

A H faktor fehérjecsald tagjai és a C3b komplement fehérje közötti kölcsönhatások vizsgálata

Készítette:

Haskó Zsolt

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia BSc, II. évfolyamos hallgató



Témavezető: Dr. Szakács Dávid
tudományos munkatárs
ELTE TTK Immunológiai Tanszék

37. OTDK Biológia Szekció

Tartalomjegyzék

Összefoglaló.....	3
1. Bevezetés	4
2. Célkitűzések	11
3. Anyag és módszer	12
4. Eredmények és megvitatásuk.....	15
5. További tervek	20
6. Köszönetnyilvánítás	21
7. Irodalomjegyzék	22

Összefoglaló

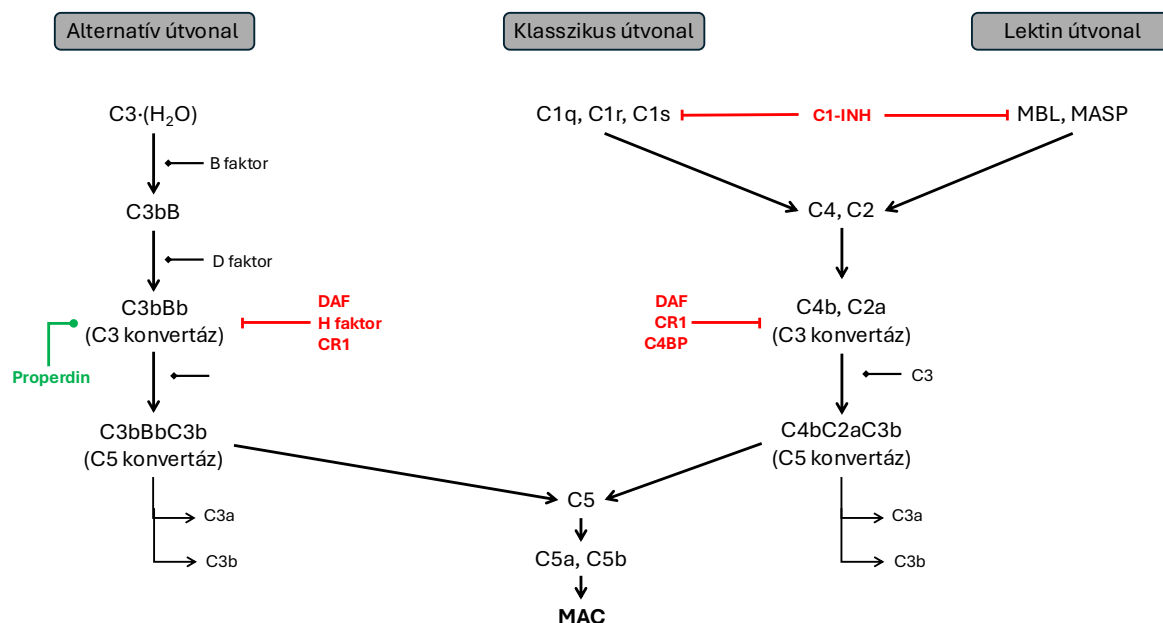
A komplementrendszer a veleszületett immunitás központi szereplője, ami nélkülözhetetlen a kórokozók elleni védelemben, vagy az immunkomplexek és apoptotikus sejtek eltávolításában. A komplement egy közel 50 plazmafehérjéből, sejtfelszíni receptorból és regulátorból álló kaszkád, amely három különböző útvonalon, a klasszikus, lektin és alternatív úton aktiválódhat. A három útvonal egy közös terminális útba torkollik, amelynek fő szereplői a C3 és C5 komplement fehérjék. A terminális út felel az effektor funkciók megjelenéséért, vagyis a gyulladásért, immunsejtek toborzásáért és aktiválásáért, valamint bizonyos kórokozók líziséért.

Az alternatív út legfontosabb szabályozója a H-faktor (FH), ami a komplementrendszer működésében központi szerepet betöltő C3b fehérjéhez kötődve gátolja a komplement aktivációt, hasonlóan a FH-val közös génről átíródó FHL-1 fehérjéhez. A FH fehérjecsaládba tartozik még öt fehérje (FHR 1-5), amelyek a FH-hoz hasonló ligandumokhoz, például a C3b-hez kötődnek, de a komplement aktivitást gátló doménjeik nincsenek. Az FHR-ek szerepe még nem kellően tisztázott. Irodalmi adatok és kutatócsoportunk megfigyelései alapján elősegítik a komplement aktivációt egyrészt a FH leszorítása, másrészt a komplement aktivitáshoz nélkülözhetetlen C3 konvertáz komplexek létrehozása és/vagy stabilizálása révén.

ELISA kísérletekben vizsgáltuk, hogy az FHR fehérjék C3b kötésének hatékonysága mutat-e összefüggést kutatócsoportunk más kísérletekben kapott eredményeivel, amelyek arra utalnak, hogy bizonyos FHR fehérjék platformként szolgálnak C3 konvertáz komplexek kialakulásához.

1. Bevezetés

A komplementrendszer a veleszületett immunitás elengedhetetlen szereplője, elsődleges védelmi vonalként funkcionál. Meghatározó szerepe van a kórokozók elleni védelemben, az immunkomplexek és apoptotikus sejtek biztonságos és hatékony eltávolításában, és az immunhomeosztázis fenntartásában. A komplement egy rendkívül összetett, közel 50 plazmában oldott vagy membrán-asszociált fehérjéből és sejtfelszíni receptorból álló kaszkádrendszer^{1,2}. A rendszer komponensei inaktív, nyugalmi állapotban vannak, aktivációjukat különböző veszélyre utaló molekuláris szignálok válthatják ki. A komplementrendszer aktiválódása esetén a komplement komponensek együttműködve képesek megjelölni, opsonizálni a szervezetbe hatoló kórokozókat és gyulladásos folyamatokat indítani. A komplement aktiváció során keletkező anafilatoxikus hatású peptidek immunsejteket toboroznak a komplement aktiváció helyszínére, és részt vesznek ezek aktiválásában is. A komplement különböző veszély szignálok hatására három különböző útvonalon aktiválódhat, ezek a klasszikus, a lektin és az alternatív útvonalak **(1.ábra)**. Mindhárom útvonal egy közös, terminális útvonalba torkollik, amelynek fő szereplői C3 és C5 nevű komplement fehérjék. Ez az útvonal felelős az effektor funkciók megjelenéséért, tehát a gyulladásért és az immunsejtek toborzásáért és aktiválásáért.

