A komplementrendszer szerepe EAE-ben (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), a sclerosis multiplex egérmodelljében

Terényi Nóra

Témavezető: Prof. Erdei Anna

ELTE TTK, Immunológiai Tanszék

Budapest, 2010.

Biológia Doktori Iskola

Immunológia Program

Programvezető: Prof. Erdei Anna

Tartalomjegyzék

Gyakrabban előforduló rövidítések 4

Bevezetés 5

A sclerosis multiplex és az EAE 5

A C57BL/6 és a SJL/J egér törzsben kialakuló EAE összehasonlítása 10

A T-sejtek és a citokinek jelentősége 11

A B-sejtek szerepe 15

Makrofágok és dendritikus sejtek funkciója 15

A hízósejtek szerepe 16

A komplementrendszer működése és szerepe az EAE-ben 17

Anyagok és módszerek 22

Reagensek és oldatok 22

EAE indukció 22

Dekomplementáció, CVFl 22

Szövettan, immunhisztokémia 22

ELISA 23

Antigénprezentációs tesz, proliferációs teszt 23

Funkcionális fehérje-chip 24

Kísérleti módszerek 25

Állatok, oltóanyagok 25

Az EAE klinikai tüneteinek pontozása 26

Szövettan és immunhisztokémia 27

Zselatin-szacharózos beágyazás 27

Májba ágyazott fagyasztott metszetek készítése 27

Félvékony metszetek készítése 28

Immunhisztokémia 28

Szérum C3 szintjének mérése ELISA módszerrel 29

C57BL/6 egerek szérumában lévő MOG-specifikus ellenanyagok mérése ELISA módszerrel 30
SJL/J egerek szérumában lévő PLP-specifikus ellenanyagok mérése ELISA módszerrel 30
Antigénprezentációs teszt 30
Funkcionális fehérje-chip 32
Statisztikai analízis 33
Célkitűzéseink 34
Eredmények 35
CVF kezelés hatása a szérum C3 szintjére 35
A betegség kialakulásának hatása az állatok testtömegére 36
CVF-kezelés hatása a betegség akut modelljében 37
CVF hatása a betegség javuló-súlyosbodó formájában 40
Az EAE tüneteink kialakulása genetikailag C3-deficiens állatokban 42
A szövettani vizsgálatok eredménye 43
MOG-specifikus T-sejtek *in vitro* restimulálása 46
Myelin-specifikus ellenanyagok vizsgálata 48
Az eredmények összegzése 53
Irodalomjegyzék 62
Eredmények 60
Összefoglalás 71
Summary 73
Köszönetnyilvánítás 75
Saját közlemények jegyzéke 76

Gyakrabban előforduló rövidítések

APC- Antigen Presenting Cell, antigénprezentáló sejt

CVF- Cobra Venom Factor, kobraméreg faktor

EAE- Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, kísérletes autoimmun agyvelőgyulladás

ELISA- Enzime Linked Immunosorbant-Assay

MAC- Membrane-Attack Complex, membránkárosító komplex

MAG- Myelin Associated Glycoprotein, myelin-kapcsolt glikoprotein

MBP- Myelin Basic Protein, myelin bázikus protein

MOG- Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, myelin oligodendrocita glikoprotein

MS- Multiple Sclerosis, sclerosis multiplex

PLP- Proteolipid Protein

TCR- T Cell Receptor, T-sejt receptor

Bevezetés

A sclerosis multiplex és az EAE

A sclerosis multiplex (SM), a leggyakoribb központi idegrendszeri, gyulladásos megbetegedés, a neuronok axonját borító myelinhüvely degradálódása miatt alakul ki. 1868-ban Jean-Martin Charcot írta le először *sclerose en plaques* néven, összegezve az addigi esettanulmányokat, melyeket kiegészített a saját megfigyeléseivel. A betegség közvetlen oka a myelint kialakító oligodendrociták pusztulása, illetve az ezt követő axon-szakadás. A szimptómák igen változatosak; szenzoros, motoros és vegetatív tünetek külön-külön vagy egyszerre jelenhetnek meg. Korai tünet lehet a látásvesztés, kettős látás, szédülés, végtaggyengeség vagy remegés, bizonytalan járás, hólyagműködési zavarok. Leggyakrabban fiatal felnőtt korban észlelik az első tüneteket. A betegségnek több altípusa ismert, melyeknek különböző a prognózisuk, és általában különböző gyógyszeres kezelést is igényelnek. 1996-ban az Amerikai Egyesült Államokban a National Multiple Sclerosis Society négy altípust írt le (1), ezek:

I. javuló-súlyosbodó,

II. másodlagosan progresszív,

III. elsődlegesen progresszív,

IV. folyamatosan súlyosbodó.

A betegség leggyakoribb formájában javuló-súlyosbodó szakaszok váltogatják egymást éveken keresztül (ilyen az esetek 85-90%-a). A rosszabbodások előfordulása megjósolhatatlan, a tünetek idővel enyhülnek, de később súlyosabb formában visszatérhetnek és állandósulhatnak. Ennek egyik változata a jóindulatú SM, mikor 5-10 éves intervallumban is csak nagyon enyhe tünetek jelentkeznek, és nem valószínű, hogy a beteg állapota később jelentősen romlik (2). A másodlagosan progresszív SM az eredetileg javuló-súlyosbodó SM átalakulása egy folyamatosan romló állapotba. Az átlagos idő, ami alatt a javuló- súlyosbodó SM átvált másodlagos progresszív formába, 19 év (3). Az elsődlegesen progresszív SM az esetek 10-15%-a; ezekben az esetekben az első tünetek megjelenése után soha nem fordulnak elő javuló szakaszok. Ilyen típusú SM általában idősebb korban alakul ki, és a betegek között gyakoribb a férfi (4). A

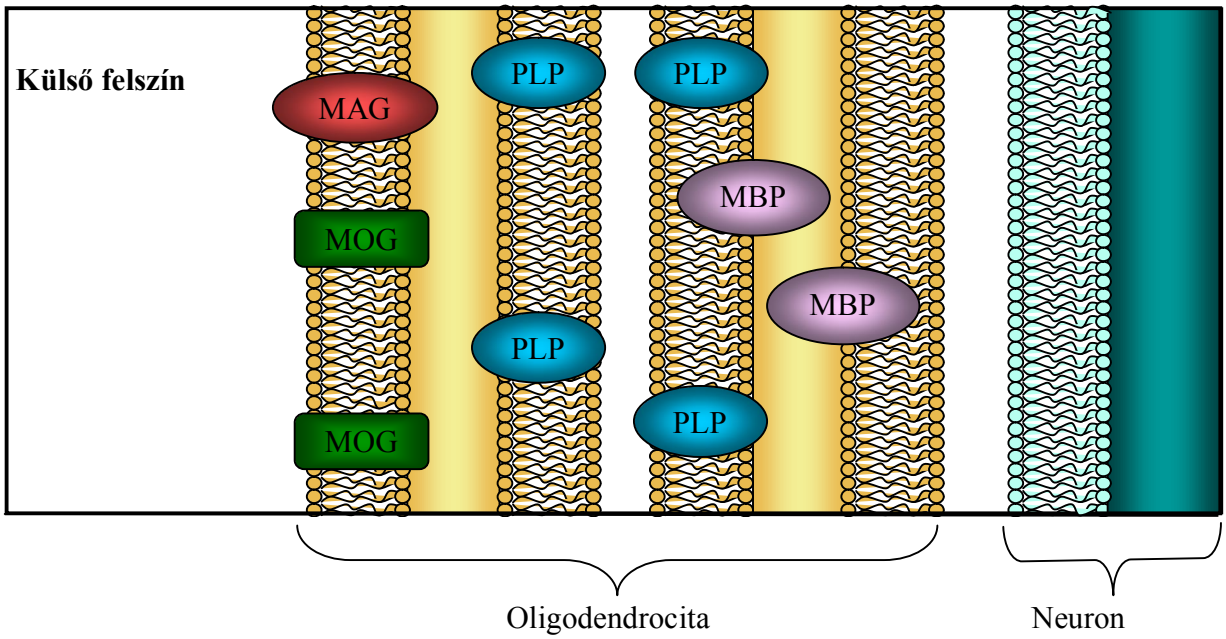
folyamatosan súlyosbodó SM tüneteire jellemző a fokozatos neurológiai hanyatlás, azonban vannak jól elkülöníthető rosszabbodások is. Ez a típus a legritkább mind közül. Ezen kívül előfordulnak olyan határesetek, amelyek e négy kategória egyikébe sem besorolhatóak. Ilyenek az ún. *Baló concentric sclerosis*, a *Marburg típusú SM*, a *Devic's neuromyelitis optica* és a gyermekekben kialakuló SM (5, 6). Nem egységes a vélemény, hogy ezeket a betegségeket a SM egy-egy formájának tekintsék-e, vagy teljesen különálló kórképként tartsák nyílván.

Az elpusztult sejtek helyén keletkezett léziókat MRI-vel (Magnetic Resonance Imaging) lehet láthatóvá tenni; ez fontos a diagnózis felállításához. A myelinhüvely és az oligodendrociták degradálódása mellett a késői plakkokra az axonok hiánya, illetve később az asztrociták felszaporodása jellemző. Az axon árosodást már az első T-sejtek központi idegrendszerben való megjelenése előtt megfigyelték. Mivel ez az asztrociták aktivációjával egy időben jelentkezik feltételezik, hogy az idegsejtek roncsolódása már a betegség elején megkezdődik (7). Ebben a legnagyobb szerepe feltehetően a gliasejteknek van (8). A demyelinizáció mellett remyelinizáció is történik az oligodendroglia prekurzorok és a központi idegrendszerbe belépő Schwann-sejtek által (9).

Az SM kialakulásának okai még nem kellően tisztázottak, de elfogadott, hogy a genetikai háttér, az életmód és a környezet is befolyásolja a megbetegedés esélyét. Egypetéjű ikrek illetve közeli családtagok között nagyobb valószínűséggel fordul elő újabb eset, ha már volt egy (10). A nők kétszer gyakrabban betegszenek meg, mint a férfiak. A betegség előfordulása a szélességi fokok növekedésével egyre gyakoribb - ez igaz mind az északi mind a déli féltekére - ezért feltételezik, hogy a kevesebb napsütéssel és a D-vitamin hiányával is kapcsolatos a kialakulása (11, 12). Így, míg az SM az egyenlítőnél ismeretlen, Magyarország területén 80-100, Svédország és Finnország területén 200 beteg jut 100 000 lakosra. A betegség súlyosságának jellemzésére általánosan elfogadott a Kurtzke-féle pontozási rendszer illetve ennek egy későbbi változata, a kiterjesztett rokkantsági állapot skálája, az EDSS (Expanded Disability Status Scale (13).

Egy ilyen súlyos és viszonylag gyakori betegség kialakulásának és patogenezisének vizsgálatához nagy segítséget jelent egy állatmodell, amelyben a lezajló folyamat mechanizmusa hasonlít az emberi betegséghez. Az SM állatmodelljének története visszanyúlik az immunológia hőskoráig, az 1880-as évekig. Először ui. Louis Pasteur figyelte meg, hogy a veszettség vírusával fertőzött nyúlgerincvelővel kezelt betegek egy részénél idegrendszeri tünetek alakulnak ki az oltás után. E megfigyelés alapján fejlesztették ki a sclerosis multiplex ma is használt modelljét (14). A kísérletes autoimmun agyvelőgyulladás (Experimental Autoimmun Encephalomyelitis-EAE) előidézésekor oligodendroglia ellen alakul ki autoimmun válasz. A betegséget aktívan és passzívan is elő lehet idézni. Aktív immunizáláskor egy oligodendrocitára jellemző fehérjét vagy annak egy szakaszát használják antigénként; ilyenek a Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG), a Proteolipid Protein (PLP), a Myelin Basic Protein (MBP), és a Myelin Associated Glycoprotein (MAG) (2. ábra). Elő lehet idézni a betegséget teljes gerincvelő-homogenizátummal is.

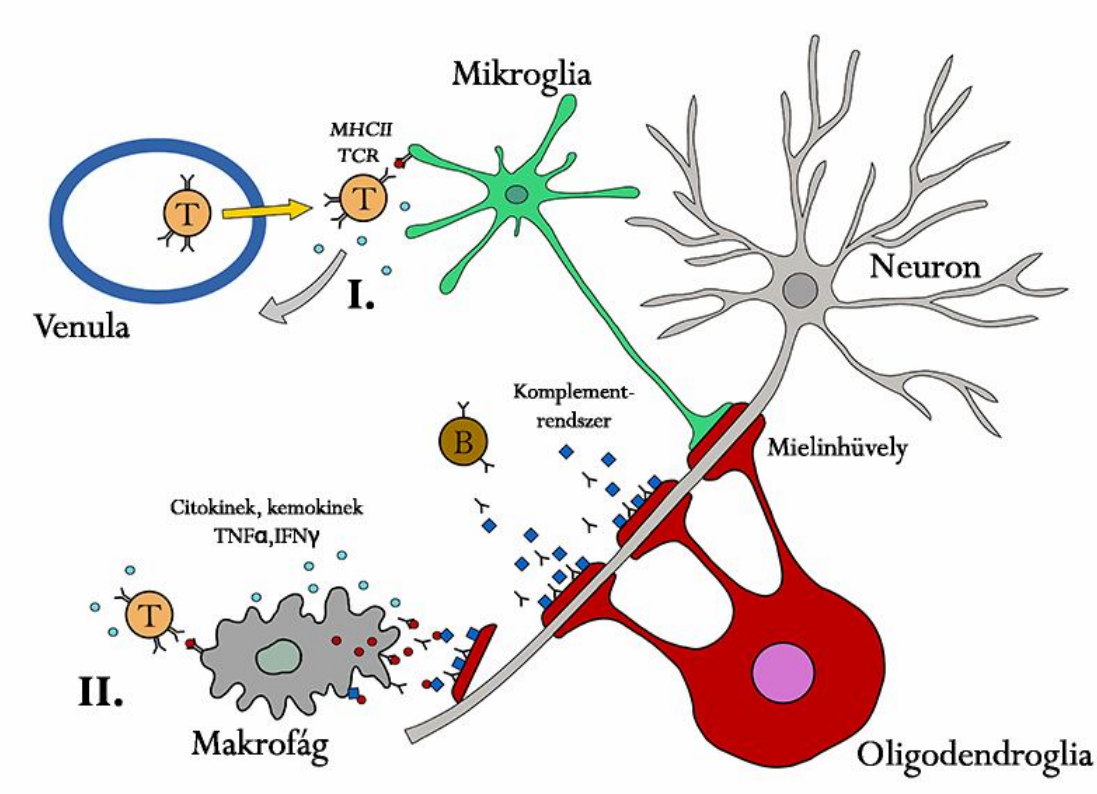
A kísérletekben leggyakrabban a MOG-ot használják, ami a myelin-fehérjék körülbelül 0,05 %-a, és a PLP-t, ami a myelinhüvely lényegesen gyakoribb komponense. Munkánk során mi is ezeket alkalmaztuk. A MOG 35-55-ös aminosav-szekvenciája és a PLP 135-151 peptid T-sejt epitópot is tartalmaz (15). A saját ellen kialakuló tolerancia áttörésének érdekében feltétlenül szükséges, hogy adjuváns kíséretében oltsuk a peptidet, mert az antigénprezentáló sejtek (APC) csak ebben az esetben fejezik ki a megfelelő kostimulátor molekulákat. Leggyakrabban komplett Freund-adjuvánst használnak, amely elölt Mycobacterium tuberculosis olajos emulziója.



1. ábra. A különböző antigének elhelyezkedése a myelinhüvelyben Hemmer és mtsai alapján (32)

Feltétlenül szükséges az emberben szamárköhögést okozó Bordetella pertussis toxinját is alkalmazni az oltáskor. Az A és B alegységből álló bakteriális toxinok (16) B komponense kötődik a sejtfelszínen kifejeződő receptorához, míg az enzimatikusan aktív A komponens a G-fehérjék G_i alegységére hatva megszakítja az intracelluláris jelátvitelt (17). A pertussis toxinnak sokféle hatása van az immunrendszerre, egyebek között serkenti a T-sejtek osztódását, a citokinek és az ellenanyagok termelődését (18, 19). Az EAE esetében talán a legjelentősebb hatása, hogy megnöveli a vér-agy gát átjárhatóságát (20, 21). A betegség passzív kialakításához oligodendrogliára jellemző antigénnel oltott állatokból izolált aktivált limfocitákat, illetve lépsejteket oltanak az állatba. Az aktív immunizálást ki lehet egészíteni passzívval is, például ellenanyag adásával. Ilyenkor súlyosabb, akut EAE alakul ki. Aktív vagy passzív immunizálással kiváltott betegség jellemzője a javuló-súlyosbodó állapot (22). Leggyakrabban egeret (C57BL/6, ABH-Biozzi, SJL/J, 129SVJ), patkányt (Lewis, DA) és tengerimalacot használnak a modellhez. A filogenetikailag közelebbi rokonságban lévő, és ezért elvileg az emberi

betegség jobb modelljéül szolgáló selyemmajmok, makákók és rhesus-majmok használata kevésbé elterjedt. A betegség kialakításában az alkalmazott faj, törzs és oltási technika függvényében az immunrendszer komponensei eltérő mértékben és minőségben vesznek részt (23). A következőkben e komponensek szerepét tárgyaljuk (3. ábra).



2. ábra. Az immunrendszer egyes elemeinek szerepe a SM illetve az EAE kialakulásában

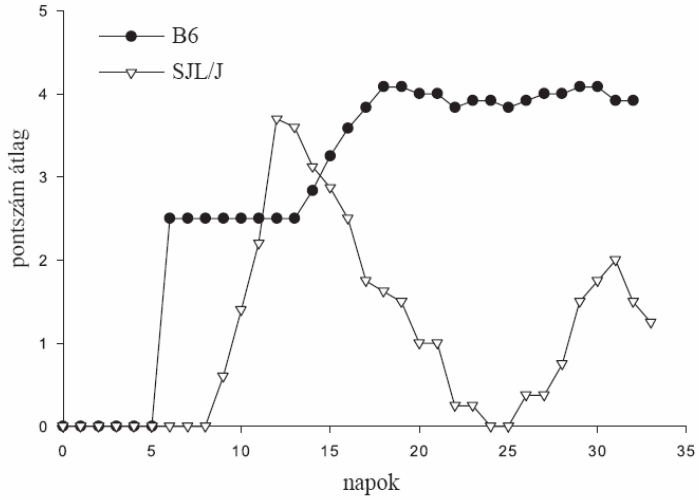
A C57BL/6 és a SJL/J egértörzsben kialakuló EAE összehasonlítása

A különböző egértörzsek között nagy különbségek vannak az EAE-érzékenységben és a betegség tüneteinek megjelenését tekintve. Hasonlóan széles skálán változnak a domináns epitópok is (23-25). A betegség kialakulása MHC-kapcsolt, ezért változnak a T-sejt epitópok is. Az I. táblázatban az EAE vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott egértörzseket és az indukcióhoz használt peptidek foglaltuk össze a (23) referencia alapján.

Egértörzs	**H-2 haplotípus**	**EAE indukcióhoz használt peptid**
SJL/J	$H\text{-}2^s$	$MBP_{89\text{-}81}$, $PLP_{139\text{-}151}$
A.SW	$H\text{-}2^s$	$PLP_{139\text{-}151}$
B10.S	$H\text{-}2^s$	$PLP_{139\text{-}151}$
B10.PL	$H\text{-}2^u$	$MBP_{1\text{-}11}$, $MBP_{35\text{-}47}$
PL/J	$H\text{-}2^u$	$MBP_{1\text{-}11}$, $MBP_{35\text{-}47}$
C57BL/6	$H\text{-}2^b$	$MOG_{35\text{-}55}$

I. táblázat Az EAE vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott egértörzsek és az indukcióhoz használt peptidek

A C57BL/6 egerekben az EAE monofázisos formában alakul ki, amire jellemző, hogy a tünetek kialakulása után az állatok állapota hosszú ideig nem változik, ill. néha ideiglenesen valamelyest javul az állapotuk. Ezek az állatok az indukált betegség következtében csak nagyon ritkán pusztulnak el.



