

Szeretnék megköszönni Prof. Medgyesi Györgynek dolgozatom mélyreható és alapos bírálatát, hasznos észrevételeit és érdekes kérdéseit.

Válaszaim a dolgozatban feltett kérdéseire:

1. Van-e adat arra vonatkozóan, hogy az MBL esetében a kollagén-szerű domén kötődik a monocitoid sejtekhez, vagy kapcsolódhat a molekula más régiója is?

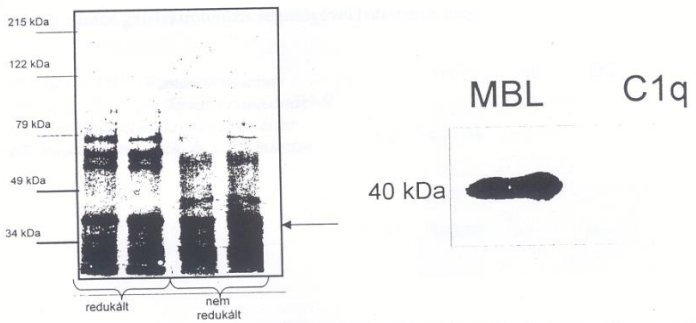
Ezt a kérdést Prof. Gál Péter is feltette, ezért mindkét bírálónak szeretnék válaszolni.

A cC1q/kollektin-receptorról illetve a Cal-C1q-receptorról kimutatták, hogy C1q és MBL kötésére is alkalmasak, és monocitoid sejteken jelen vannak (Erdei A, Mol.Immunol. 1988, Malhotra R, Biochem. Soc. Trans., 1988, Sim RB, Immunobiol. 1998, Ghebrehiwet B, Mol. Immunol. 2004.). A Cal-C1qR-ról bizonyították, hogy a komplexben lévő CD91 (α_2 M-R) lép kölcsönhatásba az MBL-el (Ogden CA, J. Exp. Med. 2001, Duus K, FEBS J. 2010.).

Downing és munkatársai humán monociták és monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek (imMDC-k) esetében intracelluláris és membránkötött MBL-t is azonosítottak. 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 is jelen van (Downing I, Immunology,2003, Downing I, Scand. J. Imm. 2005.). A szerzők azonban megállapításaik többségét később visszavonták (MacDonald SL, Biochem. Soc. Trans.2008.). Kiderült ugyanis, hogy sem a monociták, sem az imMDC-k felszínén nem mutatható ki membrán-kötött MBL abban az esetben, ha a sejteket szérum-mentes közegben tartják. Tehát a korábbi kísérleteikben detektált MBL az autológ szérumból kötődött a sejtekhez.

Saját kísérleteinkben szérum-mentes közegben tenyésztettük a sejteket, és 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 folyamán sem (Csomor E, Mol. Immun. 2007.).

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 sejt vonalat használtuk. A sejtmembrán fehérjéit biotinnal jelöltük, majd a sejtek lizátumát MBL-lel vagy C1q-val fedett Sepharose-gyöngyökkel 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).



1. ábra

MBL kötő membránfehérje kimutatása THP-1 sejteken

Az MBL-lel és a C1q-val fedett Sepharose-gyöngyökről eluált frakció fehérje tartalma. A Western-bloton ECL-el detektáltuk a sejtfelszíni fehérjét.

2. Ismeretes-e, hogy mi a funkcionális következménye az MBL kötődésének a monocitoid sejtekhez?

Saját eredményeink szerint humán monociták és az azokból differenciálódó makrofágok képesek megkötni az MBL-t bár a kötődés mértéke messze elmarad a C1q esetében tapasztalttól (Bajtay Zs, Eur. J. Immunol. 2000). Ugyanakkor, az MBL kismértékű kötődésének lehet funkcionális következménye. Ezt erősíti meg Ogden és munkatársainak eredménye, miszerint monocita eredetű makrofágok Cal-C1q-receptor közvetített fagocitózist az MBL-el vagy a C1q-val opsonizált apoptotikus sejtek egyaránt kiváltják (Ogden CA, J. Exp. Med. 2001.).

MDC-kkel végzett kísérleteink szerint az im- és ma-MDC-k megkötik a C1q-t, de nem kötik meg az MBL-t (Csomor 2007MolImm).

Ghiran és munkatársai kimutatták az MBL Ca^{2+} függő kötődését PMA-val stimulált humán neutrofil granulocitákhoz és eritrocitákhoz is. Igazolták, hogy az MBL kollagén-doménje közvetítésével kötődött a sejtek CR1 molekulájához. A CR1-hez történő MBL kötődés fagocitózist indukált (Ghiran I, J.Exp.Med., 2000).

