

Nagyon köszönöm Prof. Gál Péter alapos, körültekintő és részletes bírálatát. Megjegyzéseit és pontosításait elfogadom, a dolgozatban maradt sajnálatos elírásokért elnézést kérek.

Kérdéseire válaszaim a következők:

1.) Sem az értekezésből sem pedig a publikációkból nem derül ki, hogy milyen MBL-t használtak a kísérletekhez. Az MBL szemben a C1q-val, ami mindig hexamer alakban van jelen többféle oligomer alakban (a dimertől a hexamerig) is előfordulhat. A legfőbb oligomer forma általában a tetramer (amint ezt a 4. ábra is sugallja), azonban az egyes preparátumok összetétele eltérő lehet. Ha feltételezzük, hogy a tetramer volt a preparátumban a domináns forma, akkor az azonos tömegkoncentrációjú (30 µg/ml) C1q és MBL oldatban a két fehérje nem ekvimoláris mennyiségben volt jelen. A molarány ebben az esetben 1:1,6, vagyis több mint másfélszeres az MBL anyagmennyisége a C1q-hoz viszonyítva. Az MBL különböző oligomerizációs formái vajon azonos módon kötnek-e a receptorhoz? Kizárható-e, hogy a kis mennyiségben jelenlévő hexamer MBL ugyanahhoz a receptorhoz kötődik, mint a C1q, míg a tetramer forma másik receptorhoz?

A human MBL tisztítása egészséges donorok vérsavójából, a State Serum Intézetben, Dániában történt. Az MBL preparátumot kollaborációs partnerünk; Steffen Thiel (Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Aarhus, Denmark) bocsátotta rendelkezésünkre.

A C1q és MBL kötődéséről szóló közleményünket 2000-ben publikáltuk. Akkor még a különböző MBL oligomer formák előfordulásának aránya a szérumban nem volt ismert, ezért nem a tetramer hanem a hexamer forma tömegkoncentrációjával számoltunk a C1q-val ekvimoláris mennyiség megállapításánál.

A hasonló kollagén domént tartalmazó, a kollektin családba tartozó más molekulák esetében is előfordulnak különböző oligomerizációs formák, ezek az esetében nem merült fel, hogy eltérő receptorhoz kapcsolódnának. Annak eldöntésére, hogy az MBL különböző oligomerizációs formái vajon azonos módon kötődnek-e cC1q/kollektin-receptorhoz vagy MBL-receptorhoz, kísérleti adatok nem állnak rendelkezésre. A receptor azonosítását követően nyílna lehetőség ennek a kérdésnek megnyugtató tisztázására. Tudomásunk szerint, az MBL specifikus receptorának azonosítására rajtunk kívül más munkacsoport ezidáig nem tett kísérletet, így a ligandum különböző oligomerizációs formáinak kötődését sem volt lehetőség tanulmányozni.

2.) A C1q receptorait (kalretikulin, globuláris C1q receptor) viszonylag jól ismerjük. Lehet-e valamit tudni az MBL receptoráról?

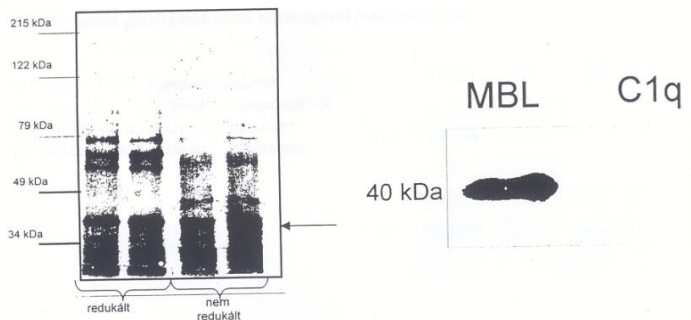
A cC1q/kollektin-receptorról illetve a Cal-C1q-receptorról kimutatták, hogy C1q és MBL kötésére is alkalmasak (Erdei A, Mol. Immunol. 1988, Malhotra R., Biochem. Soc. Trans., 1988, Sim R.B, Immunobiol., 1998). A Cal-C1qR-ról bizonyították, hogy a komplexben az asszociált CD91-el (α_2 M-R) lép kölcsönhatásba az MBL (Ogden CA, J. Exp. Med., 2001, DuusK, FEBS J. 2010).

