

dc_818_13

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI



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

Dr. Bajtay Zsuzsanna

ELTE TTK Biológiai Intézet

Immunológiai Tanszék

2014.

Bevezetés

Az immunhomeosztázist a veleszületett és az adaptív immunrendszer szoros együttműködése, sejtes és humorális elemeinek folyamatos egymásra hatása tartja fenn. A komplementrendszer nem csupán a veleszületett immunitás egyik leghatékonyabb effektor-rendszere, de biológiailag aktív hasítási termékei az adaptív immunitás szabályozásában is döntő szerepet játszanak, így hidat képeznek a kétféle immunrendszer között. Ez annak köszönhető, hogy az antigénhez kötődött komplementfragmentumok egyben immunsejteken jelenlévő receptorok ligandumai is lehetnek, és ilyen módon kapcsolatot teremtenek az antigén és a komplementreceptort hordozó immunsejtek között. A komplementreceptorok különböző fajtái vannak jelen az immunsejtek felszínén, amelyek sokféle funkciót látnak el. Így pl. közvetíthetnek fagocitózist, lehet kostimulátor aktivitásuk, kiválthatnak sejtdifferenciációt, továbbá szerepük lehet a sejtek adherenciájában.

A komplementrendszer jelentőségére az egyes komplementfehérjék öröklött hiánya is felhívja 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. Így pl. a C1q komponens hiányában nem megfelelő az apoptotikus sejtek eltakarítása, emiatt glomerulonefritisz, autoimmun betegségek alakulhatnak ki. Az MBL (mannóz kötő lektin) öröklött hiányában megnövekszik a bakteriális, virális és gombás fertőzések előfordulása, ami főleg kisgyermekkorban okoz problémát. A aktiválódás központi komponensének, a C3-nak a ritkán előforduló öröklött hiánya szintén súlyos, élettel össze nem egyeztethető fertőzésekhez vezet, de ma már az is ismert, hogy az immunsejtek érésének és működésének rendellenességeihez vezet, ami a deficiens egyén korai halálát okozza.

Céltűzés

Kutatásaink célja a komplementrendszer és az immunsejtek – elsősorban a monociták/makrofágok és a dendritikus sejtek – korábban nem ismert kapcsolatainak feltárása. Azt vizsgáltuk elsősorban, hogy a veleszületett immunrendszer egyik legfontosabb humorális elemének komponensei miként szabályozzák az adaptív immunválasz megindításában és formálásában nélkülözhetetlen antigénbemutató sejtek, a makrofágok és a dendritikus sejtek (DC) funkcióit. Kutatási eredményeink négy téma köré csoportosíthatók.

Eredmények

1. Elsőként bizonyítottuk, hogy az MBL és a C1q, a két szerkezetileg hasonló komplementfehérje, monociták és makrofágok különböző struktúráihoz kötődve, eltérő funkcionális hatással bírnak (Bajtay, 2000). Megállapítottuk, hogy az MBL elsősorban mieloid sejtekhez kötődik; THP-1, U937, P388D1 sejt vonal sejtjeihez, normál humán monocitákhoz, makrofágokhoz, de nem kötődik monocita-eredetű dendritikus sejtekhez (MDC-khez) valamint humán T és B limfocitákhoz. Ezzel ellentétben, a C1q komplementfehérje valemennyi sejt típushoz jól kötődik. Kereszt-gátlásos kísérleteinkkel elsőként igazoltuk, hogy monocitoid sejteken a C1q és az MBL receptora nem azonos. A C1q hatásának tanulmányozása során éretlen, monocita-eredetű dendritikus sejteket (imMDC) C1q-fedett felszínen tenyésztve a sejtek érését figyeltük meg; a CD83, CD86, MHCII és CCR7 expressziójuk fokozódása összevethető volt az LPS aktiváció hatásával. A C1q aktivált MDC-k az allogén T-sejtek hatékony stimulátorainak bizonyultak; a sejtek jelentősen megnövekedett proliferációja mellett a kultúrában a T limfociták IFN γ termelése 2-3-szorosára nőtt, ami Th1 irányú differenciálódásra utal. Ugyanakkor az imMDC-eket immobilizált C1q felszínen tenyésztve fokozódott a sejtekben az NF- κ B magi transzlokációja és nőtt a sejtek által szekretált IL-12, TNF α és IL-10 mennyisége is. Érdekes jelenségnek találtuk az IL-10 termelés fokozódást, ugyanis ez a citokin az IL-12-vel ellentétben, tolerogén hatású. Megállapítottuk, azt is, hogy a C1q a makrofágok TNF α és C3 termelésének fokozása révén növeli a patogének lokális opszonizációját és eliminációját.