3. ábra. Az EAE tüneteinek kialakulása a C57BL/6 és az SJL/J egértörzsek esetében. A grafikon az EAE tüneteire adott pontok számának csoport-átlagait mutatja.

Az EAE-re érzékenyebb SJL/J törzsben a betegség javuló-súlyosbodó formája alakul ki. A betegség az SJL/J egerekben - az C57BL/6 törzzsel szemben - gyakran fatális kimenetelű. Mint a 3. ábrán látható, mindezt saját kísérleti eredményeink is alátámasztják.

A T-sejtek és a citokinek jelentősége

A betegség kialakulásában fontos szerepet játszik a vér-agy gát megnövekedett permeabilitása, diszfunkciója. Mára gyakorlatilag megdőlt az a nézet, hogy a vér-agy gát tökéletes elszigeteltséget biztosít az idegszövet számára, és tudjuk, hogy az immunrendszer elemei több úton is bejuthatnak a központi idegrendszerbe. Rágcsálók és kérődzők esetében bizonyított, hogy az agy-gerincvelői folyadék a *lamina cribrosán* keresztül kapcsolatban van az orrüreg mukóza-réteg alatti nyirokszövetekkel. Ez az

ember esetében még nem igazolt, azonban az anatómiai struktúrák ugyanúgy megtalálhatók (26).

Ismert, hogy oligodendrocita-specifikus és más fajlagosságú autoreaktív T-sejtek megtalálhatóak normál egyedek vérében is (27). Feltételezhető, hogy MS és EAE esetében, a kialakuló gyulladás következtében az agyi erek falának sejtjein nagyobb mennyiségben jelennek meg a szelektinek, illetve T-sejteken a különböző adhéziós molekulák (VLA-4, VCAM, CCL- 2, CCR-2), amelyek segítségével a limfociták átjutnak az epithélsejtek és az asztrociták által kialakított vér-agy gáton (28). Az azonban még nem tisztázott, hogy előbb alakul-e ki a gyulladás - például a sejtek nekrózisa miatt vagy a T-sejtek aktiválódása után -, vagy az immunválasz következményeként keletkezik. A megfelelő TCR-rel rendelkező autoreaktív sejtek reaktiválódhatnak, amikor találkoznak az idegszövetben lévő APC-kel; a reziduális makrofágokkal, az ún. mikroglia-sejtekkel (29). Ezek a sejtek felszínükön kifejezik az MHCII molekulát, amelyen keresztül – peptidet prezentálva – aktiválják a $CD4^+$ T_H sejteket. Az aktivált T_H sejtek különféle citokineket szekretálnak, majd a keringésbe visszajutva az egész szervezetben aktiválják az immunrendszer sejtjeit, köztük a fő effektor sejteket, a makrofágokat (27).

Egy másik elképzelés alapja az a megfigyelés, hogy SJL egerekben a PLP fehérje olyan izoformája jelenik meg a tímuszban, amiből hiányzik a 116-150 peptid-szekvencia. Az agyban viszont mindkét típus megjelenik, továbbá ismert az a tény, hogy az immunodomináns epitóp az SJL egerekben a PLP 139-151. Ezek alapján feltételezik, hogy az autoreaktív T-sejtek tímuszbeli negatív szelekciójának elmaradása a döntő tényező a betegség kialakulásában (30).

Bizonyított továbbá, hogy egyes vírusok (például kanyaró, Epstein-Barr, hepatitis B vagy influenza) bizonyos fehérjéi az ember saját, - jelen esetben az MBP – fehérjéihez hasonlóak. Feltételezik ezért, hogy az eredetileg a patogén ellen indult immunválasz a saját szövetet is károsítja. Ezt nevezzük a „molekuláris mimikri” jelenségének, azonban ezt még nem sikerült bizonyítani az MS esetében (31).

Érdekesség, hogy az állatok tartási körülményei is jelentősen befolyásolhatják a betegség kialakulását. MBP-specifikus TCR-t kifejező transzgenikus állatokban, csiramentes környezetben nem, míg patogén-gazdag környezetben spontán módon

kialakult az EAE (33). Ezzel bizonyítható a környezetben található patogének szerepe. Hasonló elmélet, amely a T-sejtek *bystander* aktivációjával magyarázza az autoreaktív sejtek szaporodását. Feltételezik, hogy egy éppen zajló immunreakció ideális körülményeket teremt más, nem specifikus sejtek aktivációjához (34). A T-sejtek alapvető jelentőségét bizonyítja az is, hogy a betegséget ki lehet váltani illetve, át lehet vinni egyik egyedből a másikba aktivált T-limfocitákkal (35).

Ezeket a lehetséges magyarázatokat foglalja össze a II. táblázat, a mellette és ellene szóló tapasztalatokkal (32).

Hipotézis	**Pro**	**Kontra**
Autoimmun	• Myelin-specifikus • HLA kapcsolt • Immunszupresszió és moduláció hatással van	• Immunválasz a myelin ellen nem kapcsolódik a betegség progressziójával
Fertőzés	• HLA kapcsolt • Interferonok hatással vannak • Hasonló oligoklonális Ig megjelenése • Fertőzéses megbetegedések modelljében hasonló elváltozások	• Nem találták a patogént
Degeneratív	• Korai neuron vesztés • A progresszív fázisban kismértékű gyulladás	• HLA kapcsolt • Gyulladás

II. táblázat. Az egyes hipotézisek összehasonlítása a mellettük és ellenük szóló tények alapján (32).

A T_H sejtek citokin-termelésük alapján T_H1, T_H2, és T_H17 alpopulációkra oszthatók. A negyedik csoport főleg IL-10-t és TGF-β-t termelő regulátor T-sejtekből áll (T_{reg}). A T_H1 és a T_H2 sejtek által termelt citokinek egymás működését kölcsönösen gátolják. A T_H17 sejtek viszonya ehhez a két régebben körülírt csoporthoz még nem kellően tisztázott. Tipikusan T_H1 által termelt citokinek, az IFNγ és a TNFβ, míg a T_H2 sejtekre IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 szekréció jellemző. Az előbbiek a celluláris, az utóbbiak pedig, a humorális válasz elősegítésében játszanak szerepet. A T_H17 sejtek, főként az autoimmun, gyulladásos reakciókban van jelentős szerepük, ez az alpopuláció IL–17-et termel; ennek alapján különböztethetők meg a többi sejtpopulációtól, továbbá IL–21-t és IL–22-t is szecernálnak (36). Az EAE-re a T_H1/T_H17 túlsúly jellemző, ami kedvez a celluláris immunválasz és a gyulladásos folyamatok kialakulásának. Az állatkísérletek alapján az IL–10 és IL–12 mRNS szintézise jól követi a betegség előrehaladását; amikor a tünetek megjelennek IL–12 túlsúly van, amikor azonban a betegségből felépül az állat, az IL–10 jelenik meg nagyobb mennyiségben (37). Egy másik kísérletben IL–10 és IL–4-tanszgenikus és – hiányos egerekben idéztek elő EAE-t. Az IL-10 citokint túltermelő állatok rezisztensek voltak a betegséggel szemben, az IL-4-et nagy mennyiségben expresszálók azonban nem. IL-10 hiányos állatokban hosszabb ideig tartó és súlyosabb tünetek figyelhetők meg mint a vad típusú állatokban, vagy az IL-4 hiányos egerek esetében. Ezek az állatok több IFNγ-t is termeltek, T-sejtjeik gyorsabban osztódtak (38;39). Ezen vizsgálatok alapján feltehető, hogy a T_H2 és a T_{reg} sejtek által termelt IL-10-nek döntő szerepe van a betegség elleni védelemben. Az IL-17 jelentőségét is vizsgálták; IL-17 KO egerekben csak enyhe tünetekkel tudták kiváltani az EAE-t (40).

A $CD8^+$, citotoxikus T-sejtek az MHCI-hez kapcsoltan ismerik fel az antigént és közvetlenül a prezentáló (target) sejtre hatnak. Főleg az effektor fázisban lehet jelentős a szerepük. SM-ben szenvedő betegeket vizsgálva kimutatták, hogy a $CD8^+$ memória T-sejtek feldúsulnak a léziókban (41) Érdekeség, hogy $CD8^+$ T-sejtekkel is ki lehet váltani a betegséget, ez azonban némileg különbözik a $CD4^+$ T-sejtek által előidézett folyamattól (42).

A B-sejtek szerepe

A B-sejteknek is szerepe lehet a betegség kialakulásában, antigénprezentáló illetve antitesttermelő képességük révén. Szövettani vizsgálatok során megfigyelték, hogy a B-sejtek megjelennek a krónikus léziókban. A liquorban kimutatott oligodendroglia-specifikus ellenanyagoknak döntő szerepük van a diagnózis felállításában (43). Bizonyították, hogy B-sejt hiányos ($B^{-/-}$) egerekben nem lehet EAE-t indukálni MOG fehérjével, de MOG peptiddel igen. Ezzel szemben a vad típusú állatokban mindkettővel ki lehet váltani a betegséget (44) A $B^{-/-}$ egerek védettsége az EAE-vel szemben megszüntethető, ha MOG fehérjével aktivált B-sejteket oltanak az állatokba, azonban naiv vagy LPS-sel aktivált B-sejtek nem alkalmasak erre (45). Szintén ki lehet váltani a betegséget $B^{-/-}$ egerekben, ha nagy mennyiségű MOG-specifikus ellenanyagot oltunk az állatokba. Az MBP peptiddel indukált betegséget Lewis patkányokban MOG-specifikus ellenanyagokkal súlyosbítani lehet, azaz a tünetek 3 nappal korábban jelentkeznek és a 33%-os mortalitást 90%-ra növeli meg (46). Egy újonnan leírt transzgenikus egérmodellben, ahol az állatokban spontán jelennek meg az EAE tünetei, jelentős MOG-specifikus B-sejt aktiváció zajlik. Sok ellenanyag jelenik meg bizonyos MOG epitópok ellen, amelyek azonban különböznek a T-sejt epitópoktól (47). Ezekből az adatokból az a következtetés vontható le, hogy a B-sejtek főleg az ellenanyagtermelés révén hatnak a betegségre.

Makrofágok és dendritikus sejtek funkciója

Az egészséges egyedek központi idegrendszerében az asztrociták és a mikroglia sejtek kebelezik be az elpusztult sejteket és egyéb törmelékeket. Az SM ill. az EAE kialakulásának fontos eleme, hogy aktivált makrofágok jelennek meg a központi idegrendszerben, melyek az opszonizált oligodendrocitákat bekebelezik, illetve aktív oxigén-gyökök termelésével elpusztítják. A betegség során emberekben és állatokban egyaránt megnő a NO mennyisége a központi idegrendszerben (48). A makrofágok nemcsak közvetlen sejtpusztító képességük révén fejtenek ki jelentős hatást az SM ill. az EAE kialakulására, hanem az általuk lokálisan termelt citokinek immunmoduláló szerepe

révén is. A makrofágokból származó IL-12 fontos szerepet játszik a T_H1 jellegű immunválasz fenntartásában. Szilicium-porral makrofág-hiányossá tett egerekben a betegség tünetei később és kevésbé súlyos formában jelennek meg (49). A dendritikus sejtek szintén jelentős forrásai a citokineknek; döntően befolyásolják, hogy celluláris vagy humorális jellegű immunválasz alakul ki.

A makrofágok és a dendritikus sejtek mint professzionális antigénprezentáló sejtek, nagyon hatékonyan képesek aktiválni az immunrendszer sejtjeit. Ezáltal elősegíthetik a betegség kialakulását, áttörve a saját-struktúrákkal szemben kialakult toleranciát.

A hízósejtek szerepe

1879-ben Ehrlich írta le először, hogy az emberi agyban vannak hízósejtek, majd később kimutatták jelenlétüket emberi és más, emlős illetve madár fajok egészséges központi idegrendszerében is (50).

Az emlősök agyában a hízósejtek főleg a talamusz-hipotalamusz régió parenchimájában, a *dura materben* és a *choroid plexusban* találhatóak, elsősorban a vérerek mentén (51). Éretlen sejtként lépnek be a központi idegrendszerbe, ahol főként szeróza típusú hízósejtté érnek, de leírták mukóza típusúak jelenlétét is. Az agyban megtalálható hízósejtet kismértékű FcεRI expresszió és c-kit hiány jellemzi, szemben a többi érett hízósejttel (52). Legjobban az allergiás reakcióban játszott szerepük ismert, de feltehetően mint effektor-sejtek részt vesznek az adaptív immunválaszban, egyes autoimmun betegségekben is (53). Az SM-ben szenvedő betegek agyában, különösen a nagyobb, „krónikusan aktív" plakkokban, megjelennek a hízósejtek (54).

Ismert, hogy az SJL/J egértörzs érzékenyebb az EAE-re, ezért érdekes, hogy összehasonlítva pl. a C3H törzs egyedeivel, az előbbi központi idegrendszerében több hízósejt található. Az EAE-érzékeny Lewis és a rezisztens Brown Norway patkány-törzseket összehasonlítva is hasonló összefüggést találtak (55). Hízósejt-hiányos W/W^v egereket vizsgálva pedig azt tapasztalták, hogy azokban később és kevésbé súlyos formában jelentkeznek az EAE tünetei. Ez a viszonylagos védettség csontvelői eredetű hízósejtek (Bone Marrow-derived Mast Cell - BMMC) adásával megszűnik (56).

Mindezekből arra következtethetünk, hogy a hízósejtek is hatással vannak a betegség kialakulására, feltehetően a felszabaduló mediátorok és enzimek révén. Ilyenek például az erek permeabilitását növelő hisztamin és bizonyos arachidonsav metabolitok. A hízósejtekből felszabaduló proteázok közvetlenül is támadhatják a myelinhüvelyt illetve az idegsejteket (57). A hízósejtek termelnek mátrix metalloproteáz-9-et (MMP-9) is, amely a sejtek közötti mátrix meglazításával segíti az immunsejteket a központi idegrendszerbe való bejutásban (58).

A komplementrendszer működése és szerepe az EAE-ben

A komplementrendszer kaszkádszerűen aktiválódó molekulái a vérben és egyéb testnedvekben inaktív állapotban vannak jelen. Az enzimrendszer aktiválódása elsősorban az extracelluláris kórokozók illetve a szervezetben keletkező immunkomplexek eliminálását eredményezi. Ez a folyamat három különböző módon indulhat: a klasszikus, az alternatív és a lektin-indukált utakon (4. ábra). A komplementrendszer komponensei közül eddig több mint 30-at azonosítottak. Részei még a fent említett enzimeken kívül a rendszer szabályozásáért felelős molekulák és a különböző komponenseket megkötni képes receptorok is. Az enzimatikus kaszkád aktiválódása során a komponensek inaktív prekurzorokat aktiválnak, limitált proteolízissel. Az eközben keletkező nagyobb (b-vel jelölt) fragmentumok kötődnek az aktiváló felszínhez, így válnak a soron következő enzim alkotóelemévé. A kisebb fragmentumok három komponens esetén (C3a, C4a, C5a) a környezetbe diffundálnak és biológiailag aktív mediátorként hatnak. Egy enzim több szubsztrátot képes átalakítani, így a fent leírt folyamat számos lépésben sokszorozódik, ezáltal válik a komplementrendszer az egyik leghatékonyabb effektor tagjává az immunrendszernek.

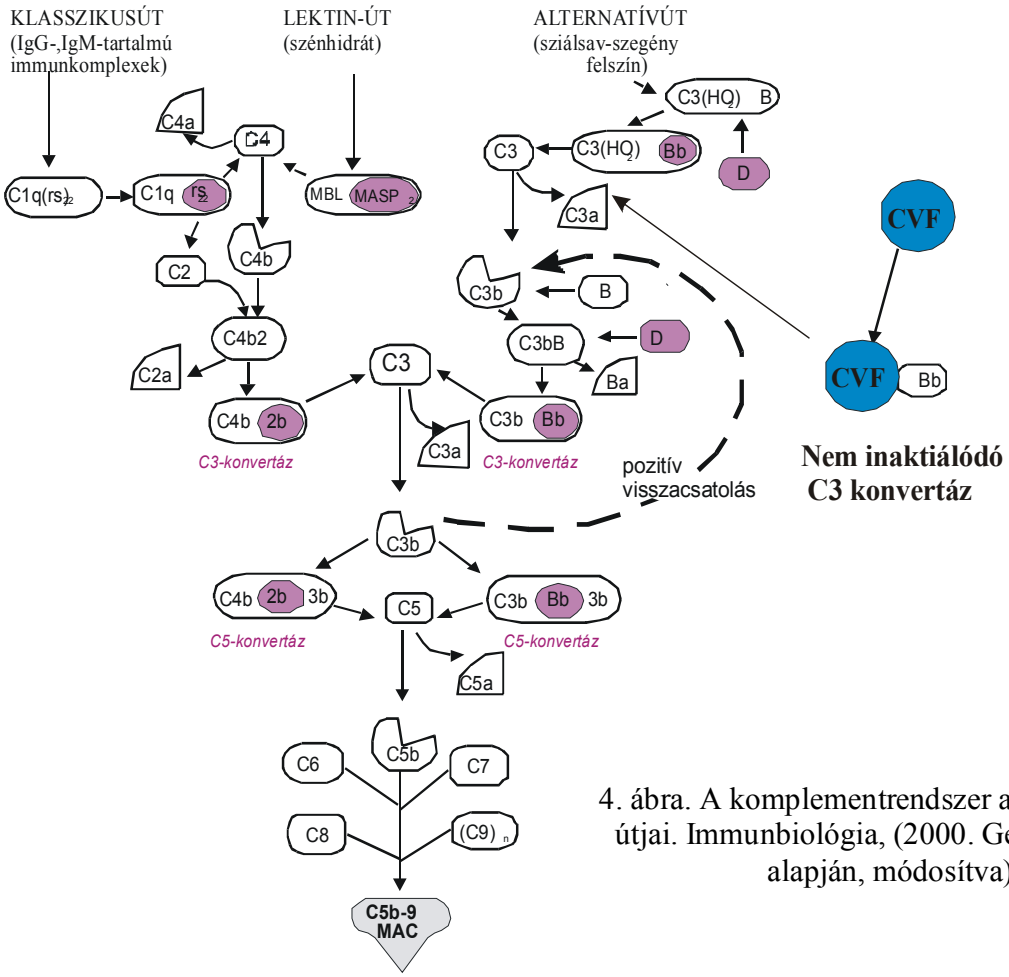
A klasszikus utat elsősorban IgM vagy IgG tartalmú immunkomplexek aktiválhatják. A C1 molekula komplex C1q alegysége az immunglobulin molekula Fc részéhez kötődik, ami a kaszkád aktiválásához, majd végső soron, a kórokozó felszínén kialakuló membránkárosító komplex (MAC) képződéséhez vezet.

A lektin-függő utat a patogén felszínén lévő mannóz oldalláncokat felismerő mannóz-kötő lektin (MBL) indítja el. A kötődés aktiválja az MBL molekulával asszociált

szerin proteáz enzimeket (MASP1,2). A lektin-indukált út a továbbiakban nem különbözik a klasszikus úttól.

A szervezetben kis mennyiségben mindig képződő C3(H_2O) molekula indíthatja el az alternatív úton való komplement-aktivációt. A C3 hidrolizációs terméke funkcionális szempontból C3b-nek felel meg, tehát a konvertáz enzimek alegységeként vesz részt a kaszkádban. A keletkező C3b a patogénekre jellemző sziálsavban szegény felszínekhez kovalensen kötődik, és így indítja be a komplement-kaszkádot. Mivel a klasszikus és a lektin-függő út aktivációja során is keletkezik C3b fragmentum, így az alternatív út egyfajta pozitív visszacsatolásként is funkcionál, ami fokozza az effektor mechanizmus hatékonyságát.