Emellett több, az MBL megkötésére alkalmas molekuláról is beszámoltak. Így az MBL szénhidrát-kötő doméntól független kötődését igazolták szolubilis rekombináns CR1-hez. Kimutatták azt is, hogy az MBL kötődik PMA-val stimulált humán neutrofil granulocitákhoz és eritrocitákhoz és a kölcsönhatás fagocitózist indukált (Ghiran I, J.Exp.Med.,2000).

Downing és munkatársai humán monociták és monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek (imMDC-k) esetében intracelluláris és membránkötött MBL-t is azonosítottak. A membrán kötött formát a monociták 12 %-ában, az imMDC-k 20 %-ában detektálták. A sejteket humán AB-savóval kiegészített médiumban tartották (Downing I, Immunology, 2003). Továbbá kimutatták azt is, hogy humán monociták, imMDC-k és B sejtek felszínén mannóz /GlcNAc-érzékeny, kalcium-ion függő MBL-receptor van jelen (Downing I, Immunology,2003, Downing I,Scand. J. Imm.,2005). Ezen megállapításaik többségét néhány év múlva visszavonták, mert megismételt kísérleteik nem igazolták korábbi megállapításaikat (MacDonald SL., Biochem. Soc. Trans. 2008.). Kiderült ugyanis, hogy sem a monociták, sem az imMDC-k felszínén nem tudtak membrán-kötött MBL-t kimutatni, abban az esetben, ha azokat szérumból kötődött ki és nem a sejtek termelték.

Saját kísérleteinkben monociták esetében nem, vagy csak nagyon kismértékű MBL-kötődést mutattunk ki, ami a makrofággá differenciálódás során enyhén megnőtt. A monocitákból differenciálódó MDC-k felszínén MBL-kötő struktúrát egyetlen esetben sem mutattunk ki és ez nem változott a sejtek érése során sem (Csomor E, Mol. Immun.,2007). Kísérleteinket szérumból kötődött ki és nem a sejtek termelték.

Vizsgálataink során több adat utalt arra, hogy az MBL molekula a C1q molekulától eltérő struktúrákhoz kapcsolódik monociták és makrofágok felszínén, ezért kísérletet tettünk az MBL-receptor azonosítására affinitás kromatográfia és Western blot alkalmazásával. Vizsgálatainkhoz az MBL-t erősen megkötni képes THP-1 humán monocitoid sejtvonalat használtuk. A sejtmembrán fehérjéit biotinnal jelöljük, majd a sejtek lizátumát MBL-lel vagy C1q-val fedett gyöngyökkel inkubáltuk és a kötődött molekulákat 0.5 M, illetve 1 M NaCl oldattal eluáltuk. A Western-blot analízise során a két ligandum által megkötött struktúrák között a legjelentősebb különbség a mellékelt ábrán bemutatott, kb. 40 kDa-os fehérje volt, ami kizárólag az MBL-hez kötődött, a C1q-hoz nem. A cC1q/kollektin- receptor, amely más kutatók (Erdei A, Biochem. J. 1988, Erdei A, Mol. Imm. 1988, Malhotra R, Biochem. Soc. Trans. 1988.) vizsgálatai alapján mind a C1q-t, mind az MBL-t megkötni képes glikoprotein, redukáló körülmények között két kb. 60 kDa méretű polipeptidláncra vált szét (1. ábra). Ezeket az eredményeinket Boross Péter TDK dolgozatában illetve szakdolgozatában ismertettük 2001-ben.



