

Patogének menekülési stratégiái a komplementrendszer előtt

Szakdolgozat
biológia alapszak,
biológus szakirány

készítette:
Zöldi Miklós

témavezető:
Dr. Józsi Mihály Krisztián
tudományos főmunkatárs
Immunológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2014

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés	4
2. Az immunrendszer szerepe, a natív és az adaptív immunitás	5
3. A komplementrendszer	7
3.1. A klasszikus út	8
3.2. A lektin út	9
3.3. Az alternatív és "extrinsic" út	10
3.4. Komplementrendszer szabályozó fehérjéi	11
3.5. A komplementrendszer egyéb feladatai	13
4. A patogének menekülési stratégiái a komplementrendszer előtt	14
4.1. Első szint: a felismerés gátlása	15
4.2. Második szint: a C3-konvertáz gátlása	17
4.2.1. A C3 és C3b molekulák szerkezete	17
4.2.2. SCIN-A	20
4.2.3. Efb	24
4.2.4. SAK	27
4.2.5. Regulátorok	29
4.3. Harmadik szint: a C5a anafilatoxikus hatásának és a terminális út aktivációjának gátlása	32
4.3.1. CHIPS	32
4.3.2. SSL7	34
4.4. Negyedik szint: a membránkárosító komplex kialakulásának megakadályozása	35
5. A komplementrendszer felhasználása a fertőzés során	36
6. Terápiás lehetőségek	37
7. Kitekintés	40
8. Összefoglalás	42
9. Summary	43
Hivatkozásjegyzék	44
Köszönetnyilvánítás	49

Rövidítésjegyzék

ANA - anaphylatoxin

AP - alternative pathway; a komplementaktiváció alternatív útja

C3bBb; C3bBb3b - az alternatív út C3-, illetve C5-konvertáz enzime

C4b2b; C4b2b3b - a klasszikus és lektin út C3-, illetve C5-konvertáz enzime

CD59 - protektin

CHIPS - chemotaxis inhibitory protein of staphylococci

ClfA - clumping factor A

CP - classical pathway; a komplementaktiváció klasszikus útja

CP5; CP8 - capsular polysaccharide serotype 5; -8

CR - komplementreceptor

CRASP - complement regulator-acquiring surface protein

CUB - complement C1r/C1s, UEGF, BMP1 domain

DAF - decay-accelerating factor; lebomlást gyorsító faktor; CD55

Fab - Fragment antigen binding

FB - B-faktor

Fc - Fragment crystallizable

fHbp - factor H binding protein

FI- I-faktor

LP - lectin pathway; a komplementaktiváció lektin útja

MAC - membrane attack complex; membránkárosító komplex

MASP – mannose binding lectin-associated serine protease

MBL - mannose-binding lectin

MCP - membrán kofaktor protein; CD46

MG - makroglobulin

MRSA - methicillinre rezisztens *Staphylococcus aureus*

PNAG - poli-N-acetilglükózamin

SAK - Staphylokinase

Sbi - Staphylococcal binder of immunoglobulins

SCIN - Staphylococcal complement inhibitor

SpA - Staphylococcal protein A

SSL - *Staphylococcus aureus* superantigen like

TED - thioester-containing domain

1. Bevezetés

Szervezetünk kórokozók elleni védelméért immunrendszerünk felelős. A hatékony immunválasz kialakításához és a kórokozó eltávolításához a veleszületett (natív) és szerzett (adaptív) immunitás elemei egyaránt fontosak. Egy kórokozó szervezetbe való kerülésekor először a veleszületett immunrendszer elemeivel találkozik, a patogének molekuláris mintázatát felismerő receptorok pedig azonnal aktiválódnak. Az adaptív immunitás ugyan csak a kórokozó behatolását követően több nap elteltével alakul ki, de a natív immunitással szemben előnye, hogy az immunválasz fajlagos, és az immunológiai memóriát biztosítja.

A veleszületett immunvédekezés egyik legősibb humorális eleme a komplementrendszer. A több, mint 30 komponensből felépülő rendszer három különböző, ám később összefonódó útvonalon indulhat el, aminek következményeként különböző enzimek kaszkádszerűen aktiválódnak. A folyamat során a fagocitózist elősegítő opszoninok borítják be a mikroba felszínét, gyulladást elősegítő peptidek szabadulnak fel, végül kialakul a célsejt lízisét előidéző terminális komplex. A komplementrendszernek a kórokozók eliminációján kívül számos más feladata is van.

Mivel a komplementrendszer azonnal aktiválódik, és kulcsszerepet játszik a patogének eltávolításában, a patogének számos stratégiát fejlesztettek ki, mellyel a komplementrendszer bizonyos pontjain gátolható, aktivációjának mértéke csökkenthető. Ezen stratégiákat a patogének komplementrendszer előli menekülési stratégiáinak nevezzük. A szakdolgozat patogének néhány különböző menekülési stratégiáját mutatja be, példaként részletesen bemutatva a *Staphylococcus aureus* stratégiáit.

A patogének menekülési stratégiáinak ismerete az általuk okozott betegségek, fertőzések gyógyítása szempontjából fontos. A szakdolgozat végül kitekintést nyújt arra is, hogy a menekülési stratégiák ismerete milyen célokat szolgálhat a jövőben.

2. Az immunrendszer szerepe, a natív és az adaptív immunitás

Az immunrendszer elsődleges feladata, hogy a veszélyes, nem a szervezetből származó vagy a szervezetből származó, de rosszul működő saját struktúrákat eltávolítsa, eliminálja. Ehhez egyrészt különbséget kell tennie a saját és a nem saját (vagy rosszul működő saját) struktúrák között, másrészt eltérő válaszfunkciókat kell kialakítania. Minden olyan struktúrát, melyet az immunrendszer felismer, antigénnek nevezünk. A jól működő saját és nem saját, ám nem is veszélyes struktúrák (például pollenek) ellen - normális esetben - nem alakul ki immunválasz, a szervezet megtűri, tolerálja azokat. A veszélyesnek azonosított struktúrák ellen viszont immunválasz alakul ki, melynek eredménye az antigénnek szervezetből való eltávolítása ("danger theory") (Pradeu és Cooper, 2012). A szervezet normális működésének, belső egyensúlyának, azaz homeosztázisának megtartásáért az immunrendszer is felelős. Az immunreakció és a káros struktúrák eltávolítása lehetőséget ad az immunohomeosztázisra.

Az immunrendszer kétféle védelmi rendszerből tevődik össze, melyek szorosan együttműködve fejtik ki hatásukat. Törzsfejlődéstanilag először a veleszületett, natív immunrendszer elemei jelentek meg. A fagocitikus aktivitással rendelkező sejtek, makrofágok, granulociták, dendritikus sejtek sejt felszínén olyan receptorok találhatók, melyek patogének molekuláris mintázatát ismerik fel. Ezek a mintázatok, azaz PAMP-ok (Pathogen Associated Molecular Patterns) csak a patogén felszínén találhatók, így az őket felismerő receptoroknak (Pattern Recognition Receptor, PRR) saját sejteken nem található meg a ligandumuk, a ligandumkött receptor általi aktivációs folyamat csak idegen sejten indulhat be. Más stratégiát alkalmaznak a természetes ölő- (NK) sejtek: azt tanulták meg, hogy melyek a jól működő saját sejtek. Minden más - így az MHC I fehérjét kisebb mértékben expresszáló tumoros vagy vírussal fertőzött sejtek is - aktiválja őket (Erdei és mtsai., 2012).

Nem csak sejt felszíni molekulák képesek bakteriális mintázatok felismerése. A komplementrendszer számos szolúbilis felismerő molekulája (C1q, MBL, fikolinok) képes patogénhez vagy apoptotikus sejthez kötődni és a komplementrendszert aktiválni. E folyamatokról az 3. fejezetben lesz részletesebben szó.

Az eddig felsorolt mintázatfelismerő-receptorok a veleszületett immunitás elemei. Ugyanazok a receptorok fejeződnek ki többféle sejten is, azaz nem klonálisak, és minden

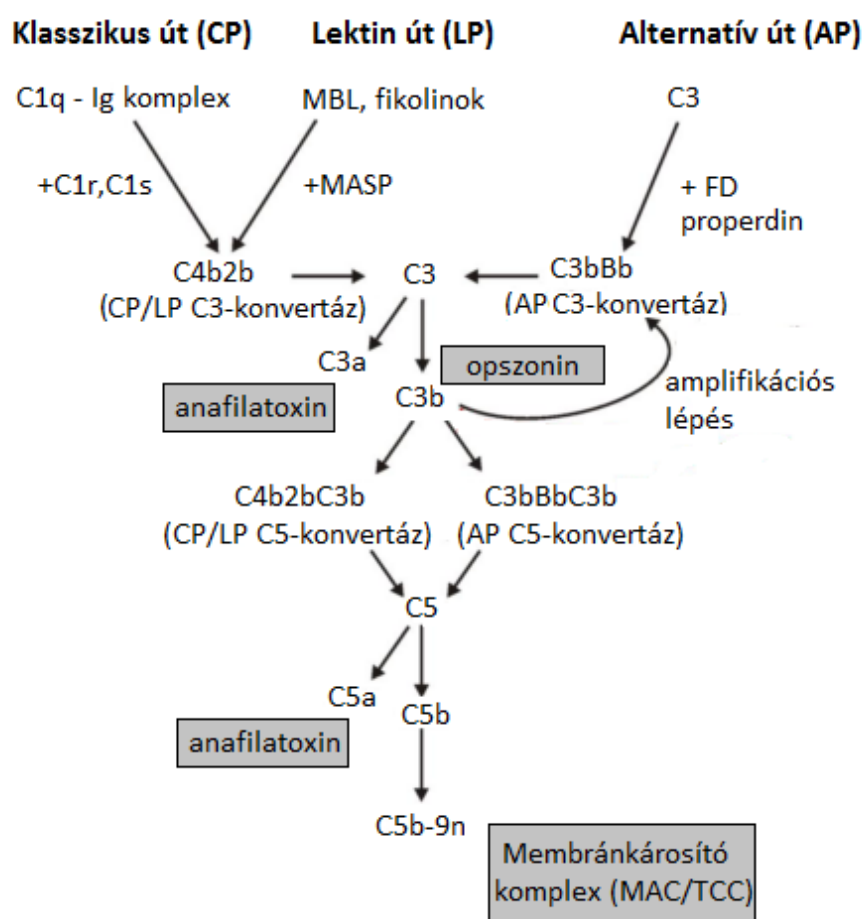
egyénben ugyanúgy megtalálhatók, hisz génjeik a csíravonalban kódoltak. Ez viszont a specificitásuknak szab határt: csak bizonyos számú ligandumot képesek felismerni. Ha az evolúció során új bakteriális mintázatok jelennek meg, vagy a meglevők antigénkötőhelyei mutáció következtében megváltoznak, a PRR-ok képtelenek lesznek felismerni azokat. Ha ismételt fertőzésen esik át az egyed, a válaszadó képessége nem lesz jobb, hisz a natív immunrendszer tagjai nem "emlékeznek" az előzményekre, nincs immunológiai memóriájuk. Mégis nagyon hatékonyak, hisz percek, órák belül aktiválódnak, hatásuk azonnal érvényesül, és nem csak a patogének, hanem az apoptotikus vagy tumorossá fajult sejtek eliminálásában is nélkülözhetetlenek.

A natív immunitás az élet megjelenésével egyidejű. A nagyon primitív szervezetek, így például az amőbák is rendelkeznek saját-nem saját felismerő képességgel. Ha nem így lenne, nem csak a táplálékot, hanem fajtársaikat vagy akár önmaguk bizonyos részeit is bekebelezhetnék, és egy idő után kipusztulnának (Janeway és mtsai., 2001). A még komplexebb, adaptív immunitás viszont csak a gerincesekben jelenik meg először, és szorosan ráépül a már meglevő natív immunitás elemeire. A T- és B-sejteken kifejeződő antigénfelismerő receptorok (TCR, BCR) génjei szomatikus rekombináción esnek át, így akár 10^9 , azaz milliárdos nagyságrendű a különböző szekvenciák, ebből adódóan a receptorok antigénfelismerő helyeinek specifitása, tehát a felismerhető antigének száma - a fajlagosság szinte korlátlan. A hatékony immunválaszt a nagyfokú specifikusság biztosítja - akár egy aminosavcsere az antigénben érzékelhető. Mivel csak azok a T- és B-sejtek proliferálnak, melyek T-, illetve BCR-e fajlagosan reagál az adott antigénnel (pozitív klónszelekció), az immunválasz csak napok, akár hetek múltán indul be. A nem megfelelő specifitású receptorral rendelkező sejtek apoptozizálnak (negatív klónszelekció). Újabb fertőzésre a szervezet már gyorsabban válaszol. Bizonyos B-sejtek memóriasejttekké alakulnak, felszínükön azt a membránkötött immunoglobulint (mIg) hordozzák, mely az aktiválódásukat kiváltotta antigénnel fajlagosan reagál. Újabb antigén inger hatására azonnal aktiválódnak és ellenanyag-termelő effektor plazmasejtté alakulnak át. A memóriasejtek akár évtizedekig is keringhetnek a szervezetben (Erdei és mtsai., 2012).

3. A komplementrendszer

Egy magyar kutató, Fodor József figyelte meg a XIX. század végén, hogy ha nyulakat *Bacillus anthracisszal* immunizált, a vérükben inkubált kórokozó elpusztult. A vérszérumnak e baktericid hatását Ehrlich, Bordet és Nuttall igazolta: a vérszérum 55 °C fokra felmelegítve baktericid hatását elvesztette, míg szobahőmérsékleten megtartotta. E hőlabilis faktort Ehrlich kezdetben alexinnek nevezte el, 1899-ben adta helyette a komplement nevet (a komplementer, azaz kiegészítő szóra utalva), mely az ellenanyagok mellett, azokat kiegészítve szükséges a sejtek líziséhez (Ehrnthaller és mtsai., 2011).

A több, mint 30 komponensből álló komplementrendszer három különböző úton is aktiválódhat, mely útvonalak egymástól nem függetlenek, és bizonyos pontokon összeérnek (1. ábra).



1. ábra: a komplementrendszer aktiválódásának útvonalai (Kopp és mtsai., 2012, nyomán).

3.1. A klasszikus út

A klasszikus (Classical pathway, CP) avagy antitest-dependens utat fedezték fel legelőször, már 1913-ban. Utóbbi neve arra utal, hogy aktiválásához legtöbbször ellenanyagmolekula szükséges. Az iniciátor C1-molekulakomplex C1q(r₂s₂) 3 alegységből áll. A C1q 18 polipeptidláncból áll, melyek hármásával összefonódva virágcsokorra emlékeztető hexamer szerkezetet vesznek fel. A 3 peptidláncból (A, B és C) álló "virágszálak" C-terminális doménjei globuláris feji véget hoznak létre, melyek egymástól kissé elállnak. Az N-terminális végeik kollagénszerű struktúrát alakítanak ki (Bottazzi és mtsai., 2010; Sjöberg és mtsai., 2009).