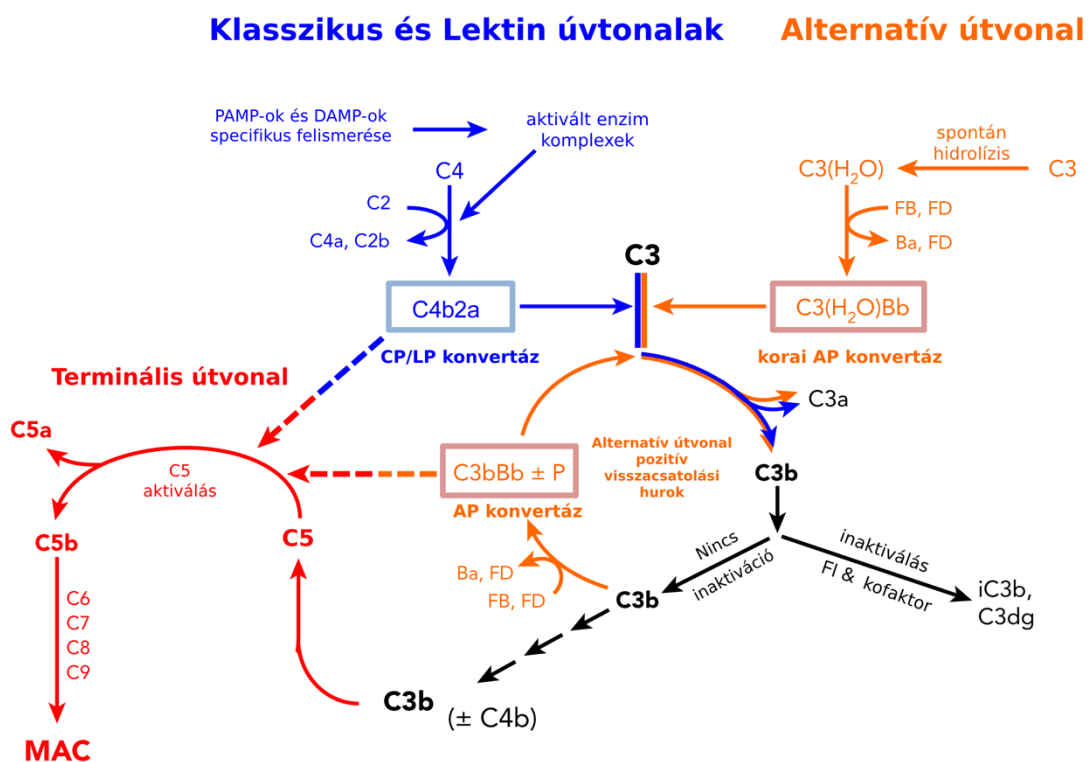


1. ábra A komplement aktivációs útvonalak sematikus ábrája. Az útvonalakat pozitívan illetve negatívan szabályozó faktorok zöld/piros színjelzéssel vannak jelölve¹.

A klasszikus útvonal elsősorban IgG vagy IgM tartalmú immunkomplexek révén aktiválódik. Az immunkomplexeket a C1 fehérjekomplex ismeri fel. A C1 komplex C1q mintázatfelismerő molekulából és a hozzá kapcsolódó C1r és C1s, inaktív állapotban lévő szerin proteáz molekulákból áll. Az útvonal ezen molekulakomplex aktiválódásával indul el. A C1s és C1r molekulák a C1q immunkomplexhez való kötődését követően aktiválódnak. Az aktív C1s képes C4 és C2 komplement komponensek hasítására. A C4 hasítás eredményeképpen C4a és C4b fragmentumok keletkeznek. A C4b egy, a hasítást követően a molekula felszínére kerülő reaktív tioészter csoporton keresztül képes a felszínre kovalensen lerakódni és C2 fehérjét kötni, amit a C1s szintén elhasít. A keletkező C2a fragmentum a C4b-hez kötve marad, ezáltal létrejön a klasszikus és lektin útvonalakra jellemző C3 konvertáz komplex (C4bC2a). A C1q nem csak immunkomplexben lévő immunglobulinokhoz, hanem más molekulákhoz, például pentraxinokhoz, extracelluláris mátrix fehérjékhez, vagy éppen apoptotikus/nekrotikus sejtekhez, illetve bizonyos mikrobiális felszínekhez is kötődik¹⁻⁴. A lektin útvonal aktiválódását bizonyos mikrobiális felszínekre jellemző szénhidrátcsoportok vagy acetilált molekulák váltják ki³. Ezeket a csoportokat különböző mintázatfelismerő molekulák, mint a mannózkötő lektin (MBL) vagy a fikolinok ismerik fel. Ezek a felismerő molekulák is inaktív állapotú szerin proteázokkal, az MBL-asszociált szerin proteázokkal (MASP) vannak komplexben. A mintázatfelismerő molekula felszínhez való kapcsolódásakor a MASP-1 és MASP-2 enzimek aktiválódnak, amelyek a klasszikus útvonalhoz hasonlóan képesek C4 és C2 aktiválásra és C4bC2a C3 konvertáz komplexek létrehozására^{1,2,5}.

Az alternatív útvonal működése aktív C3 konvertázok jelenlétén alapul, és kettős szereppel bír: felerősíti a komplement választ egy pozitív visszacsatolós mechanizmuson keresztül, valamint folyamatos „immuno-surveillance” aktivitást biztosít **(2.ábra)**. A C3 konvertáz komplex a C3 központi komplement fehérjét hasítja. A keletkező fragmentumok közül a C3a anafilatoxikus hatású, míg a C3b a C4b-hez hasonlóan egy reaktív tioészter csoporton keresztül képes kovalensen rögzülni a komplementrendszer aktiválódását kiváltó felszínen. A C3b egyrészt fontos opszonin, másrészt az alternatív útvonalra jellemző C3 konvertáz komplex alapjául szolgál. A C3b inaktív B-faktort (FB) köt a plazmából, amit ebben az állapotában a D-faktor (FD) elhasít és ezáltal aktivál. A létrejövő C3bBb C3 konvertáz további C3 molekulákat hasít, aminek eredményeképpen egyre több C3 konvertáz keletkezik. Az alternatív út tehát nagymértékben képes felerősíteni a komplement aktivációt akkor is, ha a rendszer aktiválódása eredetileg a klasszikus vagy a lektin útvonalon keresztül következett be^{1,2,4} **(2.ábra)**.

Az alternatív útvonal a másik két útvonaltól eltérően folyamatos, alacsony szintű aktivitást mutat: folyamatosan teszteli a felszíneket („immuno-surveillance”), és intenzíven aktiválódik az olyan felszíneken, amelyeket nem védelmeznek a komplementrendszer gátlására képes szabályozó fehérjék (**2.ábra**). A vérben mindig jelen van kis mennyiségben a C3 egy olyan formája, aminek reaktív tioészter csoportja vízzel reagált, és ami a C3b-hez hasonló térszerkezetet vett fel (C3_{H2O}). A C3_{H2O} FB-t köt, amit a FD aktivál. Így létrejön a vérben keringő C3_{H2O}Bb C3 konvertáz, ami folyamatosan C3b molekulákat generál. A C3b kovalensen rögzülhet saját és nem saját, például bakteriális felszíneken. Az egészséges saját felszíneket különböző komplement szabályozó fehérjék védelmezik a komplementrendszer aktiválódásától, míg a nem-saját felszínek nem rendelkeznek ilyen védelemmel, ezért azokon a komplementrendszer hatékonyan aktiválódik a már bemutatott pozitív visszacsatolási mechanizmuson keresztül, és megjelennek a komplementrendszer effektor funkciói.



2. ábra A komplementrendszer működését bemutató részletesebb ábra. Az ábra jól szemlélteti az alternatív útvonal „immuno-surveillance” és pozitív visszacsatolási hurok funkcióit. Átvett és szerkesztett ábra, Mannes, M. et al. alapján⁶.

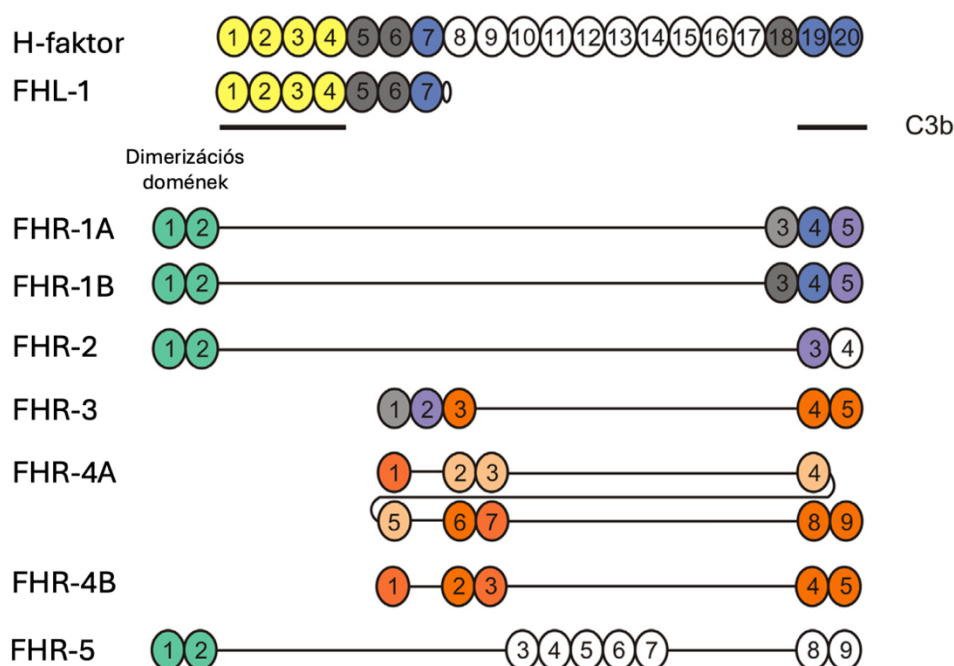
A komplementrendszer közös, terminális útvonala felel az effektor funkciók megjelenéséért, vagyis a gyulladásért és immunsejtek toborzásáért és aktiválásáért. A komplement aktiválódását kiváltó felszínen rögzült C3b, illetve annak bizonyos hasítási termékei fontos opsoninok,

amelyek segítik a megjelölt képletek (baktériumok, apoptotikus sejtek, immunkomplexek) fagocitózist.

