

Köszönöm Prof. Kurucz Istvánnak dolgozatom körültekintő bírálatát, hasznos és előremutató kérdéseit.

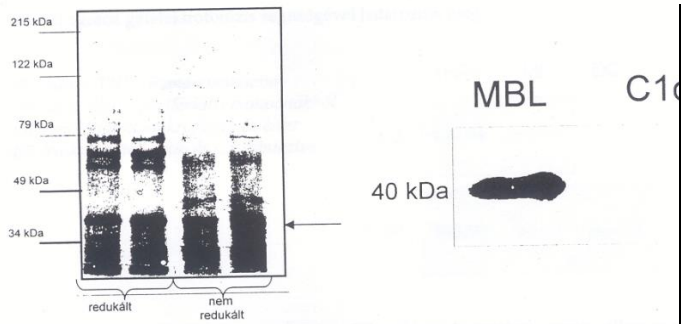
A dolgozathoz feltett kérdéseire válaszaim a következők:

*1. A C1q és MBL kötődési vizsgálatokban alkalmazott koncentrációk, általában 30 g/ml voltak. Ez fiziológiás, illetve az alatti a C1q esetében, de jelentősen fiziológiás feletti a MBL esetében; Feltételezem, hogy az alkalmazott koncentrációk elsősorban a kompetíciós kísérletekhez a közel ekvimoláris arány eléréséhez lettek kiválasztva.*

Jogosnak tartom a kérdést, és a választ két oldalról közelítem meg. Egyrészt mások adatai és saját eredményeink szerint az MBL- szint fiziológiás körülmények között is igen széles tartományban mozog a populációban (Sallenbach S, *Pediatr Allergy Immunol.* 2011., Varga L, *Clin Exp Immunol.* 2008.). Ismert továbbá az is, hogy az MBL-nek, mint akut fázis fehérjének gyulladási körülmények között jelentős mértékben megnövekszik a mennyisége. Mindemellett kísérleteink idejében még nem volt ismert az MBL különböző oligomerizációs formáinak aránya normál human szérumban ezért a C1q-MBL kötődési kompetíciós vizsgálatokban az ekvimoláris fehérje mennyiségek alkalmazását tartottuk megfelelőnek (30 µg/ml).

*2. Az MBL erősen donorfüggő kötődést mutatott monocitákon (pl 11 és 12 ábra) kérdés, hogy a jól detektálható kötődést mutató donorokon vizsgálták-e dózisfüggést, illetve tapasztaltak-e valamilyen összefüggést a kötődés erőssége és egyéb, a sejteken mért markerek megjelenésében, vagy pedig esetleg terveznek-e ilyen vizsgálatot a kötőhely/receptor azonosításával kapcsolatban?*

Valóban jelentős volt az MBL- kötődés donor függése, de ezzel együtt alacsony tartományban mozgott a megkötött MBL mennyisége. Ezért vizsgálatainkat nem ebben az irányban folytattuk, hanem az MBL-t erősen kötni képes THP-1 humán monocitoid sejteken próbáltuk meg izolálni az MBL-receptort. Vizsgálataink során több adat utalt arra, hogy az MBL molekula a C1q molekulától eltérő struktúrához kapcsolódik monociták és makrofágok felszínén, ezért kísérletet tettünk az MBL-receptor azonosítására affinitás kromatográfia és Western blot alkalmazásával. Vizsgálatainkhoz az MBL-t erősen kötő THP-1 humán monocitoid sejtvonalat használtuk. A sejtmembrán fehérjéit biotinnal jelöltük, majd a sejtek lizátumát MBL-lel vagy C1q-val fedett Sepharosegyöngyökkel inkubáltuk, és a kötődött molekulákat 0.5 M, illetve 1 M NaCl oldattal eluáltuk. A Western-blot analízise alapján egyértelmű, hogy a kb. 40 kDa-os sejtmembrán fehérje kizárólag az MBL-hez kötődött, a C1q-hoz nem (1.ábra). Ezeket az eredményeinket Boross Péter TDK dolgozatában illetve szakdolgozatában ismertettük 2001-ben. A korábban leírt 120 kDa tömegű cC1q/kollektin- receptor mind a C1q-t, mind az MBL-t megkötő glikoprotein. (Erdei A, *Biochem. J.*, 1988, Erdei A, *Mol. Imm.* 1988, Malhotra R, *Biochem. Soc. Trans.*,1988).



