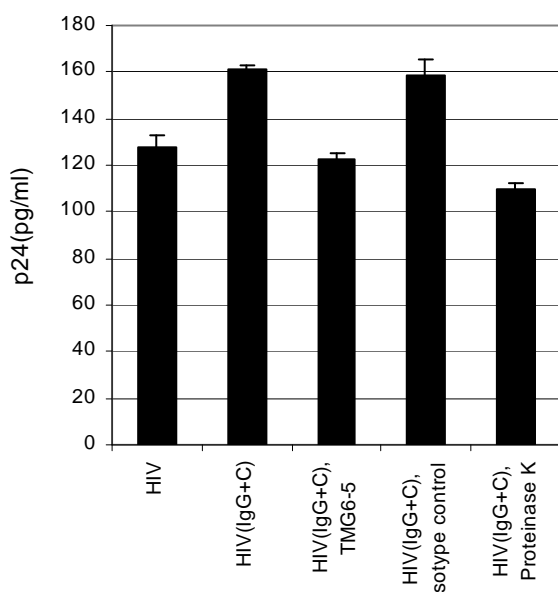
35. ábra C3-al történő opsonizáció hatása imMDC-k produktív HIV-1 fertőzésére. Im-MDC-eket HIV(IgG), HIV(IgG+C) és HIV(IgG+C+EDTA) preparátumokkal kezeltünk 1 órán át, 37°C-on. A nem kötődött vírus partikulumokat mosással eltávolítottuk, majd a sejteket kultúrába tettük. A lizált sejtekből a fertőzést követő 5., 9., 11., 13., és 15. napon ELISA módszerrel mértük a p24 nukleokapszid fehérje mennyiségét. (Öt független kísérlet átlaga  $\pm$ SD.)

Tanulmányoztuk a MDC-ken expresszálandó CR3 szerepét a komplementtel opsonizált HIV megkötésében és a produktív infekció kiváltásában. Vizsgálatainkban az imMDC-eket CD11b-specifikus TMG6-5 monoklonális ellenanyaggal kezeltük. Kötődési vizsgálataink szerint, a TMG6-5 ellenanyaggal történő előkezelés gátolta a HIV(IgG+C) fokozott megkötését (37. ábra). A produktív infekciót vizsgálva kiderült, hogy a TMG6-5 kezelés a HIV(IgG+C) által kiváltott produktív fertőzést is gátolta, a kontroll szintre csökkentve azt (36. ábra). Az izotípus kontroll ellenanyaggal történő kezelés nem gátolta a fertőzést (36. ábra).



36. ábra Anti-CD11b TMG6-5 hatása az MDC-k CR3-függő HIV-1 infekciójára. Im-MDC-eket HIV(IgG), HIV(IgG+C) és HIV(IgG+C+EDTA) preparátumokkal kezeltünk. A CR3 gátlása érdekében az imMDC-eket TMG6-5 ellenanyaggal előkezeltük, majd ezt követően inkubáltuk a HIV(IgG+C) preparátummal. Az MDC-k lizátumából ELISA módszerrel mértük a p24 nukleokapszid fehérje mennyiségét a fertőzést követő napokon. (Öt független kísérlet átlaga  $\pm$ SD.)

A receptor mediált hatás ellenőrzése érdekében a MDC-eket proteináz-K-val történő előkezélése után, a sejtfelszíni receptorok gátlása mellett is vizsgáltuk. A proteináz-K kezelés megakadályozta a HIV (IgG+C) által kiváltott fokozott kötődést (37. ábra) valamint infekciót, ami a receptor-mediált hatásra bizonyíték.



37. ábra Proteináz-K hatása MDC-k komplementtel opsonizált és nem opsonizált HIV-1 kötődésére. Az imMDC-eket TMG6-5-el (anti-CD11b), izotípus kontrollal és proteináz-K-val előkezeltük, majd HIV(IgG+C) preparátummal inkubáltuk 1 órán át, 37°C-on. A nem kötődött vírus partikulumokat mosással eltávolítottuk, a sejteket a kötődött vírussal lizáltuk és meghatároztuk a kötődött vírus mennyiségét p24 ELISA tesztben. (Hat független kísérlet eredményének átlaga  $\pm$ SD.)

*Összegzés*

A C3a és a C5a számos sejtfunkciót aktivál, így makrofágok PGE<sub>2</sub> termelését, eozinofil sejtek degranulációját és kemotaxisát váltja ki [168, 177]. Mivel az anafilatoxinok hatása súlyosan szövetkárosító is lehet, ezért szigorú kontroll alatt áll; a karboxipeptidáz-N a C-terminális arginil eltávolításával a biológiailag inaktív C3a<sub>desArg</sub> és C5a<sub>desArg</sub> kialakulását stimulálja [173, 174, 178]. Ismert, hogy a HIV-1 aktivált sejtekben gyorsan replikálódik, ami végül a fertőzés terjedését okozza a szervezetben [179]. Az anafilatoxikus komplementfragmentumok MM-k HIV fertőzésére való hatásának vizsgálata során arra az eredményre jutottunk, hogy a MM-k HIV-1 fertőzéssel szembeni érzékenységét mintegy 40-esére fokozta a C5a, enyhe fokozó hatása volt a C5a<sub>desArg</sub>-nak, viszont sem a C3a sem a C3a<sub>desArg</sub> nem befolyásolta a fertőzést. A Mo-k HIV-1 fertőzésére az anafilatoxinoknak nem volt hatása (31. ábra) [5-saját].

A primer HIV-1 fertőzés során az M-tropikus vírus által elsőként megfertőzött sejtek a makrofágok és a DC-k. A fertőzött sejtek ezt követően a szervezet különböző szöveteibe szállítják a vírust, ahol továbbítják azt a T-sejteknek [167]. A HIV-1 képes aktiválni a komplementrendszer, ami a szervezetbe kerülő vírus gyors opszonizációját eredményezi [94, 104]. A C3 szerepét illetően a HIV-1 fertőzés során egymásnak ellentmondó adatok láttak napvilágot. Különböző kutatócsoportok a C3 eliminációt okozó és fertőzést segítő hatásáról egyaránt beszámoltak [95, 104]. Kísérleteinkben először azt vizsgáltuk, hogy normál humán makrofágok C3 termelése hogyan változik a HIV-1 fertőzés során. Ismert, hogy a makrofágok aktivációs stimulus hatására fokozott mértékben szekretálnak C3-t, ami a lokális opszonizáció révén segíti a patogén felvételét [59]. Kísérleteinkből kiderült, hogy mind az M-tropikus 676, mind a T-tropikus IIIB HIV-1 izolátumok fokozták az MM-k C3 szekrécióját (32. ábra). A termelt C3 mennyisége összevethető volt az LPS stimulus hatásával [180]. Leírták, hogy a HIV-1 fertőzött makrofágok TNF- $\alpha$  termelése fokozott, továbbá az is ismert hogy a TNF- $\alpha$  fokozott C3 termelést vált ki egér makrofágok esetében [71, 176]. Indokolt volt tehát megvizsgálni, hogy human rendszerünkben az exogén TNF- $\alpha$  és IL-6 hatással van-e a HIV-1 fertőzött MM-k C3 termelésére. Eredményünk szerint, az alacsonyabb vírus-koncentrációk esetében a TNF- $\alpha$  tovább növelte a C3 termelést mindkét típusú vírus esetében, azonban az IL-6 nem okozott változást egyik esetben sem (33. ábra), [181-saját]. Adataink azt sugallják, hogy a HIV-1 fertőzés korai szakaszában, az adaptív immunválaszt megelőzően, a fertőzött makrofágokból

felszabaduló C3-nak lokális opszonizáló hatása lehet. Ugyanakkor nem zárható ki, hogy a C3-fragmentumokkal opszonizált vírus komplementreceptort hordozó makrofágokhoz és follikuláris dendritikus sejtekhez kötődhet, ami segíti a vírus terjedését a szervezetben [104, 175].