A C3b-vel gazdagon borított felszíneken létrejönnek C5 konvertázok (C3bBbC3b és C4bC2aC3b), amelyek a C5 fehérjét hasítják. A keletkező C5a anafilatoxikus hatású, míg a C5b C6, C7, C8 és C9 fehérjéket köt, aminek eredményeképpen kialakul a C5b-9 komplex. A C5b-9 egy sejtmembránba rögzülő pórust képez („membrane attack complex – MAC”), amelynek kialakulása a célsejt líziséhez/oldódásához vezethet¹⁻³.

A komplementrendszer túlzott aktivációja egészséges saját szövetek károsodásához vezet, ezért működése több szintű és redundáns szabályozás alatt áll. Kutatócsoportunk az alternatív útvonal szabályozásában kulcsszerepet betöltő H-faktor és a vele rokon fehérjék tanulmányozásával foglalkozik.

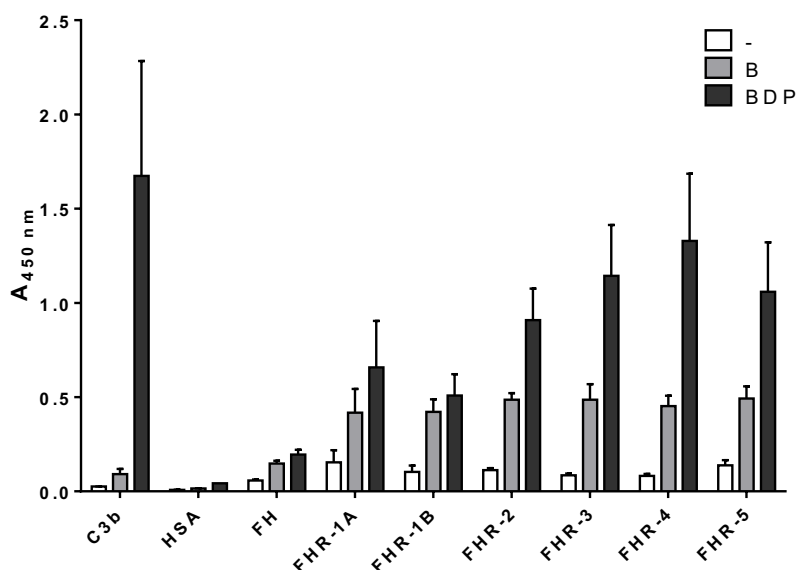
A H-faktor (FH) egy 150 kDa tömegű glikoprotein, ami a vérben kering, illetve különböző ligandumokon keresztül egészséges saját felszínekhez kötve is megtalálható **(3. ábra)**. A H-faktort 20 complement control protein (CCP) domén építi fel. A FH a C3b fehérjéhez kötődve gátolja a C3 konvertáz kialakulását, elősegíti a már kialakult konvertázok disszociációját, illetve kofaktora az I-faktor nevű szerin proteáznak, ami a C3b hasításán keresztül inaktíválja a C3 konvertázt. Hasonló a szerepe a FH-val közös génről átíródó FHL-1 (factor H-like protein 1) fehérjének is, ami a FH hét N-terminális doménjének felel meg **(3. ábra)**. A H-faktor és az FHL-1 négy N-terminális CCP doménje felelős a komplement gátló funkcióért³. A H-faktor fehérjecsaldba öt fehérje tartozik még: FHR 1-5 (factor H-related protein 1-5), amelyek a FH-hoz hasonló ligandumokhoz, mint például C3b-hez kötődnek, viszont nem tartalmazzák a FH komplement gátlásért felelős doménjeit **(3. ábra)**. Az FHR fehérjéket felépítő domének változó mértékű szekvencia hasonlóságot mutatnak a FH ligandumkötő doménjeivel^{3,7}. Minden FHR fehérje rendelkezik például C3b kötésért felelős doménekkel **(3. ábra)**. A H-faktor fehérjecsald tagjai főként a májban termelődnek, majd glikoziláció után a plazmában keringenek, nagymértékben eltérő koncentrációkban⁸. Az FHR-ek pontos szerepe még nem tisztázott. Különböző mutációik, illetve az átlagostól eltérő koncentrációjuk változatos, a komplementrendszer nem megfelelő működésére visszavezethető betegségekkel kapcsolt, ami arra utal, hogy releváns szerepük van a komplementrendszer finomszabályozásában.



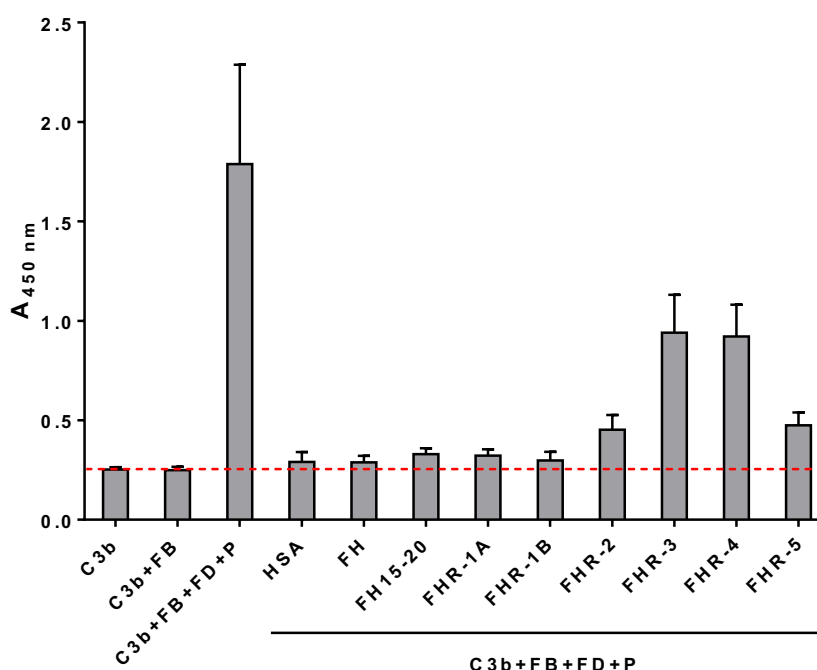
3. ábra A humán H-faktor fehérjecsalád sematikus ábrája. Minden fehérje 4-20 CCP (complement control protein) doménből áll. A domének változatos aminosav szekvencia hasonlóságot mutatnak egymással és a H-faktor fehérjével, ennek megfelelően vannak elhelyezve függőlegesen⁹.

Az FHR fehérjéknek szerepük lehet bizonyos mikrobiális kórokozók komplement-elkerülési mechanizmusai ellen való védekezésben is. Számos kórokozó esetében leírták, hogy a felszínükön a FH-t megkötő fehérjéket fejeznek ki, ezáltal a komplementrendszer effektor funkciói elleni védelmet kölcsönözve maguknak. Az FHR fehérjék szintén kötődnek sok ilyen ligandumhoz, és hatékonyan versengenek a H-faktorral az ezen ligandumokhoz való kötéstért. Az FHR-ek komplement-gátló domének híján a mikrobiális FH-ligandumokhoz kötődve csökkentik a mikroba védettségét, vagyis fokozzák az antimikrobiális komplementválasz hatékonyságát. Ilyen kórokozói mechanizmusra példa a *Borrelia* genus baktériumainak az OspE (outer surface protein E) fehérjéje, amely képes FH-t és bizonyos FHR-eket is kötni¹⁰⁻¹², ezt a fehérjét a tanszéken rekombináns formában előállítottuk és vizsgáljuk hogy képesek-e az FHR-ek leszorítani a FH-t és így fokozni a komplement választ.

