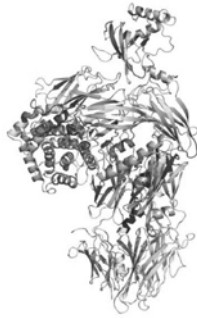


Doktori értekezés tézisei

**A C3 molekula szerepe
immunfolyamatokban;
szerkezeti és funkcionális vizsgálatok**



Papp Krisztián

Témavezető:

Prof. Erdei Anna D.Sc.

Biológiai Doktori Iskola

Immunológia doktori program

Programvezető: Prof. Erdei Anna D.Sc.

ELTE TTK, Biológiai Intézet

Immunológiai Tanszék, Budapest, 2008

Bevezetés

A veleszületett immunrendszernek szerves komponense a komplement-kaszád, mely azonnali védelmet nyújt számtalan kórokozóval szemben. A komplementrendszer több mint 30 fehérje alkotja, melyek összehangolt működésének eredményeként alakul ki ez a hatékony rendszer. A kaszkád aktiválódása a klasszikus, a lektin-indukált és az alternatív úton indulhat el, és a folyamatban szerin proteázok vesznek részt. A három útvonal a harmadik komplementkomponens, a C3 hasításakor egyesül, és ezután egységes útként folytatódva alakul ki a membránkárosító komplex (MAC). Az aktivációnak nem csak a kórokozó MAC általi elpusztítása az egyedüli következménye. A C3 molekula nagyobbik fragmentumai számos fontos biológiai hatást közvetítenek a különböző sejtek C3-receptoraihoz való kötődés révén, így pl. összekötő kapcsolatot képeznek az adaptív és a természetes immunválasz között, növelik az

antigéprezentáció hatékonyságát. A C3a fragmentum kemotaktikus hatása révén a kórokozó behatolási helyére vonzza az effektor funkcióért felelős sejteket, segítve ezzel a hatékony immunválasz kialakulását. A C3 fragmentumoknak fontos szerep jut az immunkomplexek eltávolításában is. A C3 molekula, ill. aktivációs fragmentumai tehát kulcsszerepet játszanak a komplementrendszer működésében, így szerkezetének és más molekulákkal való kapcsolatának tisztázása feltétlenül szükséges a kaszkádrendszer működésének és funkciójának megismeréséhez. A komplementrendszer „kétélű kardnak” is nevezhető, mivel egyrészt nagyon hatékony védekező mechanizmus, de éppen ezért, ha rosszul működik komoly károkat okozhat a szervezetben, - mint ahogy ez számos autoimmun betegség patomechanizmusában megnyilvánul. A komplementrendszer vizsgálata rutinszerű a diagnosztikai laboratóriumokban, de a jelenleg alkalmazott módszerekkel általában csupán a

komplementaktiváció lezajlása detektálható, de nem nyújtanak felvilágosítást a komplementaktiváció okára.

Célkitűzések

1. A emberi komplementrendszer jobb megismeréséhez szükség van megfelelő állatmodellekre, és az egyes komponensekkel reagáló, jól karakterizált ellenanyagokra. Ezért célul tűztük ki az egér C3 molekulát és fragmentumait (C3b, C3a) felismerő monoklonális ellenanyagok előállítását és karakterizálását.

2. A komplementaktiváció központi reakciójának tekinthető C3-C3b átalakulás vizsgálata fontos a rendszer működésének jobb megértése szempontjából, ezért a molekulában lezajló konformációs változásokat tömegspektrométerrel, H/D kicserélődés módszerével vizsgáltuk.

3. Célunk volt annak feltárása is, hogy a szervezet saját sejtjeihez kovalensen kötődő C3b fragmentumoknak mi a sorsa és funkciója.

4. Tervbe vettük továbbá olyan új diagnosztikai eljárás kidolgozását, mellyel nem csupán a kóros komplementaktiváció mutatható ki, hanem az aktivációt okozó autoantigén is meghatározható.