A HIV-1 opszonizációja ellenanyag jelenléte nélkül is megtörténhet a C1q direkt kapcsolódásának köszönhetően, ami a HIV-specifikus ellenanyagok megjelenésével tovább fokozódik [93, 94]. Ismert az is, hogy az MBL is képes közvetlenül kapcsolódni a vírushoz, továbbá a HIV-fertőzöttekben az alternatív komplementaktivációt is megfigyelték [97]. Más kutatók adatai szerint a HIV-1 csak a klasszikus úton aktiválja a komplementrendszer [95, 96]. A HIV-1 komplement-mediált lízis iránti érzékenységet erősen befolyásolja a virális membrán összetétele, mert a komplementaktivációt szabályozó fehérjék jelenléte - mint pl. a CD46, CD55, és CD59 -, különösen rezisztenssé teszik a vírust a lízissel szemben [105, 106].

Mivel a primer fertőzés során a vírus már a fertőzés helyszínén opszonizálódik komplement-fragmentumokkal, ezért optimális target lehet az ott jelenlévő imDC-k számára. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a HIV(IgG+C) a HIV-hez képest kismértékben kötődött jobban az imMDC-khez, viszont ez a sejtek produktív infekcióját mintegy tízszeresére növelte (34-35. ábra). Megvizsgáltuk a DC-k elsődleges fagocitotikus receptorának, a CR3-nak a szerepét a folyamatban. Az MDC-eket CD11b-specifikus monoklonális ellenanyaggal kezeltük a HIV-1 fertőzés előtt. Az előkezelés hatására a HIV(IgG+C) által kiváltott produktív fertőzés fokozás elmaradt, visszaszorult a kontroll szintjére [4-saját]. Ezzel bebizonyítottuk, hogy a C3-fragmentummal opszonizált HIV a produktív fertőzés fokozását CR3 mediált módon váltja ki. Hasonló vizsgálatokban korábban monociták HIV fertőzését anti-CR3 kezeléssel gátolni tudták [102, 103], illetve részleges gátlást mutattak ki anti-CD11b kezelt PBMC esetében [104].

Azt a kérdést, hogy HIV kötődésében talált 30 %-os növekedés - amit a komplement-opszonizáció váltott ki -, hogyan okozott 10-szeres növekedést a produktív infekcióban, nem sikerült megválaszolni. A folyamat részleteinek feltárása további vizsgálatokat igényel. Feltételezésünk az, hogy a HIV a CR3 közvetítésével olyan intracelluláris kompartmentumokba irányítja a vírust, ami nem a vírus lebontásának, hanem ellenkezőleg, a vírus termelésének biztosít kedvező környezetet.

## 6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

**Az értekezésben azokat a kutatásainkat foglaltam össze, amelyekben komplementfehérjék kölcsönhatását tanulmányoztuk monocitákkal, makrofágokkal és dendritikus sejtekkel, és azt vizsgáltuk, hogy ezek a folyamatok miként befolyásolják az adaptív immunválasz kialakulását.**

Az antigének és az immunkomplexek egyaránt képesek kiváltani a komplementkaszád aktiválódását. A komplementrendszer az alapvető antigén-elimináló szerepén túl számos szabályozó szerepet is ellát. Ez annak köszönhető, hogy az antigénhez kötődött komplementfragmentumok egyben receptorok ligandumai is, és így kapcsolatot teremtenek az antigén és a komplementreceptort hordozó immunsejtek között. A komplementreceptorok különböző fajtái fejeződnek ki az immunsejtek felszínén és sokféle funkciót látnak el. Így pl. közvetíthetnek fagocitózist, lehet kostimulátor aktivitásuk, aktiválhatják a sejteket, kiválthatnak sejtdifferenciációt, továbbá szerepük lehet a sejtek adherenciájában is.

A szervezetünkben keringő antigének és immunkomplexek a komplementrendszer aktiválása eredményeképpen C1q-, MBL-molekulákat és különböző C3 fragmentumokat egyaránt tartalmaznak [12, 24, 44, 110], és így az adott komplementfehérje receptorát kifejező sejtekkel, például fagocitákkal kölcsönhatásba kerülhetnek.

A komplementrendszer jelentőségére az egyes komplementfehérjék öröklött hiánya hívja fel a figyelmet. Ismert ugyanis, hogy a kaszkád szinte bármelyik elemének hiánya fontos funkciók kiesését eredményezheti. Az egyes komplementfehérjék szelektív hiánya is súlyos következményekkel járhat; pl. a C1q-deficiens állapotban nem megfelelő az apoptotikus sejtek eltakarítása, emiatt autoimmun betegségek alakulhatnak ki [2]. Az MBL öröklött hiánya elsősorban gyermekkorban okozza a bakteriális, virális és gombás fertőzések fokozott előfordulását [3]. A komplementrendszer központi komponensének, a C3-nak a ritkán előforduló öröklött hiánya súlyos, szövődményes fertőzésekhez, az immunsejtek érésének és működésének rendellenességeihez vezet, ami a deficiens egyén korai halálát okozza [72].

**Kutatásaink középpontjában egyrészt a komplementrendszer működésének elindításában fontos C1q és MBL fehérjék, másrészt a központi szerepet játszó C3 molekula immunsejtek működésére gyakorolt hatása áll. Azt vizsgáltuk elsősorban,**

**hogy a veleszületett immunrendszer egyik legfontosabb humorális elemének komponensei hogyan befolyásolják az adaptív immunrendszer működését, és miként szabályozzák az adaptív immunválasz megindításában nélkülözhetetlen antigénbemutató sejtek funkcióit.**

1./ Célunk volt tisztázni, hogy mely immunsejtek képesek megkötni a C1q és az MBL molekulákat, van-e kapcsolat a két fehérjét felismerő sejtfelszíni struktúrák között, és a kötődésnek mi a funkcionális következménye. Megállapítottuk, hogy az MBL elsősorban mieloid sejtekhez; a THP-, U937, P388D1 sejtvonal sejtjeihez, normál humán monocitákhoz és makrofágokhoz kötődik, de MDC-khez valamint humán T és B limfocitákhoz nem. Ezzel ellentétben a C1q komplementfehérje valamennyi fent felsorolt sejttypushoz hatékonyan kötődött. Kereszt-gátlásos kísérleteinkkel elsőként igazoltuk, hogy monocitoid sejteken a C1q és az MBL receptora nem azonos. Megállapítottuk, hogy a C1q a makrofágok TNF- $\alpha$  és C3 termelésének fokozása révén növeli a patogének lokális opszonizációját, eliminációját. **Eredményeinkkel elsőként bizonyítottuk, hogy az MBL és a C1q, a két szerkezetileg hasonló komplementfehérje, monociták és makrofágok különböző struktúráihoz kötődve, eltérő funkcionális hatással bír [45].**