A C1q feji végével képes a ligandumkötött ellenanyagmolekula Fragment crystallizable (Fc) részét kötni. Csak az IgM és IgG képes hatékony komplementaktivációra. Bizonyos molekulák (CRP, vírus proteinek, β-amiloid, DNS) vagy apoptotikus, nekrotikus sejtek képesek a klasszikus út ellenanyag-független aktivációjára is (Ehrnthaller és mtsai., 2011). A ligandumkötött C1q konformációs változást idéz elő a molekulakomplex C1r alegységében, mely aktiválódik: autokatalízis révén aktív szerin-proteázzá alakul át, majd a C1s molekulát hasítja. Az aktivált C1s (C1s*) szubsztrátja a C2 és a C4. A proteolízis során mindig lehasad a molekuláról egy kisebb fragmentum, ez az "a" fragmentum, mely a környezetbe diffundál. A megmaradó nagyobb, a kaszkádot továbbvivő molekularészek a "b" fragmentumok. Ez a terminológia az egész komplementrendszerre igaz. (Bár sok forrásban - a hagyományokat tisztelően- a C2 molekula esetén pont fordított terminológiával találkozunk: a nagyobb fragmentumot jelölik C2a-val, és így a klasszikus út C3-konvertázát is C4b2a-ként említik. Hogy a nevezéktant egységessé tegyék, újabban a C2b-t jelölik nagyobb fragmentumként) (Ricklin és mtsai., 2010).

A C4b tiosztérkötésével aktiváló felszínen (mikróba, apoptotikus sejt) a C1-molekula mellé kötődik. Ekkor a C4b-hez kötődik a C2, melyet szintén a C1s* alakít át, így kialakul a klasszikus út C3-konvertáz enzime, a C4b2b. A konvertáz enzim a kaszkád egy központi molekuláját, a komplementrendszer legnagyobb koncentrációban (1,3 mg/ml) előforduló molekuláját, a C3-at hasítja. A C3 molekula egy α- és β-láncból áll, melyeket diszulfidhíd köt össze. Az α-láncon belül található tiosztérkötés az intakt molekulában rejtve marad, ha azonban lehasad az α-lánchról a C3a fragmentum, a molekula

konformációja úgy változik meg, hogy a megmaradó C3b tioészterkötése a felszínre kerül, melyen keresztül aktiváló felszínhez kötődhet, és a fagocitózist elősegítő opszoninná válik (Law és Dodds, 1997) (4.2.1. fejezet).

A C3b receptora a neutrofilek, makrofágok, B-sejtek, eritrociták membránjában található CR1 (Complement Receptor 1, CD35). Utóbbiak nem az opszonikus fagocitózisban, hanem az immunkomplexek májba és lépbe történő szállításában fontosak. A C3 molekula hasításakor keletkező kisebb, C3a fragmentum anafilatoxin, kemoattraktáns tulajdonságával gyulladás képződését segíti elő fagocitáknak (neutrofil granulociták, monociták, makrofágok) a komplementaktiváció helyére való vonzásával. A C3 molekula hasításával tehát nem csak fagociták érkezik a "tethelyre", hanem azok fagocitikus hatékonysága is jelentősen megnő. Sőt, még több C3 hasítódásával a C3b a C3-konvertázhoz kötődve a C5-konvertázt (C4b2b3b) hozza létre, így a kaszkád súlypontja a C3 molekuláról a C5 hasítására tevődik át. A proteolízissel létrejövő C5a szintén anafilatoxin, a C3a-nál erősebben proinflammatorikus hatású (gyulladásí sejteket vonz, kis erek permeabilitását növeli). A C5b a C6 és C7 molekulával asszociálva a target sejt membránjába süllyed, a C8 molekulán keresztül pedig több (10-15) C9 molekulát is köt, a keletkező C5b-9n komplex a membránkárosító komplex (Membrane Attack Complex, MAC), más néven terminális komplex (TCC). Hasonlóan az NK-sejtek által termelt perforinok sejtölő mechanizmusához, a komplex pórust formál a sejtmembránon. A sejt ozmotikus egyensúlyát elveszti, sokkal nagyobb ozmotikus koncentrációja miatt víz áramlik belé egészen addig, míg szét nem pukkan (Ehrnthaller és mtsai., 2011; Ricklin és mtsai., 2010).

3.2. A lektin út

A lektin út (LP) mintázatfelismerő molekulái (PRM) a fikolinok (M-, L- és H-fikolin) és a C1q-ra nagyon hasonló, C-típusú kollektinekhez sorolható mannózkötő lektin (MBL). Szintén a kollektinek közé tartoznak a tüdő II-es típusú pneumocitái és a Clara sejtek által termelt Surfactant Protein-A és -D (SP-A, SP-D) fehérjék, melyek a légzőrendszerbe került patogénekhez opszoninként kötődve az alveoláris makrofágok munkáját segítik, de a komplementaktivációt nem indítják be (Ehrnthaller és mtsai., 2011). Az kollektinek ligandumai különböző szénhidrát egységek és lipid természetű molekulák, melyek számos

patogén, mint például a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Haemophilis influenzae* felszínén vagy a HIV vírus burkában, illetve apoptozizáló saját sejteken található (Bottazzi és mtsai., 2010). Az MBL és fikolinok ligandumkötött állapotában aktiválódik a hozzájuk kötődő szerint proteáz, a MASP. A MASP-2 - hasonlóan a C1s-hez - a C2 és C4 molekulák hasításával létrehozza a C3-konvertáz enzimet (C4b2b), mely megegyezik a klasszikus út konvertázenzimével; a két út itt ér össze és a kaszkád következő lépései együtt folytatódnak. A MASP-1 csak a C2 molekulát hasítja. A korábbi elképzelés - mi szerint a MASP-1 a lektin út beindítására önmaga nem képes, szerepe csak a már iniciált út felerősítése (Ricklin és mtsai., 2010) - mára megdőlt. MASP-1-re szelektív inhibitorral nem aktiválódik a lektin út, így a MASP-1 és MASP-2 egyaránt nélkülözhetetlenek a lektin út beindításához (Héja és mtsai., 2012).

Az MBL és C1q nagyfokú hasonlósága okán feltételezik, hogy kezdetben a C1q is a lektin út mintázatfelismerő receptora volt, az immunglobulinok megjelenésével specializálódott a klasszikus útra (Bottazzi és mtsai., 2010).

3.3. Az alternatív és "extrinsic" út

A komplementaktiválódás harmadik fő útja az úgynevezett alternatív út (AP). Nevével ellentétben ez az út felelős a komplementaktiváció zöméért, 80-90 százalékáért (Ricklin és mtsai., 2010). Hasonlóan az NK-sejtekhez, az alternatív út is a "minden, ami nem saját" felismerésének stratégiáját "választotta". A komplementrendszer központi C3 molekulájának natív állapotban csak kevés liganduma van. A molekulák egy kis hányada azonban spontán hidrolizáció következtében C3(H₂O)-molekulává alakul, és így új kötőhelyek kerülnek a felszínére. Megköti a B-faktort (FB), a C3(H₂O)-kötött B-faktort pedig a D-faktor (FD) hasítja a kisebb Ba és a nagyobb Bb fragmentumra. A C3(H₂O)Bb egy átmeneti C3-konvertáz enzim, mely képes a C3 molekula hasítására. Így tehát komplementaktiválódás nélkül is keletkezik a C3b opszonin. A C3b az úgynevezett tick-over mechanizmussal "próbára teszi" a környezetében levő sejteket, a reaktív, rövid életű tioészter csoportjával a sejtek felületén lévő hidroxil- és aminocsoportokhoz kötődik. Leggyakrabban természetesen a szervezet saját sejtjeihez kötődik, ám azok molekuláris környezete és regulátorfehérjei a komplementaktivációt megakadályozzák. Ha viszont a C3b idegen struktúrára talál, az aktiváció beindulhat: a kötődő B-faktor fragmentummal

kialakul az alternatív út C3 konvertáza, a C3bBb. E konvertázt a properdin stabilizálja. A properdin a konvertáz féléletidejét kb. tízszeresére növeli (Ehrnthal és mtsai., 2011; Ricklin és mtsai., 2010).

Az alternatív út C3-konvertáz enzime - ahogy a lektin és klasszikus út konvertáz enzime is - a C3 molekulát hasítja C3a és C3b fragmentumra úgy, hogy az enzim részét képezi maga a produktum, a C3b is. E látszólagos paradoxont az előbb leírt C3(H₂O) oldja fel, mely a C3b szerkezeti homológja, így egy átmeneti enzim kialakítására képes, míg létre nem jön a C3b. A keletkező C3b molekulák újabb és újabb C3 konvertázt alakítanak ki, így a rendszer nagyon rövid idő alatt hihetetlenül felerősödik, amplifikálódik. A C3 molekulából nagy koncentrációja következtében nincsen hiány, és a Bb fragmentum is folyamatosan keletkezik a D-faktor hatására. A C3b-denzitás növekedésével a C3b a konvertázenzimhez kötődik, és a létrejövő C5-konvertáz (C3bBb3b) az előző két útvonalnál ismertetett módon a szubsztrátspecifitást a C5 molekula irányába tolja el. Innentől a három út lefolyása a terminális komplex kialakulásáig azonos.

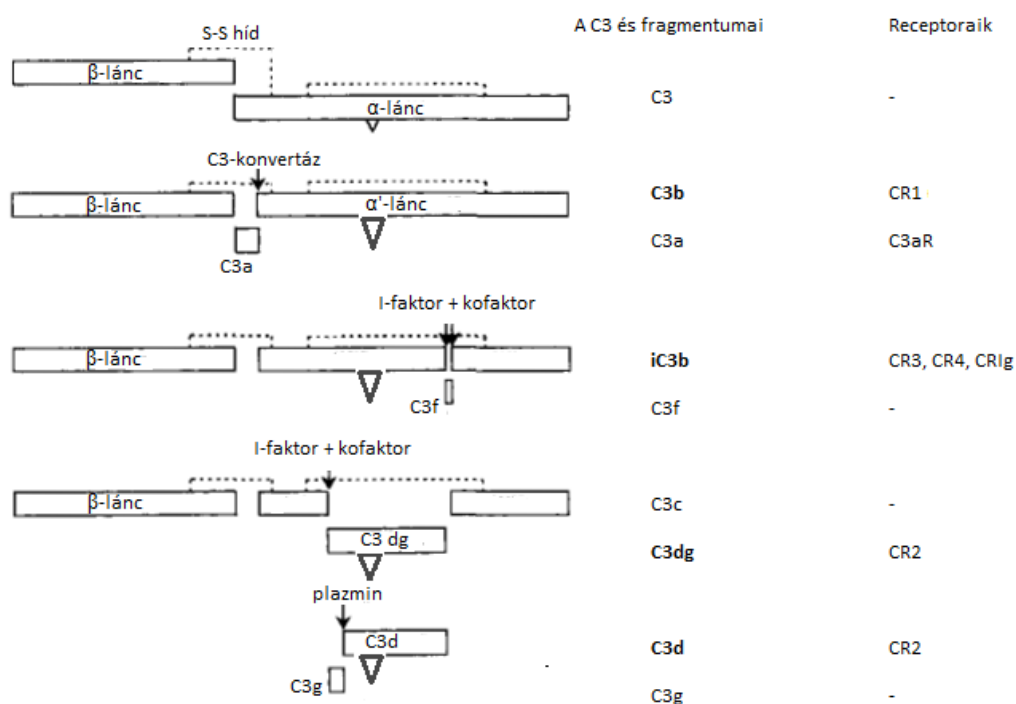
A különböző útvonalak között kommunikáció, crosstalk is megfigyelhető. A lektin és klasszikus út aktiválásával keletkezett C3b az alternatív utat is beindíthatja és fordítva, az alternatív út által generált C3b is kötődhet a már aktivált CP/LP C3-konvertázához (C4b2b) (Ricklin és mtsai., 2010).

Fontos még megemlíteni, hogy a három jól ismert útvonalon kívüli aktivációs lépések is jelen vannak a szervezetben. Bizonyos proteázok, például a véralvadási kaszkád trombinja gyulladásos folyamatokkor képes a C5 molekula hasítására és C5a generálására lokálisan. E folyamat a C5-konvertázától és a kaszkádban előtte, azaz upstream található komponensektől teljesen független, ugyanis C3-deficiens egerekben is lejátszódik. Az útvonalat "extrinsic pathway"-nek nevezik (Huber-Lang és mtsai., 2006).

3.4. Komplementrendszer szabályozó fehérjéi

A C1q és MBL molekuláknak saját egészséges sejten nincsen ligandumuk. A tick-over mechanizmussal keletkező C3b viszont saját sejten is beindíthatná a komplementaktivációt. Ennek elkerülése végett számos regulátorfehérje áll rendelkezésre. A sejtmembránban ülő membrán kofaktor fehérje (MCP, CD46) az I-faktor kofaktora. Az I-faktor (FI) hasítja a C3b és C4b molekulákat, a keletkező inaktivált C3b

(iC3b) és inaktivált C4b már nem képes a C3-konvertáz létrehozására. A lebomlást gyorsító faktor (decay-accelerating factor, DAF, CD55) szintén membránkött regulátor, mely magát a konvertáz enzimnek a létrejöttét gátolja, illetve ha létre is jött, gyorsítja a szétesését. A fagociták membránkött CR1 receptora (CD35) mind a konvertáz szétesését gyorsító, mind pedig kofaktor aktivitással is bír, sőt, a keletkező iC3b FI általi hasításának egyetlen kofaktora. A CR1 így nem csak a C3b és C4b mediált fagocitózist serkenti, de a komplementaktiváció lecsendesítésben is részt vesz. Az iC3b ligandumaihoz, a monociták, neutrofilek felszínén kifejeződő integrinreceptorokhoz (CR3/CD11b-CD18, CR4/CD11c-CD18) kötődve fagocitózist és citokinszekréciót indukál. A végső C3 fragmentum, a C3d B-sejtek differenciálódását segíti elő (2. és 5. ábra). Ez is példaként szolgál a veleszületett és adaptív immunitás közti kommunikációra. A MAC kialakulását a C8 és C9 molekulához kötődő protektin (CD59) gátolja meg (Erdei és mtsai., 2012).



2. ábra: a C3 hasítása és fragmentumainak receptorai. Az intakt C3 molekula egy α és egy β-láncból áll, melyeket diszulfidhíd köt össze. A C3 egymás utáni hasításai során csak az α-lánc fragmentálódik, a β-lánc érintetlen marad. A C3-konvertáz a C3a lehasításával a C3b molekulát hozza létre (ennek α-láncát α'-ként jelöljük), mely a felszínre kerülő tioészterkötésén (az ábrán ▼-gel jelölve) keresztül kovalensen kötődhet aktiváló felszínhez. A C3b-t az I-faktor kofaktor jelenlétében hasítja tovább az iC3b és C3f, majd a C3dg és C3c molekulákra. A kovalensen kötődő C3b, iC3b és C3dg molekulák különböző receptorokkal rendelkeznek, és különböző funkciókkal bírnak (Law és mtsai., 1997, nyomán).