Alkalmazott módszerek

- Tömegspektrometria
- Citofluorimetria
- ELISA
- Western-blot
- Hemolítikus teszt
- Konfokális mikroszkópia
- SDS poliakrilamid gélelektroforézis
- Immun-elektronmikroszkópia
- Protein chip technológia

Eredmények:

- 1.** Munkacsoportunk az egér komplementrendszerének C3-as komponensével ill. annak fragmentumaival reagáló monoklonális ellenanyagokat állított elő. Az antitesteket széleskörűen jellemeztük ELISA, FACS, Westernblott és szövetfestés módszerrel, így ezek a legkülönbözőbb kísérletekhez használhatók.
- 2.** A C3 molekula aktivációjakor bekövetkező konformációs változások nyomon követése feltétlenül szükséges a komplementfehérje funkciójának megértéséhez. A C3 és C3b molekulák röntgenkristallográfiás szerkezete csak az utóbbi évben vált elérhetővé. Mi ezt a statikus képet gazdagítottuk azzal, hogy a molekula dinamikus mozgásáról képet formáló H/D kicserélődés segítségével vizsgáltuk a konformációs változásokat, megerősítve az időközben megjelent röntgenkristallográfiás eredményeket.

3. A C3b fragmentum nem csak kórokozókhoz kötődhet kovalensen, hanem az antigénprezentáló sejtek felszínére is lerakódik fiziológias körülmények között, így segítve az antigén-specifikus T-sejtek proliferációját. Munkánk során követtük a sejtmembránhoz kötődő C3-fragmentumok sorsát, és kimutattuk, hogy ezek a molekulák exosomák felszínén hagyják el a sejtet. Bizonyítottuk azt is, hogy ezen kis vezikulumok fokozzák az antigénbemutató hatékonyságát naiv APC jelenlétében.

4. A komplementrendszer aktiválódása komoly károkat okozhat autoimmun folyamatok során. Korábban nem volt lehetőség arra, hogy párhuzamosan sok, különböző specificitású autoantitest komplementaktiváló képességét mérjük. Munkacsoportunk továbbfejlesztette az egyre nagyobb tért hódító fehérje chip technikát, és így lehetőségünk van arra, hogy egyidejűleg határozzuk meg az adott antigénnel specifikusan reagáló autoantitestek mennyiségét és komplementaktiváló képességét. Így reményeink

szerint egy hatékony technikával gazdagítjuk az autoimmun betegségek diagnózisának tárházát.

Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények

1. Dimitrios Mastellos, József Prechl, Glória László, Krisztián Papp, Eszter Oláh, Emelia Argyropoulos, Silvia Franchini, Ruxandra Tudoran, Maciej Markiewski, John D. Lambris, Anna Erdei: **“Novel monoclonal antibodies against mouse C3 interfering with complement activation: description of fine specificity and applications to various immunoassays”** Molecular Immunology 2004. 40:1213-21. (IF: 3.20)

2. Krisztián Papp, Zsuzsanna Szekeres, Nóra Terenyi, Andrea Isaák, Anna Erdei, József Prechl: **“On-chip complement activation adds an extra dimension to antigen microarrays”** Molecular & Cellular Proteomics 2007. 6:133-140. (IF:9.62)

3. Krisztián Papp, Péter Végh, József Prechl, Krisztina Kerekes, János Kovács, György Csikós, Zsuzsa Bajtay, Anna Erdei: **“B lymphocytes and macrophages release cell membrane deposited C3-fragments on exosomes with T cell response-enhancing capacity”** Molecular Immunology 2008. 45:2343–2351 (IF:4.77)

4. Krisztián Papp, Zsuzsanna Szekeres, Anna Erdei, József Prechl: **“Two-dimensional immune profiles improve antigen microarray-based characterization of humoral immunity”** [submitted]

5. Michael C. Schuster, Daniel Ricklin, Krisztián Papp, Kathleen S. Molnar, Stephen J. Coales, Yoshitomo Hamuro, Georgia Sfyroera, Hui Chen, Michael S. Winters, John D. Lambris: **“Dynamic structural changes during complement C3 activation analyzed by**

hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry” Molecular Immunology 2008.
(IF:4.77)

Egyébb publikáció

József Prechl, Eszter Molnár, Zsuzsanna Szekeres, Andrea Isaák, Krisztián Papp, Péter Balogh, Anna Erdei. **“Murine CR1/2 targeted antigenized single-chain antibody fragments induce transient low affinity antibodies and negatively influence an ongoing immune response”** Advances in Experimental Medicine and Biology, Current Topics in Innate Immunity, Springer New York 2007 vol. 598.

Szabadalom

Prechl József, Papp Krisztián: **“Measurement of complement activation products on antigen arrays”** Publication number: WO2008/007159

Előadás konferencián: 2db

Absztrakt nemzetközi konferencián: 13db

Absztrakt magyar konferencián: 7db