Tanulmányoztuk a C1q hatását MDC-k differenciálódására és működésére. Az imMDC-ket C1q-fedett felszínen tenyésztve a sejtek érését figyeltük meg; a CD83, CD86, MHCII és CCR7 moleklák expresszió-fokozódásának mértéke összevethető az LPS általi aktiváció hatásával. Továbbá, a C1q-aktivált MDC-k az allogén T-sejtek hatékony stimulátorainak bizonyultak, mivel kokultúrában a T limfociták IFN- $\gamma$  termelése 2-3-szorosára nőtt, ami Th1 irányú differenciálódásra utal. Ugyanakkor az imMDC-ket immobilizált C1q felszínen tenyésztve, fokozódott az NF- $\kappa$ B magi transzlokációja és a sejtek IL-12, TNF- $\alpha$  és IL-10 szerkéciója is. Érdekes jelenségnek találtuk, hogy az IL-10 termelése is fokozódott C1q hatására, ugyanis ez a citokin az IL-12-vel ellentétesen tolerogén hatású. **Eredményeink a C1q egy eddig nem ismert funkciójára hívja fel a figyelmet, amennyiben a DC-k aktiválása e komplementfehérje által az adaptív immunválasz fokozáshoz, vagy T-sejt toleranciához egyaránt vezethet, attól függően, hogy az adott szöveti környezetben milyen egyéb faktorok vannak jelen [128].**

2./ A komplementkaskádban kulcsfontosságú C3 fehérje sokoldalú funkciói között az adhéziós folyamatokban betöltött szerepét számos kutatócsoport, köztük már korábban a miénk is részletesen vizsgálta. Így ismert, hogy a C3 aktiválódása során keletkező C3b fragmentum kovalens megkötésére számos immunsejt képes [117, 130, 131]. Munkacsoportunk korábban bizonyította, hogy a makrofágok és a B-sejtek képesek a C3b-t kovalensen kötni a felszínükön, ami fokozza e sejtek antigénbemutató képességét [132, 134, 164].

Újabb kísérleteinkben azt tanulmányoztuk, hogy a C3 kovalens megkötésére képesek-e a humán MDC-k, és ennek van-e ennek a kölcsönhatásnak funkcionális következménye. Bizonyítottuk, hogy a tisztított, natív, hemolitikusan aktív C3-al kezelt MDC-k képesek dóziszfüggő módon, kovalensen fixálni felszínükön a C3b fragmentumokat, míg a kovalens kötésre nem képes, MA-C3 nem kötődött ezekhez a sejtekhez. CR3-specifikus ellenanyaggal előinkubálva a sejteket a C3b fixációja nem gátlódott, ami arra utal, hogy a natív C3 túlnyomórészt kovalens módon fixálódik a sejt felszínen kísérleti körülményeink között. Kimutattuk, hogy a C3b fixációt követően igen gyorsan, 10 perc után megindul a fragmentumok internalizálódása. Megállapítottuk, hogy a C3b kezelés hatására szignifikánsan nő a CD83, CD80, CD86 és MHCII sejt felszíni mennyisége, ami a sejtek differenciálódását jelzi. Ezek a változások az érett DC-k antigénprezentáló funkciójának aktiválódását mutatják. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a natív C3-mal kezelt MDC-k hatékony aktivátorai az allogen T-sejteknek, fokozzák azok osztódását. A C3 közvetített folyamatok *in vivo* jelentőségét gyulladásszerű szituációt modellező körülmények között vizsgáltuk úgy, hogy a C3-at nem termelő MDC-keket a C3-at szekretáló, aktivált makrofágok jelenlétében tenyésztettük. Kimutattuk, hogy a kokultúrákban, az MDC-k sejtmembránjukon fixálták a makrofágok által szekretált C3-eredetű C3b-t. Eredményeink összhangban vannak a Ghannam és mtsai által leírtakkal, miszerint C3 deficiens betegek esetében súlyos MDC differenciálódási zavar figyelhető meg [72]. **A dataink meggyőzően bizonyítják, hogy az antigénbemutató sejtek a környezetükben jelenlévő C3 aktiválódása, és a keletkező C3b-fragmentumok kovalens kötődésének hatására T limfociták aktiválására alkalmas sejtekké érnek, amely folyamat C3 hiányában gátolt [164].**

3./ A C3 aktiválódása során keletkező fragmentumok közül az iC3b természetes liganduma a CR3 és a CR4 receptoroknak [11, 12, 142, 145, 146]. A CR3 és a CR4



mieloid sejteken fordul elő; a neutrofil granulociták, a monociták, a makrofágok, és a dendritikus sejtek felszínén. Mindkét receptor a  $\beta_2$ -integrin család tagja, eltérő  $\alpha$  és azonos  $\beta$  láncokból álló heterodimer molekulák, amelyek extracelluláris doménje 87%-os homológiát mutat. Az integrinek fontos szerepet töltenek be a sejtadhéziós folyamatokban, az immunológiai szinapszis létrehozásában, az endotéliumon keresztül történő sejt migrációban valamint az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódásban. A patogének, az apoptotikus sejtek, a fertőzött és a tumorosan elfajult sejtek fagocitózisában elengedhetetlen a CR3 részvétele [77, 147, 148]. Korábban a DC-k CR3 és CR4 receptorainak részletes vizsgálatával nem foglalkoztak. Célunk volt kideríteni, hogy van-e különbség a két receptor ligandum-kötésében és funkcionális hatásában MDC-k esetében. Kimutattuk, hogy a sejtek megkötik az iC3b-t, és CR3 és CR4 egyaránt jelen van felszínükön. Azt találtuk, hogy a sejtek differenciálódása során a CR3 mennyisége csökken kb. 45%-al, míg a CR4 mennyisége mintegy kétszeresére nő. Megállapítottuk, hogy mindkét integrin aktív konformációban van jelen az MDC-ken, és ligandum-kötő képességük  $Mg^{2+}$ -ionok hatására nem nőtt. A sejtek differenciálódását az iC3b kötődése nem váltotta ki, továbbá nem változott a gyulladási citokin termelésük és T-sejt aktiváló képességük sem. Bizonyítottuk, hogy az iC3b-vel opsonizált baktérium és gomba hatékonyan kötődik az MDC-khez. Az opsonizált patogén fagocitózisát a CR3 ellenanyaggal történő gátlása szignifikánsan csökkentette, a CR4 gátlása viszont nem változtatta azt meg. Ezeket az eredményeinket a CR3 és CR4 RNS-csendesítési kísérleteinkkel megerősítettük. Megvizsgáltuk a receptorok eloszlását az iC3b ligandum jelenlétében, és a mikroszkópos vizsgálat bizonyította a CR3 és CR4 kolokalizációját a sejtmembránban. Megállapítottuk, hogy iC3b-vel opsonizált baktérium fagocitózisát követően a CD11b sejt felszíni mennyisége szignifikánsan csökken, viszont a CD11c mennyisége nem változik.