Kutatócsoportunk eredményei alapján az FHR fehérjék más módon is elősegíthetik a komplement aktivitást. Szilárd felszínen rögzített FHR fehérjékhez C3 konvertáz komponenseket adva stabil, aktív C3 konvertázok jönnek létre **(4. ábra)** **(5. ábra)**. Ez arra utal, hogy az FHR fehérjék mintegy platformként szolgálhatnak a C3 konvertázok kialakulásához. Ezt azt jelenti, hogy az FHR fehérjék nem csak a FH leszorításán, vagyis a komplement gátlás gátlásán keresztül segítik elő a komplementrendszer aktivitását.



4. ábra C3 konvertázok létrejötte immobilizált FHR fehérjéken. Szilárd felszínen FHR-ek voltak rögzítve (5 µg/ml), blokkolva DPBS-ben oldott 2%-os BSA oldattal 4°C-on egy éjszakán keresztül. Fehérje interakciós lépésben 20 µg/ml C3b volt hozzáadva, DPBS-ben oldva, 1 óráig inkubálva szobahőmérsékleten rázva. A konvertáz létrejöttéhez 2 µg/ml FB, 0.1 µg/ml FD és 4 µg/ml properdin volt hozzáadva NiCl₂-tartalmú pufferben, 1 órás inkubációs idővel 37°C-on. Kétlépcsős előhívás, először poliklonális kecske anti-FB-vel történt 1/1000 hígításban, majd szamar anti-kecske HRP 1/1000 hígításban. Az előhívás TMB peroxidáz szubsztráttal, a reakció leállítása kénsavval történt. Kontrollok: Csak FB (világos szürke oszlopok) vagy csak puffer (fehér oszlopok).



5. ábra Az immobilizált FHR-eken összeálló konvertázok aktivitásának kimutatása. Rögzített fehérjék: 5 µg/ml FHR, FH, HSA (human serum albumin), C3b, 1 óra, rázatás mellett szobahőmérsékleten. Blokkolás DPBS-ben oldott 2%-os BSA oldattal 4°C-on egy éjszakán keresztül. Fehérje interakciós lépésben 20 µg/ml C3b volt hozzáadva, DPBS-ben oldva, 1 óra, rázatás mellett szobahőmérsékleten. Konvertáz létrejöttéhez 2 µg/ml FB, 0.1 µg/ml FD, 4 µg/ml properdin volt hozzáadva NiCl₂-tartalmú pufferben 1 óra, 37°C. Ezt egy inkubációs lépés követte intakt C3 fehérjével 20 µg/ml koncentrációban 1 óra, 37°C. A mintákban keletkezett C3a peptid mennyisége Quidel C3a EIA kit-tel került meghatározásra. Negatív kontrollok: HSA, FH, FH fragmentumok, pozitív kontroll: C3b.

A kísérletekben az FHR-2, -3, -4 és -5 fehérjéken volt a legmagasabb a konvertázok kialakulására utaló FB-jel, és a mintákban keletkező C3a fragmentum mennyisége egyaránt. Vizsgálni kívántuk, hogy mi áll az FHR fehérjéknek a fent bemutatott funkcionális kísérletekben mutatott eltérő tulajdonságai hátterében. Mitől függ leginkább, hogy melyik FHR fehérje biztosít platformot stabil és aktív C3 konvertázok létrejöttéhez, és melyik nem?

2. Célkitűzések

Kutatómunkánk során ELISA alapú kísérletekkel és biolayer interferometry (BLI) módszerrel akartuk vizsgálni az FHR fehérjék általi C3b kötés affinitását, és ellenőrizni, hogy az FHR fehérjék között a funkcionális kísérletekben kapott különbségek magyarázhatók-e a C3b kötés hatékonyságának/affinitásának különbségeivel.

- Célunk volt az FHR fehérjék rögzítésével egy ELISA kísérletsorozatot elvégezni, amivel a C3b-vel való kölcsönhatást vizsgáltuk.
- Az előbb említett kísérletsorozat fordított felállású változatát is el akartuk végezni, annak érdekében, hogy feltárjuk vannak-e különbségek, ha C3b van rögzítve a lemezek felszínéhez.
- Cél volt emellett BLI kísérletek során a különböző FHR-ek és a C3b közötti kölcsönhatások kinetikai paramétereinek meghatározása, és ezek összehasonlítása a funkcionális és a kötődési ELISA kísérletek eredményeivel.

Az eredmények hozzájárulhatnak a komplementrendszer finom szabályozási mechanizmusainak megértéséhez, és új terápiás megközelítések alapját képezhetik bizonyos betegségek kezelésében.

3. Anyag és módszer

Kutatómunkánk során két fő módszert alkalmazva vizsgáltuk a kölcsönhatásokat. ELISA kísérleteket végeztem és bekapcsolódtam a tanszéken korábban megkezdett Biolayer interferometry kísérletekbe.

A biolayer interferometry alapú vizsgálatok célja molekuláris interakciók affinitásának és kinetikájának feltárása. Ezzel a módszerrel a kölcsönhatások asszociációs (k_{on}) és disszociációs (k_{off}) állandója, valamint az ezek hányadosaként megkapható egyensúlyi disszociációs állandója ($K_D = k_{off}/k_{on}$) meghatározása lehetséges. A BLI egy optikai módszer. A kísérlet során az egyik fehérjét (ligandum) a bioszenzor biokompatibilis rétegéhez rögzítjük. A készülék fehér fényt bocsát a bioszenzorba, ami visszaverődik a szenzor belső referencia rétegről, illetve a biokompatibilis rétegről. A két különböző rétegről visszaverődő, adott hullámhosszú fénysugarak a detektorig tartó úton interferálnak egymással. A készülék a detektorba visszajutó fény spektrális összetételét vizsgálja. A kölcsönhatás-mérés során a bioszenzort a másik fehérjét (analit) tartalmazó oldatba mártjuk. A szenzoron rögzített ligandumhoz való analit kötés miatt megváltozik a biokompatibilis réteg fényvisszaverő tulajdonsága és végső soron pedig a detektorba jutó fény spektrális összetétele. Ezt követően a szenzort üres pufferbe mártva követhető az analit disszociációja, aminek következtében a mért értékek visszatérnek az alapvonalra. A mérés során kapott szenzogram adataiból meghatározhatók a kölcsönhatás kinetikai paraméterei¹³.

A kísérletek során egy Pall (később Sartorius) Octet K2-es, kétcsatornás műszeren dolgoztunk AR2G bioszenzort használva, amelyre a fehérjéken amin csoportokon keresztül kovalensen rögzítettük a fehérjét.

ELISA alapú kísérletekben két különböző felállásban végeztünk vizsgálatokat, az első esetben FHR fehérjét rögzítettünk a lemez felszínéhez 5 µg/ml koncentrációjú oldatból, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, rázatás mellett. Minden lépés után 0.1% Tween-20 detergens tartalmazó PBS pufferrel mostuk a lemezt. Ezt egy blokkolási lépés követte, amellyel megelőzzük, hogy a későbbi lépésekben nem-specifikus módon fehérjék kössenek a lemez felszínéhez. Ehhez egy 30 mg/ml-es BSA (bovine serum albumin) oldatot használtunk fel, az előbbi mosó oldatban oldva. Az első kísérlet esetében ez a lépés mindig egy éjszakán keresztül tartott, viszont megállapítottuk, hogy nincs jelentős különbség nincs a hosszú és az 1 órás blokkolás között. A blokkolási lépés után egy C3b hígítási sort vittünk fel a lemezre (50, 20, 10, 5, 2, 0.5, 0.1 µg/ml koncentrációjú tagokban). Ez a lépés is 1 óráig tartott,