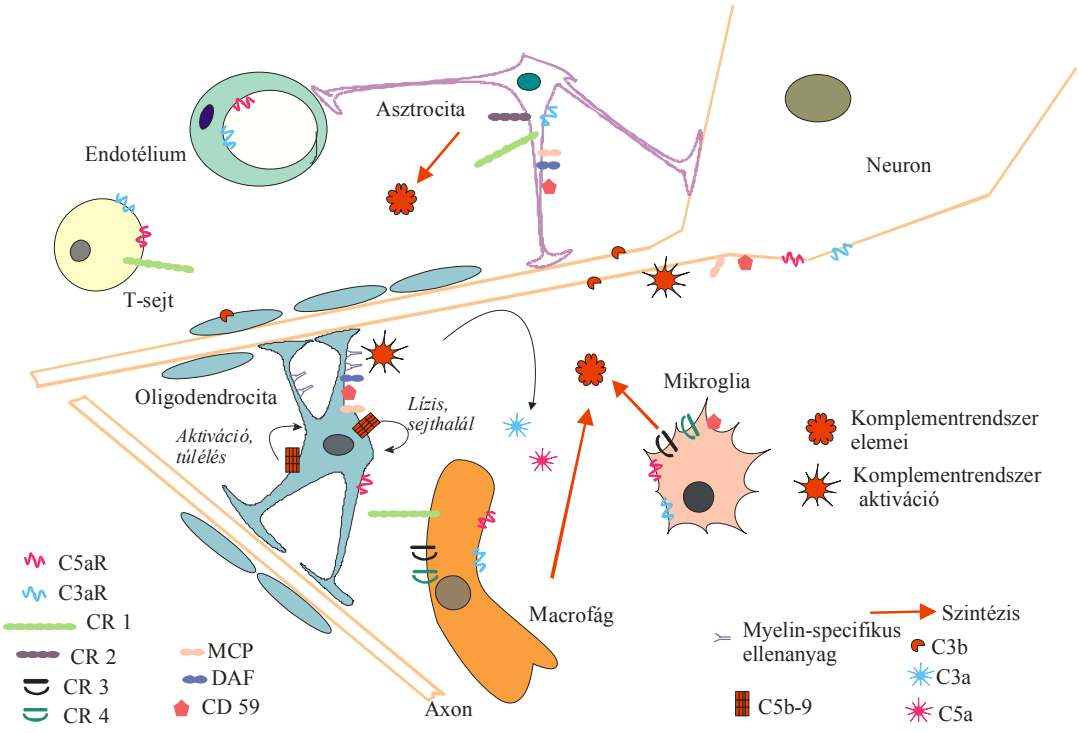
A 4. ábrán jól látható a C3 molekula központi szerepe a komplementrendszer aktivációjában; ez a komponens mind a három aktiválódási út közös eleme. Kísérleteink során a komplementrendszer kimerítését kobraméreg faktorral (cobra venom factor-CVF) végeztük. Ez a hatóanyag C3b-homológ, tehát a B faktorhoz kötődve hatékony C3 konvertázt hoz létre. Ez sokkal stabilabb, mint a szervezet saját C3 konvertázai, ezért az enzimgátlók nem képesek inaktiválni, következésképp a CVF-Bb komplex „elfogyasztja” a szérumban lévő C3 molekulákat (59;60). A CVF féléletideje viszonylag rövid, ezért a komplementrendszer aktivitása néhány nap alatt visszaáll az eredeti állapotba (61).



4. ábra. A komplementrendszer aktivációjának útjai. Immunbiológia, (2000. Gergely, Erdei alapján, módosítva)

A központi idegrendszer gyulladásos folyamatainak - ide értve az EAE-t is - iniciációjában és fenntartásában számos ponton játszhat szerepet a komplementrendszer (5, ábra). Amellett, hogy a vér-agy gát gyulladás miatt kialakuló diszfunkciója is lehetővé teszi a komplement-komponensek bejutását az agyszövetbe, a komponensek lokálisan is szintetizálódnak. Az agyi asztrociták és mikroglia sejtek, valamint az infiltráló makrofágok is képesek a komplementfehérjék előállítására. A komplementrendszer aktivációját részben a gyulladás során elpusztuló sejtek, részben az oligodendroglia-ellenes antitestek indíthatják el. A klasszikus úton végbemenő komplementaktiváció szerepét bizonyítja, hogy számos MOG-ellenes antitestet összehasonlítva a komplementrendszert aktiválni képes izotípusok bizonyultak

hatásosabbnak a demyelinizációban (62). Szintén az ellenanyag általi komplementaktiváció jelentőségére utal, hogy dekomplementáció révén csökkenthető a MOG ellenes antitestek betegséget súlyosbító hatása (63). Azonban a $C3^{-/-}$ egerekkel végzett kísérletek nem mutattak egyértelmű eredményt. Egy kutatócsoport C3 és B faktor hiányos állatokat vizsgálva kimutatta, hogy azok védettek az EAE-vel szemben (64). Ugyanakkor Calida és munkatársai, szintén $C3^{-/-}$ állatokat vizsgálva nem talált különbséget a komplement-hiányos és a normál egerek között (65). Meg kell jegyezni, hogy bizonyos C3 KO egerekben lokálisan termelődik C3, ami befolyásolhatja a folyamatot.



5. ábra. A komplementrendszer elemeinek termelődése és lehetséges szerepük a központi idegrendszerben

Az agyszövetben végbemenő komplementaktiváció eredményeként felszabaduló anafilatoxinok (C3a, C5a) kemoattraktáns hatásuk révén részt vesznek a gyulladásos infiltrátum kialakításában. A C5a molekula endothélsejteken ICAM-1 expressziót indukál, ezzel növelve a T-sejtek átjutását a vér-agy gáton. Érdemes megjegyezni, hogy C3a és C5a receptorok a makrofágok, asztrociták és T-sejtek mellett megjelennek glia- és idegsejteken is (66). Mindezek ellenére a C5aR gén kiütése nem befolyásolta az EAE kialakulását és lezajlását egérben (67). Az anafiltoxinoknak továbbá szerepe lehet az agyban lévő, főleg szeróza típusú hízósejtek aktiválásában.

Az oligodendrogliához kovalensen kapcsolódó C3-fragmentumok elősegíthetik azok komplementreceptor által közvetített fagocitózisát. Ezt támasztja alá, hogy *in vitro* elősegíthető ez a folyamat komplement általi opszonizációval, illetve gátolható CR3 (3 típusú komplementreceptor) ellenes antitestekkel (68). Az aktivált makrofágok képesek a komplementk omponenseket előállítani, ami megnöveli az opszonizáció hatékonyságát.

A C5 konvertáz létrejöttét a C5-9 komponesekből felépülő membránkárosító komplex (MAC) kialakulása követi. Az oligodendroglia felszínén zajló komplementaktiváció és a MAC képződés a demyelinizációban is szerepet játszik: C6 hiányos patkányokban nincs C9 depozíció és demyelinizáció, az EAE tünetei enyhébbek. (69).

Anyagok és módszerek

Reagensek és oldatok

EAE indukció

MOG 35-55 peptid; Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein szekvenciája: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK. PLP 139-151 peptid Proteolipoprotein szekvenciája: HSLGKWLGHPDKF. Mindkét peptid szintézisét Dr. Tóth Gábor végezte, SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet.

Mycobacterium tuberculosis; Difco Laboratory, Detroit, USA, CFA; Komplett Freund adjuváns, Sigma, Sigma-Aldrich Magyarország Kft., Pertussis toxin; List Biological Laboratories, Campbell, USA.

Dekomplementáció, CVF

Naja naja kaoutia CVF; liofilizált Cobra Venom Factor, Aczon Pharma, Italy törzs: 0,5mg/ml PBS-ben

Szövettan, immunhisztokémia

Glutáraldehid (Sigma)

Ozmium tetroxid (Polysciences Inc., Warrington, PA)

Polybed/Araldite 6500 (Polyscience)

Poli-L-lizin (Sigma)

Nyúl anti-patkány IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA

ABC kit(Vector, Vectastain Elite ABC kit)

Kloronaftol (Sigma)

patkány anti-egér Gr-1 klón: RB6-8C5

patkány anti-egér CD11b klón: M1/70.15

patkány anti-egér CD4 klón: YTS 091.1.2

patkány anti-egér CD8 klón:YTS 169AG101 HL

patkány anti-egér CD45R(B220) klón: RA3-6B2

izotípus kontroll patkány IgG2a and IgG2b

(mind ImmunoTools GmbH, Germany)

kecske anti-egér C3 F(ab)'$_2$ (Cappel)

Millonig-puffer 0,1M foszfát

1,8g $NaH_2PO_4xH_2O$

23,3g $Na_2HPO_4x7H_2O$

5g NaCl

1000 ml desztillált víz, pH:7,4

ELISA

ELISA puffer;

1,6 g Na_2CO_3,

2,9 g $NaHCO_3$,

1000 ml desztillált víz, pH:9,6

PBS;

40 g NaCl

1 g KCl

7,12 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$

1 g KH_2PO_4

5000 ml desztillált víz, pH:7,2

PBS-Tween;

500 µl Tween,

1000 ml PBS

TMB (tetra-metil-benzidin);

11 ml, 0,1 M Na-acetát; pH:5,5,

110 µl 10 mg/ml TMB,

22 µl H_2O_2

2 N H_2SO_4

Antigénprezentációs tesz, proliferációs teszt

GKN

8 g NaCl

0,4 g KCl

1,77 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$

0,69 g NaH_2PO_4 x H_2O

2 g glükóz

0,01 g fenol-vörös

1000 ml desztillált víz

RPMI+ 5% FCS

7,69 g RPMI 1640

1 g $NaHCO_3$

0,055 g Na-piruvát

0,146 g glutamin

0,25 ml merkaptoetanol (0,1M)

0,05 g streptomycin

50000 NE penicillin

5 ml NEAA (aminosavak)

5 ml BME (vitaminok)

25 ml FCS

500 ml-re kiegészíteni desztillált vízzel

ACK

4,15 g NH_4Cl

0,5 g $KHCO_3$

0,019 g Na_2EDTA

500 ml desztillált víz, pH:7,2-7,4

Triciált timidin, Pharmacia Amersham,

CFSE karboxifluoreszcein szukcinimidil észter, Molecular Probes törzs: 5mM DMSO-ban ,

Szcintillációs folyadék, Pharmacia Amersham

Con A, Sigma, Sigma-Aldrich Magyarország Kft törzs: 1mg/ml PBS-ben

Funkcionális fehérje-chip

MOG és PLP peptidek ugyanazok, melyeket az EAE indukcióhoz használtunk

MBP fehérje

MOG fehérje, mindkettő Dr. H. Wekerle ajándéka, Martinsried, Németország

pLA 1 mg/ml, Sigma

BSA, Sigma

Kísérleti módszerek

Állatok, oltóanyagok

A C57BL/6 és a SJL/J egértörzsek 6-8 hetes, nőstény egyedeit használtuk. A C57BL/6 állatokat az Országos Onkológiai intézetből vásároltuk, az SJL/J egereket pedig a Charles River cégtől. Az állatok tartását és a kísérleteket a Magyar Állatkísérleti Törvény (1998) és az Európai Unió ajánlásában megfogalmazottak (86/609/EC) alapján végeztük el. A C3 KO egerek C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkeznek, Sándor Mátyás (Madison, USA) bocsátotta rendelkezésünkre.

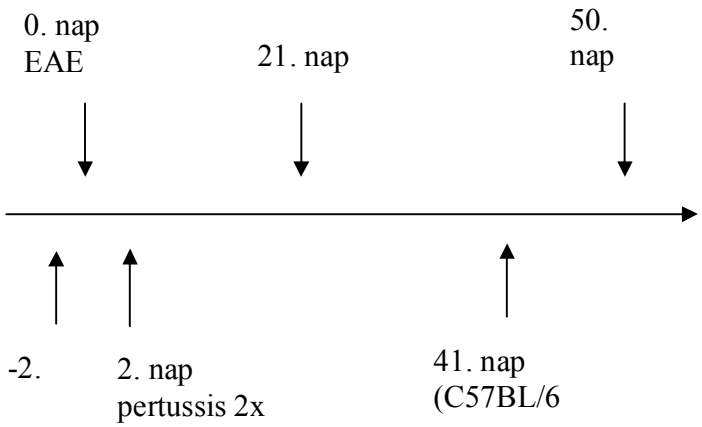
Pozitív kontroll csoport: 2 mg/ml koncentrációjú, PBS-ben oldott MOG pepidet 4 mg/ml elölt Mycobacterium tuberculosis tartalmazó komplett Freund adjuvánssal (CFA) összekevertünk 1:1 arányban, szonikálással homogenizáltuk. Egy állat 100 μl emulziót kapott *sub cutan,* a lapockái közé. Az oltást ketaminos altatásban végeztük. Az indukció napján és utána két nappal 0,5 ml PBS-ben 200 ng pertussis toxint oltottunk az állatokba *intraperitonealisan*.

Negatív kontroll csoport: A negatív kontrollként használt állatok ugyanezt a kezelést kapták, MOG 35-55 peptid nélkül.

1xCVF csoport: Vizsgálataink során egyszeri dekomplementációt végeztünk, CVF alkalmazásával, két nappal az EAE indukció előtt. Az egyszer kezelt állatokba 50 μg-ot oltottuk *intraperitonealisan*, 0,5 ml PBS-ben.

A CVF-fel kezelt állatok esetében a betegség indukciójához a *pozitív kontroll* csoportnál leírt MOG peptid tartalmú emulziót használtuk. Az oltások ideje és az oltóanyag teljesen megegyezett a két csoportban.

A kezelés protokollja az alábbiakban foglalható össze:



Kísérleteink általában 21. napig tartottak, azonban mindkét egértörzs esetében volt hosszú ideig tartó vizsgálat is, amely az SJL/J törzs esetében 50 napot, a C57BL/6 esetében, pedig 41 napot jelentett.

Az EAE klinikai tüneteinek pontozása

A klinikai tünetek súlyosságának értékelésére a C57BL/6 és a SJL/J törzsek esetében általánosan használt pontozási rendszert alkalmaztuk.

0 pont: teljesen egészséges állat, normálisan hurkol a farkával, járás közben felemeli;
1 pont: nem tudja rendesen használni a farkát, az átlóg a rácson, nem tud vele hurkolni;
2 pont: hátsó lába átesik a rácson és nem tudja visszahúzni;
3 pont: egyik hátsó lábát sem tudja használni, sima felületen sem;
4 pont: az elülső lábait sem tudja használni;
5 pont: elpusztul az állat.

Súlyos EAE betegnek a 3 és az afeletti pontszámot kapott állatok tekintettük.

Szövettan és immunhisztokémia

A kísérletek során felnőtt C57BL/6 egerek gerincvelőjét használtuk fel. Kontroll szövetek céljából lép, nyirokcsomó, tímusz és májból is mintát vettünk. A kivett szervekből immuncitokémiai vizsgálatokra májba ágyazott-, vagy zselatinos - fagyasztott blokkot készítettünk.

Zselatin-szacharózos beágyazás

A szerveket 4%-os pufferelt paraformaldehidben 1 óráig fixáltuk, majd PBS-ben háromszor 5 percig mostuk. Ezután a szerveket 15%-os szacharóz (Reanal) PBS oldatában (pH 7,2), 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd 37°C-on 1 órára 15% szacharózt és 7,5% zselatint (Fluka, kat. szám: 04055) tartalmazó PBS-be helyeztük. Az így impregnált szerveket zselatin ággyal előkészített tálkákba kiöntöttük, 4°C-on 3 percig szilárdulni hagytuk, majd körbevágással kialakítottuk a kívánt méretű blokkokat. Az így nyert zselatin blokkokat Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology Ind., 67690006) kartonpapírokra rögzítettük. A kapott blokkokat folyékony nitrogénben előhűtött, -60°C-os 2-metilbután-izopentánban (Fluka, 59075) lefagyasztottam, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Májba ágyazott fagyasztott metszetek készítése

A kivett szerveket foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, pH=7,2) tartottuk a blokk elkészítéséig. A beágyazás során egy májszeletet 1,5x1,5 cm-es kartonpapírra helyeztünk, erre tettük a szerveket, majd vékony májdarabokkal teljesen befedtük, hogy elkerüljük azok kiszáradását. Az így előkészített mintát folyékony nitrogénben -198°C-on lefagyasztottuk. A későbbi felhasználásig a blokkokat -80°C-on tároltuk.

Félvékony metszetek készítése

A kivett szerveket 4%-os Millonig-pufferes glutáraldehidben (Polyscience) fixáltuk két órán át, majd feldaraboltuk és tovább fixáltuk legalább egy éjszakán át, ugyanilyen összetételű oldatban. Ezután Millonig-pufferrel mostuk (3x5 perc), majd 1%-os ozmiumtetroxiddal utófixáltuk két órán keresztül. Újabb mosás után felszálló alkoholsorban (50%, 70%, 80%, 90% és abszolút etanol), 10-10 percig dehidráltuk a szövetet. Ezt a lépést követte az intermediummal (propilén-oxid), majd propilén-oxidban oldott műgyantával (Araldit 6005 + Polybed; Polysciences) való átitatás. Az átitatott szerveket műgyantába ágyaztuk, és egy éjszakán át 4°C-on tartottuk, majd másnap 56°C-on, termosztátban inkubáltuk a teljes polimerizációs keménység eléréséig. Az így elkészített blokkokból ultramikrotómmal készítettünk 2 μm vastagságú metszeteket, amelyeket 1%-os toluidinkékkel festettük. A metszeteket araldittal fedtük le.

Immunhisztokémia

Az immunhiszokémiai festés során a fagyasztott metszeteket először 37°C-on PBS-be helyeztük, hogy a zselatint kioldjuk és a mintákat rehidráljuk. Ezután a metszetekre rámértük a primer ellenanyagot (40-80 μl / metszet), és szobahőmérsékleten, nedves kamrákban 60 percig inkubáltuk. A használt primer ellenanyagok:

patkány anti-egér Gr-1
patkány anti-egér CD11b
patkány anti-egér CD4
patkány anti-egér CD8
patkány anti-egér CD45R(B220)
izotípus kontroll patkány IgG2a and IgG2b
kecske anti-egér C3 $F(ab)'_2$ (Cappel)

Szekunder ellenanyagként biotinnal konjugált, lóban termelt anti-egér, ill. anti-nyúl IgG-t használtunk (Vector Laboratories), 1:200 hígításban (1%-os BSA-t és Na-azidot tartalmazó PBS-ben -PBS-BSA- feloldva), amellyel további 60 percig inkubáltunk a metszetet. A következő lépésben mosás következett PBS-ben (3x5 perc). A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolására PBS-ben 3%-osra higított H_2O_2-ba

(Sigma-Aldrich, H1009) merítettük a tárgylemezeket 8-10 percre, majd újabb mosás következett PBS-ben (3x5 perc). A szekunder ellenanyagok kötődésének előhívására avidin-biotin-peroxidáz komplexet használtunk (Vectastain Elite PK-6100;Vector Laboratories). Az oldatot a cég által megadott hígításban készítettük el (1:100 arányban, PBS-ben). PBS-be mérve az avidin-, majd a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét, alaposan felkeverve, majd fél óra állás után használtuk fel. Az így készült ABC-komplex-el 30 perc inkubálást ismét 3x5 percig tartó mosás követte. Előhívásra, kromogén anyagként 25 mg 4-chloro-1-naftolt (Sigma) használtunk 100 ml PBS-ben oldva, 500 µl 3%-os H_2O_2 jelenlétében. Az előhívó oldatot 30 perc sötétben történő keverés és szűrés után használtuk fel. 25 perc inkubálás után, a kellő színreakciót elérve a metszeteket PBS-sel mostuk (3x5 perc), végül vízoldékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Mount, Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) lefedtük. Minden ellenanyag esetében ez volt a protokoll, kivéve a kecske anti-egér C3 $F(ab)'_2$-t (Cappel), ami peroxidáz enzimmel konjugált volt, így azt közvetlenül hívtam elő. A metszeteket ezután 4°C-on, hűtőben tároltuk.

Szérum C3 szintjének mérése ELISA módszerrel

50 µl ELISA pufferben oldott 2 µg/ml koncentrációjú kecske anti-egér C3 $F(ab')_2$-vel (Cappel) fedett, 96 bemélyedést tartalmazó lemezt 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután mostuk négyszer PBS-Tweennel. Az egerek szérumát PBS-Tweennel hígítottuk 10^{-4}-től 10^{-7}-ig, és szintén 50 µl-t mértünk belőle, két párhuzamos mintával, majd 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően mostuk négyszer PBS-Tweennel, majd 50 µl 2 µg/ml koncentrációjú HRPO-val konjugált kecske anti-egér C3-mal (Cappel) inkubáltuk 1 órát szobahőmérsékleten. Ezután négyszer mostuk PBS-Tweennel és előhívtuk TMB-vel. A színreakciót fotometriásan detektáltuk 450 nm-en (referencia: 620 nm).