**Kísérleteinkben elsőként mutattuk ki, hogy MDC-ken a CR3 és a CR4 integrinek kifejeződése és funkciója eltérő. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy az MDC-k iC3b-opszonizált antigén felvételében a CR3 szerepe döntő fontosságú [164]. Kísérleteinkben a mieloid sejtek CR3 receptorát, mint lehetséges új célpontot azonosítottuk, mely felelős lehet az autoimmun kórképek kialakulásáért, illetve azok súlyosságáért. Ezért a CR3 és CR4 receptorok funkcióját tervezzük autoimmun körülmények között is jellemezni, hiszen mindkettő részt vesz az opsonizált apoptotikus testek fagocitózisában, így autoimmun betegségek – például SLE – kialakulásában szerepük lehet.**

4./ A komplementaktiváció során felszabaduló anafilatoxikus peptidek (C3a, C5a) gyulladáskeltő hatásuk következtében betegségek kiváltói, vagy annak súlyosbítói lehetnek, emiatt mind a C3a és C5a, mind receptoraik a gyógyszerfejlesztés fontos célpontjai [177].

Az anafilatoxikus hatású komplementfragmentumok hatását megvizsgáltuk monociták és makrofágok HIV-fertőzésének folyamatában, mivel a primer HIV-1-fertőzés során az M-tropikus vírus számára ezek a sejtek a legfontosabb célpontok közé tartoznak. Eredményünk szerint a makrofágok érzékenységét a C5a mintegy 40-szeresére fokozta, míg a biológiailag inaktív C5a<sub>desArg</sub> hatása csökkent mértékű volt. Ugyanekkor sem a C3a sem a C3a<sub>desArg</sub> nem befolyásolta a fertőzést. A monociták HIV-1 fertőzésére az anafilatoxinoknak nem volt hatása [5].

Vizsgáltuk továbbá, hogy makrofágok C3 termelése hogyan változik a HIV-1 fertőzés során. Ismert, hogy a makrofágok aktiváció hatására fokozott mértékben szekretálnak C3-t, ami a lokális opszonizáció révén segíti a környezetükben lévő patogén feldolgozását [59]. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy M-tropikus és T-tropikus HIV-1 egyaránt stimulálja az MM-k C3 szekrécióját. A termelt C3 mennyisége összevethető volt az LPS-stimulus hatásával. Ismert, hogy a HIV-1 fertőzött makrofágok TNF- $\alpha$  termelése fokozott, ami a makrofágok C3 termelésének növekedését eredményezi [71, 176]. Indokolt volt tehát megvizsgálni, hogy human rendszerünkben az exogén TNF- $\alpha$  és IL-6 hatással van-e a HIV-1-fertőzött MM-k C3 termelésére. Eredményünk szerint az alacsonyabb vírus-koncentrációk esetében a TNF- $\alpha$  tovább növelte a C3 szekréciót mindkét típusú vírus esetében, azonban az IL-6 nem okozott változást egyik esetben sem [181]. **Adataink arra utalnak, hogy a HIV-1 fertőzés korai szakaszában, az adaptív immunválaszt megelőzően, a fertőzött makrofágokból felszabaduló C3-nak lokális opszonizáló hatása lehet, ami segíti a vírus eliminációját.** Ugyanakkor nem zárható ki, hogy a C3-fragmentumokkal opszonizált vírus komplementreceptort hordozó makrofágokhoz, dendritikus sejtekhez és folliculáris dendritikus sejtekhez is kötődhet és éppen ellenkezőleg hat, vagyis segíti a vírus szétterjedését a szervezetben [104, 175].

A HIV-1 képes aktiválni a komplementrendszer, ami a vírus opszonizációját eredményezi [94, 104]. A primer HIV-1-fertőzés során a vírus már a fertőzés helyszínén opszonizálódik komplement-fragmentumokkal, ezért optimális target lehet az ott jelenlévő imDC-k számára. A fertőzött sejtek ezt követően a szervezet különböző

szöveibe szállítják a vírust, ahol továbbítják azt a T-sejteknek [167]. A C3 molekula HIV-fertőzés során betöltött szerepét illetően egymásnak ellentmondó adatok láttak napvilágot. A C3 eliminációt fokozó, és a fertőzés elterjedését segítő hatásáról egyaránt beszámoltak [95, 104]. Kutatásunk során kimutattuk, hogy a komplement-opszonizált vírus (HIV(IgG+C)) a nem opszonizált HIV-1-hez képest kb. 30%-al jobban kötődött imMDC-khez. Megvizsgálva az imMDC-k produktív infekcióját azt találtuk, hogy a HIV(IgG+C) mintegy tízszeres növekedést okozott a nem-opszonizált vírushoz képest. Vizsgáltuk a DC-k elsődleges fagocitotikus receptorának, a CR3-nak a szerepét a folyamatban. Azt tapasztaltuk, hogy az anti-CR3 előkezelés hatására a HIV(IgG+C) által kiváltott produktív fertőzés-fokozás elmaradt és visszaszorult a kontroll szintjére. **Ezzel bizonyítottuk, hogy a C3-fragmentummal opszonizált HIV-1 a produktív fertőzés fokozását CR3 mediált módon váltja ki.** Feltételezésünk az, hogy a CR3 közvetítésével a HIV-1 olyan intracelluláris kompartmentumba kerül, ami nem a vírus lebontásának, hanem ellenkezőleg, a vírus termelésének kedvez [4].

*A dendritikus sejtek és a C3 kölcsönhatásával kapcsolatos vizsgálataink eredményei rámutatnak arra, hogy a DC-k mikro környezetében jelen lévő, lokálisan termelődő és aktiválódó C3 döntő hatással van a sejtek aktivációjára, differenciációjára. A kovalensen kapcsolódó C3b, illetve a receptorhoz kötődő iC3b/iC3b-opszonizált kórokozó teljesen eltérő hatást gyakorol a DC-kre. A veszélyt jelző stimulus hatására aktiválódó C3 molekula C3a és C3b fragmentumokra hasad. A kovalensen fixált C3b sejt differenciációt és sejt funkció fokozást (citokin szintézist, T-sejt aktivációt) eredményez. Az opszonizált patogénnel a DC-k CR3 és CR4 receptorai egyaránt kölcsönhatásba lépnek, de ennek következménye eltérő. A CR3 stimulációja nem vált ki differenciálódást, de a patogén fagocitózist igen, és így meghatározó szerepe van az antigén eliminálásában. A CR4 önmagában nem képes fagocitózist indukálni. Adataink tehát azt bizonyítják, hogy kölcsönhatások komplex hálózata áll fenn a DC-k komplementkötő struktúrái között, ami döntően befolyásolja a sejt stimulációra adott válaszát.*

## 7. Irodalomjegyzék

1. Botto, M., et al., *Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 56-9.
2. Kishore, U., et al., *C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility*. Trends Immunol, 2004. **25**(10): p. 551-61.
3. Garred, P., et al., *Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome*. J Infect Dis, 2003. **188**(9): p. 1394-403.
4. Bajtay, Z., et al., *Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18)*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 4775-8.
5. Kacani, L., et al., *C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3410-5.
6. Reid, K.B. and R.R. Porter, *Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement*. Biochem J, 1976. **155**(1): p. 19-23.
7. Jacobson, A.C. and J.H. Weis, *Comparative functional evolution of human and mouse CR1 and CR2*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 2953-9.
8. Jozsi, M., et al., *Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2782-8.
9. Gommerman, J.L., et al., *A role for CD21/CD35 and CD19 in responses to acute septic peritonitis: a potential mechanism for mast cell activation*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6915-21.
10. Andrasfalvy, M., et al., *Mucosal type mast cells express complement receptor type 2 (CD21)*. Immunol Lett, 2002. **82**(1-2): p. 29-34.
11. Erdei, A., et al., *Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions*. Mol Immunol, 2009. **46**(14): p. 2767-73.
12. Bajtay, Z., et al., *Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells*. Immunol Lett, 2006. **104**(1-2): p. 46-52.
13. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
14. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
15. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
16. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
17. Steinman, R.M., *Decisions about dendritic cells: past, present, and future*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 1-22.
18. Shin, J.S., et al., *Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination*. Nature, 2006. **444**(7115): p. 115-8.
19. Macagno, A., et al., *Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation*. Trends Immunol, 2007. **28**(5): p. 227-33.
20. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
21. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 476-83.
22. Banki, Z., et al., *Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-kappa B signaling pathway*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 3963-70.