szobahőmérsékleten, rázatás mellett. Ezt a lépést az ellenanyag jelölés követte, amelyhez 5 mg/ml BSA-t tartalmazó mosópufferben 1/20 000 hígításban alkalmazott, tormaperoxidáz (horseradish peroxidase, HRP) enzimmel kapcsolt poliklonális kecske anti-C3 ellenanyagot használtunk 20 perces inkubációs idővel, szobahőmérsékleten, rázatás mellett. Az eredmények előhívásához TMB ELISA szubsztrátot használtunk 3 perces előhívási idővel, majd 2 M koncentrációjú H_2SO_4 hozzáadásával állítottuk le a reakciót. A leolvasást minden esetben Thermo Scientific Multiskan lemezleolvasóval végeztük, 450 nm és 620 nm (referencia) hullámhosszon. A kísérlet során Alfa1-antitripsint (A1AT) használtunk negatív kontrollként. Az eredmény 3 független kísérlet értékeinek átlagában van kifejezve, emellett a szórás (standard deviation) is fel van tüntetve hibaszólként az eredményt jelző grafikonokon **(6. ábra) (7. ábra) (8. ábra) (9. ábra)**. A kísérletsorozatot egy másik, kétlépéses ellenanyag jelöléssel is elvégeztük. Ennek során Quidel A304 (kecske anti-humán C3 antiszérum) és számar anti-kecske HRP (Southern Biotech) ellenanyagokat alkalmaztunk, mindkét ellenanyagot 1/2000 hígításban. A kísérletet háromszor végeztük el. A második kísérletsorozatban az FHL-1 fehérjét is rögzítettük a kísérletek elején, 5 μ g/ml koncentrációjú oldatból.

Az ezek után elvégzett kísérletsorozatokban fordított felállással végeztük a vizsgálatokat, tehát C3b-t rögzítettünk a lemez felszínéhez, és az interakciós lépésben FHR-ek hígítási sorait vittünk fel a lemezre. Nem állt rendelkezésünkre olyan ellenanyag, amivel ebben az elrendezésben az összes FHR molekulát meg tudtuk volna jelölni, ezért két külön kísérletsorozatot végeztünk. Mindkét esetben két ellenanyagot, jelöletlen elsődleges és HRP-kapcsolt másodlagos ellenanyagot használtunk. Az első kísérletsorozat során C3b-t rögzítettünk a lemezre 5 μ g/ml koncentrációjú oldatból, emellett pozitív és negatív kontrollokat is alkalmaztunk. Pozitív kontrollnak monomer C-reaktív proteint használtunk (mCRP, 5 μ g/ml, PBS + 20 mM-os EDTA oldatban). Negatív kontrollként A1AT-t (5 μ g/ml). A fehérjék immobilizálása 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, rázatás mellett zajlott. Minden lépés után a mosópuffer oldattal mostuk a lemezt. A blokkolási lépés a korábbiakkal megegyezett. A fehérje interakciós lépésben 5 különböző fehérjét használtunk fel: FH, FHR-1A, FHR-1B, FHL-1 és a FH 15-20 doménjeit tartalmazó fragmentumot. A FH fehérjét kutatócsoportunkban emberi szérumból preparálták affinitáskromatográfiás módszerrel. Az FHR fehérjéket Sf9 rovarsejtekben, bakulovírus-transzfekciós expressziós rendszerben termelték és szintén affinitáskromatográfiás módszerrel tisztították kutatócsoportunkban. Minden fehérjéből egy hígítási sort készítettem (0nM, 15nM, 30nM, 60nM, 120nM, 180nM, 240nM, 300nM), minden fehérjeminta elkészítéséhez 5 mg/ml

BSA-t tartalmazó PBS, 0.1% Tween-20 oldatot használtunk. A fehérje interakciós lépés 1 órán keresztül tartott, szobahőmérsékleten, rázatás mellett. Ezt követte a kétlépéses ellenanyag jelölés. Elsődleges ellenanyagként kecske anti-humán fH antiszérumot használtunk, szintén 5 mg/mL BSA-t és 0.1% Tween-20-at tartalmazó PBS oldatban, 1/4000 hígításban, 40 percig, szobahőn, rázatás mellett. Ezt követte a másodlagos ellenanyag, ami HRP-konjugált számár anti-kecske poliklonális ellenanyag volt, ezt 1/10000 arányban hígítottuk a korábbiakkal azonos pufferben. Az előhívási lépés megegyezett a korábbi kísérlettel.

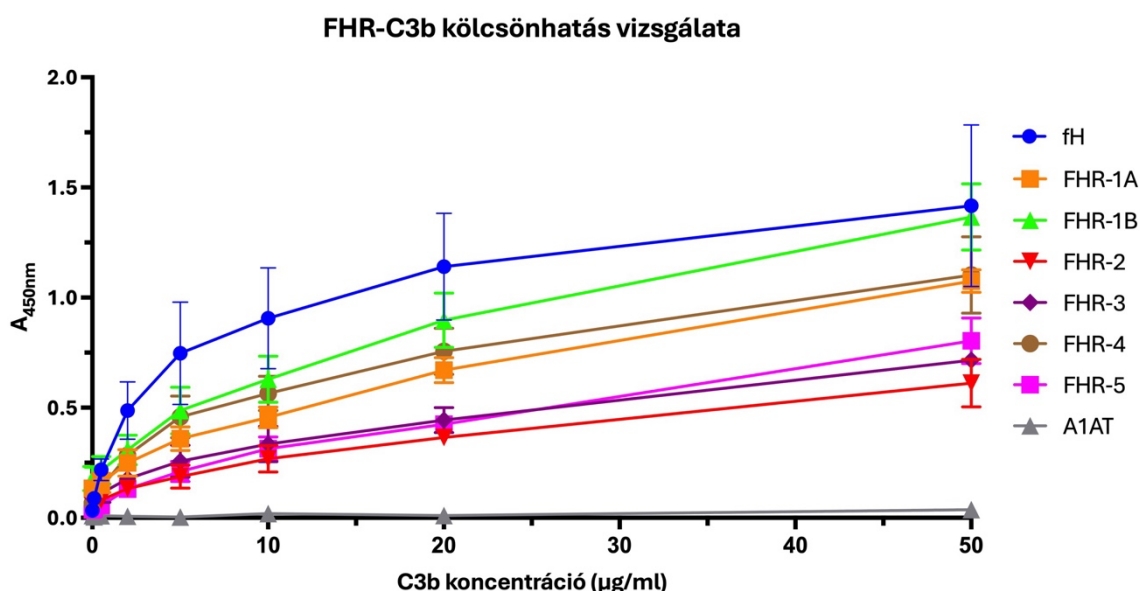
A harmadik kísérlet során egy olyan ellenanyag párost választottunk, amellyel az FHR-1A, FHR-1B, FHR-2 és FHR-5 fehérjék jeleníthetők meg. Ezt a kísérletsorozatot háromszor ismételtük meg. A második kísérletsorozattal több ponton is átfed ezen kísérlet menete: a rögzítés, a blokkolás és a fehérje interakciós lépések a már leírtakkal egyező módon zajlottak. Ennél a kísérletsorozatnál is két ellenanyagot használtunk, elsőként JHD-7.10.1 (HyCult, egér monoklonális) ellenanyagot 1/5000 arányban, 5 mg/mL BSA-t tartalmazó oldatban hígítva. Másodlagos ellenanyagnak kecske anti-egér-HRP (Dako, poliklonális) ellenanyagot használtunk 1/8000 arányban hígítva. Az előhívási lépés egyezett a korábbi kísérletekkel.