C57BL/6 egerek szérumában lévő MOG-specifikus ellenanyagok mérése ELISA módszerrel

10 μg/ml, PBS-ben oldott MOG peptiddel fedtünk 96 bemélyedést tartalmazó lemezt 4°C-on, egy éjszakán át (50 μl oldat mintánként). Ezután mostuk a lemezt négyszer PBS-Tweennel és 50 μl megfelelő hígítású szérumot mértük a lemezre, két párhuzamos mintával dolgozva. Egyórás 37 ^{o}C-os inkubálás után négyszer PBS-Tweennel mostuk, majd 50 μl HRPO-val konjugált kecske anti-egér Ig-vel (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgE, DAKO) fedtük és egy órát inkubáltuk 37 ^{o}C-on az ELISA-lemezt. Ezt követően mostuk négyszer PBS-Tweennel és előhívtuk TMB-vel, a színreakciót fotometriásan detektáltuk, 450 nm-en (referencia: 620 nm).

SJL/J egerek szérumában lévő PLP-specifikus ellenanyagok mérése ELISA módszerrel

50 μl 10 μg/ml PBS-ben oldott PLP peptiddel fedett 96 bemélyedést tartalmazó lemezt 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Ezután mostuk négyszer PBS-Tweennel és 50 μl megfelelő hígítású szérumot mértük a lemezre, két párhuzamossal dolgozva. Egyórás 37 ^{o}C-os inkubálás után négyszer PBS-Tweennel mostuk, majd 50 μl HRPO-val konjugált kecske anti-egér Ig-vel (DAKO) fedtük és egy órát inkubáltuk 37 ^{o}C-on az ELISA-lemezt. Ezt követően mostuk négyszer PBS-Tweennel és előhívtuk TMB-vel, a színreakciót fotometriásan detektáltuk, 450 nm-en (referencia: 620 nm).

Antigénprezentációs teszt

Ezt a tesztet C57BL/6 állatokból származó sejtekkel végeztük el. Az elvéreztetett egerek hónalji és a nyaki erek mentén található nyirokcsomóit sterilen kivettük, GKN-ben tároltuk. A sejteket a nyirokcsomók szétnyomkodásával nyertük ki, majd centrifugáltuk 10 percig 1200 rpm-mel. Végül a sejteket 5% FCS-t, merkaptoetanolt tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban felvettük, és jégen tartottuk felhasználásig. Két

módszert is alkalmaztunk a proliferáció mérésére. Az első esetben az osztódó nyirokcsomó-sejtek DNS-ébe beépülő radioaktív timidint mértük. Három nap elteltével 1 μCi triciált timidint mértünk a kultúrákhoz, majd egy nap múlva -20°C-ra tettük a lemezeket, így állítva le a folyamatot. A sejteket sejt-arató készülékkel („cell-harvester") Whatman-szűrőpapírra szívtuk, majd 100°C-on fél óra alatt kiszárítottunk. Ezután a szűrőpapír-korongokat 200 μl szcintillációs folyadékba tettük és β-számlálóval mértük a radioaktív timidin DNS-be történő beépülését. Később, a radioaktív anyag alkalmazásának elkerülése érdekében, áttértünk a karboxifluoreszcein szukcimidil észter (CFSE) használatára. Ekkor a nyirokcsomóból izolált limfocitákat jelöltük a fluoreszcens festékkel, mely minden osztódáskor feleződik. $2x10^7$db/ml sejtet jelöltünk 0,4 μM végkoncentrációjú CFSE-vel 5 percig, 37°C-on HBSS oldatban. A reakciót 20%-nyi FCS-sel állítottuk le, majd kétszer mostuk a sejteket 10%-os FCS-t tartalmazó RPMI tápfolyadékkal.

Antigénprezentáló sejtként az első esetben kezeletlen C57BL/6 állat lépsejtjeit, a második esetben, pedig a csontvelőből differenciáltatott dendritikus sejtjeit használtunk. A lépeket sterilen kivettük, szétnyomkodtuk, azután centrifugáltuk (10 perc, 1200 rpm). A felülúszó leöntése után 1 percig ACK-val kezeltük a sejteket, majd hozzáadtunk 2 ml hőinaktivált FCS-t és felöntöttük GKN-nel. Centrifugálás után még kétszer mostuk GKN-nel a sejteket, majd médiumban vettük fel (7 lépből készült szuszpenziót 50 ml-ben). A csontvelői eredetű DC-k előállításához egy kezeletlen egér csontvelőjét egy fecskendő segítségével, 50ml GKN-nel kimostuk. A vörösvérsejteket ACK-val lizáltuk, majd mostuk a sejteket kétszer. GM-CSF forrásként az X63 sejtek felülúszóját használtuk (Prof. A. Rolink, Basel ajándéka) 1:10 arányban hígítva a tápfolyadékkal. Így késztettük a csontvelői sejt előalakokat DC-vé differenciálódásra. A citokint kétnaponta pótoltuk. A sejteket az izolálás utáni 7. napon használtuk.

Az antigénprezentációs tesztben egy mintához 10^6 db beteg állatból származó nyirokcsomó-sejtet (50 μl) és 100 μl 10 μg/ml koncentrációjú antigént, azaz MOG-peptidet mértünk. A limfocita:APC arány 10:1 volt. A lemezt ezután termosztátba tettük (5% CO_2, 37°C), majd négy nap múlva a két módszernek megfelelően, Wallac 1409 folyadék szcintillációs β–számlálóval (Wallac, Allerod, Denmark) vagy citofluoriméterrel (BD, FACS Calibur) határoztuk meg a proliferációt. Kontrollként

kezeletlen illetve, a T-sejtek proliferációját serkentő Con A-val (5 μg/ml) kezelt sejteket használtunk.

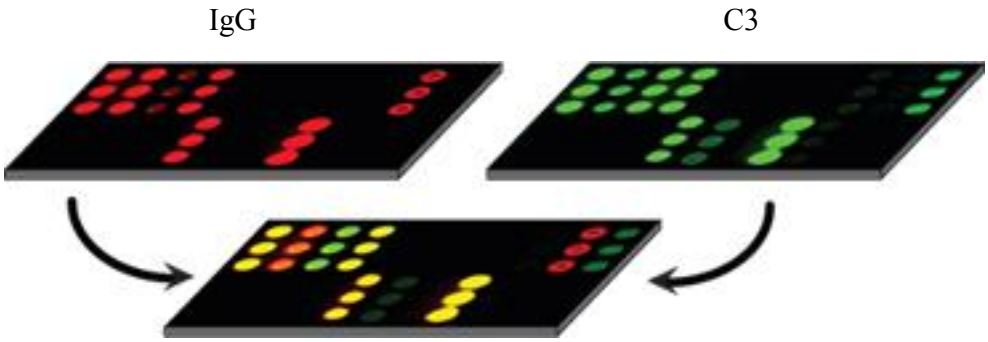
Funkcionális fehérje-chip

A specifikus ellenanyagválasz és a komplementaktiváció egyidejű mérésére alkalmas fehérje-chip technológiához C57BL/6 állatokból származó savót használtunk (70). Antigénként PLP 139-151 és MOG 35-55 peptideket (5 mg/ml), MBP (1 mg/ml) és MOG (0,6 mg/ml) fehérjéket használtunk. A negyedelő hígítási sort, három párhuzamossal Calligrapher miniarrayer (BioRad) műszerrel vittük fel a nitrocellulóz membránra, melyet egy üveg tárgylemezre erősítettünk. Minden antigént PBS-azid pufferben oldottunk. Az elkészült chipeket fénytől és nedvességtől védve +4 C-on tároltuk a felhasználásig.

A vizsgálni kívánt savókat -70°C-on, felolvasztás nélkül tároltuk. A lemezeket használat előtt 15 percig áztattuk PBS-ben, majd a savóban inkubáltuk 37°C-on egy órán át, nedves kamrában. A reakciót 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-sel történő mosással állítottuk le.

A lemezeket a detektáló ellenanyagok keverékében inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten, rotációs asztalon. A FITC-cel jelölt kecske anti-egér C3 $F(ab)_2$ és az Alexa Fluor 647-el kapcsolt kecske anti-egér IgG (H+L) (Molecular Probes) ellenanyagokat 5 % BSA, 0,05 % Tween 20 tartalmú PBS-ben hígítottuk 10000 illetve 5000 szeresére. Mosás és szárítás után a lemezeket Typhoon Trio + Imager (Amersham Bioscience) műszer segítségével szkenneltük be. A 6. ábrán látható, hogy az ellenanyag- és a komplement-depozíciót különböző színű fluoreszcens festékkel konjugált ellenanyaggal detektáltuk, majd ezeket összevetettük. A 6. ábrán hamis színek látszanak. Az adatokat ImageQuantTL (Amersham Bioscience) szoftverrel elemeztük. Kontrollként kecske anti-egér C3-at (Cappel), és kecske anti-egér IgG (Southern Biotech) ellenanyagot használtunk 1mg/ml koncentrációban és pLA-t 0,2 mg/ml koncentrációban. Ezek a reangensek a savóból megkötik a C3-at illetve az ellenanyagokat. (A pLA egy fúziós fehérje, amelyet az L protein és az A protein összekapcsolásával hoztak létre,

specifikusan köti az ellenanyag molekulákat.) A fluoreszcencia intenzitásokat a pLA-ra kapott adatokra normalizáltuk a C3 és az IgG esetében is.



6. ábra. A képen látható a chip-en való mérés és az eredmény kiértékelés elve. A felső képen hamis színekkel látható, hogy ugyanazon chipen hol kaptunk FITC-el (zöld), illetve Alexa 647-el (piros) jeleket. A FITC anti-egér C3 $F(ab)_2$ ellenanyaggal, míg az Alexa 647 anti-egér IgG ellenanyaggal kapcsolt. Az alsó képen a két különböző gerjesztési csatornán felvett, két különböző fehérjét detektáló képnek az egymásra illesztett formája látható. Ahol mindkét fehérje együtt detektálható, az sárga színű.

Statisztikai analízis

A naponta mért átlagpontokat Mann-Whitney U-teszttel hasonlítottuk össze. A tünetek megjelenésének időpontját egy-utas ANOVA segítségével elemeztük. A T-sejtek *in vivo* restimulációjának statisztikai szignifikanciáját χ^2 próbával elemeztük. A null hipotézist elvetettük, ha a p kisebb volt mint 0,05.

Minden kísérletet 2-5-ször elvégeztünk. Az Eredmények fejezetben bemutatott ábrák többségükben egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatjuk be.

Célkitűzéseink

I. Annak megállapítása, hogy a komplementrendszer hiánya a betegség indukciójakor milyen hatással van a tünetek kialakulására a C57BL/6 egértörzsben, ahol a betegség akut, monofázisos tünetekkel jelentkezik.

II. Annak megállapítása, hogy a komplementrendszer hiánya a betegség indukciójakor, milyen hatással van a tünetek kialakulására az SJL/J egértörzsben, ahol a betegség során a tünetek javuló-súlyosbodó tendenciájúak.

III. C3 KO állatokat vizsgálva célunk volt annak megállapítása, hogy milyen hatása van a C3 komponens teljes hiányának a monofázisos jellegű betegség kialakulására és lezajlására.

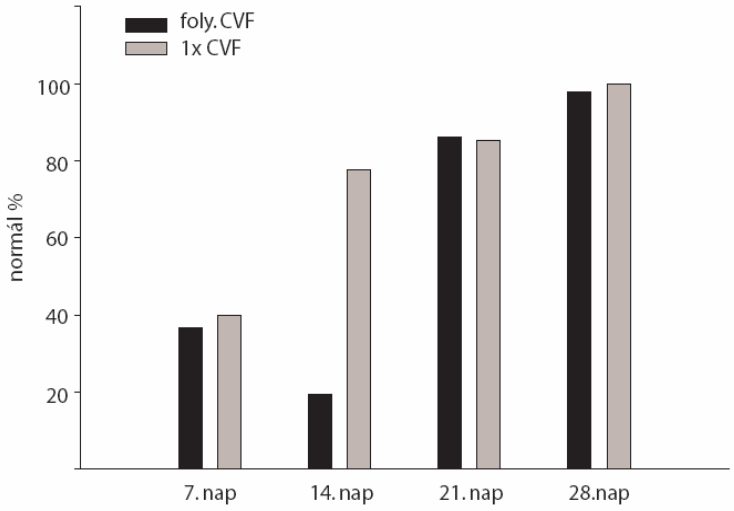
IV. Célul tűztük ki annak meghatározását, hogy a MOG-peptiddel oltott állatokban milyen mennyiségben jelennek meg a specifikus ellenanyagok, továbbá vizsgálni kívántuk a MOG-specifikus T-sejtek antigén-specifikus aktivációját *ex vivo*. Célunk volt a myelin-specfikus ellenanyagok komplement-aktiváló képességének meghatározása is.

V. Szövettani metszeteken vizsgáltuk a központi idegrendszerben lezajló változásokat, és tanulmányoztuk, hogy kimutatható-e komplement depozíció.

Eredmények

CVF-kezelés hatása a szérum C3-szintjére

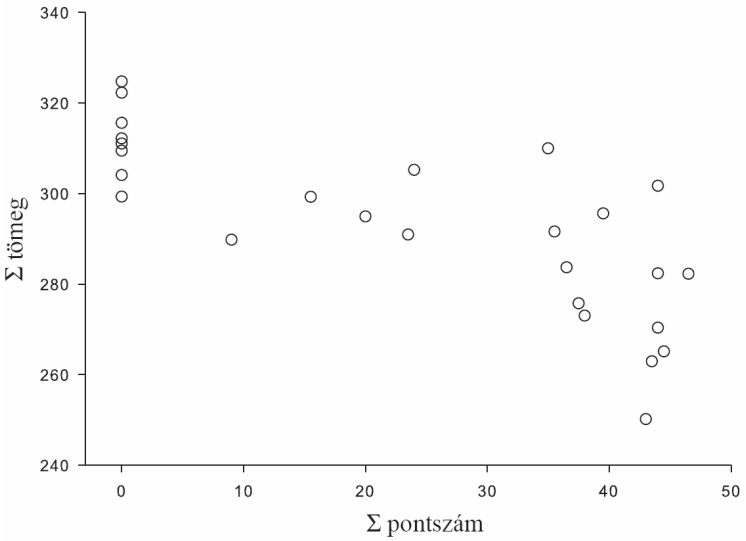
A CVF a kobra méreganyagában található C3b–analóg fehérje, amely a B faktorral nem inaktiválódó C3-konvertáz enzimet hoz létre, és így kimeríti a szérumban található C3-at. A kialakuló komplement-hiány reverzibilis, és az állat C3-szintje idővel visszaáll az eredeti koncentrációra. Kísérleteinkben először megvizsgáltuk, milyen hatással van a CVF-kezelés egerek szérumának C3-szintjére A CVF-t egyszer, illetve folyamatosan (nyolc hétig, hetente egyszer, növekedő dózisban) oltottuk a C57BL/6 törzsbe tartozó egerek hasüregébe. A CVF mennyiségét az irodalomban leírt adatok alapján alkalmaztuk; egy kb. 20g-os egérnek 50 μg CVF-et adtunk *intraperitonealisan,* PBS-ben oldva. A folyamatosan kezelt csoportban a CVF-et 50 μg induló dózisról 75 μg-ra, majd 100 μg-ra emeltük 8 hét alatt. Az oltások után hat nappal vért vettünk, és a szérum C3-szintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. Az eredmény a 7. ábrán látható. Az oltás utáni első héten mindkét CVF-el kezelt csoportban alacsony volt a C3-szint, míg a második héten csak azokban az állatokban nem állt helyre, amelyek további CVF oltást kaptak. Azonban ez a különbség a harmadik hétre eltűnik, és a továbbiakban a megnövelt CVF dózis ellenére sem csökkent a komplementfehérje szintje. Ennek oka valószínűleg az, hogy ellenanyag termelődik a CVF ellen, ami semlegesíti a C3b-analóg hatását. Megállapítottuk, hogy a CVF-kezelésnek nem volt szemmel látható hatása az egerekre, súlycsökkentést nem okozott.



7. ábra. CVF-kezelés hatása egerek szérumának C3 szintjére.
Az y-tengelyen a CVF-fel kezelt egerek ELISA-val mért C3 szintjének százaléka látható, ahol 100% a -3. napon vett savókban mért C3 szint. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

A betegség kialakulásának hatása az állatok testtömegére

A kísérletek során naponta mértük az állatok testsúlyát. Azt tapasztaltuk, hogy már az első idegrendszeri tünetek megjelenése előtt fogyni kezdenek az egerek, ami biztos jele a betegség kialakulásának. Ilyenkor ui. még bizonyosan nem azért fogynak, mert a bénulásos tünetek miatt nem érik el a táplálékot, hanem feltehetően a gyulladás kiterjedése miatt. (A későbbiek során is gondoskodtunk arról, hogy az élelem és a víz elérése ne okozzon gondot-megemelt alom, illetve friss alma). A 8. ábrán az állatok betegségére jellemző pontszámokat tüntettük fel a testtömegük függvényében. Látható, hogy pozitív a korreláció a testtömeg-vesztés és a betegség tüneteinek kialakulása között. Az ábrán a 21 nap alatt kialakuló pontszámok és a mért testtömegek összege látható.

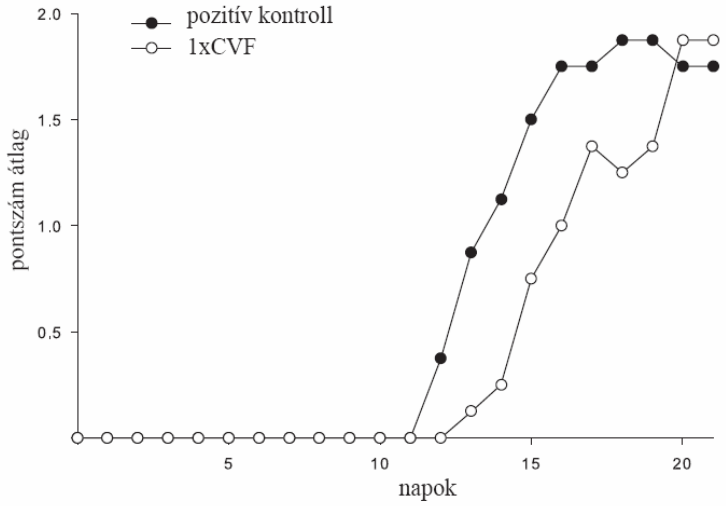


8. ábra. Az összpontszám az össztömeg függvényében. Az egyes egerek értékeit külön ábrázoltam, a CVF-fel kezelt állatok nincsenek megkülönböztetve a kezeletlen egyedektől.