23. Nauta, A.J., et al., *Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation*. Eur J Immunol, 2002. **32**(6): p. 1726-36.
24. Thielens, N.M., P. Tacnet-Delorme, and G.J. Arlaud, *Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses*. Immunobiology, 2002. **205**(4-5): p. 563-74.
25. Castellano, G., et al., *Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3813-20.
26. Fey, G. and H.R. Colten, *Biosynthesis of complement components*. Fed Proc, 1981. **40**(7): p. 2099-104.
27. Gaboriaud, C., et al., *Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle*. Trends Immunol, 2004. **25**(7): p. 368-73.
28. Thiel, S., et al., *A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 506-10.
29. Day, A.J., *The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily*. Biochem Soc Trans, 1994. **22**(1): p. 83-8.
30. van de Wetering, J.K., L.M. van Golde, and J.J. Batenburg, *Collectins: players of the innate immune system*. Eur J Biochem, 2004. **271**(7): p. 1229-49.
31. Takahashi, K., et al., *The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 16-23.
32. Tsutsumi, A., R. Takahashi, and T. Sumida, *Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(6): p. 364-72.
33. Gadjeva, M., K. Takahashi, and S. Thiel, *Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule*. Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 113-21.
34. Taylor, P.R., et al., *A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 359-66.
35. Christiansen, O.B., et al., *Mannan-binding lectin deficiency is associated with unexplained recurrent miscarriage*. Scand J Immunol, 1999. **49**(2): p. 193-6.
36. Saevarsdottir, S., et al., *Mannan-binding lectin may facilitate the clearance of circulating immune complexes--implications from a study on C2-deficient individuals*. Clin Exp Immunol, 2007. **148**(2): p. 248-53.
37. Eggleton, P., K.B. Reid, and A.J. Tenner, *C1q--how many functions? How many receptors?* Trends Cell Biol, 1998. **8**(11): p. 428-31.
38. Erdei, A., *C1q receptor on murine cells*. J Immunol, 1990. **145**(6): p. 1754-60.
39. Tenner, A.J., *C1q receptors: regulating specific functions of phagocytic cells*. Immunobiology, 1998. **199**(2): p. 250-64.
40. Reid, K.B., et al., *Complement component C1 and the collectins--first-line defense molecules in innate and acquired immunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 115-7.
41. Sim, R.B., et al., *Interaction of C1q and the collectins with the potential receptors calreticulin (cC1qR/collectin receptor) and megalin*. Immunobiology, 1998. **199**(2): p. 208-24.
42. Ghebrehiwet, B. and E.I. Peerschke, *cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection*. Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 173-83.
43. Vegh, Z., et al., *Maturation-dependent expression of C1q-binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(3): p. 345-57.
44. Nauta, A.J., et al., *Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3044-50.
45. Bajtay, Z., et al., *Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1706-13.

46. Vegh, Z., et al., *Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR*. Mol Immunol, 2006. **43**(9): p. 1402-7.
47. Nauta, A.J., et al., *Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins*. Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 148-54.
48. Isenman, D.E., et al., *Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties*. Biochemistry, 1981. **20**(15): p. 4458-67.
49. Law, S.K. and A.W. Dodds, *The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4*. Protein Sci, 1997. **6**(2): p. 263-74.
50. Sim, R.B., et al., *The covalent-binding reaction of complement component C3*. Biochem J, 1981. **193**(1): p. 115-27.
51. Tack, B.D. and J.W. Prah, *Third component of human complement: purification from plasma and physicochemical characterization*. Biochemistry, 1976. **15**(20): p. 4513-21.
52. Colten, H.R., et al., *Regulation of complement protein biosynthesis in mononuclear phagocytes*. Ciba Found Symp, 1986. **118**: p. 141-54.
53. Behrendt, N., et al., *Localization and functional significance of a polymorphic determinant in the third component of human complement*. Mol Immunol, 1987. **24**(10): p. 1097-103.
54. Nishida, N., T. Walz, and T.A. Springer, *Structural transitions of complement component C3 and its activation products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19737-42.
55. de Bruijn, M.H. and G.H. Fey, *Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(3): p. 708-12.
56. Gros, P., F.J. Milder, and B.J. Janssen, *Complement driven by conformational changes*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 48-58.
57. Pangburn, M.K., R.D. Schreiber, and H.J. Muller-Eberhard, *Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3*. J Exp Med, 1981. **154**(3): p. 856-67.
58. Andrews, P.A., W. Zhou, and S.H. Sacks, *Tissue synthesis of complement as an immune regulator*. Mol Med Today, 1995. **1**(4): p. 202-7.
59. Ezekowitz, R.A., et al., *Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan*. J Exp Med, 1984. **159**(1): p. 244-60.
60. Maison, C.M., C.L. Villiers, and M.G. Colomb, *Secretion, cleavage and binding of complement component C3 by the human monocytic cell line U937*. Biochem J, 1989. **261**(2): p. 407-13.
61. Perlmann, H., et al., *Interaction of target cell-bound C3bi and C3d with human lymphocyte receptors. Enhancement of antibody-mediated cellular cytotoxicity*. J Exp Med, 1981. **153**(6): p. 1592-603.
62. Ramos, O.F., et al., *The elevated natural killer sensitivity of targets carrying surface-attached C3 fragments require the availability of the iC3b receptor (CR3) on the effectors*. J Immunol, 1988. **140**(4): p. 1239-43.
63. Ramos, O.F., et al., *Complement-dependent cellular cytotoxicity: lymphoblastoid lines that activate complement component 3 (C3) and express C3 receptors have increased sensitivity to lymphocyte-mediated lysis in the presence of fresh human serum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(16): p. 5470-4.
64. Dierich, M.P., et al., *Detection of proteolytic (C3-cleaving) activity on mouse mastocytoma (P 815) cells and other mouse cell lines by formation of cell contact with C3-carrying mouse lymphocytes*. Eur J Immunol, 1979. **9**(12): p. 928-32.