Az eddig említett membránkötött regulátorfehérjéken kívül szolúbilis regulátorok is megtalálhatók az emberi szervezetben. Az alternatív út és amplifikációs lépésének fő regulátora a H-faktor (FH), mely szintén egyaránt bír konvertázdestabilizáló és kofaktor aktivitással az I-faktor általi proteolízisben. A túlzott mértékű amplifikációval olyan mennyiségű C3b keletkezhetne, mely már a saját sejteken is komplementaktivációt idézne elő, azokat károsítaná és pusztítaná el. A számos regulátorfehérjének köszönhetően normál esetben ez nem következhet be. A CP/LP útvonalon a H-faktorhoz hasonló szerepet a C4b-kötő fehérje (C4BP) tölti be. A C4BP, H-faktor, CR1, DAF és MCP homológ fehérjék, a regulators of complement activation (RCA) fehérjecsalád tagjai, melyek különböző számú 60 aminosavas alkotóelemekből (short consensus repeat, SCR) állnak (Ehrnthaller és mtsai., 2011; Sjöberg és mtsai., 2009).

3.5. A komplementrendszer egyéb feladatai

A komplementrendszernek nem csak a mikrobák eliminációjában van szerepe. Az apoptotikus vagy sérülés következtében nekrozissal elhalt sejtek, sejtörmelékek eltávolításában is kulcsfontosságú szerepet játszik. Az apoptotikus sejtek kezdetben csökkentik a membránkötött regulátorok (mint a CD46) expresszióját, majd sejtfelszíni összetételük úgy változik meg, hogy az MBL és a C1q globuláris feji doménjén keresztül közvetlenül kötődhet, és beindítja a lektin, illetve klasszikus utat. A sejtfelszínre kerülő eredetileg intracelluláris molekulák, így például a DNS is komplementaktivátorok. Hogy ne keletkezzen mindig gyulladás egy apoptotikus sejt eltávolításakor, attenuált komplementaktivációra van szükség, a C5a felszabadulását gátolni kell. Az attenuációt regulátorok, mint a C4BP és FH biztosítják. A pentraxinok családjába tartozó PTX3 és CRP mind az aktivátorokat, mind az inhibitorokat megkötik, így úgy gyorsítják a C3b-mediált fagocitózist, hogy közben a túlzott mértékű aktiválódás veszélyét is csökkentik.

Ha a komplement túlzott mértékben aktiválódik, - ami ilyen pozitív visszacsatolást tartalmazó rendszereknél nem is nehéz - az apoptotikus sejtek eltávolításába is jóval több energiát fektet a szervezet, de súlyosabb esetekben akár a saját sejtek is károsodhatnak. Ilyen túlzott mértékű aktiválódás játszik szerepet például az időskori makuladegeneráció (AMD), rheumatoid arthritis (RA) vagy az atipikus hemolitikus urémiás szindróma (aHUS) esetében is (Sjöberg és mtsai., 2009).

A komplementrendszer ezen kívül a B-sejtek érésében, Toll-like receptorok közti crosstalkban és számos nem immunológiai folyamatban is - mint a lipid metabolizmus, angiogenezis, szöveti regeneráció, szinapszisok érése - részt vesz (Ricklin és mtsai., 2010).

4. A patogének menekülési stratégiái a komplementrendszer elől

A komplementrendszert gyakran szokás az első védelmi vonalként emlegetni, így nem csoda, hogy a patogének is számos menekülési stratégiát dolgoztak ki ellene. Ha a kaszkád valamelyik lépését, elemét gátolják, virulenciájukat jelentősen növelhetik. A lehetőségek egy ilyen sokkomponensű rendszernél elég szerteágazóak, ám a legtöbb patogén (baktériumok, vírusok, gombák) - ha evolúciós léptékben messze is áll egymástól - csak pár hasonló stratégiát alkalmaz: proteázokat szekretálnak, a gazdaszervezet komplementregulátorait kötik meg vagy ahhoz hasonló fehérjéket expresszálnak, olyan inhibitorfehérjéket termelnek, melyek a felismerést, konvertázenzimek összeszerelődését vagy az anafilatoxinok receptoraikhoz való kötődését gátolják. Ezen stratégiák nem csak, hogy nagyon izgalmasak, és a patogének "leleményességére", a patogén-gazda koevolúcióra világítanak rá, de ismeretük a betegségek gyógyítása - mint terápiás célpontok - szempontjából is fontos (Frank, 2001; Lambris és mtsai., 2008).

Terjedelmi okok miatt nincs lehetőség a különböző patogének menekülési stratégiáinak egyenkénti bemutatására. A *Staphylococcus aureus* az immunrendszer védekező mechanizmusának valamennyi lépését több, mint 50 faktor szekretálásával gátolja, így menekülési stratégiája intenzíven kutatott terület, melyről sok információ áll rendelkezésünkre (Chen és mtsai., 2010). A szakdolgozat ezért főleg a *S. aureus* menekülési stratégiáival foglalkozik, néhány kitekintéssel más patogének egyéb megoldásaira.

A *Staphylococcus aureus* korunk egyik gyakori patogéne. Az emberi populáció 20%-ban általánosan megtalálható az elülső orrüregekben, ám alkalmanként bőrfelszíni elváltozásokat (impetigo, furunkulusok) vagy akár invazív fertőzéseket - mint a szeptikus arthritis, osteomyelitis, endocarditis, tüdőgyulladás, bacteremia - okozhat (Foster, 2005). Kezelésüket megnehezíti, hogy az 1960-as években megjelentek, és azóta egyre jobban elterjedtek a methicillinre ellenálló MRSA törzsek. Az 1990-es évek közepéig az MRSA törzsek szinte kizárólag kórházakban tartózkodó vagy műtéteken áteső, legyengült

betegeket fertőzték meg, a '90-es évek végén megjelenő és az USA-ban járványt okozó ún. community-associated, CA-MRSA törzsek (az USA300 és USA400) viszont az egészséges, a fertőzést megelőző években kórházakban nem járt embereket is megfertőzik (Daum és Spellberg, 2012).

2003-ban az Egyesült Államokban már a kórházi *S. aureus* fertőzések 64,4%-át MRSA törzsek okozták. Becslések szerint 2005-ben az USA-ban 94360 (31,8/100.000) ember fertőződött meg invazív MRSA törzsekkel, melynek következtében 18650 (6,3/100.000) ember halt meg (Klevens és mtsai., 2007).

A *S. aureus* különböző menekülési stratégiái aszerinti sorrendben kerülnek bemutatásra, hogy a komplementaktiváció mely szintjén hatnak, kezdve a patogén felismerésétől az opszonikus részecskék lerakódásán és anafilatoxinok felszabadulásán át egészen a MAC képzéséig.

4.1. Első szint: a felismerés gátlása

A komplementaktiváció első szintje maga a patogén felismerése. Az immunglobulinok kötődése nem csak a fagocitózist segíti elő, hanem a klasszikus út C1q általi aktiválódásához is szükséges. A *S. aureus* membránkötött Protein A (SpA) fehérjéje 4-5 doménnel rendelkezik, melyek egyenként képesek az IgG molekulák Fc részét kötni. Mivel az Ig-k Fc részükkel kötődnek a fagociták Fc-receptorához és a C1q-hoz is, az SpA a baktérium felszínét olyan IgG-kel borítja be, melyek effektor funkciójuk teljesítéséhez helytelen orientációban helyezkednek el. Az SpA funkciója nem csak a komplementre korlátozódik: a B-sejtek IgM receptorának antigénköti (Fab) V_H3 doménjéhez kötődve szuperantigénként viselkedik: úgy stimulálja a B-sejteket, hogy azok proliferáljanak és apoptózissal elpusztuljanak, így nem alakul ki normális adaptív immunválasz. Az SpA egerekben a B-1 és marginális zóna B-sejtekre hat a leginkább (Kim és mtsai., 2012). Ebben az interakcióban az SpA II-es és III-as, az IgG kötésben pedig az I-es hélice játszik szerepet (Foster, 2005). Az SpA funkciója valószínűleg még ennél is sokszínűbb: felismeri a TNF- α receptorát, a TNFR-1-t. Az SpA-TNFR-1 által közvetített szignalizációs útvonal a *S. aureus* általi tüdőgyulladás kialakításában játszik szerepet (S H M Rooijackers és mtsai., 2005). Ezen kívül megköti a vérlemezkék adhéziójában szerepet játszó von Willebrand

faktort és a B-sejteken, vérlemezkéken kifejeződő gC1qR/p33 receptort is. Endocarditis kialakulásához a vérlemezkékkel való interakciója szükséges (Kim és mtsai., 2012).

Az Sbi (Staphylococcal binder of immunoglobulins) és SSL-10 (Staphylococcal superantigen-like protein 10) szintén IgG molekulákat kötnek, és a klasszikus út általi aktivációt és a fagocitózist gátolják (Serruto és mtsai., 2010). Az Sbi 2 Ig-kötő domént tartalmaz, melyek az SpA Ig-kötő doménjával szekvenciahasonlóságot mutatnak, ám az Sbi az Ig-k Fc részét köti csak meg, Fab régiójukat nem (Kim és mtsai., 2012). Az Sbi a C3b-vel és H-faktoral egy háromkomponensű komplexet is kialakít, melyet a 4.2.5. fejezet tárgyal részletesebben.

Az SSL-7 az IgA1 és IgA2-k megkötésével és receptorukhoz (FcαRI, CD89) való kötődésüknek gátlásával azokon a helyeken segíti a *S. aureus*, ahol a B-sejtek IgG helyett IgA-t termelnek (Rooijackers, van Kessel és mtsai., 2005). Az IgA főleg mukozális felszíneken szekretálódik, megkötésével a *S. aureus* a kolonizáció helyére koncentrálnak (Lorenz és mtsai., 2013). Az SSL-7 a C5 kötésére is képes. (4.3.2. fejezet). Ez is mutatja, hogy a *S. aureus* immunrendszer előli menekülést biztosító fehérjéinél gyakori, hogy egy fehérje több, különböző funkciót lát el.

Számos szekretált molekula képes Ig-k hasítására. A Staphylokinase (SAK) a gazda szérumában található plazminogént köti meg, melyet aktív plazminná alakít át. A plazmin (PL) az IgG molekulák Fc részének lehasításával effektor funkciójukat teljesen gátolja (Rooijackers, van Kessel és mtsai., 2005). A SAK másik, még változatosabb funkcióját a 4.2.4. fejezet mutatja be.

Más mechanizmuson keresztül hat a membránkötött ClfA (Clumping factor A). Nevét eredetileg onnan kapta, hogy a fibrinogénmolekulák γ láncának C-terminálisát kötve képes két különböző sejtet fibrinogénon keresztül összekapcsolni. A sejtek *in vivo* azonban nem találhatók meg ilyen nagy mennyiségben, így a főleg stacionárius fázisban kifejeződő ClfA feladata más. A gazda fibrinogénjeivel olyan mértékben beboríthatja a sejtfelszínt, hogy már az opszoninok sejthez való hozzáférhetőségét gátolja (Foster, 2005). A ClfA védelmet nyújt a *S. aureus* humán neutrofilek általi fagocitózisa ellen. Valószínű, hogy a különböző fibrinogénkötő fehérjék, mint például a ClfB is hasonlóan hatnak, csak a baktériumok növekedésének exponenciális fázisában (Foster, 2005). Mivel a ClfA fibrinogén jelenléte nélkül is antifagocitikus hatékonyságúnak bizonyult, sejteni lehetett, hogy egyéb funkcióval is rendelkezik: képes az I-faktor megkötésére, és kofaktoraként

viselkedve a C3b proteolízisét segíti elő. A fibrinogénkötésben a P336 és Y338 aminosavak kulcsfontosságúak. A P336A, Y338S ClfA mutánsok (ClfAPYII) nem kötik a fibrinogént, és nem csak a ClfA⁺, hanem a ClfA nullmutáns törzseknél is kevésbé virulensek. A ClfAPYII mutáns az I-faktort a vad típusú törzsekhez hasonlóan köti, kofaktoraktivitása viszont nincs. Hair és mtsai. erre a következő magyarázatot adták: az I-faktor inaktivált formában van jelen, a fibrinogén-ClfA komplexhez kötődve konformációs változást szenved, és aktív formává alakul át. Az I-faktor önmagában is képes a ClfA-hoz kötni, ám ekkor inaktív formában marad. A fibrinogén tehát nem az I-faktor kötéséhez, hanem aktív formává alakításához szükséges. Emellett, fiziológiás fibrinogénkoncentrációnál a ClfA több I-faktort köt, mint fibrinogén nélkül (Hair és mtsai., 2010).

A legtöbb klinikai baktériumtörzs sejtfalán kívül még egy poliszacharidokból álló vékony kapszulát is fejleszt. A kapszula ugyan nem akadályozza meg a komplement általi felismerést, aktivációt és C3b-depozíciót, de a neutrofilek komplementreceptorainak az opszoninokhoz való hozzáférhetőségét gátolja, így antiopszonikus tulajdonságú (Foster, 2005).

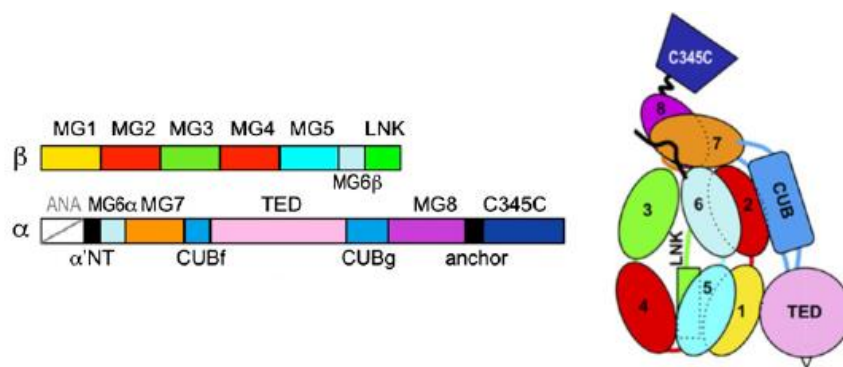
4.2. Második szint: a C3-konvertáz gátlása

A kaszkád egyik legkitüntetettebb pontja a C3-konvertáz létrejötte: a C3 hasításával keletkező C3b (vagy a további hasítási termék, az iC3b) az opszonikus fagocitózist segíti elő, nagyobb koncentrációban pedig a C3/C5 szubsztrátváltással a C5a anafilatoxin felszabadulását idézi elő, így nem csoda, hogy a patogének számos, a C3-hasítási lépésbe beavatkozó molekulát szekretálnak. Ha a komplementaktiváció be is indult, e lépésbe avatkozva a patogén sikeresen megmenekülhet.