CVF-kezelés hatása a betegség akut modelljében

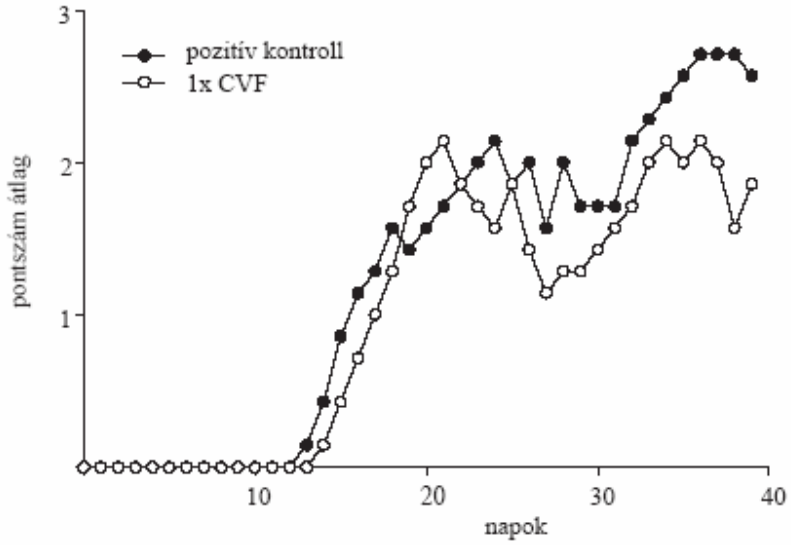
Az EAE a sclerosis multiplex elfogadott egér-modellje, ami sok tekintetben hasonló az emberi betegséghez. Az irodalomban ellentmondásos adatok találhatók a komplementrendszer szerepéről SM-ben illetve EAE-ben. A C57BL/6 egértörzs esetében az EAE-nek egy monofázisos, akut formája alakul ki, amely nagyon hasonló az emberi SM egyik típusához. Az állatokban a betegséget 100 μg MOG peptiddel és kétféle adjuváns együttes alkalmazásával indukáljuk. Az egyik, a komplett Freund-adjuváns olajos emulziója, amely elölt Mycobacterium tuberculosist tartalmaz. Az állatba oltva az antigént is tartalmazó depót képez a bőr alatt és granulóma kialakulását váltja ki, ami fenntartja a gyulladásos miliőt. A másik adjuváns a Bordetella pertussis baktérium toxinja, ami a vér-agy gát átjárhatóságát növeli meg. Ezt a modellt alkalmazva tisztázni akartuk, hogy milyen hatással van a komplementrendszer a betegség lefolyására. Ennek

érdekében az EAE indukciójakor komplementhiányos állapotot idéztünk elő CVF alkalmazásával, ami reverzibilis dekomplementációt idéz elő. Az állatokat két nappal az indukció előtt kezeltük CVF-fel. Azt tapasztaltuk, hogy az EAE indukciójakor komplementhiányos állatokban szignifikánsan később jelennek meg a betegség tünetei (9. ábra). A betegség első két napján a CVF-kezelt csoport átlag-pontszáma szignifikánsan kisebb volt, mint az intakt komplementrendszerrel rendelkező csoporté. Ugyanakkor a CVF-kezelésnek nem volt hatása a betegség tüneteinek minőségére, illetve a megjelenésük sorrendjére. A III. táblázatban látható, hogy a betegség gyakorisága kissé csökkent a CVF-kezelés hatására, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns. A táblázatban látható a súlyos EAE-esetek száma is, illetve az ilyen állapotban eltöltött napok száma. Súlyos EAE-t 3, vagy annál nagyobb napi pontszám jelent. Látható, hogy a súlyos EAE gyakoriságát nem befolyásolta a CVF-kezelés, azonban az idejét kissé lerövidítette. Ezeket a kísérleteket a 21. napon állítottuk le.



9. ábra. CVF-kezelés hatása az EAE kialakulására C57BL/6 egerek esetében. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Hosszú idejű vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a CVF-fel kezelt csoport állatainak átlagpontszáma mindig alatta marad az intakt komplementrendszerrel rendelkező csoport átlagának, azonban ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (10. ábra).



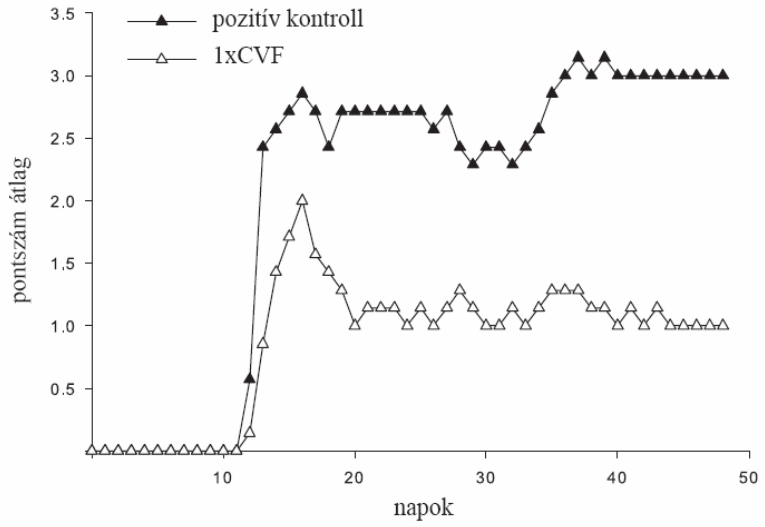
10. ábra CVF-kezelés hatása az EAE kialakulására C57BL/6 egerek esetében, hosszúidejű kísérlet. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Csoport	Egyedszám	Betegek száma	Első nap ± SD	Súlyos EAE	Súlyos EAE napok
Pozitív kontroll	31	25	15±3	15	55
1xCVF	30	20	17±3 *	14	42

III. táblázat CVF-kezelés hatása az EAE kialakulására C57BL/6 egerek esetében. A csillaggal jelzett érték szignifikánsan különbözik a két csoportban. Súlyos EAE betegnek a 3 és az afeletti pontszámot kapott állatok tekintettük.

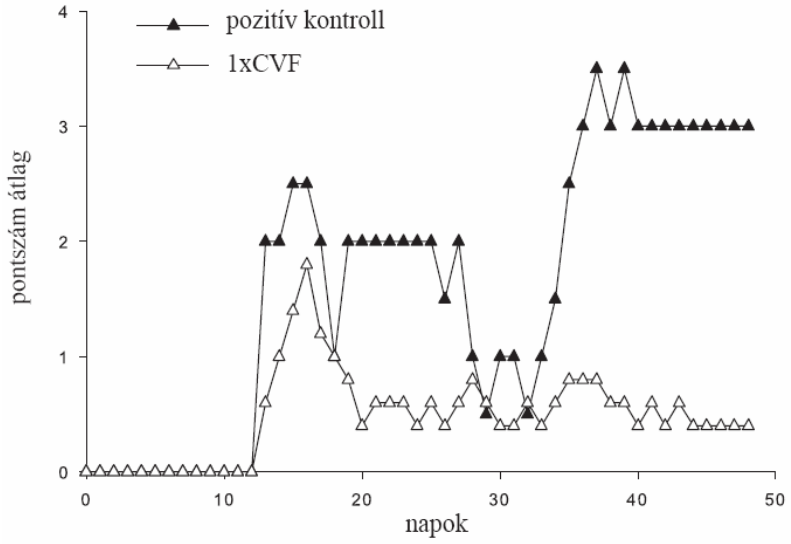
CVF hatása a betegség javuló-súlyosbodó formájában

Az EAE-re érzékenyebb SJL/J törzsben a betegség javuló-súlyosbodó típusa alakul ki, és az állatok egy része el is pusztul a betegség következtében. A betegséget ezekben az állatokban is a C57BL/6 törzs esetében leírtakhoz hasonló módon indukáltuk, azonban MOG peptid helyett 100 μg PLP peptidet oltottunk az állatokba. A 11.ábra készítésekor az elpusztult állatokat is bevontuk az értékelésbe (5 ponttal), ezért nem látható a betegség „hullámzó" jellege. Jelentős különbség, hogy az SJL/J törzs esetében, szemben a C57BL/6 állatokkal, a komplementhiányos állapot nem okoz változást a betegség megjelenésének időpontjában, azonban a tünetek jóval enyhébbek, és csökken a mortalitás is. Továbbá – mint a IV. táblázatban látható -, a súlyos EAE gyakorisága és ideje is jelentősen csökkent CVF-kezelés hatására.



11. ábra. CVF-kezelés hatása az EAE kialakulására SJL/J egerek esetében. Az ábrázolás során az elpusztult állatok adataival is számoltunk. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Ha kizárjuk az elpusztult állatokat az értékeléskor, akkor a 12. ábrán látható eredményt kapjuk. Így jól látható az is, hogy az egyszeri CVF-kezelés gátolja az állapot rosszabbodását a betegség későbbi szakaszában.



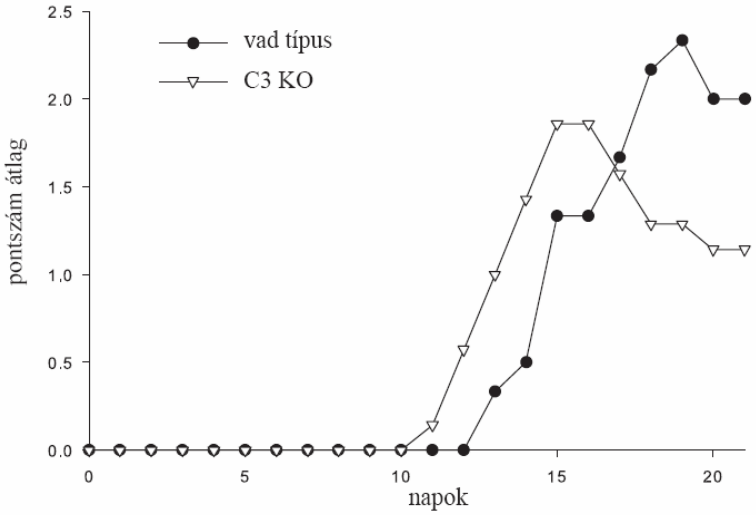
12. ábra. CVF-kezelés hatása az EAE kialakulására SJL/J egerek esetében. Az ábrázolás során az elpusztult állatok adatait nem vettük figyelembe. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Csoport	Egyedszám	Betegek száma	Mortalitás	Súlyos EAE	Súlyos EAE napok
Pozitív kontroll	7	5	3	5	32
1xCVF	7	4	1	2	16

IV. táblázat CVF-kezelés hatása az EAE kialakulására SJL/J egerek esetében. Súlyos EAE betegnek a 3 és az afeletti pontszámot kapott állatok tekintettük.

Az EAE tüneteink kialakulása genetikailag C3-deficiens állatokban

A komplementrendszer hiányának hatását az EAE kialakulására genetikailag C3-deficiens (C3 KO) állatokban is megvizsgáltuk. Ezek az egerek C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkeznek, és a C3 mRNS-e teljes mértékben hiányzik a májból, ami ezen fehérje fő forrása.



13. ábra. EAE kialakulása C3 KO egerekben. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Csoport	Egyedszám	Betegek száma	Első nap ± SD	Súlyos EAE	Súlyos EAE napok
Pozitív kontroll	20	18	14±3	14	68
C3 KO	21	19	12±1	13	51

V. táblázat. EAE kialakulása C3 KO egerekben

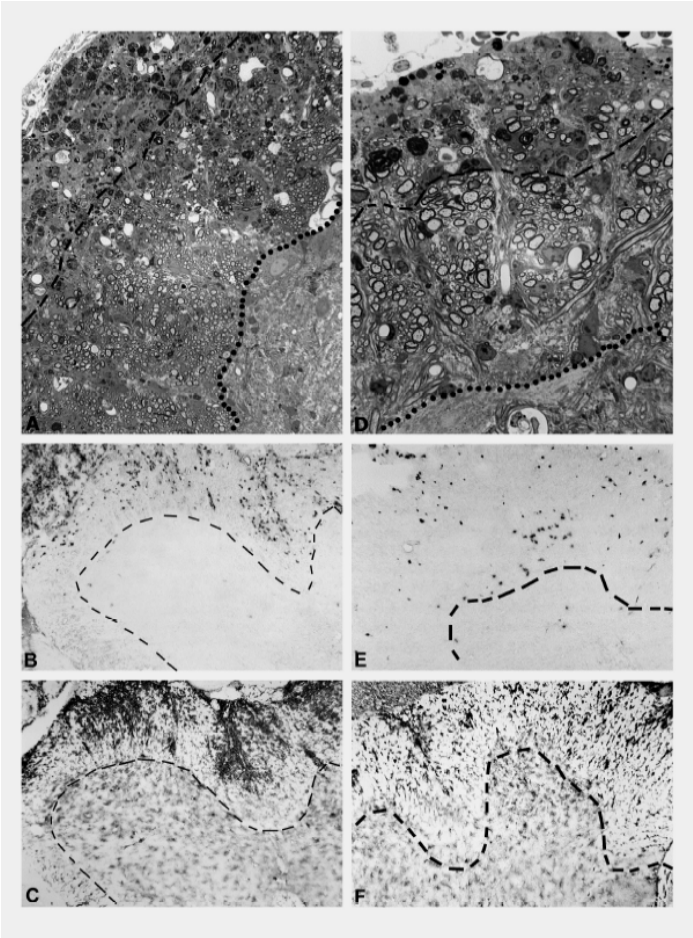
Súlyos EAE betegnek a 3 és az afeletti pontszámot kapott állatok tekintettük.

Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy C3 KO egerekben a MOG-peptiddel indukált betegség tünetei hamarabb jelentkeznek, mint a vad típusú állatokban (13. ábra). Megfigyelhető azonban, hogy idővel az állatok állapota javul, és a C3 KO egerek pontszámának átlaga alatta marad a vad típusúakénak. EAE-tüneteket. A súlyos EAE kialakulásának gyakoriságában nem találtunk különbséget a C3 KO és a vad egerek között (V. táblázat).

A szövettani vizsgálatok eredménye

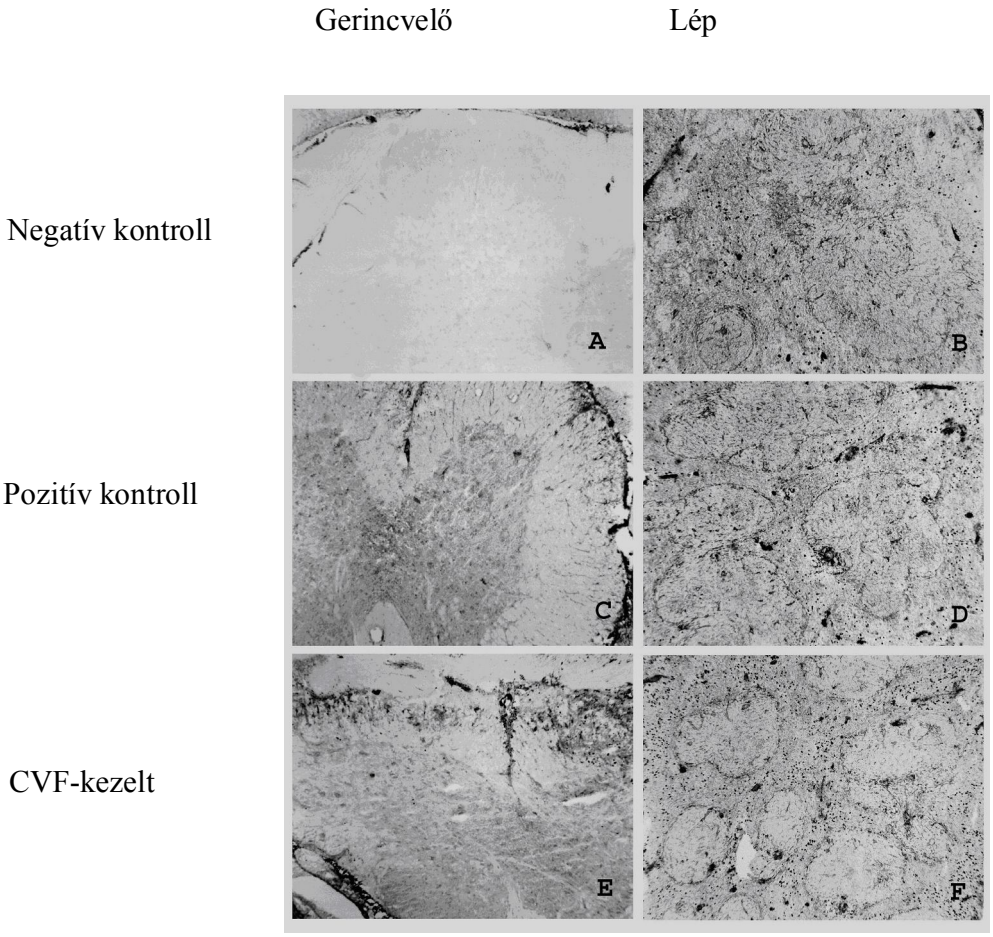
Mivel az EAE indukálásának időpontjában CVF-fel előidézett időleges dekomplementáció mérsékelte az EAE látható tüneteit, megvizsgáltuk, hogy egyéb patológiás különbségek is kimutathatók-e. Ezért összehasonlítottuk az EAE-indukált, CVF-fel kezelt ill. kezeletlen állatok gerincvelőjéből készített félvékony metszeteket. A toloudin kékkel festett metszeteket vizsgálva azt találtuk, hogy a demyelinizáció mértéke a klinikai tünetek súlyosságával harmonizál (14. ábra A és D fotók). Az oligodendrociták pusztulása és az axonok károsodása csupán a fehér állományban figyelhető meg, szövettanilag felismerhető változás nem látható a szürkeállományban és a gerincvelői idegek ventrális szarván. Általában a gerincvelő oldalsó és hátulsó kötegei érintettek; az elülső kötegekben alig van elváltozás. A patológiás változások a szürkeállományon belül is inkább a felszíni területeken figyelhetőek meg, míg a fehérállománnyal szomszédos területek szinte érintetlenek. A hátulsó és az elülső kötegek szélső zónájában hiányzik a legtöbb axon, eltérően a kötegek belső állományával, ahol az axonok és az azokat körülvevő myelinhüvely, kerek vagy ovális, erősen festődő képletként látható.

Az immunhisztokémiai festés kevesebb beszűrődő $CD4^+$ T-sejtet mutat a CVF-fel kezelt állatok fehérállományában (14. ábra B és E), míg a CD11b pozitív makrofágok száma azonos a két csoport gerincvelő metszetein (14. ábra C és F). Vizsgáltuk továbbá a $CD8^+$ T-sejteket, a granulocitákat és a $B220^+$ B-sejteket, melyek szintén bevándoroltak a gerincvelőbe, azonban mennyiségük nem változott meg a CVF kezelés hatására.



14. ábra. Hisztokémiai vizsgálatok a pozitív kontroll (A, B, C) és a CVF-kezelt (D, E, F) állatok gerincvelőjéből készített metszeteken. Az A és a D félvékony metszeteket toluidin-kékkel festettük. (A: 400x-os, D: 200x-os nagyítás.)
Az oldalsó és hátulsó kötegekben egyértelműen elkülöníthető a perifériás és a belső zóna (szaggatott vonallal jelölve). A B és az E fotókon látható metszeteket anti-CD4 ellenanyaggal festettük, a C és az F fotók metszeteit, pedig anti-CD11b ellenanyaggal (40x nagyítás)

Eredményeink alapján felmerült a kérdés, hogy kimutatható-e változás a C3-depozíció tekintetében is a CVF-fel kezelt ill. nem kezelt, EAE-indukált állatok esetében ezért megvizsgáltuk az anti-C3-mal való festődését a gerincvelőből és a lépből készült metszeteken (21. nap). Eredményeink szerint a C3 megjelenése összefügg a gyulladásos folyamatokkal a központi idegrendszerben.

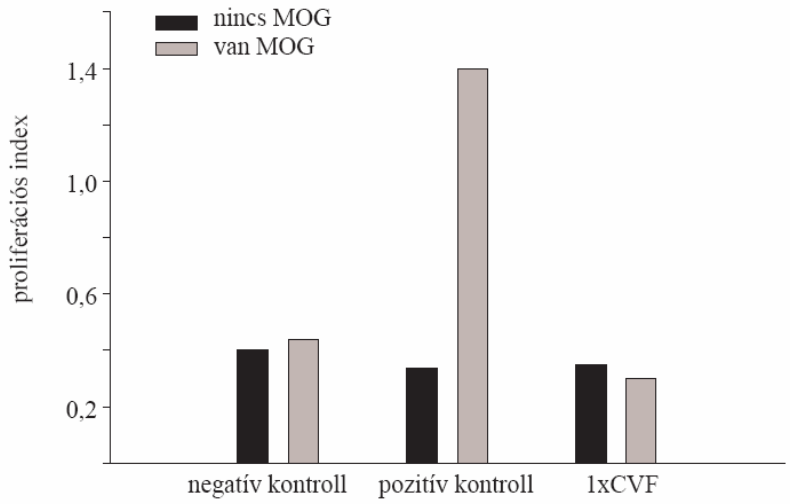


15. ábra. C3-depozíció a gerincvelőben és a lépben. Gerincvelő: A, C, E; lép: B, D, F. Negatív kontroll: A, B; pozitív kontroll: C, D; CVF-fel kezelt állatok: E, F. Minden metszetet anti-egér C3-mal festettünk (40x nagyítás)

A 15. ábrán látható egy-egy állat gerincvelőjéből illetve lépéből készült metszet; a negatív kontroll (A és B fotó), a pozitív kontroll (C és D fotó) és a CVF-fel kezelt (E és F fotó) egerek csoportjából. Látható, hogy azon állatok esetében, amelyeket csak adjuvánssal oltottunk, MOG peptiddel nem, és nem alakult ki gyulladás a központi idegrendszerben,(*negatív kontrol*) nincs C3-festődés. Ezzel szemben a másik két csoportban (vagyis a MOG-gal oltott – *pozitív kontrol* -, ill. előzetesen dekomplementált, majd MOG-gal oltott állatok esetében) jól látható diffúz C3 festődést figyelhetünk meg. Ezekben az állatokban kialakultak az EAE tünetei, tehát van gyulladás az idegrendszerükben. Látható az is, hogy a perifériás nyirokszervben, a lépben, mindhárom kísérleti csoport esetében egyforma intenzitású C3-depozíció történik.