65. Janssen, B.J. and P. Gros, *Structural insights into the central complement component C3*. Mol Immunol, 2007. **44**(1-3): p. 3-10.
66. Law, S.K., T.M. Minich, and R.P. Levine, *Covalent binding efficiency of the third and fourth complement proteins in relation to pH, nucleophilicity, and availability of hydroxyl groups*. Biochemistry, 1984. **23**(14): p. 3267-72.
67. Longo, A., et al., *C3-induced 3LL cell proliferation is mediated by C kinase*. J Cell Biochem, 2005. **94**(3): p. 635-44.
68. Marquart, H.V., S.E. Svehag, and R.G. Leslie, *CR2 is the primary acceptor site for C3 during alternative pathway activation of complement on human peripheral B lymphocytes*. J Immunol, 1994. **153**(1): p. 307-15.
69. Mold, C., et al., *CR2 is a complement activator and the covalent binding site for C3 during alternative pathway activation by Raji cells*. J Immunol, 1988. **140**(6): p. 1923-9.
70. Parker, C.J., C.M. Soldato, and W.F. Rosse, *Abnormality of glycophorin-alpha on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes*. J Clin Invest, 1984. **73**(4): p. 1130-43.
71. Di Renzo, L., et al., *IFN gamma and TNF alpha cause an increased release of C3 by murine macrophages*. Immunol Lett, 1994. **42**(3): p. 167-72.
72. Ghannam, A., et al., *Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 5158-66.
73. Lee, W., J. Sodek, and C.A. McCulloch, *Role of integrins in regulation of collagen phagocytosis by human fibroblasts*. J Cell Physiol, 1996. **168**(3): p. 695-704.
74. Ravichandran, K.S. and U. Lorenz, *Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 964-74.
75. Foukas, L.C., et al., *Phagocytosis of Escherichia coli by insect hemocytes requires both activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway for attachment and beta3 integrin for internalization*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14813-8.
76. Moita, L.F., et al., *In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in A. gambiae*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 65-73.
77. Dupuy, A.G. and E. Caron, *Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 11): p. 1773-83.
78. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
79. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
80. Bunting, M., et al., *Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands*. Curr Opin Hematol, 2002. **9**(1): p. 30-5.
81. Hogg, N., et al., *Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 164-71.
82. Griffin, F.M., Jr., et al., *Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane*. J Exp Med, 1975. **142**(5): p. 1263-82.
83. Evans, R., et al., *Integrins in immunity*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 215-25.
84. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 339-62.
85. Berton, G. and C.A. Lowell, *Integrin signalling in neutrophils and macrophages*. Cell Signal, 1999. **11**(9): p. 621-35.
86. Lim, J.Y., et al., *The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography*. Biomaterials, 2007. **28**(10): p. 1787-97.

87. Tadokoro, S., et al., *Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation*. Science, 2003. **302**(5642): p. 103-6.
88. Vachon, E., et al., *CD44-mediated phagocytosis induces inside-out activation of complement receptor-3 in murine macrophages*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4492-502.
89. Caron, E. and A. Hall, *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1717-21.
90. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1369-75.
91. Granelli-Piperno, A., et al., *Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2733-7.
92. Herbein, G., et al., *Macrophage activation and HIV infection: can the Trojan horse turn into a fortress?* Curr Mol Med, 2002. **2**(8): p. 723-38.
93. Dierich, M.P., et al., *HIV and human complement: mechanisms of interaction and biological implication*. Immunol Today, 1993. **14**(9): p. 435-40.
94. Ebenbichler, C.F., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1417-24.
95. Sullivan, B.L., et al., *Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1791-8.
96. June, R.A., et al., *Complement and antibody mediate enhancement of HIV infection by increasing virus binding and provirus formation*. AIDS, 1991. **5**(3): p. 269-74.
97. Yefenof, E., et al., *Alternative complement pathway activation by CD4+ T cells of HIV infected individuals: a possible role in AIDS pathogenesis*. Int Immunol, 1994. **6**(9): p. 1361-6.
98. Thieblemont, N., et al., *CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) mediate infection of human monocytes and monocytic cell lines with complement-opsonized HIV independently of CD4*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(1): p. 106-13.
99. Delibrias, C.C., M.D. Kazatchkine, and E. Fischer, *Evidence for the role of CR1 (CD35), in addition to CR2 (CD21), in facilitating infection of human T cells with opsonized HIV*. Scand J Immunol, 1993. **38**(2): p. 183-9.
100. Legendre, C., et al., *Mechanisms of opsonized HIV entry in normal B lymphocytes*. FEBS Lett, 1996. **381**(3): p. 227-32.
101. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 33-54.
102. Bouhlal, H., et al., *Soluble CD16 inhibits CR3 (CD11b/CD18)-mediated infection of monocytes/macrophages by opsonized primary R5 HIV-1*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3377-83.
103. Kacani, L., et al., *Dendritic cells transmit human immunodeficiency virus type 1 to monocytes and monocyte-derived macrophages*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6671-7.
104. Stoiber, H., et al., *Inhibition of HIV-1 infection in vitro by monoclonal antibodies to the complement receptor type 3 (CR3): an accessory role for CR3 during virus entry?* Mol Immunol, 1997. **34**(12-13): p. 855-63.
105. Montefiori, D.C., et al., *Binding of human immunodeficiency virus type 1 to the C3b/C4b receptor CR1 (CD35) and red blood cells in the presence of envelope-specific antibodies and complement*. National Institutes of Health AIDS Vaccine Clinical Trials Networks. J Infect Dis, 1994. **170**(2): p. 429-32.
106. Stoiber, H., C. Speth, and M.P. Dierich, *Role of complement in the control of HIV dynamics and pathogenesis*. Vaccine, 2003. **21 Suppl 2**: p. S77-82.
107. Freundlich, B. and N. Avdalovic, *Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes*. J Immunol Methods, 1983. **62**(1): p. 31-7.



108. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 83-93.
109. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *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, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
110. Nauta, A.J., A. Roos, and M.R. Daha, *A regulatory role for complement in innate immunity and autoimmunity*. Int Arch Allergy Immunol, 2004. **134**(4): p. 310-23.
111. Hansen, S. and U. Holmskov, *Structural aspects of collectins and receptors for collectins*. Immunobiology, 1998. **199**(2): p. 165-89.
112. Holmskov, U., et al., *Comparative study of the structural and functional properties of a bovine plasma C-type lectin, collectin-43, with other collectins*. Biochem J, 1995. **305** (Pt 3): p. 889-96.
113. Malhotra, R., et al., *Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains*. J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 955-9.
114. Soell, M., et al., *Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF-alpha release*. J Immunol, 1995. **154**(2): p. 851-60.
115. Geertsma, M.F., et al., *Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of Staphylococcus aureus by monocytes*. Am J Physiol, 1994. **267**(5 Pt 1): p. L578-84.
116. Arvieux, J., H. Yssel, and M.G. Colomb, *Antigen-bound C3b and C4b enhance antigen-presenting cell function in activation of human T-cell clones*. Immunology, 1988. **65**(2): p. 229-35.
117. Erdei, A., et al., *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, 1988. **25**(3): p. 295-303.
118. van den Berg, R.H., et al., *Anti-C1q receptor/calreticulin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. Clin Exp Immunol, 1998. **111**(2): p. 359-64.
119. Turner, M.W., *Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 532-40.
120. Tobiasova-Czetoova, Z., et al., *Effects of human plasma proteins on maturation of monocyte-derived dendritic cells*. Immunol Lett, 2005. **100**(2): p. 113-9.
121. Baldwin, A.S., Jr., *Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 3-6.
122. Thompson, A.G., et al., *T cells signaled by NF-kappa B- dendritic cells are sensitized not anergic to subsequent activation*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1671-80.
123. Yoshimura, S., et al., *Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI*. Eur J Immunol, 2001. **31**(6): p. 1883-93.
124. Corinti, S., et al., *Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4312-8.
125. Smits, H.H., et al., *Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 123-9.
126. Xu, W., et al., *IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4930-7.
127. Allavena, P., et al., *IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 359-69.
128. Csomor, E., et al., *Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells*. Mol Immunol, 2007. **44**(13): p. 3389-97.
129. Erdei, A., G. Fust, and J. Gergely, *The role of C3 in the immune response*. Immunol Today, 1991. **12**(9): p. 332-7.