3. Feltételezhető-e, hogy a C1q jelenlétében éretté vált dendritikus sejtek más-más szubpopulációja termel IL-12-t, ill. IL-10-et?

Kísérleteinkben humán vérből izolált monocitákból *in vitro* differenciáltattunk DC-ket. A vérben lévő monociták nem alkotnak egységes populációt, a CD14 és CD16 molekulák expressziója alapján több alpopulációt írtak le; ezek a $CD14^{+}CD16^{-}$, $CD14^{+}CD16^{+}$ és a $CD14^{-/+}CD16^{+}$ monociták (Auffray C, Annu. Rev. Immunol. 2009). Ezek közül a $CD14^{+}CD16^{-}$ sejtekből, más néven a gyulladáshoz monocitákból differenciálódnak *in vitro* körülmények között DC-k. Ezek az ún. monocita-eredetű DC-k vagy MDC-k, amelyek fiziológiai megfelelői a Tip DC-k (TNF- α and iNOS-producing DC). Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a donorok aktuális egészségi állapota, esetleges fertőzöttségük jelentősen befolyásolja a sejtek aktiválhatóságát. Az *in vitro* differenciáltatott MDC-k CD14, CD83, CD86, CD80, CCR7 és MHCII expressziója alapján nem merült fel a gyanú, hogy különböző alpopulációk lennének jelen az imMDC vagy az maMDC kultúrákban. Viszont érdemes megjegyezni, hogy Nauta és munkatársai 2004-ben leírták; az MDC-k

apoptótikus sejt fagocitózisa megnöveli azok IL-6, IL-10, and TNF- α termelését, viszont az IL-12 bioszintézisét nem befolyásolja. Kísérleti körülményeink között nem zárható ki, hogy a kultúrában keletkező apoptótikus sejtek fagocitózisa egyes MDC-k által, hasonlóképpen befolyásolja a citokin termelésüket és esetlegesen szupresszor sejtekké váló differenciálódásukat. A kérdés egyértelmű megválaszolásához szükséges lett volna sejten belül kimutatni az IL-12-t és az IL-10-et, ilyen vizsgálatot viszont nem végeztünk.

4. Natív C3 éretlen dendritikus sejtekkel való inkubálása során milyen tényezők vezethetnek a C3 aktiválódására, hogy C3b kötődhessen a sejt felszíni akceptor csoportokhoz?

Munkacsoportunk és mások adatai bizonyítják, hogy a C3b kovalens megkötésére számos immunsejt képes; humán és egér monociták, makrofágok és B sejtek is. A C3 aktiválásában a sejtek által szekretált proteázok játszanak szerepet (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.). Az U937 humán monocitoid sejtvonal esetében kimutatták, hogy a sejtek által termelt elasztáz és katepszin G specifikusan hasítja a sejtek által termelt C3-at, és az így keletkező naszcens C3b-fragmentum kovalensen kötődik a sejt felszínhez (Maison CM, J. Biochem. 1989, Maison CM, J. Immunol. 1991).

5. Az 56. oldal 1. bekezdésében olvasható a következőzés, mely szerint a „az MDC-k felszínén kovalensen fixált C3-fragmentum a T-sejtek komplement receptora közvetítésével vált ki aktivációt”. Van a T-sejtek komplement receptorának szerepére közvetlenül utaló adat?

Saját eredményeink és más kutatócsoportok adatai egyértelműen bizonyítják, hogy a humán T-limfociták kifejeznek egyes típusú komplementreceptort (CR1, CD35) (Wilson JG, J. Immunol. 1983, Wagner C, Mol. Imm. 2006, Erdei A, Mol. Imm. 2009.). CR2 (CD21) és CR3 (CD11b/CD18) expresszió tekintetében nem egybehangzóak a szakirodalmi eredmények; néhány közlemény kismértékű CR2 és CR3 expresszióról számol be T sejtek esetében (Fischer E, J. Immunol. 1991, Tsoukas CD. Eur. J. Immunol. 1988, Masilamani M, Immunobiol. 2002, Wagner C, Eur. J. Immunol. 2001).