A már említett bakteriális OspE fehérje képes FH-t és bizonyos FHR-eket kötni, ezért egy kísérletsorozat során azt vizsgáltuk, hogy szilárd felszínhez rögzített OspE fehérjéhez FH-t, FHR fehérjéket vagy puffert adtunk, majd egy következő lépésben C3b-t. Azt vizsgáltuk, hogy az OspE fehérjéhez kötött FHR fehérjéket is tartalmazó mintahelyeken nagyobb C3b jelet kapunk-e, mint az FHR fehérjét nem tartalmazó mintahelyen. A kísérletek során 5 µg/ml OspE fehérjét, A1AT-t (negatív kontroll) és Sbi-t (bakteriális FH-kötő fehérje, pozitív kontroll) rögzítettünk a lemezre, majd 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten rázatva. Minden kísérleti lépést, mint a már említettekben is, mosás követett. A blokkolási lépés egyik napról a másikra történt minden ismétlés során. Az első fehérje interakciós lépés során FH-t, FHL-1-et és FHR 1-5-t adtunk a lemezhez 15 µg/ml koncentrációban, majd 1 órás inkubáció következett szobahőmérsékleten. Ezt a második fehérje interakciós lépésünk követte, ahol C3b-t adtunk a lemezhez 10 µg/ml koncentrációban az előző lépéssel egyező körülmények között, ugyanannyi ideig. Ezt egy két ellenanyag jelölés követte, amely során A304-et (kecske anti-C3) és számár anti-kecske-HRP-t használtunk 1/2000. Az előhívás reagensei a korábban bemutatott kísérletekkel azonosak voltak.

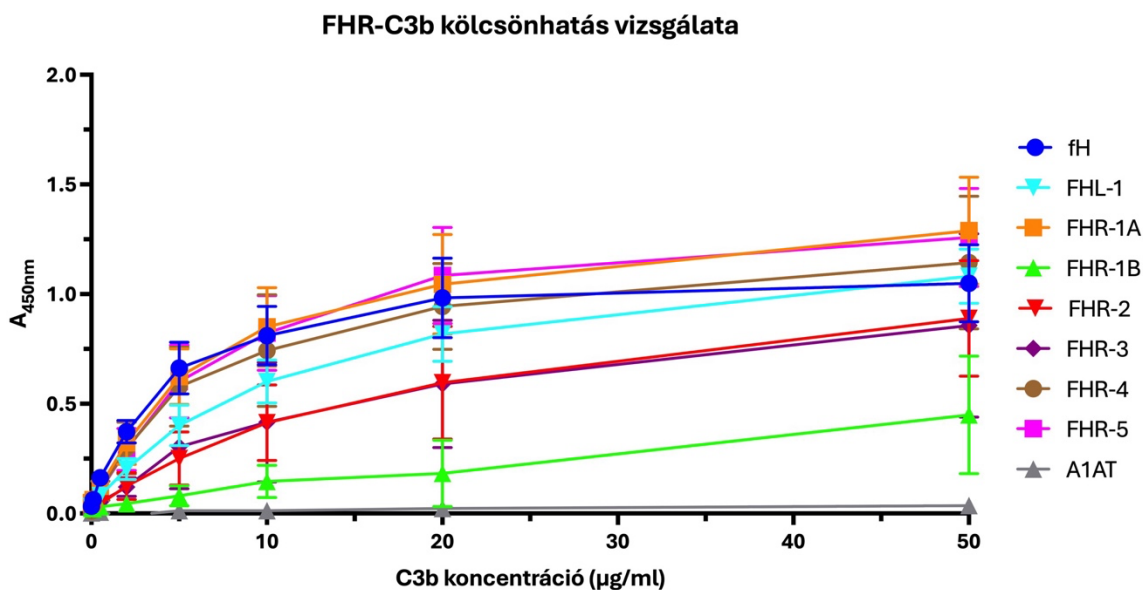
4. Eredmények és megvitatásuk

Feltételeztük, hogy azokon az FHR-eken képes összeállni és a legstabilabban működni a C3 konvertáz (4.ábra) (5.ábra), amelyek a legnagyobb affinitással kötik a C3b fehérjét. Ezért kiindulásnak cél volt meghatározni az affinitásokat kinetikai mérésekkel, BLI módszerrel. A mérésekhez AR2G bioszenzort használtunk, amihez az FHR fehérjéket rögzítettük. Több kísérlet után azonban nem sikerült mindegyik FHR fehérje esetében meghatározni a C3b-vel való kölcsönhatásuk kinetikai paramétereit és affinitását. A FH esetében a K_D kb. 100 nM, míg az FHR-5 esetében 1 és 5 μM közötti értékeket kaptunk. A mérések során az analitként alkalmazott C3b fehérjéből 1 μM volt a legmagasabb koncentráció, amit alkalmazni tudtunk. A mérések sikertelenségét okozhatta esetleg a nem kellően magas analit koncentráció, vagy akár az, ha a FHR-C3b kölcsönhatás nem tud kialakulni, mert az AR2G szenzoron rögzített FHR fehérjék C3b kötőhelye nem hozzáférhető. A BLI adatok hiányossága miatt nem tudtuk vizsgálni, hogy a C3b kötés affinitása korrelál-e a konvertáz kialakulással vagy a C3a keletkezéssel az FHR fehérjék esetében.

Következő lépésként ELISA alapú kísérletekben néztük meg a különböző FHR fehérjék és a C3b közötti kölcsönhatások kötéserősségét (6.ábra) (7.ábra) (8.ábra) (9.ábra). Ezzel pontos kinetikai adatokat nem tudtunk meghatározni, viszont alkalmas arra, hogy a különböző fehérjék kölcsönhatásai közötti különbségeket kimutassuk vele.



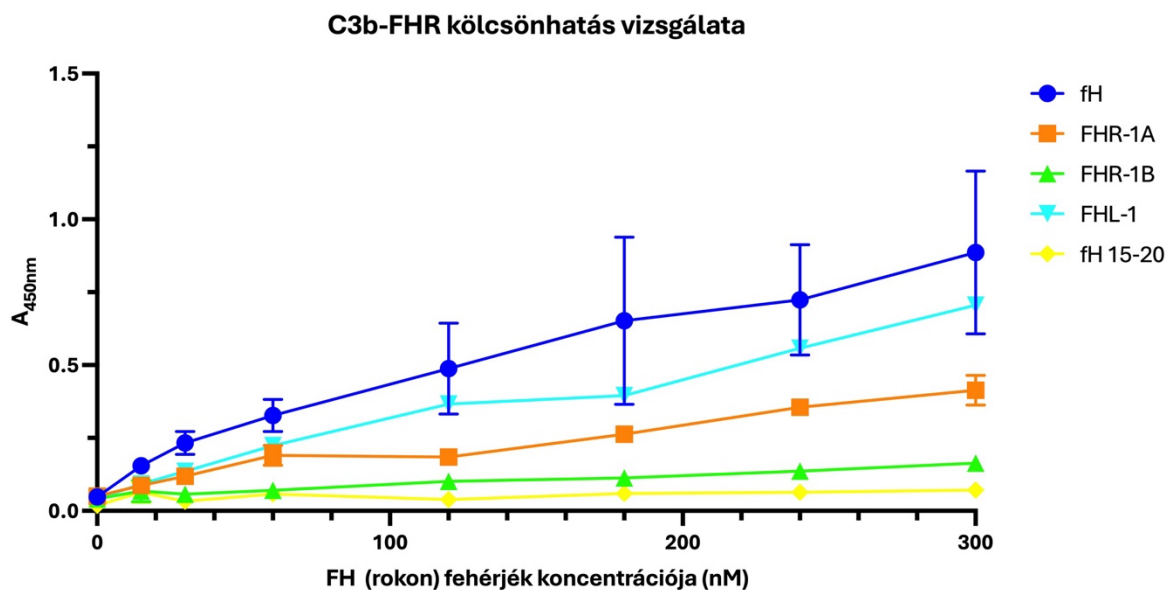
6. ábra Microplaten FHR fehérjék rögzítése, majd interakciója különböző koncentrációjú C3b mintákkal. Jelölő ellenanyag: HRP-konjugált poliklonális kecske anti-C3. Három független mérés átlaga, a hibaszalók a szórást (SD) mutatják.