130. Fabry, Z., A. Erdei, and J. Gergely, *A possible self-regulating mechanism mediated by C3b-acceptor-bound C3b generated by stimulated macrophages*. Scand J Immunol, 1985. **22**(5): p. 549-55.
131. Gergely, J., et al., *Functional cooperation of C3b-acceptors, Fc gamma-receptors and cell-surface proteases on macrophages*. Immunol Lett, 1985. **11**(3-4): p. 141-6.
132. Kerekes, K., et al., *A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1923-30.
133. Erdei, A., et al., *Macrophage-bound C3 fragments as adhesion molecules modulate presentation of exogenous antigens*. Immunobiology, 1992. **185**(2-4): p. 314-26.
134. Papp, K., et al., *B lymphocytes and macrophages release cell membrane deposited C3-fragments on exosomes with T cell response-enhancing capacity*. Mol Immunol, 2008. **45**(8): p. 2343-51.
135. Melchers, F., et al., *Growth control of activated, synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement*. Nature, 1985. **317**(6034): p. 264-7.
136. Biro, A., et al., *A trypsin-like serine protease activity on activated human B cells and various B cell lines*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2547-53.
137. Erdei, A., et al., *The action of human C3 in soluble or cross-linked form with resting and activated murine B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1985. **15**(2): p. 184-8.
138. Matsumoto, M. and T. Seya, *Homologous C3 deposition and homotypic cell adhesion in a human myeloid cell line, P39*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2270-8.
139. Cohen, J.H., et al., *Human T lymphocytes expressing the C3b/C4b complement receptor type one (CRI, CD35) belong to Fc gamma receptor-positive CD4-positive T cells*. Cell Immunol, 1989. **121**(2): p. 383-90.
140. Reis e Sousa, C., et al., *Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli*. Pathol Biol (Paris), 2003. **51**(2): p. 67-8.
141. Singer, L., et al., *Inherited human complement C3 deficiency. An amino acid substitution in the beta-chain (ASP549 to ASN) impairs C3 secretion*. J Biol Chem, 1994. **269**(45): p. 28494-9.
142. Carroll, M.C., *The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 545-68.
143. Li, K., et al., *Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells*. Mol Immunol, 2011. **48**(9-10): p. 1121-7.
144. Liu, D. and Z.X. Niu, *The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CRI/CD35)*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009. **31**(4): p. 524-35.
145. Rosen, H. and S.K. Law, *The leukocyte cell surface receptor(s) for the iC3b product of complement*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **153**: p. 99-122.
146. Ross, G.D. and V. Vetvicka, *CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(2): p. 181-4.
147. Oliva, C.R., et al., *The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs Bacillus anthracis spores into professional phagocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1261-6.
148. van Spruiel, A.B., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2478-86.
149. Ehrchiou, D., et al., *CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1519-24.
150. Sohn, J.H., et al., *Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 206-12.

151. 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, 2002. **196**(12): p. 1553-61.
152. Bullock, W.E. and S.D. Wright, *Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of Histoplasma capsulatum by human macrophages*. J Exp Med, 1987. **165**(1): p. 195-210.
153. Varga, G., et al., *Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation*. Blood, 2007. **109**(2): p. 661-9.
154. Birdsall, H.H., et al., *Monocytes stimulated by 110-kDa fibronectin fragments suppress proliferation of anti-CD3-activated T cells*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3347-53.
155. 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, 2003. **101**(2): p. 611-20.
156. Schmidt, J., et al., *Release of iC3b from apoptotic tumor cells induces tolerance by binding to immature dendritic cells in vitro and in vivo*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(1): p. 31-8.
157. Veldhoen, M., *Oral tolerance: passing CD11b on the way to tolerance*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 397-8.
158. Carroll, M.C., *The complement system in B cell regulation*. Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 141-6.
159. Kemper, C. and J.P. Atkinson, *T-cell regulation: with complements from innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 9-18.
160. Torok, K., et al., *Human T cell derived, cell-bound complement iC3b is integrally involved in T cell activation*. Immunol Lett, 2012. **143**(1): p. 131-6.
161. Skoberne, M., et al., *The apoptotic-cell receptor CR3, but not alphavbeta5, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function*. Blood, 2006. **108**(3): p. 947-55.
162. Georgakopoulos, T., S.T. Moss, and V. Kanagasundaram, *Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity*. Mol Immunol, 2008. **45**(13): p. 3671-81.
163. Graham, I.L., H.D. Gresham, and E.J. Brown, *An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors*. J Immunol, 1989. **142**(7): p. 2352-8.
164. Sandor, N., et al., *A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 438-48.
165. Behrens, E.M., et al., *Complement receptor 3 ligation of dendritic cells suppresses their stimulatory capacity*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6268-79.
166. Sandor, N., et al., *CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells*. Immunobiology, 2013. **218**(4): p. 652-63.
167. Balter, M., *HIV's other immune-system targets: macrophages*. Science, 1996. **274**(5292): p. 1464-5.
168. Gerard, C. and N.P. Gerard, *C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 775-808.
169. Gerard, N.P. and C. Gerard, *The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin*. Nature, 1991. **349**(6310): p. 614-7.
170. Haviland, D.L., et al., *Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung*. J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1861-9.
171. Nataf, S., et al., *Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4018-23.

172. Ottonello, L., et al., *rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6510-7.
173. Zwirner, J., A. Fayyazi, and O. Gotze, *Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells*. Mol Immunol, 1999. **36**(13-14): p. 877-84.
174. Zwirner, J., et al., *The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg)*. Scand J Immunol, 1998. **47**(1): p. 19-24.
175. Joling, P., et al., *Binding of human immunodeficiency virus type-1 to follicular dendritic cells in vitro is complement dependent*. J Immunol, 1993. **150**(3): p. 1065-73.
176. Merrill, J.E., *Cytokines and retroviruses*. Clin Immunol Immunopathol, 1992. **64**(1): p. 23-7.
177. Hugli, T.E., *Structure and function of C3a anaphylatoxin*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **153**: p. 181-208.
178. Daffern, P.J., et al., *C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation*. J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2119-27.
179. Fauci, A.S., *Host factors in the pathogenesis of HIV disease*. Antibiot Chemother (1971), 1996. **48**: p. 4-12.
180. Sutton, M.B., R.C. Strunk, and F.S. Cole, *Regulation of the synthesis of the third component of complement and factor B in cord blood monocytes by lipopolysaccharide*. J Immunol, 1986. **136**(4): p. 1366-72.
181. Bajtay, Z., et al., *HIV-1 induces human monocyte-derived macrophages to produce C3 and to fix C3 on their surface*. Journal of Leukocyte Biology, 1998. **63**(4): p. 463-468.