4.2.1. A C3 és C3b molekulák szerkezete

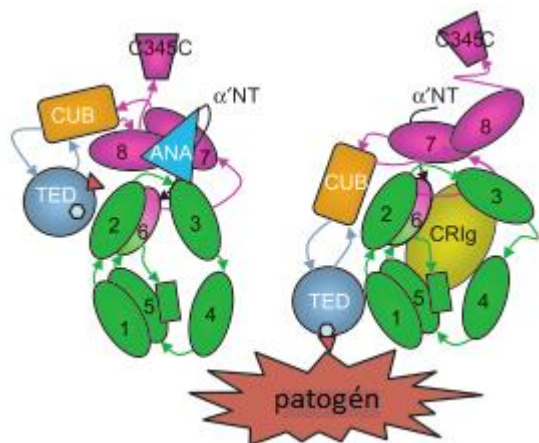
Mivel a szakdolgozat a C3-konvertáz gátlásának molekuláris mechanizmusára is kitér, megértéséhez ismernünk kell a C3b (és C3) molekula szerkezetét. Az intakt C3 molekula egy α - és β -láncból áll, melyeket diszulfidhíd tart egyben. (3. ábra) A molekula összesen 13 doménből áll. A β -lánc 6 makroglobulin (MG1-6) doménje megtekeredve egy ún. β -gyűrűt alkot, mely az aktiválódás során jelentősen nem változik, lehetőséget adva

más domének konformációváltozására. Az α -lánc N-terminálisán található az anaphylatoxin (ANA) domén, mely a C3a-t tartalmazza. A C-terminális felé haladva a MG7 és MG8 domének fogják közre a CUB-TED doméneket (Janssen és mtsai., 2006). A thioester-containing domain (TED) tartalmazza a 4 aminosavból (Cys-Gly-Glu-Gln) felépülő, 15 atomból álló vázú tiolaktongyűrűt, melyben a Cys988 és Gln991 aminosavak tiol- és amidcsoportjai között egy tioészterkötés alakul ki. A tiolaktongyűrű felépítése (Cys*-Gly-Glu-Glx*) már 1980-ban majdnem teljesen ismert volt. 5 évvel később cDNS szekvenálással állapították meg, hogy a Glx glutamin és nem glutamát. A tiolaktongyűrű felépítése megegyezik a C4b és α 2 makroglobulin molekulákban is, és evolúciósan is erősen konzervált (Law és mtsai., 1997). A TED domént mindkét oldalról a CUB ('complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1') egy aldoménje, a CUBf és CUBg határolja, melyek a C3f, illetve C3g molekulák részét képezik. Az α -lánc C-terminálisán a C345C domén található (Janssen és mtsai., 2006).



3. ábra: a C3b molekula doménszerkezete. MG- macroglobulin, LNK- linker, ANA- anaphylatoxin (szürkével jelölve, csak a C3 molekulában található meg), α' NT- a C3b új N-terminális doménje, CUB-complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1, TED- thioester-containing domain, anchor- 'horgony' régió, C345C- az α -lánc C-terminális doménje (Chen és mtsai., 2010, nyomán).

Mivel a legtöbb ligandum (FH, FB, CR-ek, properdin) csak a C3b-hez (esetleg a vele strukturálisan megegyező C3(H₂O)-hoz) kötődik, sejteni lehetett, hogy komplementaktiválódás során a molekula konformációja jelentősen megváltozik. (4. és 5. ábra) A natív C3 molekulában a C3a-t tartalmazó ANA domén stabilizálja a TED és MG8 érintkező felületét. Az ANA lehasadásával ez a stabilizálás megszűnik, az MG8 és MG7 domének elfordulnak, az α -lánc új N-terminális doménje (α' NT) a molekula ellentétes részén felszínre kerül, a CUB és TED domének pedig kilendülnek (Gros és mtsai., 2008).



4. ábra: a C3a lehasadására bekövetkező konformációváltozás. ANA- a lehasadó anaphylatoxin domén, α' NT- a C3b α -láncának új N-terminálisa, TED- thioester-containing domain, CUB- complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1 domain, 1-8- makroglobulin domének. A szerzők a C3b-t egyik receptorával, a komplement receptor Ig-vel (CRlg) stabilizálják (Wiesmann és mtsai., 2006).

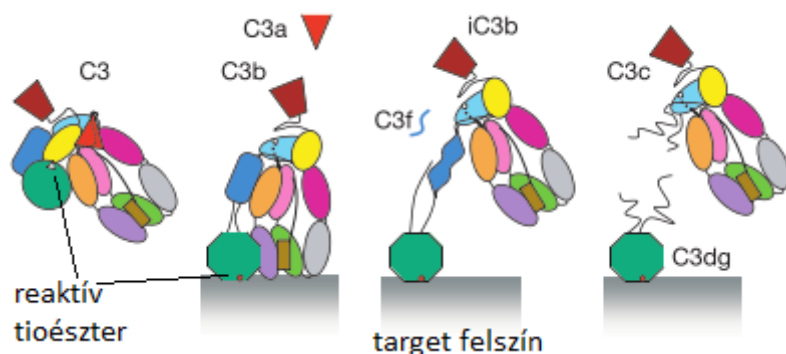
A C3 molekulát Janssen és mtsai metaforaként egy bábjátékoshoz hasonlították, melyben az illető testét a MG1-6 és linker domének, vállait az MG7 és MG8, fejét a C345C alkotják. A bábjátékos babáját (TED) karjaival (CUB domén) a vállaihoz szorítja. A C3b-ben a bábjátékos bábját karjával (TED-CUB) leengedi, mely maga után vonja vállai (MG7-8) elfordulását is (Janssen és mtsai., 2006). A cikk internetes videójában ez a hasonlat és a konformációváltozás könnyebben megérthető.¹

Az eddig a molekula belsejében rejtve maradt α' NT felszínre kerülésével kötőhelyet biztosít a FB, FH és a CR1 számára. A TED domén 85 Å-re eltávolodva felfedi tioészterkötését (Wiesmann és mtsai., 2006). A His1104 ekkor olyan közelségbe kerül a tioészterkötéssel, hogy egy acil-imidazol intermedieren keresztül a cisztein tiolát csoportját felszabadítja, mely bázisként viselkedve a Gln991 egy nukleofil akceptorhoz (hidroxil- vagy aminocsoport) való transzferét katalizálja (Law és mtsai., 1997). Így képes a C3b észter- vagy amidkötésen át aktiváló felszínhez kötődni. A C3 molekulában a His1104 túl messze van az intermedier kialakításához, ehhez a TED domén rotációja szükséges (Wiesmann és mtsai., 2006).

A C3b molekula egésze erősen negatívan töltött. A tioészterkötés környékén a molekula azonban elektropozitív, mely a molekula negatívan töltött targetfelszínekhez (baktériumsejtek, apoptotikus sejtek) való orientációjához szükséges. Mivel az acil-imidazol intermedier nagyon rövid életű (féléletideje kevesebb, mint 100 μ s) és nagyon reaktív, a helyes orientáció nélkül az intermedier az őt körülvevő oldószerrel (H_2O) reagálna (Janssen és mtsai., 2006). A vízzel való reakció a káros, aktiválódás helyétől távoli kötődést gátolja meg (Gros és mtsai., 2008).

¹ - A videó a <http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7116/supinfo/nature05172.html> weboldalon érhető el. (Supplementary Movie)

A C3b szerkezetéről szintén közöltek egy cikket a Nature folyóiratban 2006-ban (Ajees és mtsai., 2006). A cikk szerzői közt szerepel az a H. M. Krishna Murthy, aki e cikkel együtt 10 cikkben is hamis adatokat tett közzé.² A Nature ugyan nem vonta vissza ezt a cikket, de a közölt C3b szerkezet nem minden részletében egyezik meg a Janssen és Wiesmann által kapott szerkezetekkel.³



5. ábra: a C3 konformációváltozásai fragmentumok lehasadására (Gros és mtsai., 2008). A reaktív tioészter a C3a lehasadása során kerül a C3b felszínére, melyen keresztül a C3b és fragmentumai (iC3b, C3dg) az aktiváló felszínhez kötődhet.

4.2.2. SCIN-A

A *Staphylococcus aureus* egy génklasztere, a *S. aureus* pathogenicity island 5 (SaPI5), vagy újabb nevén IEC-1 (first immune evasion cluster) 4 fehérjét tartalmaz, melyek mind humánspecifikusak, ezek a CHIPS, enterotoxin A, a már említett staphylokinase és a staphylococcal complement inhibitor A (SCIN-A) (S. H. M. Rooijackers és mtsai., 2005). A klaszter bakteriofág által integrálódott a β -hemolysint kódoló génbe, és a klinikai és laboratóriumi törzsek 90 %-a hordozza.

A C3-konvertáz szintjén ható SCIN-A-t (a kezdetekben és a továbbiakban csak SCIN) kódoló *scn* gént genetikai analízissel azonosították Rooijackers és mtsai. 2005-ben, mint a SaPI5 hiányzó, negyedik génje. A SCIN egy kevesebb, mint 10 kDa-os, szekretált protein, melynek először antifagocitikus hatékonyságát vették észre: ha neutrofileket *S. aureus*, humán szérum és rekombináns SCIN jelenlétében inkubáltak, a C3b-depozíció

² - <http://www.nature.com/news/2009/091222/full/462970a.html>

³ - <http://www.nature.com/nature/journal/v448/n7154/full/nature06102.html>

gátlásával a baktériumok neutrofilek általi bekebelezése jelentősen csökkent (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2005).

A SCIN a CP/LP C3b-depozíciót részlegesen, ugyanakkor az alternatív út általi C3b-depozíciót teljesen gátolja. Mivel mindhárom út C3b-lerakódása csökken, de a C4b-szint nem változik (tehát a C1 komplex és MBL-MASP aktivitását megtartja), feltételezhető, hogy a SCIN a C3-konvertáz működését gátolja. A C3b és Bb nem csak funkcionálisan, hanem strukturálisan is hasonlít a C4b illetve a C2b molekulákra, így lehetséges, hogy mindkét konvertáz (bár az alternatív út C3bBb-jét hatékonyabban) működését akadályozza.

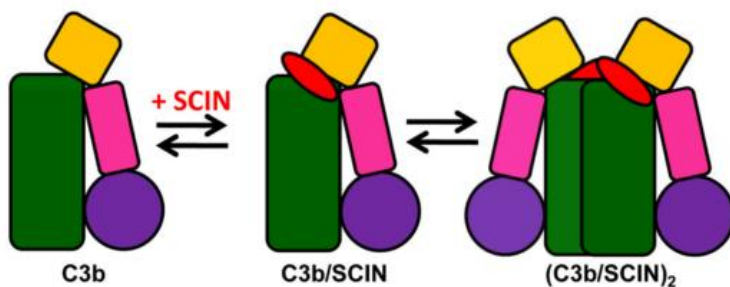
A kezdeti kísérletek (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2005) azt mutatták, hogy a SCIN önmagában nem kötődik a C3b-hez, C3bB-hez, csak a teljesen összeállt C3bBb konvertázhoz, így kötőhelyét a Bb aktív zsebében feltételezték. Felszíni plazmon rezonancia (SPR) és izotermális titrációs kalorimetria eljárással Ricklin és mtsai. 2009-ben kimutatták a SCIN és C3b direkt kötődését, majd a C3b/SCIN és C3c/SCIN kristályszerkezetek is elkészültek (Garcia és mtsai., 2010). A SCIN kötőhelye a C3b molekula C3c részén található α' NT és MG6-7 domének, melyek más orientációban helyezkednek el a C3b-ben, mint az intakt C3 molekulában, így csak az aktivált forma a SCIN liganduma. Az FB kötőhelye a C3b α' NT és C345C doménjeiben található, így C3b-hez való kötődését a SCIN részlegesen gátolja (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2009). Az FB D-faktor általi hasítása pedig csak C3b-hez kapcsolva valósul meg, ugyanis a C3b kötődése során kerül felszínre az FB Ba és Bb közti linker doménje, mely a hasítandó kötést (scissile bond) tartalmazza (Gros és mtsai., 2008). Így kevesebb Bb, ezáltal kevesebb C3-konvertáz keletkezik. A C3bBb komplexet properdinnel stabilizálva SCIN jelenlétében kevesebb Bb fragmentum detektálható (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2005). A SCIN fő funkciója azonban a C3-konvertázok stabilizálás: SCIN jelenlétében a kisebb C2a és Ba fragmentumok nem, csak a felszínköttött C2b és Bb fragmentumok mutathatóak ki. Mivel a C2b és Bb folyamatosan disszociál a komplexről, a konvertázok száma valójában több, mint a felszínen detektált C2b/Bb mennyisége (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2005).

A C3-konvertázok eleve rövid életű, tranziens komplexek, féléletidejük 1-2 perc. A disszociált C2b és Bb inaktív, és nem képes reasszociálni, új konvertázt alkotni, mert hiányzik róluk a két lépcsőben megvalósuló kötődés kialakításához szükséges C2a, illetve Ba. A C3b-hez viszont új FB, illetve a C4b-hez új C2 kötődhet. E mechanizmust a C3-

konvertáz dinamikus instabilitásának hívjuk. A folyamatos disszociáció szerepe a komplementaktiváció amplifikációjának regulálása (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2009). A Bb fragmentum konformációja nem különbözik a C3bBb komplexben jelen léve, önállóan mégsem aktív enzim, a C3b kötődése tehát nem allosztérikusan indukálja a Bb proteolitikus aktivitását. A C3b flexibilis C345C doménje "lengő platformként" a Bb aktív részének a natív C3-hoz való orientációjában játszik szerepet (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2009). A SCIN kötődése a C3b-hez e domén flexibilitását, és így a Bb megfelelő orientációját gátolja, a stabilizált komplex így nem képes aktivitását fenntartani (S. H. M. Rooijakkers és mtsai., 2009). Csak a C3->C3b átalakulás a gátolt, ugyanis a natív C3 így is képes kötődni (Chen és mtsai., 2010).

A SCIN funkciója tehát elég sokrétű: mivel a B-faktorról is kompetál, a konvertáz létrejöttét gátolja, a már meglévő konvertázt inaktív formában tartja, sőt, azt sem engedi, hogy a H-faktor a stabilizált konvertázt szétszedje, és új konvertáz alakulhasson ki. Az FH a C3b α' NT, MG6 és TED doménjeihez kötődik (Janssen és mtsai., 2006), kötőhelye a SCIN-nel teljes mértékben átfed. Mivel kofaktor aktivitását sem tudja fenntartani, a C3b->iC3b átalakulás is gátolt, így a CR3 és CR4 (melyeknek liganduma az iC3b) általi fagocitózis sem valósulhat meg (Garcia és mtsai., 2012).