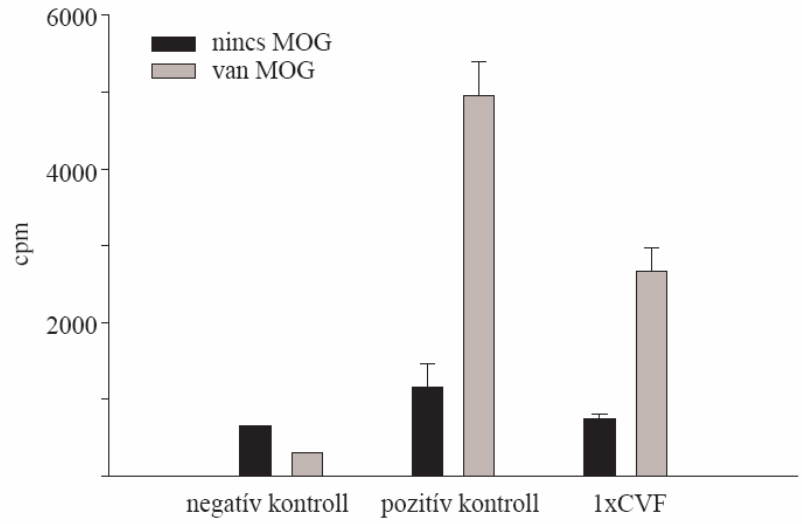
MOG-specifikus T-sejtek in vitro restimulálása

A szövettani eredményekből látható, hogy a T-sejtek funkciói megváltoztak a CVF-kezelés hatására, ami indokolta, hogy tovább vizsgáljuk e sejtek aktiválhatóságát. Ezért a C57BL/6 állatok nyirokcsomóiból izolált sejteket *ex vivo* újra- stimuláltuk MOG peptiddel (16. ábra). Az EAE-indukció után három héttel izolált sejtek osztódását egér lépsejtek – mint APC-k - jelenlétében, MOG peptiddel indukáltuk. A negatív kontroll csoportba tartozó állatok esetében – melyeket nem oltottunk MOG peptiddel -, nem vártunk specifikus T-sejt választ, szemben a másik két kísérleti csoporttal. A 16. ábrán látható, hogy a CVF-fel való kezelés után 21 nappal izolált sejtek osztódása gátolt a intakt komplementrendszerrel rendelkező állatokból származó sejtekhez képest.



16. ábra. MOG-specifikus T-sejtek proliferációja az EAE indukciótól számított 21. napon. (A proliferációs index az antigénnel nem stimulált és az antigénnel stimulált sejtek számának hányadosa). Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

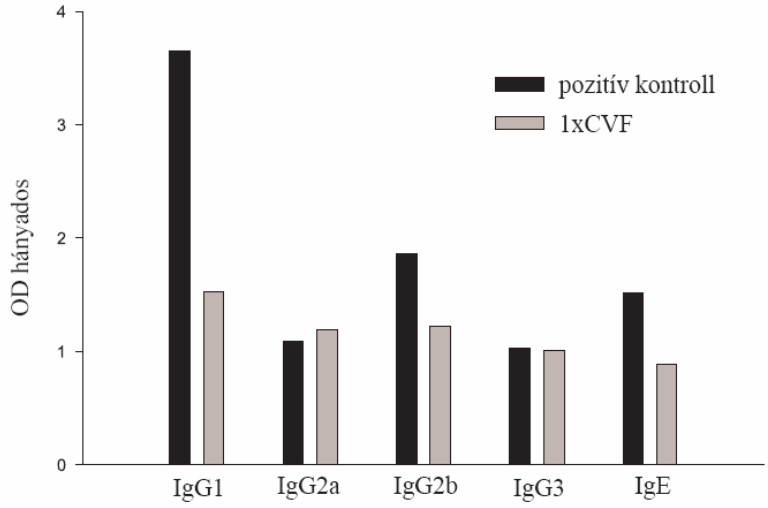
Kíváncsiak voltunk arra, hogy hasonló eredményt kapunk-e abban az esetben is, ha a sejteket az EAE-indukció után még későbbi időpontban restimuláljuk. Az oltástól számított 39. napon izolált sejtekkel nyert eredményeket a 17, ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a dekomplementált állatokból származó sejtek ebben az esetben is kisebb proliferációs képességet mutattak a CVF-fel nem kezelt állatokéhoz képest, de az osztódásuk nem gátolódott teljesen, ahogy a 21. napon izolált sejteknél láttuk. A komplementrendszer aktivitása ebben a két időpontban már biztosan helyreállt, tehát ez a csökkent proliferációs képesség nem a CVF-kezelés közvetlen hatása, hanem az indukciókor hiányzó komplement-aktivitás eredménye.



17. ábra. MOG-specifikus T-sejt proliferáció, az EAE indukciótól számított 39. napon. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

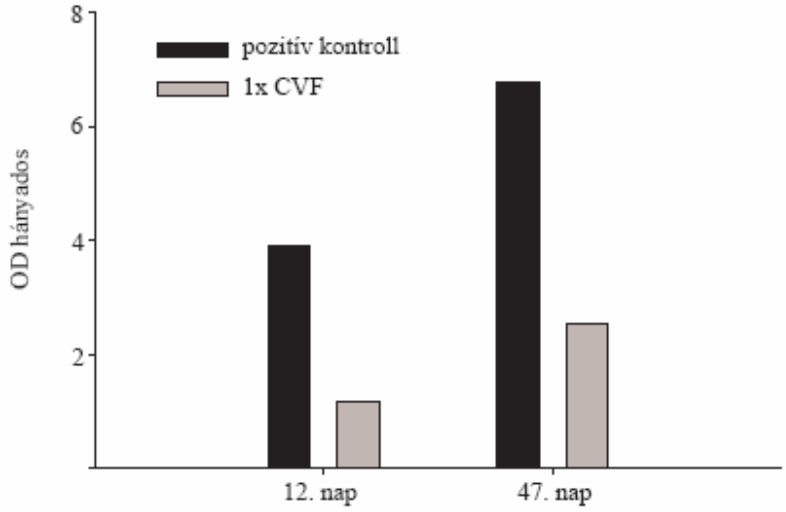
Myelin-specifikus ellenanyagok vizsgálata

Bár a T-sejtek szerepe döntő az EAE (és SM) kialakulása ill. a betegség lezajlása során, feltehetőleg a B-sejtek által termelt ellenanyagoknak is fontos szerepük van a kórlefolyásban. Ezért fontosnak tartottuk az ellenanyagok vizsgálatát is. Először a savóban mérhető MOG-specifikus ellenanyagok mennyiségét hasonlítottuk össze a CVF-fel kezelt és nem-kezelt állatokból származó mintákban, az EAE indukciótól számított 24. napon. A 18. ábrán látható, hogy az IgG1 izotípusú MOG-specifikus ellenanyagok mennyisége kisebb a CVF-fel kezelt csoport savó-mintáiban. Az intakt komplementrendszerrel rendelkező állatok esetében kissé több IgG2b és IgE ellenanyagot mértünk, a különbség azonban nem volt szignifikáns. A többi izotípus esetében egyáltalán nem találtunk eltérést az egyes kísérleti csoportok között.



18. ábra. A különböző izotípusú MOG-specifikus ellenanyagok mennyisége C57BL/6 állatok savójában, az EAE indukciótól számított 24. napon. Az ábrán az ELISA módszerrel mért optikai denzitás csoportonkénti átlaga látható a negatív kontroll hányadosaként ábrázolva. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

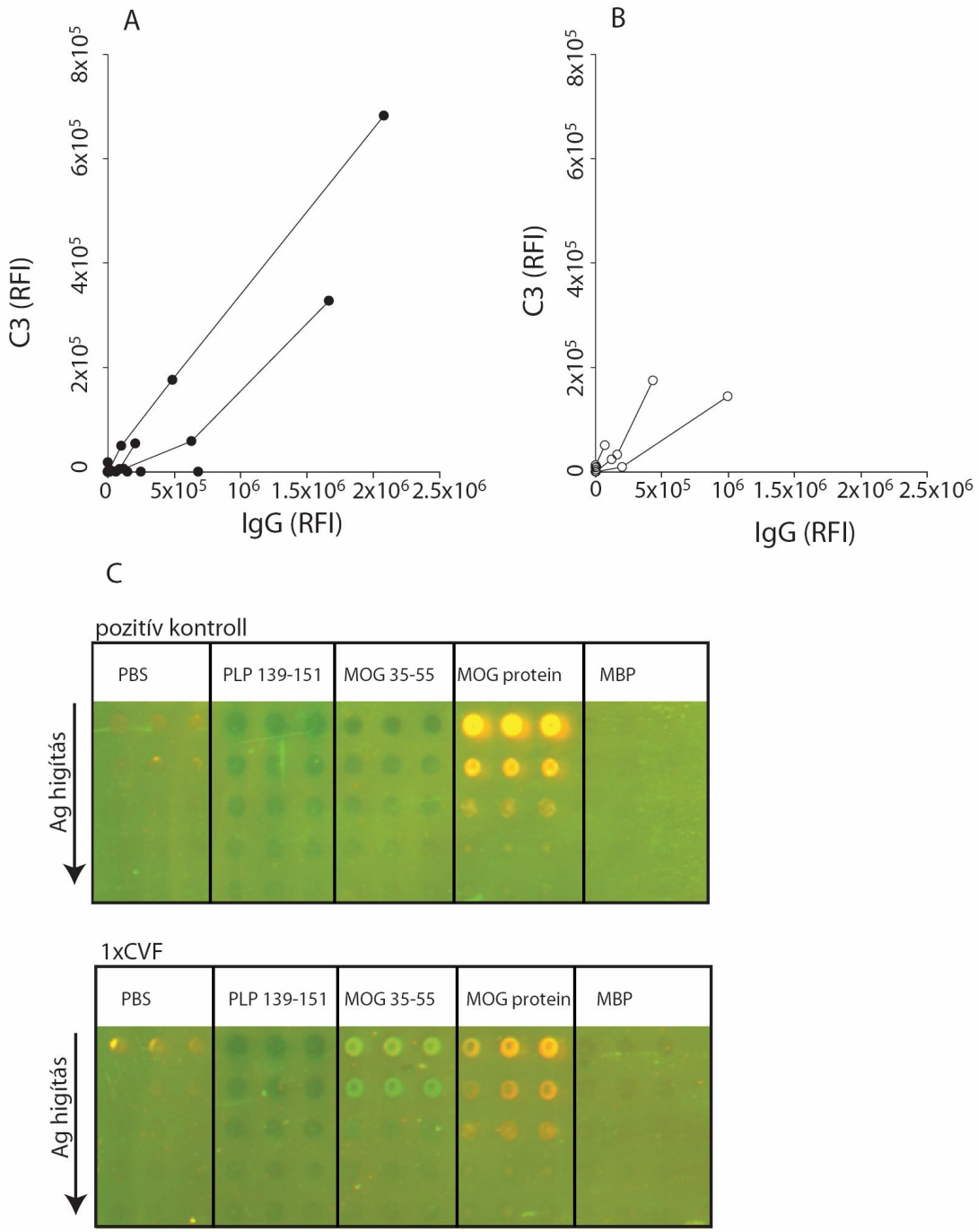
Ehhez nagyon hasonló eredményt kapunk az SJL/J egerek savóinak vizsgálata esetében is, amikor a teljes IgG mennyiségét mértük a 12. és a 47. napon (19. ábra). Látható, hogy a PLP-specifikus ellenanyagok mennyisége a CVF-fel kezelt egerek savóiban a 12. napon a negatív kontrolléval megegyező. A későbbi időpontban pedig jelentősen csökkent koncentrációt mutat, összehasonlítva a nem dekomplementált állatokkal.



19. ábra. A PLP-specifikus ellenanyagok mennyisége az EAE indukciótól számított 12. és 47. napon, SJL/J állatok savójában. Az ELISA módszerrel meghatározott optikai denzitás csoportonkénti átlaga látható a negatív kontroll hányadosaként ábrázolva. Egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Az ellenanyagok jelenlétén és mennyiségén kívül fontos az is, hogy milyen effektor folyamatokat indítanak el az immunválasz során. Ennek vizsgálatához az Immunológiai Tanszéken kifejlesztett chip-technikát alkalmaztunk, mellyel egyszerre tudjuk mérni az antigén-specifikus ellenanyagok mennyiségét és azok komplement-aktiváló képességét (20. ábra). A technika lényege röviden: a vizsgált savóban található és a chip-re „nyomtatott" antigénekre specifikus ellenanyagok a megfelelő „pontokhoz" kötődnek és ha komplementet aktiválnak, akkor az adott területeken C3-fragmentumok lerakódása mutatható ki. A kötődött ellenanyagok és a komplement-fragmentumok két különböző színű fluoreszcens festékkel konjugált ellenanyaggal detektálhatók, és így egyszerre vizsgálható az ellenanyagok jelenléte és azok komplement-aktiváló képessége. Vizsgálataink során több ismert, az EAE-ben vagy a SM-ben leírt antigént vittünk fel a membránra, azonban csak a teljes MOG fehérje ellen mértünk detektálható választ, így

csak ezt ábrázoltam. A 20. ábra A és B paneljén az x tengelyen az ellenanyagok relatív fluoreszcenciáját az y tengelyen pedig a detektálható C3 relatív értékeit tüntettük fel. Az A panelben az intakt komplementrendszerrel rendelkező, míg a B panelen a CVF-el kezelt állatok adatait ábrázoltuk. Látható, hogy az indukciótól számított 21. napon vett vérmintákban a CVF-kezelt állatokban kevesebb MOG-fehérje specifikus ellenanyag mérhető, és ezek kevésbé aktiválják a komplementrendszert. A C panelen mindkét csoportból egy-egy állat C3 és IgG eredményének egymásra illesztett képe látható; a zöld szín a C3, míg a piros az IgG mennyiségét jelöli. Látható, hogy csak a teljes MOG fehérjével reagáló ellenanyag és az általa aktivált komplement mérhető. A többi antigén ellen nincs detektálható mennyiségű antitest a vizsgált állatok szérumában. A MOG 35-55 peptid-szekvenciája esetében a pozitív reakció hiányának oka lehet az, hogy a 20 aminosav hosszú peptid térszerkezete a membránra való kitapadás során megváltozik, ezért nem ismerik fel az ellenanyagok. A többi antigén estében pedig az immunválasz hiánya lehet az ok, az epitóp szóródás jelensége a vizsgált antigének esetében nem alakult ki.



20. ábra MOG-fehérje specifikus ellenanyag- és komplement depozíció mértéke (relatív fluoreszcencia intenzitás) intakt komplementrendszerrel rendelkező pozitív kontroll csoport illetve CVF-fel kezelt csoport esetében. A és B panel: Teli kör: intakt komplementrendszerű állatok, Üres kör: CVF-fel dekomplementált állatok szérum-mintái. C-panel: mindkét csopotból egy-egy állat „egyedi chipje”.

Az eredmények összegzése

A sclerosis multiplex a leggyakoribb központi idegrendszert érintő gyulladásos betegség. Kialakulásának háttere komplex, és még nem kellően tisztázott, de nagy valószínűséggel autoimmun folyamatoknak is szerepük van a patogenezisben. A dolgozatban az immunrendszer egyik legfontosabb, és mégis viszonylag kevéssé tanulmányozott eleme, a komplementrendszer szerepét vizsgáltuktuk egér modell-rendszer alkalmazásával. A komplementrendszer aktivációjának bizonyítottan fontos szerepe van számos autoimmun betegség kialakulásában. Igy pl. a szisztémás lupus erithematosus (SLE) tüneteinek megjelenésében nagy szerepe van a klasszikus út aktivációjának. Érdekes módon SLE-ben a komplementrendszer működésének többrétű a hatása, mivel bizonyítottan részt vesz az ellenanyag-közvetített szövet károsításban, de a klasszikus út bizonyos elemeinek – elsősorban a C1q - hiánya fokozza a betegség kialakulásának kockázatát (108). A komplementrendszer egyéb aktiválódási útjainak szerepe is egyre inkább előtérbe kerül. Kimutatták pl., hogy az IgA jelenléte által dominált Hanoch Schöchlein Purpura betegségben a lektin-függő út aktivációja súlyosbítja a tüneteket (109,110). Az anti-neutrophil citoplazma ellenanyag (ANCA)-kapcsolt vasculitis esetében, bár nem találtak komplementaktivációt annak ellenére, hogy ellenanyag depozíció megfigyelhető, a komplementrendszer alternatív útjának aktivációját a patogenezis fontos elemének írták le (111).

Az SM egérmodelljének, az EAE-nek alkalmazásával vizsgáltuk a komplementrendszer szerepét a betegség kialakulásának különböző szakaszaiban, mert bár már régóta végeznek ezirányú kísérleteket, mégsincs egyértelmű válasz pontos szerepére (35, 71-73). Két kutatócsoport C3 KO, C57BL/6 genetikai hátterű egereket, MOG 35-55 peptiddel oltva teljesen különböző eredményre jutott. Calida és munkatársai nem talált különbséget a vadtípusú egerekhez képest, míg Nataf és kollégái enyhébb tünetek megjelenését tapasztalták a C3 hiányos állatokon (64, 65). Aktívan és passzívan kiváltott EAE-t vizsgálva egy másik csoport leírta, hogy a C3 KO állatok esetében a betegség tünetei enyhébbek (74). C4 hiányos C57BL/6 állatokat oltva nem találtak különbséget a vad típushoz képest (75). Megvizsgálták továbbá a C5 szerepét is; C5 KO egeret használva a kísérlethez, és leírták, hogy a C5 hiányos állatokban kevésbé súlyos az

EAE (76). ICAM-1 és C3 dupla KO állatokat vizsgálva érdekes módon a betegség súlyosbodását figyelték meg (77). Patkány modellekben is vizsgálták a komplementrendszer szerepét, C6 KO állatokat használva. Tran és kollégái enyhébb tüneteket figyeltek meg ezekben az állatokban, és azok később is jelentek meg (78). Ezzel szemben Mead és csoportja nem talált különbséget a C6 hiányos és a vadtípusú állatokban kiváltott EAE lefolyásában (69). Az említett vizsgálatokat génkiütött állatokkal végezték el, ami tekintettel a betegség komplex hátterére és a komplementrendszer egyes elemei funkcióinak más faktorok általi helyettesíthetőségére (pl. C3 – C4), nem a legmegfelelőbb választás. Mindazonáltal e kísérletek eredményeiből világosan látszik, hogy nincs egyértelmű válasz a komplementrendszer lehetséges szerepére az EAE modellben, illetve SM-ben. Néhány kutatócsoport CVF-általi dekomplementációt alkalmazott patkányokkal végzett vizsgálatai során. E kísérletekben az EAE indukció után, még éppen az első tünetek megjelenése előtt alkalmazták a CVF-kezelést. Azt tapasztalták, hogy a tünetek enyhébbek voltak összehasonlítva a normál komplement-aktivitással rendelkező patkányok csoportjában mért adatokkal. Hasonló eredményt kaptak egy másik, súlyosabb tüneteket produkáló modell esetében is, amikor az állatok az adjuvánssal való indukció mellett myelin-specifikus ellenanyagot is kaptak (61).