## 8. Saját közlemények

### 8.1 A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények

Bajtay ZS, Kacani L, Erdei A, Dierich MP. HIV-1 induces human monocyte-derived macrophages to produce complement component C3 and to fix C3 on their surface. JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 63: pp. 463-468. (1998) IF: 4.262

Kerekes K, Prechl J, Bajtay ZS, Józsi M, Erdei A. A further link between innate and adaptive immunity: C3-deposition on antigenpresenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells. INTERNATIONAL IMMUNOLOGY 10: pp. 1923-1930. (1998) IF: 3.188

Bajtay ZS, Józsi M, Bánki Z, Thiel S, Thielens N, Erdei A. Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 30: pp. 1706-1713. (2000) IF: 5.24

Kacani L, Banki Z, Zwirner J, Schennach H, Bajtay Z, Erdei A, Stoiber H, Dierich MP. C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection. JOURNAL OF IMMUNOLOGY 166: pp. 3410-3415. (2001) IF: 7.065

Andrasfalvy M, Prechl J, Hardy T, Erdei A, Bajtay Z. Mucosal type mast cells express complement receptor type 2 (CD21). IMMUNOLOGY LETTERS 82: p. 29. (2002) IF: 1.847

Bajtay ZS, Speth C, Erdei A, Dierich MP. Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). JOURNAL OF IMMUNOLOGY 173:(8) pp. 4775-4778. (2004) IF: 6.486

Bajtay ZS, Csomor E, Sándor N, Erdei A. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. IMMUNOLOGY LETTERS 104:(1-2) pp. 46-52. (2006) IF: 2.352

Csomor E, Bajtay ZS, Sándor N, Kristóf K, Arlaud GJ, Thiel S, Erdei A. Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. MOLECULAR IMMUNOLOGY 44:(13) pp. 3389-3397. (2007) IF: 3.742

Sándor N, Pap D, Prechl J, Erdei A, Bajtay Z. A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes. MOLECULAR IMMUNOLOGY 47:(2-3) pp. 438-448. (2009) IF: 3.202

Erdei A, Isaak A, Torok K, Sándor N, Kremlitzka M, Prechl J, Bajtay Z. Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions. MOLECULAR IMMUNOLOGY 46:(14 Special Issue) pp. 2767-2773. (2009) IF: 3.202

Sándor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z. CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. IMMUNOBIOLOGY 218:(4) pp. 652-663. (2013) IF: 2.814

**A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények IF: 43.4**

## **8.2 A PhD fokozat megszerzése óta megjelent további saját közlemények**

Erdei A, Toth G, Andrasfalvy M, Matko J, Bene L, Bajtay ZS, Ischenko A, Rong X, Pecht I. Inhibition of IgE-mediated triggering of mast cells by complement-derived peptides interacting with the FcεRI. IMMUNOLOGY LETTERS 68: pp. 79-82. (1999) IF: 1.494

Kerekes K, Cooper PD, Prechl J, Józsi M, Bajtay ZS, Erdei A. Adjuvant effect of gamma-inulin is mediated by C3-fragments deposited on antigen presenting cells. JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 69: pp. 69-74. (2001) IF: 4.516

Józsi M, Kapus A, Kerekes K, Kármán J, Bajtay ZS, Erdei A. Characterization of factor H-related cell membrane molecules expressed by human B lymphocytes and neutrophil granulocytes. IMMUNOLOGY LETTERS 77: pp. 55-62. (2001) IF: 2.009

Jozsi M, Prechl J, Bajtay Z, Erdei A. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. JOURNAL OF IMMUNOLOGY 168: p. 2782. (2002) IF: 7.014

Papp K, Vegh P, Prechl J, Kerekes K, Kovacs J, Csikos G, Bajtay Z, Erdei A. B lymphocytes and macrophages release cell membrane deposited C3-fragments on exosomes with T cell response-enhancing capacity. MOLECULAR IMMUNOLOGY 45:(8) pp. 2343-2351. (2008) IF: 3.555

Kristóf K, Erdei A, Bajtay Z. Set a thief to catch a thief: Self-reactive innate lymphocytes and self tolerance. AUTOIMMUNITY REVIEWS 7:(4) pp. 278-283. (2008). IF: 5.371

Varga L, Szeplaki G, Laki J, Kocsis A, Kristof K, Gal P, Bajtay Z, Wieslander J, Daha MR, Garred P, Madsen HO, Fust G, Farkas H. Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY 153:(1) pp. 68-74. (2008) IF: 2.853

Kristóf K, Madách K, Czaller I, Bajtay Z, Erdei A. Mathematical analysis of clinical data reveals a homunculus of bacterial mimotopes protecting from autoimmunity via oral tolerance in human. MOLECULAR IMMUNOLOGY 46:(8-9) pp. 1673-1678. (2009) IF: 3.202

Kristóf K, Madách K, Sándor N, Iványi Z, Király A, Erdei A, Tulassay E, Gál J, Bajtay Z. Impact of molecular mimicry on the clinical course and outcome of sepsis syndrome. MOLECULAR IMMUNOLOGY 49:(3) pp. 512-517. (2011) IF: 2.897

Madách K\*, Kristóf K\*, Tulassay E, Iványi Z, Erdei A, Király A, Gál J, Bajtay Z. Mucosal Immunity and the Intestinal Microbiome in the Development of Critical Illness. ISRN IMMUNOLOGY 2011: Paper 545729. 12 p. (2011)

Torok K, Kremlitzka M, Sandor N, Toth EA, Bajtay Z, Erdei A. Human T cell derived, cell-bound complement iC3b is integrally involved in T cell activation. IMMUNOLOGY LETTERS 143:(1) pp. 131-136. (2012) IF: 2.337

Szittner Z, Papp K, Sandor N, Bajtay Z, Prechl J. Application of fluorescent monocytes for probing immune complexes on antigen microarrays. PLOS ONE 8:(9) Paper e72401. 9 p. (2013) IF: 3.73

Orgovan N, Salánki R, Sándor N, Bajtay Z, Erdei A, Szabó B, Horvath R. In-situ and label-free optical monitoring of the adhesion and spreading of primary monocytes isolated from human blood: Dependence on serum concentration levels. BIOSENSORS & BIOELECTRONICS 54: pp. 339-344. (2014) IF: 5.437

**A PhD fokozat megszerzése óta megjelent további közlemények IF: 44.4**

**Összesített IF: 93.2**

**Összes hivatkozás: 413**

*Könyvfejezet:*

Anna Erdei, Zsuzsa Bajtay and Krisztina Kerekes. The role of C3 in cellular and molecular adhesion in: *New Aspects of Complement Structure and Function*. 1994. p.:73-83. R.G.Landes Company, Austin, ed.: Anna Erdei

Anna Erdei, Eszter Molnár, Eszter Csomor, Zsuzsa Bajtay, József Prechl: Coordination of adaptive immune responses by C3. in: *The Complement System*. 2004. Kluwer Academic Publisher, p.: 77-97. ed.: János Szebeni

**Immunológiai módszerek**, szerkesztette: Erdei Anna (Medicina, 2006)  
Önálló fejezet: 8., 9., Társszerző: 5., 11. fejezet

**Immunológia**, szerkesztette: Erdei Anna (Medicina, 2012)  
Társszerző: 3., 7., 21. fejezet