Jongerijs és mtsai. 2007-ben nem csak két új, a SCIN-A-hoz hasonló fehérjét (SCIN-B, SCIN-C) azonosítottak, hanem a SCIN egy új funkcióját is igazolták (Jongerijs és mtsai., 2007, 2010). A SCIN-ben található dimerizációs doménen keresztül dimer konvertázkomplexek (C3bBbSCIN)₂ alakulhatnak ki. Hogy a dimer és monomer komplexek közti különbség vizsgálható legyen, a SCIN dimerizációs doménjén belüli aminosavcserével olyan SCIN mutáns (SCIN Δ C3b₂) hoztak létre, mely nem képez dimereket. Mindkét forma ugyanúgy gátolta a C3 hasítását és C3b-depozíciót folyadékfázisban, bakteriális felszínen azonban 37 °C-on a monomer SCIN-konvertázhoz képest a dimer féléletideje a duplájára, 4 órára nőtt. (A konvertáz féléletideje SCIN nélkül csak 1-2 perc!) Ez önmagában nem magyarázná azt a tapasztalatot, hogy a fagocitózist a vad típusú, dimert képző SCIN teljesen gátolja, míg a mutáns csak 50 %-ban. Ennek hátterében az áll, hogy a dimerizált SCIN-konvertáz rosszabbul kötődik a fagociták CR1 és CR1g receptorához (Jongerijs és mtsai., 2010). A dimer C3b molekulái "háti" részükkel kapcsolódnak, és így elfedik a máj Kupffer-sejtjein kifejeződő CR1g kötőhelyeit (6. ábra).



6. ábra: a SCIN kötődése és a dimer képzése. Zölddel a C3b molekula váza, sárgával a C345C domén, rózsaszínnel és lilával a "bábjátékos" karja és bábja, a CUB, illetve TED domén (Forrás: Garcia és mtsai., 2012).

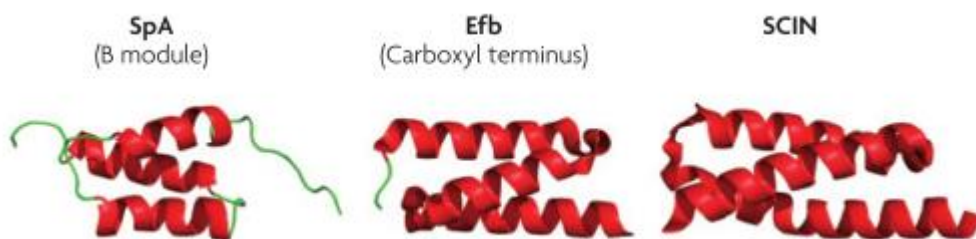
A Kupffer-sejtek a vérbe került patogének kiszűrésében játszanak fontos szerepet, a *S. aureus* így olyan kései fertőzési stádiumban is megmenekülhet a fagocitózis elől, mikor már a szövetekből a véráramba került. A neutrofilek, makrofágok CR1 kötőhelyeit még nem térképezték fel teljesen (a CR1g-C3b kristályszerkezetek viszont már elkészültek, Wiesmann és mtsai., 2006), így a gátlás mechanizmusa további vizsgálatokat igényel.

A *S. aureus*ban adatbázis elemzésekkel három nyílt olvasási keretet azonosítottak, melyek szekvenciája a SCIN-A-val nagymértékben egyezik, ezek a SCIN-B, SCIN-C és ORF-D/SCIN-D. A SCIN-B és -C egy újabb "menekülési klaszter" (evasion cluster), az IEC-2 tagjai. Az ORF-D a génklaszteren kívül van, nem kötődik semelyik C3 fragmentumhoz és a fagocitózist sem befolyásolja, szerepe tisztázatlan (Jongerus és mtsai., 2007). A SCIN-B és SCIN-C viszont a SCIN-A-hoz hasonló mértékben és mechanizmussal gátolja a C3b-depozíciót és a MAC kialakulását, habár a SCIN-B a C3b szintjén kevésbé hatásos a klasszikus és lektin úton, mint a másik két fehérje. A SCIN-B és SCIN-C a *S. aureus* törzsek 47, illetve 32 százalékában vannak jelen, a baktérium védekező stratégiájának redundanciájához járulnak hozzá.

A SCIN-A (és a többi IEC-1 génklaszterben kódolt) fehérje humánspecifikus, nyúl eritrociták nem humán szérum általi hemolízisét nem akadályozza meg. Az *scn* gént is csak emberből izolált baktériumtörzsekben azonosították, ami azt igazolja, hogy a SCIN-A kifejezetten embereket fertőző *Staphylococcus*okban fejlődött ki (S. H. M. Rooijackers és mtsai., 2005). A SCIN-A ígéretes terápiás molekula lehet a komplement túlzott mértékű aktivációja okozta betegségekben, humánspecifitása viszont állatkísérletekben történő vizsgálatának szab gátat. Az IEC-2 tagjai, így a SCIN-B és -C viszont nem humánspecifikusak, ezt támasztja alá az a tény is, hogy a génklaszter a szarvasmarhát fertőző RF122 *S. aureus* törzsekben is jelen van. Az IEC-2 klaszterről - mivel mobilis elemeket és bakteriofág maradványokat tartalmaz - feltételezik, hogy horizontális géntranszfer által kerültek a *Staphylococcus*okba (Jongerus és mtsai., 2007).

4.2.3. Efb

Szintén az IEC-2 tagjai az extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) és homológja, az extracellular complement-binding protein (Ecb/Ehp). A SCIN-hez strukturálisan hasonló, trihelikális szerkezetű fehérjék (7. ábra). Ez a homológia, valamint a kezdeti megfigyelések, miszerint az Efb liganduma szintén a C3 és fragmentumai, és a C3-konvertázhoz kötődik, arra utalt, hogy működésének mechanizmusa is a SCIN-nel megegyező (Garcia és mtsai., 2012).



7. ábra: az SpA, Efb és SCIN szerkezeti hasonlósága (Forrás: Lambris és mtsai., 2008).

Az Efb nevét onnan kapta, hogy N-terminális doménje képes a fibrinogén kötésére. C-terminális doménjének (Efb-C) szerepe ekkor még tisztázatlan volt. Hammel és mtsai. 2007-ben igazolták, hogy az Efb-C kötődik a C3d TED doménjéhez, illetve a C3d-t tartalmazó C3-hoz és C3b-hez egyaránt (Hammel és mtsai., 2007). Ugyanebben az évben Jongerius és mtsai. kimutatták, hogy míg az Efb-C és Ecb a C5a mediált kalciummobilizációt a SCIN-hez hasonlóan a komplementaktiválódás mindhárom útvonalán gátolják, a C3b-depozíció csak az alternatív út működése esetén csökken jelentősen, a CP/LP általi aktivációs útvonalon nem változik. Ezek az adatok bizonyították, hogy az Efb és Ecb csak a C3b-t tartalmazó konvertázokra (AP C3-konvertáz, C5-konvertázok) van hatással, a CP/LP C4b2b konvertázokat nem blokkolja (Garcia és mtsai., 2012). Az a tény, hogy a C5b-9 komplex képződése mindhárom útvonalon kisebb mértékű volt, nem csak a C5 konvertázok, hanem a klasszikus út amplifikációs lépésének gátlásával is magyarázható. A keletkező C3b bármelyik út C3-konvertázához kötődhet, így nem csak a klasszikus út aktivációját erősíti.

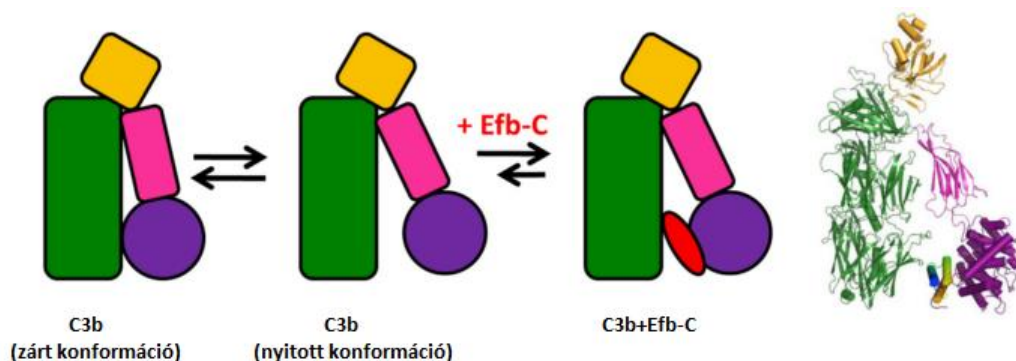
Az Efb azonban más mechanizmuson keresztül fejti ki hatását, mint a SCIN. Az Efb-C kristályszerkezetét szabad, illetve C3/C3b-kötött állapotban 2007-ben oldották meg. Az

Efb-C C3d-kötő felszíne preformált, ugyanis szinte teljesen azonos strukturálisan a két állapotban. Az interakcióban az Efb-C R131 és N138 aminosavak kulcsfontosságúak: irányított mutagenézissel létrehozott dupla mutánsok, az R131A és N138A valamint R131E és N138E aminosavcseréket tartalmazó mutánsok (RANA és RENE) nem képesek ligandumuk kötésére. Az Efb-C/C3d komplex kinetikailag nagyon stabil, féléletideje körülbelül 60 perc (Hammel és mtsai., 2007).

Különböző megfigyelések utaltak arra, hogy az Efb a C3b molekulában konformációs változást idéz elő. Az aktivált C3 formákra (C3b, iC3b, C3c) specifikus ellenanyag, a mAb C3-9 C3b-hez való kötődése sokkal erősebb volt Efb-C jelenlétében, ami azért érdekes, mert az Efb-C kötőfelszíne (C3d/TED) a mAb C3-9 kötőhelyétől (MG7/MG8) 100 Å távolságra van (Garcia és mtsai., 2012). Ez csak egy, a molekula egészére kiterjedő konformációváltozással magyarázható. Szintén különös, hogy az Efb-C affinitása C3b-hez kisebb, mint a hozzá strukturálisan hasonló C3(H₂O)-hoz vagy natív C3-hoz. Ez a preferencia egyedinek számít, ugyanis a szervezet fehérjéi inkább C3b-hez kötődnek, az intakt C3 molekulához vagy egyáltalán nem, vagy csak nagyon kis affinitással kötődnek. Az Efb-C kötődését a C3b MG1 doménje sztérikusan akadályozná, a kölcsönhatás megvalósulásához a C3b molekulán belüli átrendeződések szükségesek (Garcia és mtsai., 2012). Hogy a C3 formák közül a legnagyobb K_d (disszociációs konstans) és k_{on} (asszociáció sebesség) értékek a C3dg-hez tartoztak, azzal magyarázható, hogy a kölcsönhatást semmilyen más domének nem befolyásolják (Hammel és mtsai., 2007).

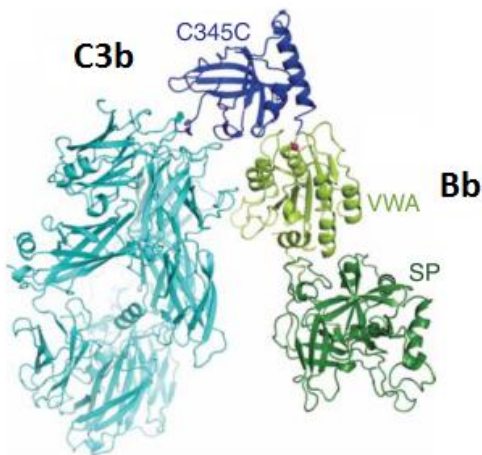
Chen és munkatársainak 2010-ben sikerült bebizonyítaniuk, hogy az Efb-C valójában egy allosztérikus inhibitor (Chen és mtsai., 2010). Hidrogén/deutérium kicserélő tömegspektroszkópiát (HDX-MS) és Small angle X-ray scattering (SAXS) technikákat alkalmazva egy molekula konformációváltozásai nyomon követhetőek. Az Efb-C/C3b interakcióban a kontrol RANA/C3b-hez képest a TED domén HDX értékei alacsonyabbak voltak: a fehérje-fehérje kölcsönhatás védi az interakcióban levő amidhidrogéneket a H/D kicserélődéstől, e technikával is bizonyítható, hogy az Efb a TED doménhez köt. A CUB és MG8 domének HDX értékei is megváltoztak. Ez érthető, ugyanis a TED-ben bekövetkező változások kihatnak a CUB és MG7-8 doménekre (a "kéz" mozgatásával a "kar" és a "váll" is mozdul). A megnőtt HDX értékek megmagyarázzák, hogy miért köt a mAb C3-9 (kötőhelye a MG7/8) jobban a komplexhez: e domének még jobban felszínre kerültek (Chen és mtsai., 2010).

SAXS technikát alkalmazva kiderült, hogy a C3b egy zártabb (45%) és egy nyitottabb (55%) konformációban található meg. A TED domén rotációjával a CUB-TED domének szabadon mozoghatnak, és alakíthatják ki a két konformációt. Az Efb-C az MG1 és TED domének közé ékelődik be, az ék a C3b-t a nyitott állapotban (79 %) stabilizálja (8. ábra).



8. ábra: az Efb-C kötődése a C3b-hez. A különböző színnel jelzett domének megfeleltetése: zöld- C3b váza, sárga- C345C, rózsaszín- CUB, lila- TED. Jobb oldalt a komplex szalagábrázolással (Forrás: Garcia és mtsai., 2012).

Az Efb-C/C3b komplex képződésének alacsony sebességét az magyarázza, hogy az Efb-C csak a nyitott konformerhez tud kötni, hogy elkerülje az MG1 domén sztérikus akadályozó hatását. Ez a konformációváltozás a konvertázformációt akadályozza: a B-faktor kötődése gátolt. Ezt bizonyítja, hogy Efb-C jelenlétében bakteriális felszínen kevesebb Bb fragmentum detektálható (Chen és mtsai., 2010). A D-faktor általi proteolízis ugyanis csak a B-faktor C3b-hez való kötődése során valósul meg, a kötődés váltja ki azt a konformációváltozást, mely során a B-faktor von Willebrand type A (vWA) és SCR3 doménje közti, a D-faktor hasítási helyét tartalmazó linker a felszínre kerül (Torreira és mtsai., 2009). A B-faktor két lépésben kötődik a C3b-hez: először a Ba fragmentum (SCR1-3) kötődik a CUB doménhez, a B-faktor globuláris formából egy 'V' alakot vesz fel, így szabadul fel a linker domén mellett a vWA domén (mely a szerin proteáz SP doménnel együtt a Bb fragmentum alkotója) C3b-kötőhelye is. Az első lépés, az ún. load step a Bb fragmentumot megfelelő orientációba hozza a C3b-vel. A Ba lehasadásával, mivel kevesebb interakciós pont lesz a B-faktor és a C3b közt, a vWA-SP domének sokkal flexibilisebbek lesznek: a kiálló SP domén képes lesz a szubsztráthatásra (Torreira és mtsai., 2009) (9. ábra). Az Efb-C kötődése elsősorban a load stepet, a C3b-Ba interakciót gátolja. A Ba CUB doménben levő kötőhelye nem csak konformációváltozást szenved,



hanem teljesen más pozícióba is kerül. Ezzel szemben a Bb kötőhelyek (C345C) az Efb-C/C3b interakcióban nem érintettek (Chen és mtsai., 2010).

9. ábra: a C3b-Bb interakció. VWA- von Willebrand type A, SP- szerin proteáz domén, C345C- a C3b α -láncának C-terminálisa (Forrás: Rooijackers és mtsai., 2009).