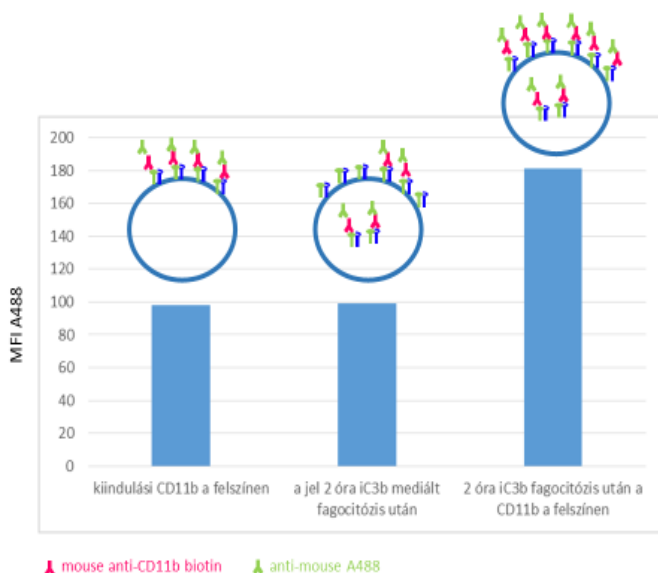
A CR1 molekulák fő liganduma a C3b és az iC3b fragmentum, így e receptor közvetítésével a T sejt képes olyan sejtekkel konjugátumot képezni, amelyek felszínükön ezeket a C3-fragmentumokat hordozzák. Saját eredményünk szerint, a sejt felszínükön C3b-t fixált MDC-k kölcsönhatásba kerülnek a CR1-et hordozó T limfocitákkal és ez a kapcsolódás fokozza a T sejtek aktivációját. A CR1 jelentőségét az aktivációs folyamatban bizonyítja az a megfigyelés, hogy ha az MDC-T sejt kölcsönhatás kialakulását anti-C3 IgG F(ab')₂-vel megakadályozzuk, akkor a T sejt aktiváció fokozódás elmarad (Sándor N. Mol. Imm. 2009.). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a CD35 fontos szabályozó szerepet tölt be a T sejtek funkcióiban.

6. Mind a CR3 receptor CD11b ellenanyaggal való blokkolása, mind a CR3 receptor expresszió csökkentése (27., ill. 28. ábra) bár jelentősen csökkentette az opsonizált élesztő-sejtek, ill. baktériumok fagocitózist, de az anti-CD11b mellett, ill. a csökkentett CR3 expresszió esetében is észlelhető volt fagocitózis. Értelmezhető-e ez úgy, hogy más receptoroknak is lehet szerepe az opsonizált részecskék fagocitózisában?

Az opsonikus fagocitózist közvetítő receptorok mellett az MDC-k különböző mintázatfelismerő receptorokat, pl. C-lektin receptorokat is kifejeznek, amelyekről ismert, hogy szintén képesek fagocitózist közvetíteni.

Az anti-CD11b ellenanyaggal történő kezelés után, vagy a csökkentett CR3 expresszió mellett mért fagocitózis adatok értelmezéséhez fontos megemlítenünk, hogy a CR3 rendkívül gyors recirkulációt végez. Bretscher és munkatársai egér monocitoid sejtvonalakon kimutatták a CR3 folyamatos és gyors mozgását a sejtmembrán és az endocitotikus kompartmentumok között, és bizonyították, hogy e folyamat során a receptorok 2-4%-a internalizál percenként (Bretscher MS, EMBO J. 1992.).

Saját kísérleteinkben az MDC-k vizsgálata során hasonló jelenséget tapasztaltunk. Meghatároztuk a sejtek felszínén a CR3 aktuális mennyiségét jelzett, specifikus ellenanyag segítségével, majd két órán át végzett iC3b-vel opsonizált *S. aureus* fagocitózist követően is (2. ábra). Két óra után a jelölést megismételve, a jel intenzitásának jelentős fokozódását tapasztaltuk. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a kísérlet időtartama alatt újabb CR3 molekulák kerültek ki a sejt felszínre. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy az említett kísérletekben is szerepet játszhatnak a sejt felszínre újonnan kikerülő receptorok, amelyek részvétele a fagocitózisban befolyásolja a mért alapértékeket.



2. ábra

Sejt felszíni CD11b kimutatás imMDC-ken

1. oszlop: CD11b kimutatása anti-CD11b-biotin (mouse IgG) + anti-mouse IgG-A488 jelöléssel

2. oszlop: a jelölés mértéke 2 óra iC3b *S. aureus* fagocitózis után

3. oszlop: sejt felszíni CD11b kimutatás anti-CD11b-biotin (mouse IgG) + anti-mouse IgG-A488 ismételt jelöléssel

Citofluorimetriás vizsgálattal mért MFI értékek.

Sándor Noémi eredményei

Még egyszer nagyon köszönöm Prof. Medgyesi György bírálatát!

Dr. Bajtay Zsuzsanna