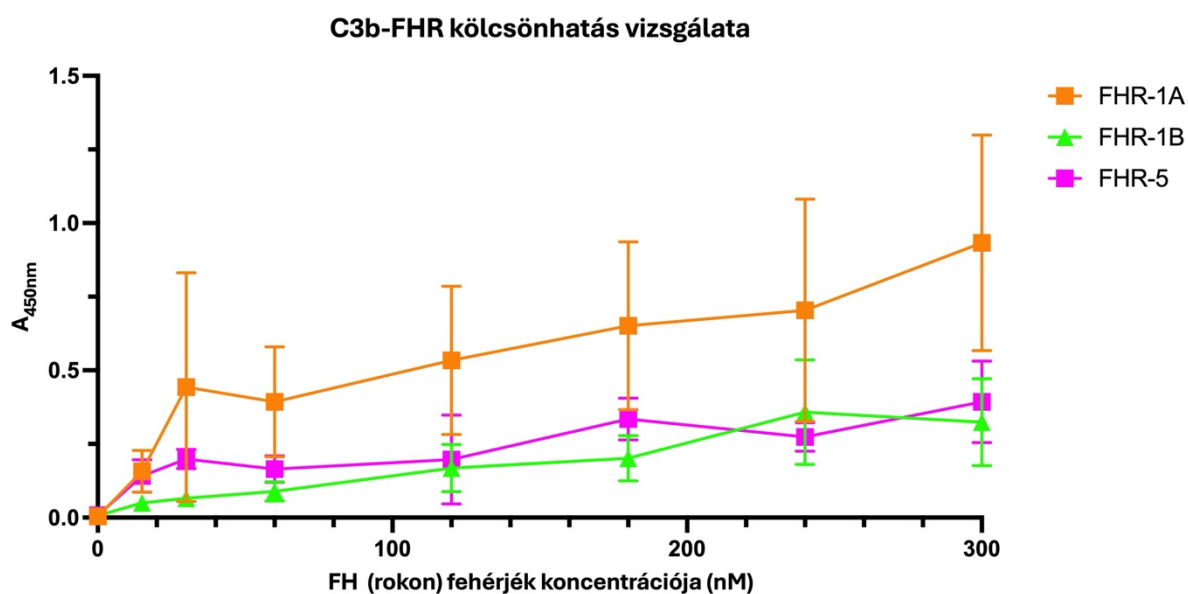
7. ábra Microplaten FHR fehérjék rögzítése, majd interakciója különböző koncentrációjú C3b mintákkal. Jelölő ellenanyagok: A304 (poliklonális kecske anti-C3) és poliklonális szamár anti-kecske-HRP. Három független mérés átlaga, a hibaszázalék a szórást (SD) mutatják.

A különböző ELISA kísérletsorozatok során különböző ellenanyagokat használva hívtuk elő az eredményeket, és kétféle felállásban (rögzített C3b illetve rögzített FHR) is vizsgáltuk a kölcsönhatásokat, viszont az eredmények között több eltérés is van, nem minden esetben viselkedtek a fehérjék egyformán. Az első kísérlet **(6.ábra)** és a két jelölő ellenanyagot alkalmazó változata **(7.ábra)** között nagymértékű eltérés tapasztalható. Legnagyobb mértékben az FHR-1A és az FHR-5 fehérjékkel kapott eredmények térnek el a különböző módon jelölt ELISA kísérletekben. Az FHR-1A az egylépéses jelölés esetén minden koncentrációban a FH-nál kisebb jeleket adott, míg a kétlépéses jelölés esetében a kapott jelek a FH mintahelyeken kapottakkal azonosak. Az FHR-5 a kétlépéses jelölést alkalmazó kísérletben a legnagyobb jeleket adó fehérjék közé tartozott, míg egylépéses jelölés esetében, az FHR-2 és FHR-3 fehérjékkel együtt, a legkisebb jeleket kaptam vele.

Az első (rögzített FHR fehérjék, oldatban adott C3b **(6.ábra)** **(7.ábra)**) és második (rögzített C3b, oldatban adott FHR fehérjék **(8.ábra)**) kísérleti felállások eredményei között az FHR-1B fehérjével kapott eredmények a leginkább ellentmondásosak. Az első felállásban a FH-hoz közeli, magas C3b-kötési értékeket kaptunk, amíg a második kísérletben ez a fehérje kifejezetten alacsony kötési jeleket adott. A kiemelteken kívül is több pontban tapasztalható ellentmondás a kísérletsorozatok eredményei között, valamint evidens egyezést egyik kísérletsorozat eredménye sem mutat munkatársaim funkcionális kísérletekben kapott eredményeivel.



8. ábra Microplaten C3b fehérje rögzítése, majd interakciója különböző FH fehérjecsald fehérjemintákkal. Jelölő ellenanyagok: anti-fH kecske antiszérum és számár anti-kecske. Három független mérés átlaga, a hibaszázlók a szórást (SD) mutatják.



9. ábra Microplaten C3b fehérje rögzítése, majd interakciója különböző FH fehérjecsald fehérjemintákkal. Jelölő ellenanyagok: JHD-7.10.1 (egér monoklonális) és kecske anti-egér-HRP (poliklonális). Három független mérés átlaga, a hibaszázlók a szórást (SD) mutatják.

A harmadik kísérletsorozat előzetes kísérletei során az alkalmazott ellenanyag által egyébként jól jelölődő FHR-2 fehérjével nagyon alacsony C3b kötési jeleket kaptunk, ezért ezt a kölcsönhatást FHR-2 hígítási sorral nem vizsgáltuk. A tanszéken korábbi adatok igazolják, hogy JHD-7.10.1 és kecske anti-egér-HRP-s előhívásos kísérletekben, immobilizált OspE fehérjén az FHR-2 nagy és specifikus jelet ad, vagyis feltételezhető, hogy nem az FHR-2 fehérje

megjelölésének problémája okozta az FHR-2 fehérjével kapott alacsony jeleket, hanem a C3b fehérjével kialakított kölcsönhatásának alacsony affinitása.

A különböző ELISA kísérletekben kapott adatok közti számos ellentmondás rámutat az ELISA/ellenanyag-jelölés alapú kísérletek alapvető problémájára, miszerint a kapott eredmények nagymértékben függenek az alkalmazott reagensek minőségétől, tulajdonságaitól. Egy reagens lecserélése gyakran kisebb-nagyobb mértékben megváltoztatja a kapott eredményeket. Esetünkben mindkét elrendezésben akár A1AT, akár a C3b-t illetve FHR fehérjét nem tartalmazó negatív kontroll mintákhoz viszonyítva kifejezetten specifikus kötési jeleket kaptunk, alacsony hátterek mellett tudtunk dolgozni. A fehérjék közti kölcsönhatás az irodalomban is le van írva és a saját kísérleteink is megerősítik, de a különböző ELISA kísérletekben kapott ellentmondásos adatok, illetve a BLI kísérletek hiányos eredményei miatt nem tudtuk megbízhatóan vizsgálni, hogy a funkcionális tesztekben munkatársaim által kapott eredmények korrelációt mutatnak-e az FHR fehérjék és a C3b közti kölcsönhatás affinitásával.

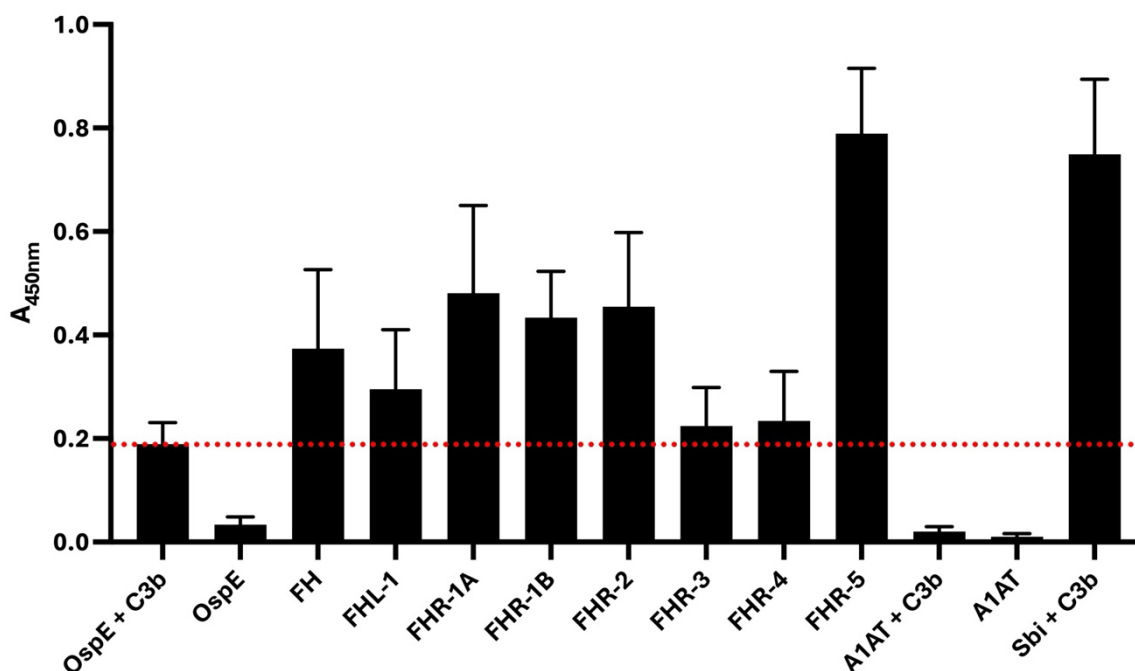
Mindkét esetben a működőképes a rendszerünk, függetlenek a kísérletek, alapvetően igazolja a fehérjék közötti kölcsönhatást, viszont az eltérések miatt és a kinetikai adatok hiányossága miatt pontos konklúziót nem tudunk levonni, szükség lesz a BLI alapú kísérletek újragondolására és a rendszer optimalizálására, amely a jövőbeli tervek részét képezi.