A 20 SCR (short consensus repeat) doménből álló H-faktor regulátorfunkciót biztosító N-terminális SCR1-4 doménjeinek kötőhelye a C3b TED doménjében található. Az Efb-C/C3b interakció a FH SCR1-4 kötődését, és így regulátorfunkcióját teljesen gátolja (Chen és mtsai., 2010). A teljes hosszúságú FH mégis erősebben köt az Efb-C/C3b komplexhez, mint a C3b-hez egyedül, ugyanis a FH SCR19-20 doménje szintén tartalmaz olyan C3b-kötőhelyet, mely az interakció során elérhetőbbé válhat. Hogy a baktériumnak milyen előnye származhat abból, hogy erősebben, ám inaktív formában köti meg a H-faktort, még tisztázatlan (Garcia és mtsai., 2012).

Az Efb-vel homológ, kevésbé vizsgált Ehp fibrinogén kötésére nem képes, viszont majdnem háromszor erősebb inhibitora az alternatív útnak, mint az Efb. Mivel aminosavszekvenciája az Efb-C-vel nagymértékben megegyezik, hasonlóan is tekeredik fel, mégis tartalmaz az Efb-C-től eltérő plusz C3/C3b/C3d kötőhelyet. Működésének mechanizmusa még nem ismert, de mind az Efb, mind a SCIN mechanizmusára emlékeztet: a C3b-ben konformációváltozást idéz elő, de nem a FB kötődését akadályozza meg, hanem C3b-hez való kötődését stabilizálja úgy, hogy a D-faktor ne férhessen hozzá (Garcia és mtsai., 2012).

4.2.4. SAK

Az Efb és Sbi fehérjék nem csak a konvertáz létrejöttét gátolják. Azáltal, hogy a C3/C3b kötése mellett a humán plazminogént (plg) is megkötik, a lehetséges konvertázok számát is csökkentik. A megkötött plg-t a staphylokinase (SAK) vagy humán aktivátora, az urokináz plg aktivátor (uPA) alakítja aktív plazminná, mely utóbbi a C3 és C3b molekulák mindkét láncát egyaránt hasítja (S H M Rooijackers és mtsai., 2005). Sőt, a C3 hasításakor

keletkező C3a proteolízisére is képes, így meggátolja a C3a nem kívánt anafilatoxikus hatását (Koch és mtsai., 2012). Az Efb/Sbi-kötött plg nem csak, hogy hozzáférhető marad aktivátoraihoz, de plazminná alakítva sokkal hatékonyabban hasítja a komplementkomponseket, hisz az Efb/Sbi szimultán és megfelelő közelségben köti a plg-t és C3/C3b-t. A két bakteriális fehérje szekvenciahasonlósága igen csekély, de mindketten tartalmaznak egy trihelikális motívumot, mely a C3d-kötésért felelős (Koch és mtsai., 2012). A staphylokinase-t kódoló *sak* gént a *S. aureus* törzsek 67 %-a fejezi ki, azonban a plazmin generálásának fontosságát jelzi, hogy a *S. aureus* képes az uPA aktivitását növelni emlős sejtekben vagy aureolysin által a prouPA-uPA átalakulást serkenteni (Koch és mtsai., 2012). A plazminogén kötése egyébként bevett stratégiának számít, számos patogén (*H. influenzae*, *B. burgdorferi*, *C. albicans*) alkalmazza.

A klinikai megfigyelések viszont azt mutatták, hogy a SAK expressziója és a *S. aureus* okozta bacteremia kimenetelének súlyossága, mortalitása közt negatív korreláció áll fenn: a SAK-expresszáló törzsek esetében 3-4-szer kevesebb a letális betegségek száma (Jin, 2003). A begyűjtött és aktivált plazmin ugyanis az extracelluláris mátrix komponenseit is bontja, megvonva a baktériumot a letapadásához szükséges felületektől, így kevésbé lesz invazív. Másik lehetséges magyarázat lehetne, hogy a SAK gént tartalmazó bakteriofág a β -haemolysint kódoló génbe ugrott bele, mely gén így nem tud expresszálódni. Mivel a β -haemolysinnek csak elhanyagolható szerepet tulajdonítanak a *S. aureus* patogenezisében, a mortalitási ráták csökkenése valóban a SAK termelésével korrelál (Jin, 2003). Ezt olyan humán plazminogént kifejező transzgénikus egerekkel lehetett kísérletesen igazolni, melyeket különböző mennyiségű SAK-ot expresszáló baktériumtörzsekkel fertőztek. Az eredeti LS-1 baktériumtörzs a *sak* gént nem hordozza, vektorral a gént a baktériumba juttatva az *SpA* promóterrel fúzionáltatva (LS-1 *SpA-sak*) a fehérje ötször nagyobb mennyiségben fejeződött ki, mint saját promóteréről (LS-1 *sak*). Enyhe bacteremia esetén SAK⁺ törzsekkel való fertőzéskor az egerek túlélése magasabb volt, mint SAK⁻ törzsek fertőzésekor. Súlyos bacteremiánál az LS-1 *SpA-sak* törzsekkel való fertőzéskor az egerek kevesebb súlyt vesztek, mint az LS-1 *sak* vagy LS-1EP (üres vektort tartalmazó) törzsek esetén (Kwieciński és mtsai., 2010).

Az *in vivo* eredmények tehát azt mutatták, hogy a SAK a szisztémás fertőzések megakadályozásában és a szimbiotikus kapcsolat fenntartásában fontos. Így például

orrüregben előforduló *S. aureus* törzsek inváziójának veszélyessége is megjósolható: a nem invazív törzsek magas arányban expresszálják e fehérjét (Jin, 2003).

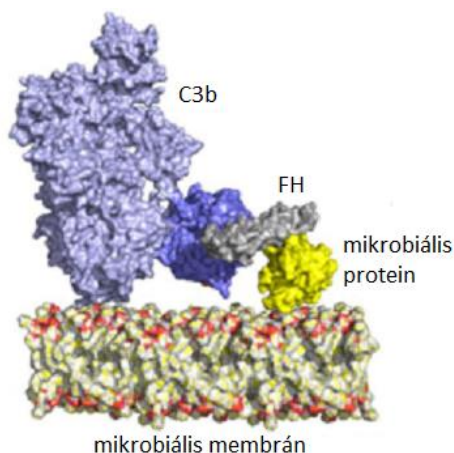
4.2.5. Regulátorok

A C3-konvertáz aktiválódását saját sejteken a szervezet komplementregulátorai akadályozzák meg. Gyakran alkalmazott menekülési stratégiának számít a gazdaszervezet szolúbilis regulátorainak (FH, C4BP) megkötése, így a patogén a megfertőzött szervezet saját molekuláit felhasználva csendesítheti le a komplementaktivációt. Néhány esetben, például az *E. colinál* még membránkötött regulátorok (CD59) *in vivo* transzfere is megfigyelhető. Bizonyos vírusok, mint a fekete- vagy tehénhimlő pedig saját regulátorfehérjéket expresszálnak, melyek szintén SCR doménekből állnak (molekuláris mimikri). Kis méretük ellenére (a vaccinia virus complement-control protein/VCP csak 4 SCR doménből áll) képesek kofaktor és konvertázdestabilizáló hatásuk kifejtésére is (Lambris és mtsai., 2008).

A legfontosabb szolúbilis regulátor, a 20 SCR doménből felépülő H-faktor saját sejtek negatívan töltött glükózaminoglikán vagy szíálsav molekuláihoz a C-terminális SCR20 doménen keresztül kötődik. A C3b C3d részét az SCR19 doménen keresztül köti, így az SCR19-20 a targetfelismerésért felelős. A regulátorfunkciót az N-terminális doménjei (SCR1-4) biztosítják (Kopp és mtsai., 2012). Aktiváló felszínen a H-faktor szabad utat enged a komplementaktivációnak, hisz nincs megfelelő liganduma, ott nem képes kötődni - kivéve ha a patogén FH-kötő fehérjéket fejez ki. Már 1988-ban ismert volt, hogy az M proteint kifejező M⁺ *Streptococcusok* FH kötése által annak konvertázdestabilizáló hatása hatszorosára, kofaktoraktivitása nyolcszorosára nőtt, csökkentve így a komplementmediált fagocitózis mértékét (Horstmann és mtsai., 1988).

Számos, evolúciós léptékben egymástól távol álló patogén, mint a Gram-negatív *P. aeruginosa*, a Gram-pozitív *S. pneumoniae* vagy az eukarióta *C. albicans* különböző fehérjei ugyanazon a részén, az SCR20 doménen keresztül köti a H-faktort. A C3d jelenléte a mikrobiális protein-FH interakciót növeli, és a *B. burgdorferi* OspE (outer surface protein E) vagy a *B. hermsii* FhbA (FH-binding A) fehérjei is a FH19-20 C3b-hez való kötődését erősíti. Ezen eredmények alapján egy háromkomponensű komplex kialakulását

feltételezték, mely komplexnek létre is kell jönnie, ugyanis az OspE önmagában nem köti a C3b-t (Meri és mtsai., 2013) (10. ábra).



10. ábra: a C3b-FH-FH-kötő fehérje komplex bakteriális felszínén (Meri és mtsai., 2013, nyomán).

A vizsgált mikrobiális fehérjék mindegyike az SCR20 domént, annak is egy kitüntetett részét ("superevasion site") köti, melynek 3 kulcsfontosságú aminosava minden interakcióban részt vesz, más aminosavak viszont csak bizonyos interakciókban fontosak, mivel a FH-kötő fehérjék nem homológok, és a közös FH-kötő rész mellett más oldalláncokat igényelnek hidrogénhidak és egyéb fontos kölcsönhatások kialakításához. Mivel a FH kötőhelye csak részlegesen fed át heparinkötőhelyével, molekuláris mimikri helyett itt célszerűbb a funkcionális mimikri fogalmát használni (Meri és mtsai., 2013).

Hogy ilyen sok patogénnél is pont az SCR20 kötése alakult ki, konvergens evolúció eredménye. Azért ez a domén preferált, mert kötésével a C3b még mindig köthető az SCR19 által, és így a H-faktort targetjéhez közel hozza. Az SCR1-4 domének érintetlenek maradnak, a FH regulátorfunkcióját megtartja, sőt, a mikróbaproteint kötve még erősebben fejti ki. Az FH-kötő proteinek hosszú molekulák, így nem csak membránlokalizációjuk helyén képesek hatni (Meri és mtsai., 2013).

Néhány patogén a H-faktort a SCR7 doménjén keresztül köti. Így a 7 SCR doménből álló FHL-1 - mely az FH gén alternatív splicing produktuma, és hasonló funkciókkal bír - is megköthető. Az igazán "biztos" stratégia több különböző fehérje egyidejű szekretálása: a *B. burgdorferi* OspE fehérjéje az SCR19-20, CRASP-1 (Complement regulator-acquiring surface protein 1) fehérjéje pedig az SCR7 domént köti.

Az emberi szervezetben a H-faktor fehérjecsaládba további öt, úgynevezett H-faktorról rokon (CFHR) fehérje tartozik, melyek 4-9 SCR doménnel rendelkeznek. A domének a H-faktor SCR6-9 és 18-20 doménjeivel mutatnak nagyfokú szekvenciahasonlóságot, így ligandumaik a H-faktoréhoz hasonlóak, ám az SCR1-4 hiányában komplementregulátor-funkcióval nem, vagy csak nagyon kis mértékben rendelkeznek. Az 5 SCR doménből álló CFHR1 C-terminális 3 doménjének szekvenciája szinte 100%-ban azonos az FH SCR18-20 doménjével, a *Borrelia* fajok bizonyos CRASP

fehérjéi (CRASP3-5) az FH mellett a CFHR1-et is kötik. A CFHR fehérjék jelenléte ezért lehet, hogy patogén-gazdaszervezet koevolúció eredménye: "förládozzák" magukat, hogy a patogén FH-kötő fehérjéi FH helyett őket kössék, így a komplementaktiváció nem csendesedhet le a patogén felszínén a H-faktor által. A CFHR fehérjékben bekövetkező mutációkkal összefüggésbe hozott különböző vese- és szembetegségek arra engednek következtetni, hogy a fehérjéknek egyéb lokális szerepük is lehet (Józsi és Zipfel, 2008).

Sokáig azt hitték, hogy a *Staphylococcus*ok majdnem minden taktikát alkalmaznak, kivéve regulátorfehérjék megkötését (Lambris és mtsai., 2008). A multifunkcionális Sbi-t - mely az IgG, plazminogén és β_2 -glikoprotein I fehérjéket is köti - 2008-ban azonosították, mint FH-kötő fehérje (Haupt és mtsai., 2008). Az Sbi 4 funkcionális doménjéből az I-II felelős az IgG, míg a III-IV a H-faktor kötéséért. A H-faktor kötése viszont nem önmagában valósul meg (mint például a *Borrelia* CRASP fehérjéi esetén), hanem szérumbeli mediátorok, a C3d fragmentumot tartalmazó molekulák (C3d,C3,C3b, de az iC3b nem) által, melyekkel az Sbi egy háromkomponensű Sbi:C3:FH komplexet képez. A H-faktor direkt kötődik az Sbi-hez, melyet a C3d "asszisztál" (Haupt és mtsai., 2008). FH-fragmentumokkal igazolták, hogy az Sbi-kötőhelyet az SCR19-20 tartalmazza. (Meri és mtsai. sajnos az Sbi fehérjét nem vizsgálták, hogy vajon az FH ugyanazon a részén kötődik-e hozzá, mint a fentebb említett fehérjéknél.) Az Sbi az alternatív útvonalat hatásosan blokkolja, viszont a CP/LP zajló komplementaktiváció ellen nem nyújt védelmet. Hatásköre széles, nem csak humán szérumra korlátozódik.

A fejezetet összegezve elmondható, hogy a *S. aureus* a C3-konvertázt működését nagyon hatékonyan gátolja: az Efb nem engedi létrejönni, a SCIN a már létrejöttet tartja inaktív formában, az Sbi a H-faktor megkötésével pedig annak szétesését segíti elő (Chen és mtsai., 2010). Az Sbi és Efb plazminogén megkötésével a C3b-t hasítja, így a létrejövő konvertázok száma is eleve kevesebb.

4.3. Harmadik szint: a C5a anafilatoxikus hatásának és a terminális út aktivációjának gátlása

A komplementaktiváció során, ha a C5-konvertáz létrejön, a C5 molekula hasításával C5a szabadul fel. A C5a kemoattraktáns minden myeloid sejttel szemben, receptorhoz való kötődése a leukociták adhézións molekula (ICAM-1) expressziójának növekedését, citokin szekréciót, proteolitikus enzimek és reaktív oxigén- és nitrogénvegyületek felszabadulását idézi elő. Szerepe van a simaizom-összehúzóásban, az ér átmérőjének és permeabilitásának változtatásában. Biológiai aktivitása a C-terminális argininjének karboxipeptidáz általi lehasításával (C5a-desArg) jelentősen csökken (Wright és mtsai., 2007).