Saját kísérleteink során a komplement-hiány hatását vizsgáltuk az EAE-indukciójára, a komplementrendszer reverzibilis kimerítésével. Kísérleteink egyedülállóak, mivel – a korábbiakkal ellentétben – mi egyetlen alkalommal való CVF-oltás hatását vizsgáltuk az egér modellben. Emellett megvizsgáltuk azt is, hogy a mi kísérleti körülményeink között hogyan viselkednek a genetikailag komplement-hiányos állatok.

A betegség oligodendroglia eredetű fehérjékkel vagy peptidekkel, adjuvánsok kíséretében oltva indukálható. Az általunk használt oltási séma eredményeként az egerekben súlyos gyulladás alakul ki, mivel Pertussis toxint is alkalmaztunk a komplett Freund adjuváns mellett. Mindez az alapvető jelentőségű gyulladásos immunválasz és az érpermeabilitás fokozásának megteremtéséhez szükséges. A komplett Freund adjuváns egyik szerepe, hogy depót képezve hosszú időn keresztül, folyamatosan biztosítsa az antigén, vagyis a MOG peptid jelenlétét az állatban. A pertussis toxin növeli az állatok

hisztamin-érzékenységét, ezzel megnöveli a vér-agy gát átjárhatóságát (79). A betegség $CD4^+$ T-sejt függő, mivel a kezelt állat T-sejtjeivel átvihető naív egerekbe, de szérummal, vagy más sejttípussal nem (80, 81).

Az időleges komplement-hiány előidézéséhez CVF-et használtunk, ami a komplementrendszer legfontosabb, központi elemét, a C3-t inaktiválja, és így átmenetileg „kimeríti" a savóból. A központi idegrendszerben alacsony a komplementfehérjék koncentrációja; a C3 és a B faktor mennyisége itt körülbelül két nagyságrenddel kisebb, mint a vérben (96). Azonban gyulladás következtében nagyobb mennyiségben jutnak át a komplementfehérjék a vérből, továbbá számos sejttípus képes lokálisan a termelésükre (97). A CVF hatására a komplementaktivációnak csupán a kezdeti néhány lépése zajlik le, és ez átmeneti komplement-hiányt okoz. Az oltást követő második héten már közel normális C3-koncentrációt mérhető a savóból. Az EAE első tünetei az indukció után leghamarabb két hét múlva láthatók; ekkorra már a komplementrendszer működése visszaáll az eredeti szintre. A komplementaktivációkor keletkező anafilatoxinoknak (C3a, C5a) sincs már ekkor hatásuk, ezek a CVF-Bb komplex működésekor keletkeznek, de nagyon hamar inaktiválódnak ill. kiürülnek, és az EAE indukciókor sem találhatók meg nagy mennyiségben (107). Kísérleteinkben a MOG peptiddel való oltás előtt CVF-el kezeltük az állatokat, és azt vizsgáltuk, hogy milyen hatással van az EAE kialakulására, ha dekomplementált állatokban indukáljuk. Ebben az esetben tehát az immunválasz kezdeti lépései idején – vagyis az immunválaszt döntően meghatározó *antigénprezentáció* során – nem volt jelen az aktív komplementrendszer. Eredményeinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a komplementrendszer hiánya az indukciókor a C57BL/6 törzsben késlelteti a tünetek megjelenését. A javuló-súlyosbodó tüneteket mutató SJL/J törzs esetében csökkent a mortalitás dekomplementáció hatására, és a későbbi visszaesések is elmaradtak. Mindez jó összhangban van a munkacsoportunk által korábban leírt megfigyeléssel miszerint ha az APC-k felszínére C3-fragmentumok kötődnek, akkor sokkal hatékonyabban képesek aktiválni a T-sejteket (98). A C3 hiánya a betegség indukciójakor tehát kisebb mértékű antigénprezentációt eredményez, ami gátolhatja az autoimmun folyamat kialakulását.

A T-sejtek aktivációjában több ponton is részt vehet a komplementrendszer. Közvetetten, az APC-k érését, kostimuláló molekulák expresszióját befolyásolhatja (117,

118). Leírták, hogy a dendritikus sejtek által termelt C3 szükséges a T-sejtek teljes aktivációjához (87). A dendritikus sejtek érése sem tökéletes C3 hiányában, noha az érést szabályozó citokinek jelen vannak (88). Egy másik kísérletben vizsgáltak C3 hiányos makrofágokat, és hasonlóan a dendritikus sejtekhez, a komplement hiányában a makrofágok nem tudták megfelelően aktiválni a T-sejteket (89). Nagyon ritka emberi betegség a C3 deficiencia, de a néhány ismert eset alapján elmondható, hogy e komponens hiánya vagy csökkent mennyisége gátolja a dendritikus sejtek érését, és jelentősen befolyásolja a memória B-sejtek és a regulátor T-sejtek fejlődését (90). Ez utóbbi esetben a T-sejteken megjelenő C3a és C5a receptorok szerepét bizonyították. A komplementrendszer immunszupresszív hatását is leírták, bemutatva, hogy a TCR és a CD46 keresztkötése Tr1 regulátor T-sejtek kialakulását eredményezi, amelyek IL-10 szekrécióval gátolják az immunválaszt, SM betegekben ezen sejtek funkciója csökkent (112). Saját eredményeink alapján feltételezhető, hogy az immunválasz kezdeti lépéseiben csökkent aktivitású komplementrendszer a nyirokcsomókban az APC-k és a T-sejtek közötti szinapszis kialakulásakor fejtette ki hatását, a T-sejtek aktivációt csökkentve. Más munkacsoportok megfigyelései alapján az is feltehető, hogy a komplementhiány az autoimmunitás és gyulladás kialakulásában döntő szerepet játszó IFN-γ és IL-17 citokinek szekrécióját is csökkentette. Az utóbbi időben leírt, és azóta élénken tanulmányozott T_H17 helper T sejtek szerepe alapvető az EAE kialakulása szempontjából. Sokáig csupán a T_H1 sejtek szerepét tanulmányozták, azonban a szerepüket megkérdőjelező eredmények miatt (82) egyre inkább elfogadottá válik, hogy az EAE modellben főleg a T_H17 sejteknek van jelentőségük (83-85). Leírták, hogy a különböző myelin-epitópokra specifikus T-sejtek különböző arányban hoznak létre T_H1 és T_H17 populációkat, függően a TCR és az MHC-peptid közötti kapcsolat aviditásától (86). Nemrég írták le azt a megfigyelést, hogy a komplementrendszer valószínűleg a Toll-like receptorok közreműködésével befolyásolja a T_H17 sejtek IL-6 citokin termelését. Rendszerünkben a komplementfehérjék immunválaszra pozitívan ható szerepe kerül előtérbe (99).

A nem megfelelő T-sejt aktivációt támasztják alá az immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei is. Megfigyeltük, hogy a CVF-kezelt állatok gerincvelő metszeteiben kevesebb $CD4^+$ T-sejt található. Ez tehát a komplementrendszer szerepére

utal, mivel a vér-agy gáton csupán a megfelelően aktivált T-sejtek képesek átjutni, amennyiben kellő mennyiségű és minőségű adhéziós molekulát expresszálnak a felszínükön (100). (Ezért lehetnek hatásosak a az integrinekre illetve receptoraikra specifikus monoklonális ellenanyagok MS terápiában (101, 102).)

A kezdeti komplementhiány a memóriasejtek kialakulására is hatással lehetett kísérleti rendszerünkben, mivel az antigénspecifikus T-sejtek proliferációs képessége gátolt volt az indukció utáni 21. napon, sőt még a 39. napon izolált és vizsgált sejtek esetében is. A komplementrendszer hatása a memória T-sejtek kialakulásában még nem kellően tisztázott, de más tanulmányok is azt igazolják, hogy valamilyen módon szerepet játszik.

A komplementrendszer eddig ismertetett közvetett szerepe mellett közvetlen módon is hatással lehet az EAE kialakulására és patogenezisére, mivel aktivációja különböző sejtek líziséhez vezethet. Kimutatták, hogy izolált myelin képes aktiválni a komplementrendszert a klasszikus úton, és azt is igazolták, hogy az emberi MOG protein képes C1q-t kötni (91, 92). Emberi oligodendrociták sejtkultúrában felszínükön csak DAF és CD59 molekulákat expresszálnak, de CR1-et, H faktort és MCP-t nem (93). Ha tisztított H-faktort, vagyis komplement-reguláló fehérjét juttattak a központi idegrendszerbe, akkor jelentősen csökkent a gyulladás, és ezzel párhuzamosan a demyelinizáció területe és a klinikai tünetek súlyossága is (94). Vizsgálták egy másik, sejtfelszíni komplement-reguláló fehérje, a DAF szerepét is EAE-ben. Azt találták, hogy a genetikailag DAF-hiányos állatok jobban megbetegedtek, mint a vad típusúak. Myelin-specifikus T-sejtjeik több IFN-γ és IL-17 citokint termeltek, ami egy újabb kapcsolat lehet a komplementrendszer és a T-sejt aktiváció között (106). Saját eredményeinkhez hasonlóan mások is azt találták, hogy a komplementaktivációnak lehet protektív hatása is. Leírták ugyanis, hogy a C5-9 komplex képes megvédeni az oligodendrocitákat az apoptózistól, a C5 pedig részt vesz a remyelinizációban és az axonok védelmében (95). Rendszerünkben ez a közvetlen hatás is érvényesülhetett, hiszen a beteg állatok központi idegrendszerében C3-depozíciót találtunk. Azonban ezt a CVF-kezelés nem befolyásolta, tehát a komplementaktiváció valószínűleg a betegség tüneteinek megjelenésekor zajlik le. A CVF-kezelés tehát késlelteti az állatokban a tünetek megjelenését. A C3-depozíció a központi idegrendszerben a gyulladásos folyamatokkal ill. az átjárhatóvá váló vér-agy

gáttal lehet kapcsolatban. Az immunhisztokémiai metszetek alapján azonban nem lehet eldönteni, hogy a lerakódó C3-fragmentumok a perifériás vérből származnak, vagy lokálisan – pl- a mikroglia sejtek által termelt komplementfehérjékből.

Régóta ismert, hogy a B-sejteknek és az általuk termelt ellenanyagoknak jelentős szerepük van az MS patogenezisében. MS-ben fontos diagnosztikai kritérium az agy-gerincvelői folyadékban megtalálható oligoklonális ellenanyagok jelenléte (113). Az EAE állatmodellben ez kevésbé egyértelmű. B.10PL genetikai hátterű, B-sejt hiányos állatokat vizsgálva nem találtak jelentős különbséget a betegség kialakulásának gyakoriságában és a súlyosságában (104). Egy másik tanulmányban pedig C57BL/6 háttéren vizsgálták a MOG peptiddel illetve teljes fehérjével kiváltott EAE-t, és csupán a teljes fehérjével immunizált B-sejt hiányos állatok mutattak tüneteket, a peptidnek nem volt hatása (44). Mi arra voltunk kíváncsiak, hogy az antitestek komplementaktiváló tulajdonsága szerepet játszat-e a folyamatban? Ezért a munkacsoportunkban kifejlesztett fehérje-chip segítségével megvizsgáltuk a beteg állatokból származó myelin-specifikus ellenanyagok mennyiségét és komplementaktiváló képességét (114, 115). Eredményeink az mutatják, hogy az átmenetileg dekomplementált állatokban kevesebb specifikus ellenanyag termelődött, és azoknak kisebb volt a komplementaktiváló képessége. Megfigyeléseinket jól alátámasztja, hogy az ellenanyagok demyelinizációs képessége egyértelműen azok komplementaktiváló képességétől függ, és FcR-tól független (105). A komplementrendszernek a memória B-sejtek kialakulásban is bizonyítottan szerepe van (119). Ennek alapján feltehető, hogy ez is sérül a CVF-kezelt állatokban, ami a 47. napon mért csökkent ellenanyagszintben is megmutatkozik.

Nehéz értelmezni a C3 KO állatokkal végzett kísérleteink eredményeit, mivel nem volt különbség a betegség kialakulásának gyakoriságában, sőt, a betegség tünetei hamarabb jelentkeztek, és csupán a későbbi pontszámok mutattak enyhébb betegséget a vad típusú állatokkal összehasonlítva. Ez a rendszer más kutatócsoportok vizsgálataiban is más-más eredményt mutatott, függően a tartási körülményektől és az oltási sémától, ahogyan azt a korábbi felsorolásban láthattuk. Itt szerepe lehet a lokálisan termelődő C3-nak a T-sejt aktivációban, és később, pedig a májból származó nagy mennyiségű fehérje hiányának a betegség aktív fázisában. Leírták, hogy C4 KO egerekbe beültetett vadtípusú csontevői őssejtek helyreállították a normális immunválaszt, annak ellenére, hogy C4

nem volt mérhető az állatok szérumában (103). Az általunk használt C3 KO állatokban csupán a máj nem képes C3 szintézisre, hiszen a májsejtek más promóterrel használják a gént mint más sejttípusok (120). Ezért feltehető, hogy az immunválasz kezdeti lépéseikor jelen volt annyi lokálisan termelődő C3, ami elég volt a T-sejt aktivációhoz, azonban később hiányzott a nagy mennyiségű fehérje, amikor masszív komplementaktiváció zajlott a vadtípusú állatokban.

Ki kell emelni, hogy ez az első tanulmány, amelyben a komplementrendszer reverzibilis inaktiválásának hatását vizsgálták az EAE kialakulásának kezdeti lépéseiben. *Összefoglalva* tehát eredményeink arra utalnak, hogy a komplementrendszer befolyásolja az EAE patogenezisét, mivel a komplementaktivitás hiánya a betegség indukciójakor késlelteti a tünetek megjelenését, továbbá csökkenti a később megjelenő, MOG-specifikus T-sejtek aktivációját, a MOG-specifikus ellenanyagok megjelenését és a központi idegrendszerbe belépő $CD4^+$ T-limfociták számát.

Eredmények

I. Eredményeink alapján a CVF-fel dekomplementált C57BL/6 állatok esetében a betegség első tünetei szignifikánsan később jelennek meg, és a csoport átlagpontszáma a későbbiekben is alatta marad az intakt komplementrendszerrel rendelkező egerek csoportjával összehasonlítva.

II. Az SJL/J törzset vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a CVF-kezelés gátolja a visszatérő relapszusok kialakulását, és a betegség rosszabbodását. Továbbá az állatok túlélése is megnőtt a dekomplementált csoportban.

III. Az EAE-t C3 KO állatokban indukálva azt tapasztaltuk, hogy a tünetek hamarabb jelentkeznek, és a későbbiekben a komplement-hiányos csoportban a betegség mértékére utaló átlagpontok minden esetben a vad típusú állatok értékei alatt maradtak.

IV. Eredményeink szerint a CVF-fel kezelt állatokból származó T-sejtek szignifikánsan kisebb mértékben aktiválhatók, mint a normál komplementrendszerrel rendelkező állatok és a MOG-specifikus ellenanyagok szintje is alacsonyabb a dekomplementált állatokban.

V. A központi idegrendszerbe belépő $CD4^+$ T-limfociták száma kisebb volt a CVF-kezelt állatokban. Toluidin-kékkel festett metszeteken azonban nem találtunk jelentős különbséget a CVF-kezelt és nem kezelt állatok myelin-festődése között; a szöveti károsodás megfelelt a betegség stádiumának.

Irodalomjegyzék

(1) Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology 1996; 46(4):907-911.

(2) Pittock SJ, Rodriguez M. Benign multiple sclerosis: a distinct clinical entity with therapeutic implications. Curr Top Microbiol Immunol 2008; 318:1-17.

(3) Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. Lancet Neurol 2006; 5(4):343-354.

(4) Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol 2007; 6(10):903-912.

(5) Capello E, Mancardi GL. Marburg type and Balo's concentric sclerosis: rare and acute variants of multiple sclerosis. Neurol Sci 2004; 25 Suppl 4:S361-S363.

(6) Stark W, Huppke P, Gartner J. Paediatric multiple sclerosis: the experience of the German Centre for Multiple Sclerosis in Childhood and Adolescence. J Neurol 2008; 255 Suppl 6:119-122.

(7) Wang D, Ayers MM, Catmull DV, Hazelwood LJ, Bernard CC, Orian JM. Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis. Glia 2005; 51(3):235-240.

(8) Ayers MM, Hazelwood LJ, Catmull DV, Wang D, McKormack Q, Bernard CC et al. Early glial responses in murine models of multiple sclerosis. Neurochem Int 2004; 45(2-3):409-419.

(9) Bruck W, Stadelmann C. Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. Neurol Sci 2003; 24 Suppl 5:S265-S267.

(10) Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. Lancet 2004; 363(9423):1773-1774.

(11) Beretich BD, Beretich TM. Explaining multiple sclerosis prevalence by ultraviolet exposure: a geospatial analysis. Mult Scler 2009; 15(8):891-898.

(12) Smolders J, Thewissen M, Peelen E, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Damoiseaux J et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. PLoS One 2009; 4(8):e6635.

(13) Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology 1983; 33(11):1444-1452.

(14) Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. Nat Rev Immunol 2007; 7(11):904-912.

(15) Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV et al. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. J Immunol 1994; 153(10):4349-4356.

(16) Burnette WN. Bacterial ADP-ribosylating toxins: form, function, and recombinant vaccine development. Behring Inst Mitt 1997;(98):434-441.

(17) Wong WS, Simon DI, Rosoff PM, Rao NK, Chapman HA. Mechanisms of pertussis toxin-induced myelomonocytic cell adhesion: role of Mac-1(CD11b/CD18) and urokinase receptor (CD87). Immunology 1996; 88(1):90-97.

(18) Morse JH, Kong AS, Lindenbaum J, Morse SI. The mitogenic effect of the lymphocytosis promoting factor from Bordetella pertussis on human lymphocytes. J Clin Invest 1977; 60(3):683-692.

(19) Munoz JJ, Arai H, Bergman RK, Sadowski PL. Biological activities of crystalline pertussigen from Bordetella pertussis. Infect Immun 1981; 33(3):820-826.

(20) Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. Cell Immunol 1982; 73(2):299-310.

(21) Yong T, Meininger GA, Linthicum DS. Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. J Neuroimmunol 1993; 45(1-2):47-52.

(22) Piddlesden S, Lassmann H, Laffafian I, Morgan BP, Linington C. Antibody-mediated demyelination in experimental allergic encephalomyelitis is independent of complement membrane attack complex formation. Clin Exp Immunol 1991; 83(2):245-250.

(23) Fazekas G, Tabira T. What transgenic and knockout mouse models teach us about experimental autoimmune encephalomyelitis. Rev Immunogenet 2000; 2(1):115-132.

(24) Sobel RA, Greer JM, Kuchroo VK. Minireview: autoimmune responses to myelin proteolipid protein. Neurochem Res 1994; 19(8):915-921.

(25) Greer JM, Kuchroo VK, Sobel RA, Lees MB. Identification and characterization of a second encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein (residues 178-191) for SJL mice. J Immunol 1992; 149(3):783-788.

(26) Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat Rev Immunol 2003; 3(7):569-581.

(27) Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. Cell 1996; 85(3):299-302.

(28) Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisakk P, Tucky B et al. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. Brain 2006; 129(Pt 1):212-223.

(29) Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunity 2001; 14(5):547-560.

(30) Anderton SM, Wraith DC. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. Nat Rev Immunol 2002; 2(7):487-498.

(31) Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. Cell 1995; 80(5):695-705.

(32) Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Nat Rev Neurosci 2002; 3(4):291-301.

(33) Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. Cell 1993; 72(4):551-560.

(34) Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, Nicholson LB. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. Annu Rev Immunol 2002; 20:101-123.

(35) Levine S, Cochrane CG, Carpenter CB, Behan PO. Allergic encephalomyelitis: effect of complement depletion with cobra venom. Proc Soc Exp Biol Med 1971; 138(1):285-289.

(36) Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol 2009; 27:485-517.

(37) Issazadeh S, Lorentzen JC, Mustafa MI, Hojeberg B, Mussener A, Olsson T. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent

mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. J Neuroimmunol 1996; 69(1-2):103-115.

(38) Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. J Immunol 1998; 161(7):3299-3306.