Mindezek után valószínűsítjük, hogy a különböző FHR fehérjéken való C3 konvertáz keletkezés és aktivitás különbségei nem magyarázhatók csupán a C3b – FHR kölcsönhatások affinitásának különbségeivel. Például a C3b-t gyengén kötő FHR-2 fehérje a gyenge affinitás ellenére is képes aktív konvertáz kialakulásához platformként szolgálni, míg az ELISA kísérletek alapján a C3b-t erősebben kötő FHR-1A nem képes ugyanerre.

A korábban említett bakteriális OspE H-faktor ligandum fehérjével kapcsolatban felmerült, ki tudjuk-e mutatni rögzített OspE fehérje által megkötött és orientált FHR fehérjék esetében a C3b kötést és/vagy a C3 konvertáz kialakulását. A szakirodalomban már leírták, hogy az FHR-1, FHR-2 és FHR-5 kötik az OspE fehérjét, míg az FHR-3 és FHR-4 fehérjék nem¹⁰⁻¹². Kutatócsoportunkban ezeket az eredményeket munkatársaim maguk által termelt és tisztított fehérjékkel reprodukálták, és kiegészítették azzal, hogy az FHR-2 és az FHR-3 is képes az OspE fehérjéhez kötődni.

Az antimikrobiális komplement válasz hatékonyságát növelné, ha a baktérium felszínén lévő H-faktor ligandum fehérjékhez kötődő FHR fehérjéken C3 konvertázok keletkeznének. Ennek vizsgálatára végeztük el az alábbi kísérletet **(10.ábra)**.

OspE - FHR - C3b kölcsönhatás vizsgálata



10. ábra Microplaten OspE, fehérje rögzítése, majd interakciója FHR mintákkal, amit egy C3b-s interakciós lépés követett. Jelölő ellenanyag: A304 (poliklonális kecske anti-C3) és poliklonális számár anti-kecske-HRP. Három független mérés átlaga, a hibázászlók a szórást (SD) mutatják, negatív kontroll: A1AT; pozitív kontroll: Sbi.

A kísérlet során az OspE fehérjét rögzítettük és kezeltük oldatban adott FHR fehérjékkel, majd C3b-vel. Végül a C3b fehérjét mutattuk ki a mintahelyeken. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az FHR fehérjékkel kezelt OspE felszínen több C3b-t tudunk-e kimutatni, mint a csak C3b-vel kezelt OspE felszínen. Az eredmények azt mutatják, hogy az FHR-1A, FHR-1B, FHR-2 és FHR-5 fehérjék OspE-hez kötődve képesek kimutatható mennyiségű C3b-t is kötni. Vagyis az összes OspE fehérjét megkötni képes FHR fehérje OspE-kötött állapotában képes C3b kötésére is. Ez elengedhetetlen ahhoz, hogy a szükséges komponensek jelenlétében C3 konvertázok keletkezessenek. Ha ez az összetettebb bakteriális felszínen, *in vivo* megtörténik, az lokálisan erősítheti a komplement aktivációt és segítheti a szervezet antimikrobiális védekezését.

A dolgozat beadása előtt elkezdtük a rögzített és FHR fehérjékkel kezelt OspE fehérjén való konvertáz keletkezés vizsgálatát. Az eddig elvégzett mérések során túl magas háttér jeleket tapasztaltunk, a kísérlet optimalizálása folyamatban van.

5. További tervek

A továbbiakban azt szeretnénk vizsgálni, hogy szilárd felszínhez rögzített OspE fehérjén FHR-eket hozzáadva létrejönnek-e stabil és aktív konvertázok. Ehhez egy több lépéses, összetettebb kísérletet tervezünk összeállítani, amely során a tanszéken korábban tesztelt **(4.ábra)** **(5.ábra)** konvertáz kísérleteket vennénk alapul. Amennyiben tudjuk igazolni, hogy össze tudnak állni konvertázok az OspE által megkötött FHR fehérjéken, az arra utalna, hogy az FHR fehérjék bakteriális felszíneken is képesek lehetnek lokálisan növelni az aktivációt, ezáltal leküzdve a baktériumok komplementrendszeret kijátszó védekező mechanizmusait.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Szakács Dávidnak, témavezetőmnek, a szükséges módszertani és lexikális háttér elsajátításában nyújtott segítségét, emellett a folyamatos mentorálást a kísérletek és az egész projekt során. Köszönöm Dr. Józsi Mihálynak, az ELTE Immunológiai Tanszék tanszékvezetőjének, a lehetőséget a komplementrendszerrel kapcsolatos kutatáshoz való csatlakozáshoz. Mindezek mellett hálásan köszönöm az ELTE Immunológiai Tanszék további munkatársainak a segítséget és a kísérletekhez szükséges fehérjeminták és reagensek biztosítását.

7. Irodalomjegyzék

1. Sarma, J. V. & Ward, P. A. The complement system. *Cell Tissue Res.* **343**, 227–235 (2011).
2. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
3. Józsi M. A H-faktor molekulacsalád tagjainak élettani funkciója és szerepük komplement-közvetítette betegségekben. (ELTE, 2017).
4. Dunkelberger, J. R. & Song, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* **20**, 34–50 (2010).
5. Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
6. Mannes, M. *et al.* Complement inhibition at the level of C3 or C5: mechanistic reasons for ongoing terminal pathway activity. *Blood* **137**, 443–455 (2021).
7. Sándor, N. *et al.* The human factor H protein family – an update. *Front. Immunol.* **15**, (2024).
8. Lucientes-Contiente, L., Márquez-Tirado, B. & Goicoechea de Jorge, E. The Factor H protein family: The switchers of the complement alternative pathway. *Immunol. Rev.* **313**, 25–45 (2023).
9. Józsi, M., Schneider, A. E., Kárpáti, É. & Sándor, N. Complement factor H family proteins in their non-canonical role as modulators of cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **85**, 122–131 (2019).
10. Alitalo, A. *et al.* Lysine-Dependent Multipoint Binding of the *Borrelia burgdorferi* Virulence Factor Outer Surface Protein E to the C Terminus of Factor H1. *J. Immunol.* **172**, 6195–6201 (2004).
11. Hellwage, J. *et al.* The Complement Regulator Factor H Binds to the Surface Protein OspE of *Borrelia burgdorferi* *. *J. Biol. Chem.* **276**, 8427–8435 (2001).
12. Siegel, C. *et al.* Complement Factor H-Related Proteins CFHR2 and CFHR5 Represent Novel Ligands for the Infection-Associated CRASP Proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLOS ONE* **5**, e13519 (2010).
13. Jug, A., Bratkovič, T. & Ilaš, J. Biolayer interferometry and its applications in drug discovery and development. *TrAC Trends Anal. Chem.* **176**, 117741 (2024).