1. ábra MBL kötő membránfehérje kimutatása THP-1 sejteken

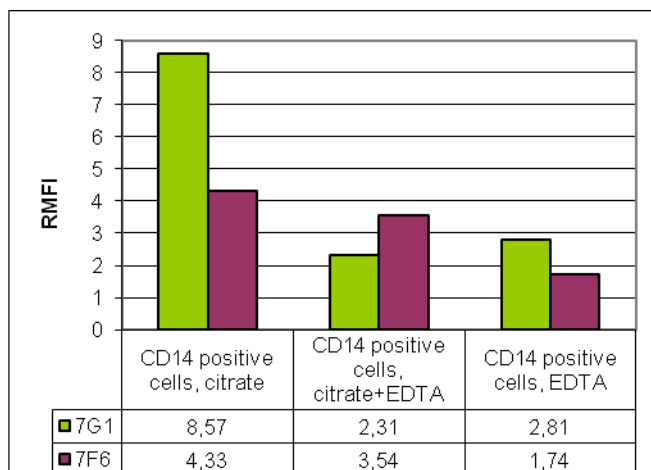
A bal oldali kép; az MBL-beadről eluált fehérjék Western blot képe DAB-al történő előhívás után. A jobb oldali ábra a 40 kDa-os mérettartomány Western-blot képe MBL- és C1q-bead-ről történő elúció után, ECL-el detektálva. Boross Péter eredményei.

3.) Vizsgálta-e valaki fikolinok kötődését az immunsejtekhez? Tekintetbe véve a fikolinok különösen a H- fikolin magas szérumkoncentrációját (624 nM), a fikolinok kötődésének élettani jelentősége lehet.

Laboratóriumunkban Sándor Noémi 2004-ben végzett vizsgálatai szerint; a H-fikolin és az L-fikolin imMDC-k és maMDC-k néhány százalékához kötődött. A kötődés a sejtek érésére jellemző CD83 és CD86 molekulák expresszióját nem befolyásolta.

Az M-fikolinok szérumban és leukociták felszínéhez asszociált módon egyaránt előfordulnak. A monociták makrofággá illetve dendritikus sejtekké differenciálódása során az M-fikolin mRNS szintje csökken. Monociták és neutrofil sejtek esetében az M-fikolin jelenlétét citoplazmatikus granulumokban is kimutatták (Rørvig SJ, Leukoc. Biol. 2009.). Annak ellenére, hogy membrán horgonyzó motívum nincs jelen az M-fikolinban, a molekula jelenlétét bizonyították monociták mellett neutrofil sejtek membránjában is (Zhang J, J. Immunol. 2010, Rørvig S, J. Leukoc. Biol. 2009.). Az M-fikolin fibrinogén doménje közvetítésével kötődik Streptococcus agalactiae és Streptococcus aureus szialsav molekuláihoz és szerepet játszik az E.coli fagocitózisában is. Monociták esetében az M-fikolin túlnyomórészt membrán-kötött formában mutatható ki (Teh C, Immunology, 2000). Az M-fikolin membrán-kötőhelyeként felmerült a leukosialin (CD43) neutrofil sejteken, illetve a GPCR43 (FFAR2) monocitákon (Moreno-Amaral AN, J. Leukoc. Biol. 2012, Zhang J, J. Immunol. 2010.).

M-fikolin jelenlétét megvizsgáltuk 2007-ben, humán vérből izolált CD14⁺ monocitákon. Az ellenanyagokat S. Thiel (Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Aarhus, Denmark) biztosította. Eredményeink szerint a citráttal alvadásgátolt vérben mindkét M-fikolin specifikus ellenanyaggal -7F6, 7G1 - detektáltunk M-fikolint a sejtfelszínen (2. ábra). Az ellenanyagok kötődése EDTA kezelés hatására visszaszorult. Sajnos, ezeket az eredményeket mi nem publikáltuk, de Troels és munkatársai hasonló eredményeket igen (Troels R J. Leukoc. Biol. 2011.).