(39) Bettelli E, Nicholson LB, Kuchroo VK. IL-10, a key effector regulatory cytokine in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Autoimmun 2003; 20(4):265-267.

(40) Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2006; 177(1):566-573.

(41) Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. Brain 2002; 125(Pt 3):538-550.

(42) Steinman L. Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis. J Exp Med 2001; 194(5):F27-F30.

(43) Hjelmstrom P, Juedes AE, Fjell J, Ruddle NH. B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. J Immunol 1998; 161(9):4480-4483.

(44) Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. Eur J Immunol 1999; 29(11):3432-3439.

(45) Lyons JA, Ramsbottom MJ, Cross AH. Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. Eur J Immunol 2002; 32(7):1905-1913.

(46) Schluesener HJ, Sobel RA, Linington C, Weiner HL. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. J Immunol 1987; 139(12):4016-4021.

(47) Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bosl MR, Dunn R et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. J Exp Med 2009; 206(6):1303-1316.

(48) Giovannoni G. Cerebrospinal fluid and serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis. Mult Scler 1998; 4(1):27-30.

(49) Brosnan CF, Bornstein MB, Bloom BR. The effects of macrophage depletion on the clinical and pathologic expression of experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol 1981; 126(2):614-620.

(50) Silver R, Silverman AJ, Vitkovic L, Lederhendler II. Mast cells in the brain: evidence and functional significance. Trends Neurosci 1996; 19(1):25-31.

(51) Zappulla JP, Arock M, Mars LT, Liblau RS. Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? J Neuroimmunol 2002; 131(1-2):5-20.

(52) Shanas U, Bhasin R, Sutherland AK, Silverman AJ, Silver R. Brain mast cells lack the c-kit receptor: immunocytochemical evidence. J Neuroimmunol 1998; 90(2):207-211.

(53) Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. Nat Immunol 2005; 6(2):135-142.

(54) Ibrahim MZ, Reder AT, Lawand R, Takash W, Sallouh-Khatib S. The mast cells of the multiple sclerosis brain. J Neuroimmunol 1996; 70(2):131-138.

(55) Johnson D, Yasui D, Seeldrayers P. An analysis of mast cell frequency in the rodent nervous system: numbers vary between different strains and can be reconstituted in mast cell-deficient mice. J Neuropathol Exp Neurol 1991; 50(3):227-234.

(56) Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. J Exp Med 2000; 191(5):813-822.

(57) Brown MA, Tanzola MB, Robbie-Ryan M. Mechanisms underlying mast cell influence on EAE disease course. Mol Immunol 2002; 38(16-18):1373-1378.

(58) Kanbe N, Tanaka A, Kanbe M, Itakura A, Kurosawa M, Matsuda H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. Eur J Immunol 1999; 29(8):2645-2649.

(59) Vogel CW, Muller-Eberhard HJ. The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. J Biol Chem 1982; 257(14):8292-8299.

(60) Vogel CW, Fritzinger DC, Hew BE, Thorne M, Bammert H. Recombinant cobra venom factor. Mol Immunol 2004; 41(2-3):191-199.

(61) Linington C, Morgan BP, Scolding NJ, Wilkins P, Piddlesden S, Compston DA. The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. Brain 1989; 112(Pt 4):895-911.

(62) Piddlesden SJ, Lassmann H, Zimprich F, Morgan BP, Linington C. The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. Am J Pathol 1993; 143(2):555-564.

(63) Morris-Downes MM, Smith PA, Rundle JL, Piddlesden SJ, Baker D, Pham-Dinh D et al. Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice. J Neuroimmunol 2002; 125(1-2):114-124.

(64) Nataf S, Carroll SL, Wetsel RA, Szalai AJ, Barnum SR. Attenuation of experimental autoimmune demyelination in complement-deficient mice. J Immunol 2000; 165(10):5867-5873.

(65) Calida DM, Constantinescu C, Purev E, Zhang GX, Ventura ES, Lavi E et al. Cutting edge: C3, a key component of complement activation, is not required for the development of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. J Immunol 2001; 166(2):723-726.

(66) Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR. Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? Trends Neurosci 1999; 22(9):397-402.

(67) Reiman R, Gerard C, Campbell IL, Barnum SR. Disruption of the C5a receptor gene fails to protect against experimental allergic encephalomyelitis. Eur J Immunol 2002; 32(4):1157-1163.

(68) van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, Lodder IJ, Dopp EA, Dijkstra CD. Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. J Neuroimmunol 1996; 70(2):145-152.

(69) Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. J Immunol 2002; 168(1):458-465.

(70) Papp K, Szekeres Z, Terenyi N, Isaak A, Erdei A, Prechl J. On-chip complement activation adds an extra dimension to antigen microarrays. Mol Cell Proteomics 2007; 6(1):133-140.

(71) Oldstone MB, Dixon FJ. Immunohistochemical study of allergic encephalomyelitis. Am J Pathol 1968; 52(2):251-263.

(72) Pabst H, Day NK, Gewurz H, Good RA. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis with cobra venom factor. Proc Soc Exp Biol Med 1971; 136(2):555-560.

(73) Morgan BP, Gasque P, Singhrao S, Piddlesden SJ. The role of complement in disorders of the nervous system. Immunopharmacology 1997; 38(1-2):43-50.

(74) Szalai AJ, Hu X, Adams JE, Barnum SR. Complement in experimental autoimmune encephalomyelitis revisited: C3 is required for development of maximal disease. Mol Immunol 2007; 44(12):3132-3136.

(75) Boos LA, Szalai AJ, Barnum SR. Murine complement C4 is not required for experimental autoimmune encephalomyelitis. Glia 2005; 49(1):158-160.

(76) Weerth SH, Rus H, Shin ML, Raine CS. Complement C5 in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) facilitates remyelination and prevents gliosis. Am J Pathol 2003; 163(3):1069-1080.

(77) Smith SS, Ludwig M, Wohler JE, Bullard DC, Szalai AJ, Barnum SR. Deletion of both ICAM-1 and C3 enhances severity of experimental autoimmune encephalomyelitis compared to C3-deficient mice. Neurosci Lett 2008; 442(2):158-160.

(78) Tran GT, Hodgkinson SJ, Carter N, Killingsworth M, Spicer ST, Hall BM. Attenuation of experimental allergic encephalomyelitis in complement component 6-deficient rats is associated with reduced complement C9 deposition, P-selectin expression, and cellular infiltrate in spinal cords. J Immunol 2002; 168(9):4293-4300.

(79) Clausen C, Munoz J, Bergman RK. Lymphocytosis and histamine sensitization of mice by fractions from Bordetella pertussis. J Bacteriol 1968; 96(5):1484-1487.

(80) Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. J Immunol 1981; 127(4):1420-1423.

(81) Levine S, Hoenig EM, Kies MW. Allergic encephalomyelitis: immunologically specific inhibition of cellular passive transfer by encephalitogenic basic proteins. Clin Exp Immunol 1970; 6(4):503-517.

(82) Furlan R, Brambilla E, Ruffini F, Poliani PL, Bergami A, Marconi PC et al. Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. J Immunol 2001; 167(3):1821-1829.

(83) Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). Allergol Int 2008; 57(2):115-120.

(84) Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. Nat Immunol 2007; 8(4):345-350.

(85) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. J Immunol 2007; 178(12):7525-7529.

(86) Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. Nat Med 2008; 14(3):337-342.

(87) Peng Q, Li K, Patel H, Sacks SH, Zhou W. Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. J Immunol 2006; 176(6):3330-3341.

(88) Reis ES, Barbuto JA, Kohl J, Isaac L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. Mol Immunol 2008; 45(7):1952-1962.

(89) Zhou W, Patel H, Li K, Peng Q, Villiers MB, Sacks SH. Macrophages from C3-deficient mice have impaired potency to stimulate alloreactive T cells. Blood 2006; 107(6):2461-2469.

(90) Ghannam A, Pernollet M, Fauquert JL, Monnier N, Ponard D, Villiers MB et al. Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. J Immunol 2008; 181(7):5158-5166.

(91) Johns TG, Bernard CC. Binding of complement component Clq to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel mechanism for regulating CNS inflammation. Mol Immunol 1997; 34(1):33-38.

(92) Vanguri P, Koski CL, Silverman B, Shin ML. Complement activation by isolated myelin: activation of the classical pathway in the absence of myelin-specific antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79(10):3290-3294.

(93) Scolding NJ, Morgan BP, Compston DA. The expression of complement regulatory proteins by adult human oligodendrocytes. J Neuroimmunol 1998; 84(1):69-75.

(94) Griffiths MR, Neal JW, Fontaine M, Das T, Gasque P. Complement factor H, a marker of self protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2009; 182(7):4368-4377.

(95) Tegla CA, Cudrici C, Rus V, Ito T, Vlaicu S, Singh A et al. Neuroprotective effects of the complement terminal pathway during demyelination: implications for oligodendrocyte survival. J Neuroimmunol 2009; 213(1-2):3-11.

(96) Stahel PF, Nadal D, Pfister HW, Paradisis PM, Barnum SR. Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. Lancet 1997; 349(9069):1886-1887.

(97) Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. Immunol Today 1996; 17(10):461-466.

(98) Kerekes K, Prechl J, Bajtay Z, Jozsi M, Erdei A. 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):1923-1930.

(99) Fang C, Zhang X, Miwa T, Song WC. Complement promotes the development of inflammatory T-helper 17 cells through synergistic interaction with Toll-like receptor signaling and interleukin-6 production. Blood 2009; 114(5):1005-1015.

(100) Cannella B, Cross AH, Raine CS. Adhesion-related molecules in the central nervous system. Upregulation correlates with inflammatory cell influx during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. Lab Invest 1991; 65(1):23-31.

(101) Coisne C, Lyck R, Engelhardt B. Therapeutic targeting of leukocyte trafficking across the blood-brain barrier. Inflamm Allergy Drug Targets 2007; 6(4):210-222.

(102) Coisne C, Mao W, Engelhardt B. Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis. J Immunol 2009; 182(10):5909-5913.

(103) Gadjeva M, Verschoor A, Brockman MA, Jezak H, Shen LM, Knipe DM et al. Macrophage-derived complement component C4 can restore humoral immunity in C4-deficient mice. J Immunol 2002; 169(10):5489-5495.

(104) Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. J Exp Med 1996; 184(6):2271-2278.

(105) Urich E, Gutcher I, Prinz M, Becher B. Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(49):18697-18702.

(106) Li Q, Huang D, Nacion K, Bu H, Lin F. Augmenting DAF levels in vivo ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. Mol immunol 2009, 46(15):2885-2891.

(107) Bokisch VA, Müller-Eberhard HJ. Anaphylatoxininactivator of human plasma: its isolation and characterisation as a carboxypeptidase. J Clin Invest 1970, 94(12):2427–2436.

(108) ChenM, Daha MR, Kallenberg CG. The complement system in systemic autoimmune disease. J Autoimm (in press)

(109) Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn B, Schlagwein N, Gijlswijk-Jassen D, Stahl GL, Matsushita M, Fujita T, Kooten C, Daha MR. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. J Am Soc Nephrol 2006, 17: 1724-1734.

(110) Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Iwasaki H. Activation of the lectin complement pathway in Henoch-Schönlein purpura nephritis, Am J Kidney Dis 2005, (45):295–302.

(111) Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway int he pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. Am J Pathol 2007, 170(1): 52-64.

(112) Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patiens with multiple sclerosis. J Clin Invest 2006, 116(12):3252-3257.

(113) McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis guidelines from the International Panel ont he diagnostic of multiple sclerosis. Ann Neurol 2001, 50(1):121-127.

(114) Papp K, Végh P, Miklós K, Németh J, Rásky K, Péterfy F, Erdei A, Prechl J. Detection of complement activation on antigen microarrays generates functional antibody profiles and helps characterization of disease-associated changes of the antibody repertoire. J Immunol 2008, 181(11):8162-8169

(115) PappK, Szekeres Zs, Erdei A, Prechl J. Two-dimensional immune profiles improve antigen microarray-based characterizationof humoral immunity. Proteomics 2008, 8(14):2840-2848

(116) Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. 2007 Nat Rev Immunol 7(1):9-18.

(117) Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS, Medof ME. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatoryand survival signals to naive CD4+ T cells. 2008 Immunity, 28(3):425-435.

(118) Lalli PN, Strainic MG, Yang M, Lin F, Medof ME, Heeger PS. Locally produced C5a binds to Tcell-expessed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. 2008 Blood, 112(5):1759-1766

(119) Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. 2007, Immunol Rev, 219: 157-166

(120) Circolo A, Garnier G, Fukuda W, Wang X, Hidvegi T, Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE, Wetsel RA, Colten HR. Genetic disruption of the murine complement C3 promoter region generates deficient mice with extrahepatic expression of C3 mRNA. 1999, Immunopharmacology, 42(1-3):135-149.

Összefoglalás

A Sclerosis Multiplex (SM) a leggyakoribb gyulladásos, demyelinizációval járó központi idegrendszeri betegség. A fehér állományba belépő limfociták és más gyulladásos fenotípusú sejtek, valamint az aktiválódó komplementrendszer okozza a demyelinizációt és később az axonok károsodását. A feltételezések szerint mind a Sclerosis Multiplexben, mind annak egér modelljében - Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE Kísérletes Autoimmun Ecephalomyelitis) - a $CD4^+$ T-sejtek indítják el ill. szabályozzák a gyulladást, azonban a betegség patomechanizmusa pontosan még nem ismert. Munkánk során elsősorban a komplementrendszer szerepét vizsgáltuk, egér-modellt alkalmazva.

A nőstény C57BL/6 egereket és ugyanilyen genetikai hátterű C3 KO állatokat myelin oligodendrocita glikoprotein eredetű peptiddel (MOG 35-55) és adjuvánsokkal oltottunk. Továbbá immunizáltunk az EAE-re sokkal érzékenyebb SJL/J egereket is, proteolipoprotein eredetű peptiddel (PLP 139-151), hasonlóan a C57BL/6 állatokhoz. Ismert, hogy a két törzs különbözik a betegség tüneteiben, ui. míg a C57BL/6 állatokban monofázisos, krónikus betegség alakul ki, addig az SJL/J törzsre visszatérő súlyosbodások és javulások jellemzőek. A betegség indukciójának időpontjában az átmeneti komplementdepléciót kobraméreg faktorral (cobra venom factor, CVF) értük el, ezzel időszakosan csökkentettük a C3-szintet, ami a kezelés után egy héttel már visszaállt a normális szintre.

Eredményeink alapján a CVF-fel dekomplementált C57BL/6 állatok csoportjában a betegség első tünetei szignifikánsan később jelennek meg, és a betegség súlyosságára utaló átlagpontszámok a későbbiekben is alacsonyabbak maradtak az intakt komplementaktivitással rendelkező csoporttal összehasonlítva. C3 KO állatokat oltva azt tapasztaltuk, hogy a tünetek ugyan hamarabb jelentkeznek, de később a komplementhiányos csoport átlagpontjai minden esetben a vad típusú csoport értékei alatt maradt. Az SJL/J törzset vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a CVF kezelés elnyomja a visszatérő relapszusok kialakulását, és a betegség rosszabbodását, továbbá az állatok túlélése is megnőtt a dekomplementált csoportban.

Megvizsgáltuk az állatok nyirokcsomójából izolált T-limfociták proliferációs képességét is, *in vitro*. Eredményeink szerint a CVF-fel kezelt állatokból származó T-sejtek szignifikánsan kisebb mértékben aktiválhatók, mint az intakt komplementrendszerrel rendelkező állatok sejtjei. Kísérleteinkben a tanszékünkön kifejlesztett mikroarray segítségével vizsgáltuk a MOG-specifikus ellenanyagszintet és az antitestek komplementaktiváló képességét. Csökkent ellenanyag-koncentrációt és komplementaktivációt detektáltunk a CVF-kezelt állatokból származó savóban. Szövettani metszeteken követve a betegség lefolyását azt találtuk, hogy a központi idegrendszerbe belépő $CD4^+$ T-limfociták száma kevesebb volt a CVF-kezelt állatokban, mint a kezeletlenekben.

Összegezve, eredményeink arra utalnak, hogy a komplementrendszer befolyásolja az EAE patogenezisét, mivel a komplementaktivitás hiánya a betegség indukciójakor késlelteti a tünetek megjelenését, továbbá csökkenti a később megjelenő, MOG-specifikus T-sejtek aktivációját, a MOG-specifikus ellenanyagok megjelenését és a központi idegrendszerbebelépő $CD4^+$ T-limfociták számát.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is the most common inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system. The histopathologic hallmarks of the disease include focal infiltration of lymphocytes and other inflammatory cells into the white matter causing demyelination and axonal damage. In both MS and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), it is thought that infiltrating $CD4^+$ T cells initiate an inflammatory process and collect other immune effectors to mediate tissue damage. However, the pathophysiology of the disease remains unclear. We have focused on the role of the complement system in the pathomechanism of the disease.

Transiently C3-deficient and non-treated female C57BL/6 mice were immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide 35-55 emulsified in complete Freund's adjuvant and pertussis toxin. We have also investigated SJL/J mice injected with a peptide derived from proteolipoprotein (PLP 139-151). This strain is more sensitive for EAE, than C57BL/6 and shows relapsing-remitting type of the disease, in contrast to C57BL/6 mice which develops the acute, monophasic type of EAE. To achieve the transient, very low complement level at the time of induction of the disease, cobra venom factor (CVF) had been injected into the animals before the induction of EAE.

Our results show that in C57BL/6 animals with transiently depleted complement at the onset of the disease, development of EAE is significantly delayed, and severity is lower, compared to animals with normal complement activity. EAE induced in C3 KO animals showed earlier symptomes, but later less severe disease, than wild type mice. CVF administration was found to inhibit the relapses of EAE in SJL/J mice, and reduced mortality. We investigated the in vitro response of antigen-specific T cells isolated from the lymph nodes of MOG-immunized animals at the onset of the symptomes. Our results show that the proliferative capacity of antigen-specific T cells derived from CVF treated animals is significantly lower than in the control group. With a protein microarray system developed in our department we have detected lower MOG-specific antibody levels in the sera of CVF-treated mice. Moreover, we found lower numbers of $CD4^+$ T cells in the central nervous system of CVF-treated mice.

Our data prove, that complement has a modulatory effect in the pathogenesis of EAE. We have shown that lack of complement at the time of induction delays the onset of the disease and modulates the activity of MOG-specific T cells, reduces the level of MOG-specific antibodies and the number of infiltrating $CD4^+$ T cells in the central nervous system.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszenetet mondani Erdei Annának, témavezetőmnek, amiért lehetővé tette, hogy az Immunológiai Tanszéken dolgozhassak, és a rengeteg szakmai támogatásért.

Hálás köszönet Prechl Józsefnek, a munkám során nyújtott sok támogatásért és segítségért. Papp Krisztiánnak a AbC chipen végzett mérésekért. Oláh Imrének és Nagy Nándornak az immunhisztokémiai vizsgálatokért. Kármán Józsefnek és Fazekas Györgynek az EAE-vel kapcsolatos tanácsaiért.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk minden tagjának, kiemelten Mikesy Árpádnak és Greff Zsuzsának és Pásztor Mártának a technikai segítségükért.

Saját közlemények jegyzéke

Cikkek, referált folyóiratban

Terényi N, Nagy N, Papp K, Prechl J, Oláh I, Erdei A.
Transient decomplementation of mice delays onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and impairs MOG-specific T cell response and autoantibody production.
Mol Immunol. 2009 Feb 6., IF: 3,555

Papp K., Szekeres Zs., Terényi N., Isaák A., Erdei A. , Prechl J.
On-chip complement activation adds an extra dimension to antigen microarrays.
Mol Cell Proteomics. 2006 Oct 27, IF: 9,4

Terényi N., Prechl J., Erdei A.
The role of the complement system in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis.
Adv Exp Med Biol. 2006;586:177-88., IF: 0,66

Idézhető absztraktok

2006 16th European Congress of Immunology, Paris, France
Terényi N., Prechl J., Erdei A.
The effect of *in vivo* decomplementation in the mouse model of multiple sclerosis
Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, Hungary

2005 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary
Terényi N., Prechl J., Erdei A.
MOG peptide specific antibody response in the mouse model of multiple sclerosis shows no correlation with the severity of the disease