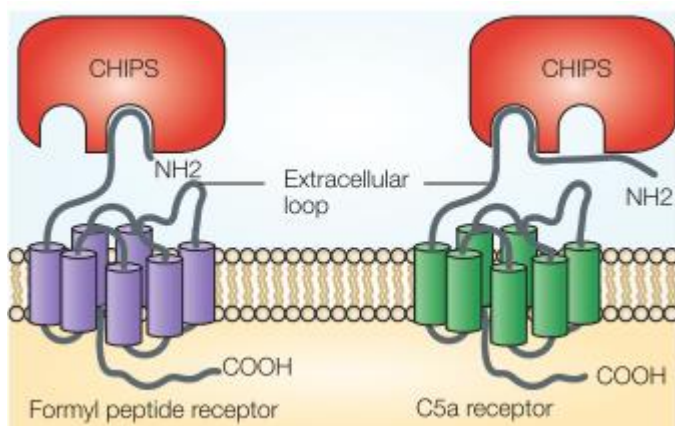
A C5a receptora egy rodopszin fehérjecsaldba tartozó GPCR (G-protein coupled receptor). A GPCR-ek 7 transzmembrán (TM) hélixből állnak, melyeket hurkok (loop) kötnék össze, N-terminális végük az extracelluláris, C-terminálisuk az intracelluláris oldalon található. Ligandumkötéskor a molekula konformációja megváltozik, melynek következtében egy G-fehérjét aktivál. A különböző G-fehérjék különböző szignalizációs útvonalakat aktiválnak, a C5aR C5a kötésekor a PI3-K, PLD, PKC, MAPK, vagy makrofágok esetén az NF- κ B útvonal aktiválódik (Sarma és Ward, 2013).

A C5a két részén keresztül köt receptorához, a C5aR-hez: diszulfidhidat tartalmazó fő része (core) a C5aR N-terminálisához és a 3. extracelluláris hurokhoz, míg a C5a C-terminális az 5. transzmembrán domén által létrehozott zsebbe köt. A receptorhoz való kötődéshez a C5a mindkét része szükséges (Sarma és mtsai., 2013).

4.3.1. CHIPS

S. aureus törzsek 60%-a szekretálja a 121 aminosavból álló chemotaxis inhibitory protein of staphylococci (CHIPS) fehérjét, mely az IEC-1 tagja. A CHIPS a C5aR N-terminális részét blokkolja csak, de már ez is meggátolja a C5a kötődését. A CHIPS és a C5a nem mutatnak homológiát sem szekvenciájukban, sem harmadlagos szerkezetükben, egyedül méretük és alakjuk hasonló (Sarma és mtsai., 2013). A CHIPS ezenfelül a formilpeptid-receptor (FPR) antagonistája is. Prokarióta fehérjék iniciátor aminosava az eukariótákkal ellentétben nem metionin, hanem formil-metionin. A bakteriális fehérjék

proteolízisekor felszabaduló formilált peptidfragmentumok az FPR-hez kötve szintén inflammatorikus hatásúak. A CHIPS FPR-kötőhelye az N-terminálisán lokalizált, és távol van a C5aR-kötő doméntól (11. ábra) (Foster, 2005).



11. ábra: a CHIPS kötődés humán receptorokhoz (Forrás: Foster, 2005).

A C5a másik receptora, a C5L2 a C5aR receptorral 35% szekvenciahasonlóságot mutat. Granulociták és éretlen dendritikus sejtek fejezik ki. A C5a-t és dezarginált formáját is közel azonos affinitással köti, utóbbit erősebb affinitással, mint a C5aR. A C5L2 szintén 7TM-receptor, de nem kapcsolódik hozzá G-fehérje, így Ca-

mobilizáció sem figyelhető meg ligandumkötéskor. A receptor gyulladásos folyamatokban betöltött szerepe kérdéses (Sarma és mtsai., 2013). Lehetséges, hogy gyulladáscsökkentő, a C5a negatív regulátora, hisz kivonja a keringésből a C5a-t és C5a-desArg molekulát, meggátolva a túlzott mértékű inflammatorikus választ (Wright és mtsai., 2007).

Wright és mtsai. 2007-ben létrehoztak egy N-terminális doménjétől megfosztott, rekombináns CHIPS fehérjét (rCHIPS₂₈₋₁₄₉). A CHIPS₂₈₋₁₄₉ a C5aR-hoz kötődik, és a C5a kötődését megakadályozza. A C5L2 receptorhoz csak minimálisan kötődik, ami érdekes a C5L2 és C5aR N-terminálisának nagy szekvenciahasonlósága miatt. A C5a kötődését nem, míg a C5a-desArg kötődését nagy koncentrációban gátolta, így elképzelhető, hogy a C5a- és C5a-desArg kötőhelyei eltérőek. Az, hogy a CHIPS csak a C5aR-t blokkolja, a C5L2-t pedig nem, fontos a *S. aureus* számára: a gyulladásos válasz negatív regulátorának blokkolásával a C5aR blokkolásának hatását közömbösítené. A C5a-desArg C5L2-höz való kötődésének megakadályozása *in vivo* valószínűleg nem valósul meg, ugyanis túl magas CHIPS-koncentrációt igényel (Wright és mtsai., 2007).

A CHIPS gyulladásos betegségekben való alkalmazása is felvetődött. 24 vizsgált, "normál", nem *S. aureus* által fertőzött egyénekben is mind kimutathatóak voltak anti-CHIPS ellenanyagok (IgG és IgA), a CHIPS tehát túl immunogén ahhoz, hogy gyógyszerhatóanyagként használjuk. Mivel az ellenanyagok a CHIPS különböző epitópjaihoz kötődnek, csak némelyek gátolják meg kötődését a C5aR-hez, mások akár elő

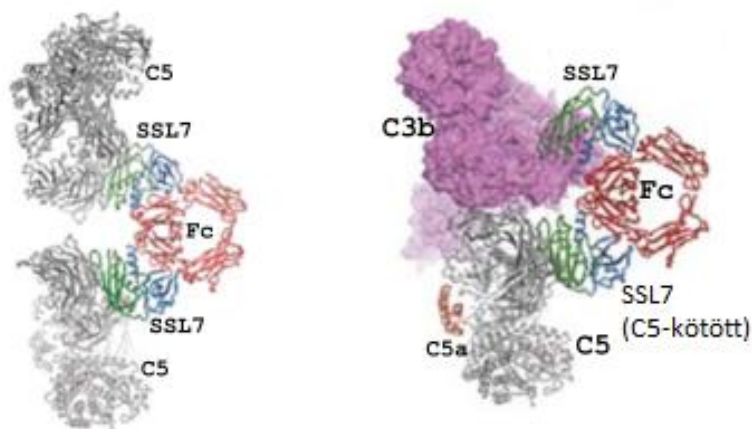
is segítik azt. Az interakciót csökkentő antitestek *S. aureus* elleni fertőzésekben "bevezethetők" lennének, azonban az antitest fertőzött vagy egészséges emberben való jelenléte, illetve szérumbeli koncentrációja nem korrelál azzal, hogy a CHIPS kötődését elősegíti, gátolja, vagy nem befolyásolja (Wright és mtsai., 2007).

4.3.2. SSL7

A *S. aureus* superantigen like 7 (SSL7) a 14 fehérjéből álló SSL család tagja, melyek nem viselkednek szuperantigénként, de struktúrájuk homológiát mutat velük. (Bestebroer és mtsai., 2010) Míg az N-terminális OB domén az IgA-t, a C-terminális β -grasp domén a C5 molekulát köti meg, így szimultán képes az IgA és C5 kötésére. Géliszűrési kromatográfiával az Fc-SSL7₂-C5₂ komplex létét meg lehetett jósolni (Laursen és mtsai., 2010) (12. ábra). Ellentmondásos adatok születtek arról, hogy az IgA megkötése kizárólagosan szükséges a C5 C5-konvertázhoz való kötődésének gátlásához (Laursen és mtsai., 2010), vagy csak a gátlás mértékét növeli (Bestebroer és mtsai., 2010; Lorenz és mtsai., 2013). Az SSL7 nem specifikus humán IgA-ra, de egér IgA-t nem köt, így egér modellekben vizsgálható IgA kötésének jelentősége. Immunkomplexek (Bestebroer és mtsai., 2010), illetve *S. aureus* által kiváltott (Lorenz és mtsai., 2013) egér peritonitisben az SSL7 a neutrofilek migrációját meggátolja, ám humán IgA hasüregbe való injektálása a gátlás mértékét növeli. Tehát *in vivo* is bizonyított, hogy az IgA kötése a C5a anafilatoxin keletkezését erősebben gátolja.

Rekombináns SSL7 molekulát expresszáló *Lactococcus lactis* esetében az SSL7 hatása az egyéb *S. aureus* virulenciafaktorok nélkül vizsgálható. Az SSL7⁺ *L. lactis* túlélése már 0,25 μ M SSL7 koncentráción is 40-szeresére nőtt az SSL7⁻ törzsekhez képest, és négyszeresére az SSL7 IgA⁻, azaz IgA kötésére nem képes SSL7-et kifejező mutáns törzsekhez képest. Bár a Gram-pozitív *L. lactis* felszínén kialakuló MAC nem képes a sejt lízisére, az SSL7 a MAC (C5b-9) kialakulását is meggátolja. A gátlás SSL7 IgA⁻ törzsekben negyedrésszére csökken (Lorenz és mtsai., 2013). Az IgA kötése viszont egyáltalán nem szükséges vörösvérsejtek hemolízisének gátlására, melyet az magyarázhat, hogy a hemolízist reguláló C3bBb3b nem igényli az IgA-SSL7₂-C5₂ komplexet, míg az SSL7-re kevésbé érzékeny, *E. coli* bakteriális aktivitását reguláló C4b2b3b C5-konvertáz igen (Laursen és mtsai., 2010).

Az SSL7 a C5 C5a-t tartalmazó részének ellentétes oldalán, az MG1 és MG5 domének közt kötődik, tehát a C5 molekulában lévő hasítási helyet nem fedi el, a C5 C5-konvertázhoz C3b₂ dimeren keresztüli kötődését gátolja (12. ábra). Az IgA kötése sztérikusan gátolja a C3b-hez való hozzáférhetőségét, ez a gátlás még egy SSL7, illetve SSL7-C5 kötődésével még nagyobb mértékű. A C5-SSL7-IgA komplex ezenfelül az SSL7-re specifikus IgG-k hozzáférhetőségét is nagyban megakadályozza (Laursen és mtsai., 2010).



12. ábra: az Fc-SSL7-C52 pentamer és az IgA-kötés jelentősége. Fc- az IgA Fc régiója (Forrás: Laursen és mtsai., 2010).

4.4. Negyedik szint: a membránkárosító komplex kialakulásának megakadályozása

Sok patogén rendelkezik a MAC kialakulása ellen passzív menekülési stratégiával. A Christian Gram által kidolgozott festési eljárással, a Gram-festéssel a Gram-pozitív és -negatív baktériumokat különböztethetjük meg. A Gram-pozitívak például a *Staphylococcus*, *Streptococcus* és *Clostridium* vastag, több rétegből felépülő murein, avagy más néven peptidoglikán (N-acetilglukózamin és N-acetilmuraminsav polimerje) sejtfallal rendelkeznek, mely eleve meggátolja a MAC kialakulását. Érdekes, hogy a Gram-pozitív *Streptococcusok* is rendelkeznek a MAC létrejöttét gátló, C5b-C7 komplexszel interferáló SIC (Str. Inhibitor of Complement) fehérjével. E fehérje - még ha rendelkezik is más funkciókkal - MAC-gátlásban betöltött szerepe nem tisztázott (Lambris és mtsai., 2008).

A Gram-negatívak murein sejtfala viszont jóval vékonyabb, de egy külső, lipopoliszacharidból (LPS) felépülő membrán is található a sejtfal extracelluláris oldalán. A

MAC a Gram-negatívok külső és belső sejtmembránjába egyaránt képes behatolni, bár hogy utóbbin a MAC komponensek hogyan szerelődnek össze, még tisztázatlan (Serruto és mtsai., 2010). A C8b és C9 megkötésével a *B. burgdorferi* CD59-szerű (CD59-like) fehérjéje a membránfúró komplex összeszerelődését gátolja, az *E. coli* pedig a gazdaszervezet membránkötött CD59 fehérjéjének átvételére képes (Lambris és mtsai., 2008).

5. A komplementrendszer felhasználása a fertőzés során

A patogének komplementrendszer elleni védekezése saját vagy a gazdaszervezet fehérjei által elengedhetetlen túlélésükhöz. Számos patogén azonban a fertőzéséhez, sejtekbe való behatolásához is igényel komplementfehérjéket. Így például az évente 1 millió áldozatot követelő malária kórokozója, a *Plasmodium falciparum* is, mely obligát intracelluláris parazita, eritrociták belsejébe hatol be. A felismeréshez specifikus ligandum-receptor interakciók szükségesek. A *Plasmodium* erythrocyte-binding-like antigens (EBAs) fehérjecsaldjának ligandumai a glikoforinok, melyek érzékenyek neuraminidázzal való kezelésre, így a parazita glikoforinokon keresztüli sejtbe jutását szíalsavdependens inváziós útvonalnak nevezik. A neuraminidázos kezelés azonban nem gátolja meg a *P. falciparum* sejtbe hatolását, ezért léteznie kell egy szíalsavindependens útvonalnak is, mely a parazita fertőzésének hatékonyságát növeli meg (Tham és mtsai., 2010).

2010-ben azonosították a reticulocyte-binding-like homolog proteins (RBPs/PfRh)s fehérjecsaldba tartozó PfRh4 fehérjét, mint az eritrociták CR1 receptorának ligandumát. A CR1 expresszió mértéke a PfRh4 kötődésének mértékével korrelál. Szolúbilis CR1-t (sCR1) vagy anti-CR1 ellenanyagokat növekvő koncentrációban adva a PfRh4-CR1 kötődés gátolható. sCR1-et neuraminidázzal kezelt eritrocitákhoz adva a *P. falciparum* *in vitro* sejtbe jutása gátolható, *in vivo* azonban nem fordulnak elő neuraminidázzal kezelt sejtek. Nem minden törzs a PfRh4-CR1 interakciót használja szíalsavindependens útként, így a PfRh4-et nem expresszáló W2mef törzs sejtbe jutását a sCR1 nem akadályozza. A CR1-nek más szerepe is van a Plasmodium fertőzésében: a PfEMP-1-hez kötődve rozetták képződését, a fertőzött sejtek nem fertőzött eritrocitákhoz való kapcsolódását segíti elő. E kapcsolódás mértékét szintén csökkeni az sCR1 és az alacsony CR1-expresszió (Tham és

mtsai., 2010). Más patogének fertőzésükhöz egyéb komplementreceptorokat is igényelnek, a kanyaró vírus és Epstein-Barr vírus liganduma például a CR2, míg a HIV vírusé a CR3. (Lambris és mtsai., 2008)

A HIV hatékony fertőzéséhez nem csak a komplementreceptorok jelenlétét, hanem a komplementrendszer aktiválódását is igényli. Az MBL a HIV buroklehéjének, a gp120 szénhidrátláncainak felismerésével a lektin utat, a C1q pedig ellenanyagoktól függetlenül is, a gp41 direkt felismerésével a klasszikus utat aktiválja. A virolízist meggátolva a HIV külső lipidburokába (envelop) regulátorlehejét (CD46, CD55, CD59) vesz át, a gp41/120 pedig FH kötésére képes (Datta és Rappaport, 2006).