2. ábra

M-fikolin kimutatása humán vérből izolált CD14⁺ monocitákon, 7F6 és 7G1 monoklonális ellenanyaggal, citráttal alvadásgátolt vérben, EDTA hozzáadásával, valamint EDTÁ-val alvadásgátolt vérben. Citofluorimetriás vizsgálat. Dr. Sándor Noémi mérései

4.) A 46. oldalon olvashatjuk, hogy szérumból izolált natív C3-mal vagy normál humán szérummal kezelve imMDC-ket szignifikáns C3 kötődést lehet kimutatni a sejteken. Mi lehet az oka és a mechanizmusa ebben az esetben a C3 komponens aktiválódásának? Mennyire imMDC specifikus ez a jelenség, tekintetbe véve hogy, később (72. oldal) azt olvashatjuk, hogy MM sejtek esetében is hasonló jelenség figyelhető meg? Milyen fiziológiás szituációban találkozhat imMDC szérummal illetve C3-mal? Vajon minden ilyen találkozás C3 depozíciót eredményez?

Saját eredményeink és mások adatai is alátámasztják, hogy monocitoid sejtek, makrofágok és B sejtek képesek a C3-t sejt felszíni enzimjeikkel proteolitikusan aktiválni és a C3 eredetű fragmentumokat kovalensen megkötni sejt felszínükön (Gergely J, Imm. Let. 1985, Erdei A, Immunobiol. 1992, Papp K, Mol.Immunol. 2008, Kerekes K, Int. Immunol. 1998, Maison CM, Biochem. J. 1989). A makrofágok a szekretált és proteolitikusan hasított C3-fragmentumokat egyrészt felszínükön fixálják, másrészt a környezetükben lévő antigént opszonizálják is azokkal (lokális opszonizáció) (Ezekowitz RA, J. Exp. Med. 1984). A lokális opszonizáció az antigén hatékony fagocitózisához vezet. Hasonló mechanizmus révén, a sejtek által termelt proteolitikus enzimeikkel történő kölcsönhatás eredményezheti a natív C3 elhasítását az imMDC-k esetében is. Az enzimátikus hasítást bizonyítja, hogy abban az esetben, ha a sejteket PMSF enzimgátlóval kezeltük, a C3 kovalens fixáció mértéke visszaszorult.

Az említett kísérletben azt bizonyítottuk, hogy aktivált MM-kat és imMDC-ket közös kultúrában tartva, a MM-k által szekretált C3-at az imMDC-k képesek voltak enzimátikusan hasítani és felszínükön kovalensen megkötni. Abban az esetben viszont, ha aktivációs stimulust nem alkalmaztunk, a fixáció elmaradt. A C3 mennyisége - lévén akut fázis fehérje -, jól tükrözi a környezet aktuális állapotát, esetleg gyulladásos folyamatok kialakulását. Amint azt korábbi munkáink alátámasztják, az antigénbemutató sejtekhez kovalensen kötődött C3-fragmentumok hatékonyan fokozzák azok T-limfocita aktiváló képességét (Kerekes K, Int. Immunol. 1998.).

A másodlagos nyirokszervekben az antigénprezentáló sejtek (dendritikus sejtek, makrofágok) és a limfociták közvetlen kölcsönhatásba kerülnek egymással. Az általunk leírt folyamat jelentőségét abban látjuk, hogy az aktivált makrofágok fokozott C3 szekréciójuk révén egyrészt a dendritikus sejtek differenciációját fokozzák, másrészt a megnövekedett C3 fixáció elősegíti a T limfociták aktivációját, biztosítva a hatékony adaptív immunválaszt.

Még egyszer köszönöm Prof. Gál Péter bírálatát!

Dr. Bajtay Zsuzsanna