**I. ábra**

*MBL kötő membránfehérje kimutatása THP-1 sejteken*

*Az MBL-lel és a C1q-val fedett Sepharose-gyöngyökről eluált frakció fehérje tartalma. A Western-blotton ECL-el detektáltuk a sejt felszíni fehérjét.*

*3. Történet-, vagy terveznek-e kísérleteket az imMDChez kovalensen kötődő C3 fragmentumok acceptorhelyeinek meghatározására? (pl. immunprecipitáció C3- fragmentum specifikus ellenanyaggal, majd ezt követően tömegspektroszkópiás meghatározás?)*

Munkacsoportunk és mások adatai bizonyítják, hogy a C3b kovalens megkötésére számos immunsejt képes; humán és egér monociták, makrofágok és B sejtek (Biro A, Eur. J. Immunol.1992, Erdei A, Immunol.Today,1991, Ezekowitz RA, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1983, Fabry Zs, Scand. J. Immunol., 1985, Gergely J, Immunol. Lett.,1985, Janssen BJ, Mol. Immunol., 2007; Kerekes K., Int. Immunol., 1998, Law SK, Biochemistry, 1984., Law SK, Protein Sci.,1997, Maison CM, Biochem. J.,1989; Papp K, Mol. Immunol.,2008, Longo A, J. Cell. Biochem., 2005.). Érdeemes megjegyezni zgyanakkor, hogy T limfocitákhoz kovalensen kötődő C3-fragmentumot nem sikerült kimutatni. A kovalens kötőhelyet egyedül B sejteken tudták azonosítani, ez nem más mint a CR2 (CD21), aminek liganduma a C3d (Marquart HV, J. Immunol., 1994, Mold C J, Immunol., 1988).

A kitartó próbálkozások ellenére a többi – CD21-et nem expresszáló sejt típus esetében - a mai napig nem sikerült a kovalens kötőhelyet/akceptor-helyet azonosítani. Az ismert, hogy a “naszcens C3b”, vagyis a C3a lehasadásakor keletkező molekula rövid ideig aktív, kovalens kötés kialakítására képes csoportja a sejtmembránon megfelelő környezetben lévő hidroxil (esetleg amin) csoportokkal reagálhat.. A kapcsolódásért felelős struktúra környezetében egyéb receptorok is találhatóak, mert a C3b fixáció pl. az Fcγ-R-ok funkcióját erősen befolyásolja, ahogy ezt több közlemény is alátámasztja (Fabry Zs, Scand. J. Immunol., 1985, Gergely J, Immunol. Lett.,1985.).

Érdekességként jegyzem meg, hogy egér Lewis tüdő karcinoma sejtek, amelyek nem fejeznek ki komplementreceptort, szintén képesek voltak C3-fragmentumot kovalensen megkötni egér szérumból (Di Renzo L, Immunobiology, 1999), ami sejtostódást és PKC aktiválódást eredményezett (Longo A, J. Cell. Biochem., 2005.).

*4. imMDC-khez kovalensen kötődő C3 fragmentumok internalizációjának vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy a kötődött molekulák jelentős része a sejtbe kerül, de egy ugyancsak jelentős része (40-50 % a 19. ábra alapján) még 48 óra múlva is detektálható a felszínen. Érdekes lenne ezeket az akceptor helyeket feltérképezni, és megvizsálni, hogy specifikusnak, vagy spontán, egyszerűen a kémiai reakcióra alkalmas kötőhelyeknek tekinthetők-e ezek?*

Korábbi kísérleteink eredménye szerint makrofágok esetében a kovalensen fixált C3-fragmentumok egy része internalizálódik, másik részük még 24 óra múlva is detektálható volt a sejt felszínen. Hasonló eredményt kaptunk imMDC-k vizsgálata során.

Egyetértek avval, hogy ezeket a stabilnak tűnő kötőhelyeket lenne célszerű izolálni a membránból és feltárni a környezetükben előforduló egyéb struktúrákat. A kötőhely azonosítása igen nagy előrelépést jelentene és megmagyarázná a ligandum kötődésének számos funkcionális következményét és sejt-specifikus megjelenését. A tisztított, natív C3-mal végzett kísérletek során, amikor kovalensen kötődnek a keletkező C3b-fragmentumok, telítődést tapasztaltunk imMDC-k esetében (18.ábra), ennek alapján úgy gondoljuk, hogy specifikus kötőhelyről van szó.

*5. A HIV-1 vírus opszonizálásához használt ellenanyag amit HIV+ páciensek összegyűjtött szérumból nyertek, milyen módszerrel került megtisztításra és milyen koncentrációban (10-, vagy 50 µg/ml) használták?*

A HIV-specifikus ellenanyag összegyűjtése és tisztítása a projektben résztvevő Innsbrucki Klinikán történt. Szóbeli információjuk szerint a HIV+ páciensek összegyűjtött szérumból Protein G-vel tisztították az IgG-t. 50 mg/ml IgG specifikus aktivitás 10-20 mg/ml között volt, ami főként Gag- és Env-specifikus ellenanyagot tartalmazott.

Az opszonizáláshoz 50 µg/ml anti-HIV IgG-t használtunk 1 µg/ml p24 tartalmú HIV-1 preparátumhoz.

Még egyszer nagyon köszönöm Prof. Kurucz István bírálatát!

Dr. Bajtay Zsuzsanna