Eredményeink a C1q egy eddig nem ismert funkciójára hívják fel a figyelmet, amennyiben a DC-k aktiválása e komplementfehérje által az adaptív immunválasz fokozásához, vagy T-sejt toleranciához egyaránt vezethet, attól függően, hogy az adott szöveti környezetben milyen egyéb faktorok vannak jelen (Csomor, 2007).

2. Bizonyítottuk, hogy a dendritikus sejtek a környezetükben lokálisan termelődött és aktiválódott C3 hatására, a C3b fragmentum kovalens kötődésének eredményeként a T limfociták stimulálására alkalmas, hatékony antigénbemutató sejtekké érnek (Sándor, 2009). Megállapítottuk, hogy az MDC-k a natív, hemolitikusan aktív C3-mal történő kezelés során felszínükön dóziszfüggő módon kötik meg a C3b fragmentumokat. Azt, hogy a fehérje kovalensen fixálódott az bizonyítja, hogy inaktív

(metilaminnal kezelt) C3 esetében a kötődés nem mutatható ki. Bizonyítottuk, hogy a C3b-fixációt követően igen gyorsan, 10 percen belül megindul a fragmentumok internalizálódása, és ennek hatására szignifikánsan nő a sejtek differenciálódását jelző CD83, CD80, CD86 és MHCII sejtfelszíni mennyisége. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a felszínükön kovalensen kötött C3-fragmentumokat hordozó MDC-k nagyon hatékony aktivátorai az allogen T-sejteknek.

Modelleztük a C3-közvetített folyamatok *in vivo* jelentőségét gyulladásos szituációban oly módon, hogy a C3-at nem termelő MDC-eket 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 nemrég leírtakkal, miszerint C3-deficiens betegek esetében nem történik meg a DC-k differenciálódása.

3. Az emberi MDC-ken kifejeződő integrinek, a CR3 és a CR4 fagocitózisban betöltött szerepét elsőként vizsgálva bizonyítottuk, hogy az iC3b-vel opsonizált antigén felvételében a CR3 szerepe döntő fontosságú, ellentétben a CR4-gyel (Sándor, 2013). Kimutattuk, hogy az imMDC-k megkötik az iC3b-t, és a CR3 és a CR4 egyaránt jelen van felszínükön, azonban differenciálódásuk során a CR3 mennyisége jelentősen 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+} hatására nem nő. A sejtek differenciálódását az iC3b kötődése nem váltotta ki, valamint nem változott a gyulladásos citokin termelésük és T-sejt aktiváló képességük sem a komplement-fragmentum hatására. Bizonyítottuk, hogy az iC3b-vel opsonizált baktérium és gomba fagocitózisát a CR3-specifikus ellenanyag szignifikánsan csökkentette, míg a CR4 gátlása hatástalan volt. Ezeket az eredményeinket a CR3 és CR4 RNS csendesítési kísérleteinkkel megerősítettük. Megvizsgáltuk a receptorok eloszlását az iC3b ligandum jelenlétében, és mikroszkópos vizsgálattal bizonyítottuk a CR3 és CR4 kolokalizációját a sejtmembránban. **Megállapítottuk, hogy iC3b-vel opsonizált baktérium fagocitózisát követően a CD11b sejtfelszíni mennyisége szignifikánsan csökken, míg a CD11c mennyisége nem változik.** Kísérleteinkben a mieloid sejtek CR3 receptorát, mint lehetséges új célpontot azonosítottuk, mely felelős lehet bizonyos autoimmun kórképek kialakulásáért, illetve annak súlyosságáért.

4. A komplementrendszer szerepét vizsgálva a HIV-1-el való fertőződés folyamatában egyrészt kimutattuk, hogy a C5a anafilatoxikus peptid a monocita-eredetű makrofágok (MM) érzékenységét mintegy 40-szeresére növeli, másrészt bizonyítottuk, hogy a fertőzés korai szakaszában, a fertőzött makrofágokból felszabaduló C3-nak lokális opszonizáló hatása lehet, és az így opszonizált HIV-1 a produktív fertőzést CR3-mediált módon fokozza.

Eredményünk szerint a monociták HIV-1 általi fertőződésére az anafilatoxinoknak nem volt hatása. Ugyanakkor a C5a anafilatoxikus peptid a monocita-eredetű makrofágok (MM) érzékenységét mintegy 40-szeresére fokozta, míg a biológiailag inaktív C5a_{desArg} hatása csökkent mértékű volt. Megállapítottuk azt is, ahogy a másik anafilatoxin, a C3a továbbá a C3a_{desArg} nem befolyásolta a fertőzést (**Kacani, 2001**).

Megvizsgáltuk azt is, hogy a makrofágok C3 termelő képessége hogyan változik a HIV-1 fertőzés során. Ismert, hogy a makrofágok aktiváció hatására jelentősen fokozott mennyiségben szekretálnak C3 fehérjét, ami lokális opszonizáció révén segíti a környezetükben lévő patogének felvételét. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az M-tropikus és a T-tropikus HIV-1 egyaránt jelentősen, az LPS hatásához hasonló mértékben stimulálja az MM-ek C3 termelését. Ismert, hogy a HIV-1 fertőzött MM TNF α termelése fokozott, ami a makrofágok C3 termelésének növekedését eredményezi. Indokolt volt tehát megvizsgálni, hogy humán rendszerünkben az exogén TNF α és IL-6 hatással van-e a HIV-1-el fertőzött MM-k C3 termelésére. Eredményünk szerint az alacsonyabb vírus koncentrációk mellett a TNF α tovább növelte a C3 szekréciót mindkét típusú vírus fertőzés során, azonban az IL-6 nem okozott változást egyik esetben sem (**Bajtay, 1998**).

A HIV közvetlenül képes aktiválni a komplementrendszer alternatív útját, ami a vírus opszonizációját eredményezi. A primer HIV-1 fertőzés során a vírus már a bejutás helyszínén opszonizálódik komplement-fragmentumokkal, ezért optimális target lehet az ott jelenlévő éretlen DC-k (imDC-k) számára. Korábbi kutatásokban a C3 vírus eliminációt fokozó és a fertőzés elterjedését segítő hatásáról egyaránt beszámoltak. Kutatásunk során kimutattuk, hogy a komplement-opszonizált vírus (HIV(IgG+C)) a nem opszonizált HIV-1-hez képest kb. 30%-al jobban kötődik imMDC-khez. Megvizsgálva az imMDC-k produktív infekcióját azt találtuk, hogy a HIV(IgG+C) mintegy tízszeres növekedést okozott a nem-opszonizált vírushoz képest. Megvizsgáltuk az MDC-k elsődleges fagocitotikus receptorának, a CR3-nak a szerepét a folyamatban és azt tapasztaltuk, hogy az anti-CR3 előkezelés hatására a HIV(IgG+C) által kiváltott produktív fertőzés-fokozás elmaradt, visszaszorult a kontroll

szintjére. Feltételezésünk az, hogy a CR3 közvetítésével a HIV-1 olyan intracelluláris kompartmentumba kerül, ami nem a vírus lebontásának, hanem ellenkezőleg, a vírus termelésének kedvez (Bajtay, 2004).

A dendritikus sejtek és a C3 kölcsönhatásával kapcsolatos vizsgálataink eredményei rámutatnak arra, hogy a DC-k mikrokörnyezetében 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 szintézis, T-sejt aktiváció) 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 fagocitózisát 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.

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, Bánki 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

Sandor 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, Sandor 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

Sandor 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 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

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 Szabó

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

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 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.