A komplementaktiválás szükségességét jelzi, hogy az anti-HIV ellenanyagokkal és komplementkomponensekkel előkezelt HIV jobban kötődik az éretlen dendritikus sejtekhez (imDC) és jobban fertőzi is azokat, mint a csak anti-HIV-vel előkezelt. A fokozott fertőzés és kötés EDTA hozzáadásával (jelenlétében a komplement nem aktiválódik) megszüntethető. Az opsonizált vírus felvétele a CR3 receptoron keresztül történik, hisz anti-CR3 ellenanyagokkal az opsonizált HIV fertőzésének mértéke a nem opsonizált szintjére esik vissza (Bajtay és mtsai., 2004). Komplementaktiválás során tehát az opsonizált HIV CR3 általi felvétele nő. A H-faktor és MCP megkötése így nem csak a védekezés szempontjából fontos: a C3b opsoninok hasításával iC3b keletkezik, mely a dendritikus sejteken is kifejeződő CR3 (és CR4) liganduma. Az opsonizáció nem csak a vírus felvételére, hanem annak dendritikus sejteken belüli eloszlására, az antigénprezentációra és a transzinfekcióra is hatással van (Tjomsland és mtsai., 2011).

6. Terápiás lehetőségek

A kórházi fertőzések 20-25 %-ért a *S. aureus* felelős. A fertőzött egyének átlagosan háromszor annyi ideig maradnak kórházban, és ötször nagyobb az esély kórházban bekövetkező halálukra, mint a nem fertőzött egyéneknek (Anderson és mtsai., 2012). Mivel a *S. aureus* törzsek a legtöbb, a klinikai gyakorlatban alkalmazott antibiotikumra (vancomycin, linezolid, daptomycin, mupirocin, methicillin) rezisztensek, vakcinák kifejlesztésére égető szükség van (Daum és mtsai., 2012).

20 éve próbálkoznak *S. aureus* ellen hatékony vakcinák kifejlesztésével - ez idáig sikertelenül. A *H. influenzae* b-típusú, a *N. meningitidis* bizonyos szerotípusainak, illetve a

S. pneumoniae kapszulájának poliszacharidjei ellen kifejlesztett vakcinák hatékonynak bizonyultak, így kezdetben a *S. aureus* esetében is antigénként a kapszulával próbálkoztak. A klinikai törzsek 2 leggyakoribb kapszulatípusát (CP5 és CP8) egy fehérjehordozóhoz, a *Pseudomonas* enterotoxin A-hoz kötötték, és dialízisen áteső betegeket immunizáltak vele. A kezdeti kisebb sikerek után következő kísérletben kontrollként placebót kapott betegeket is vizsgálva kiderült, hogy a vakcináció hatására nem csökken a bacteremia súlyossága. A StaphVax tesztelésének III. fázisában elbukott (Anderson és mtsai., 2012; Daum és mtsai., 2012).

A vakcina sikertelenségére különböző hipotézisek születtek: lehet, hogy a CP5 és CP8 nem protektív antigén. Vagy lehet, hogy protektív antigén, csak a dialízisen áteső betegek túl immunszuppresszáltak voltak ahhoz, hogy védettséget fejlesszenek ellenanyagfüggő úton. Ezenfelül sok törzs nem fejleszt kapszulát, a CA-MRSA fertőzések zömét okozó USA300 törzsek sem CP5, sem CP8 típusú kapszulával nem rendelkeznek (Daum és mtsai., 2012).

Megfigyelték, hogy ha egy másik szénhidrát antigénnel, a poli-N-acetilglükózamin (PNAG) és CP5/CP8 antigénekkal együtt immunizálnak állatokat, a kombinált antigének nem szinergista módon hatnak: kevésbé javítják az állat védettségét, mint külön-külön használva. (Skurnik és mtsai., 2012). Ha bacteremiás betegek szérummintáit CP⁻ vagy PNAG⁻ *S. aureus* törzseken abszorbeálták, a megmaradó, csak CP vagy PNAG elleni antitesteket tartalmazó szérumok 35-80% opsonofagocitikus ölő aktivitást mutattak *S. aureus*szal szemben. Ha viszont a szérummintákat CP⁻,PNAG⁻ törzseken abszorbeálták, a szérumminták csak 60 %-a mutatott ölő hatást, és csak kisebb, 1-35 %-os mértékben (Skurnik és mtsai., 2012). A PNAG és CP ellen képződő ellenanyagok tehát egymással interferálnak. 15 egészséges ember - akik nem estek át jelentősebb *S. aureus* fertőzésen - szérumában is találtak PNAG elleni IgG-ket. Tehát ez az interferencia nem csak fertőzés hatására képződő anti-PNAG, hanem az emberek szérumában eleve jelen lévő, természetes, nem opsonikus tulajdonságú anti-PNAG esetében is megfigyelhető, mely a CP-antigének elleni vakcinák sikertelenségét is megmagyarázza: ugyan képződnék anti-CP ellenanyagok, de ezek szintje a természetes PNAG-ellenanyagokkal való interferálás során túl alacsonyra csökken (Skurnik és mtsai., 2012). Ez az interferencia úgy is megszüntethető, ha a humán szérumot *S. aureus*, vagy akár egy más, szintén PNAG-t kifejező baktériumon, például *E. coli*n abszorbeálják (Skurnik és mtsai., 2012).

A kapszula mellett egyéb antigének ellen is folyik a vakcinák fejlesztése. A Veronate, melyet anti-ClfA szérumból nyernek, tesztelésének III. fázisában sikertelennek bizonyult újszülöttekben (Anderson és mtsai., 2012). Létrehoztak olyan mutáns *S. aureus* protein A-t (SpA_{KKAA}), mely nem köt sem Ig-t, és nem indukálja B-sejtek apoptózisát sem. Egereket SpA_{KKAA}-val immunizálva az állatok némi védettséget szereztek *S. aureus* okozta bacteremiával szemben, hisz olyan ellenanyagokat is termeltek, melyek hatását az SpA nem közömbösítette. Ellenanyagalapú vakcinák fejlesztése az SpA Ig-kötő képessége miatt amúgy is nehéz (Daum és mtsai., 2012).

A *S. aureus* számos faktort szekretál, melyek funkciói egymással átfednek, egy virulenciafaktor elleni vakcina talán nem is lehet hatásos. A Pfizer ezért most trivalens (CP5, CP8 és rmClfA), illetve tetraavalens (CP5, CP8, rmClfA, MntC⁴) vakcinákkal próbálkozik, melyek tesztelésüknek I/II fázisaiban vannak (Anderson és mtsai., 2012).

Természetesen más patogének ellen is folyik a vakcinák fejlesztése. Az agyhártyagyulladás (meningitis) okozó *Neisseria meningitidis* A, C, Y és W135 szerotípusú törzsek kapszuláris poliszacharidjai ellen már hatékony vakcinákat hoztak forgalomba, a B szerotípusú törzsek ellen viszont ez nem sikerült: kapszuláris poliszacharidjuk nem erős immunogén, hisz α -2,8-kötésű N-acetilneuraminsavból épül fel, mely a humán sejtek felszínén lévő glikánokban is megtalálható (Harris és mtsai., 2011). A Novartis reverz vakcinológiát használva, azaz a *N. meningitidis* genomját vizsgálva keresett olyan antigéneket, melyek egy gyógyszer hatékony targetjei lehetnek. Ezen technika alkalmazásával született meg a Bexsero, a 4 komponensű vakcina (4CmenB), mely a H-faktor kötő fehérje (fHbp), Neisserial adhesin A (NadA), Neisserial heparin binding antigen (NHBA) és PorA-t tartalmazó "külső membrán vezikula" (outer membrane vesicle) antigének keveréke (Andrews és Pollard, 2014).

A fHbp a komplementrendszer előli menekülési stratégia részeként a gazdaszervezet H-faktorát gyűjti be. Az fHbp knock-out törzsek humán szérumban a komplementmediált lízisre fogékonyabbak (Andrews és mtsai., 2014). Az fHbp elvesztése ellen is szelekciós nyomás hat, hisz bizonyos törzsek *fhhp* génjében lévő deléciós mutációt más törzsek (melyek ezt a deléciót ugyanúgy hordozzák) különböző helyen lévő inszerciókkal kompenzálták (Harris és mtsai., 2011). Az fHbp erős immunogén, *N.*

⁴ A mangán-transzporter C (MntC) a gazdaszervezet mangánionjait gyűjti be. A mangán számos enzim, például a szuperoxid diszmutáz kofaktora.

meningitidis törzsek csak kis százalékában nincs jelen. Az ellene termelődő ellenanyagok a NHBA elleni ellenanyagokkal pedig szinergistán hatnak. Az fHbp és NHBA stabilitását növelve a 4CmenB vakcinában ezen antigéneket a GNA2091, illetve GNA1030 fehérjékkel fúzionálták, melyeket szintén a genomból azonosítottak (Andrews és mtsai., 2014).

A Bexsero-val szemben azonban több kétely is felmerült. A B-típusú meningococcusok kb. 20 %-a ellen nem hatásos. Ahogy pedig a vakcinára érzékeny törzsek prevalenciája csökken, helyüket a vakcinára rezisztens törzsek vehetik át ("type replacement"). Szintén kérdés, hogy a vakcinálás költsége megtérül-e: 2009-ben a meningococcális betegségek aránya Európában csak 0.89/100000 volt. A legmagasabb arány Írországból és az Egyesült Királyságból volt (3.01, illetve 1.93/100000), ám a megbetegedések száma itt évről-évre csökken (English, 2013). Ezenkívül a NadA-t csak kevés patogén törzs expresszálja, és a porA is genetikailag nagyon diverz, így egy variánsa elleni antitestek más variánsok ellen nem nyújtanak védelmet, így a vakcina hatékonysága is kérdéses marad. 2014 márciusában, a brit Joint Committee on Vaccination and Immunisation (JCVI) a vakcina 3 dózisban való alkalmazását javasolta csecsemőkben, így a bizonytalanságok, kérdések megválaszolása a vakcina alkalmazását követően lehetséges lesz (Andrews és mtsai., 2014).

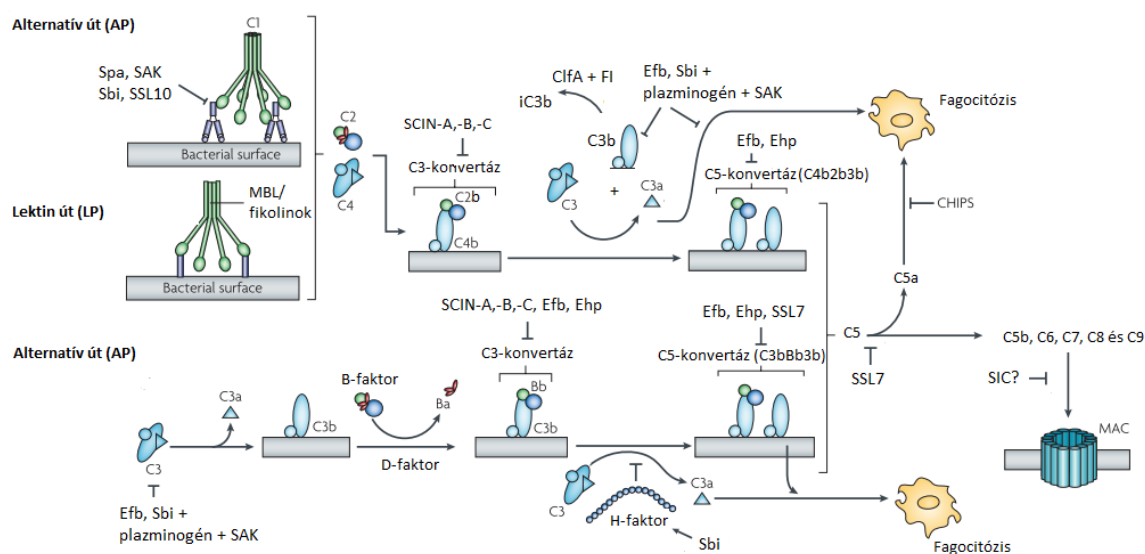
7. Kitekintés

A szakdolgozat patogének néhány komplementrendszer előli menekülési stratégiáját mutatta be, példaként részletesen tárgyalva a *Staphylococcus aureus* változatos módszereit (13.ábra). Miért fontos e stratégiák ismerete? A *S. aureus* elleni vakcinák példáján láthattuk, hogy patogének immunrendszer előli védekezésüknek molekuláris mechanizmusát pontosan megértve lehet csak majd hatékony vakcinákat kifejleszteni, illetve azt megérteni, hogy miért nem sikerült az eddigiek alkalmazása.

A bakteriális fehérjék megismerése nem csak a fertőzések elleni védekezés szempontjából fontos. Számos fehérjét lehetne alkalmazni humán autoimmun betegségek kezelésére is. Az alternatív út amplifikációs lépésének regulálására alkalmas lehet a nem immunogén VCP, mely ötvözi a DAF és MCP regulátorok hatásmechanizmusait, hasonlóan a CR1-hez, ám annál jóval kisebb méretű (Lambris és mtsai., 2008). Szintén a C3b túlzott mértékű keletkezését akadályozhatná meg az Efb vagy Ehp. Mivel a SCIN nem csak az

alternatív út konvertázára specifikus, szisztémás lupus erythematosusban is alkalmazható lenne, ahol a klasszikus út aktiválódik a kelleténél erősebben (Lambris és mtsai., 2008). A C5 hasítását megakadályozó Eculizumab humanizált monoklonális ellenanyagot paroxizmális nokturnális hemoglobinúria (PNH) kezelésére használják. Az SSL7 alternatív lehetőséget kínálhat, ugyanis sokkal kisebb fehérje, és könnyű előállítani. C-terminális doménje pedig szelektíven blokkolja a MAC létrejöttét, a C5a inflammatorikus hatását viszont csak kisebb mértékben akadályozza (Laursen és mtsai., 2010). Bakteriális eredete következtében az SSL7 (és SCIN) is immunogén, így egy kevésbé immunogén, ám aktivitását fenntartó forma alkalmazása járhatna sikerrel (Bestebroer és mtsai., 2010).

A patogének menekülési stratégiáinak megismerésével és megértésével így nem csak kórokozók okozta betegségek válhatnak majd kezelhetővé, hanem a természet által más fajokban már létrehozott fehérjék egyéb betegségekben is az ember hasznára lesznek fordíthatók.



13. ábra: A *S. aureus* szakdolgozatban is megemlített komplementrendszer előli menekülést biztosító fehérjéi és hatásuknak helye (Serruto és mtsai., 2010, ábrája nyomán).

8. Összefoglalás

Az immunrendszer legfontosabb feladata szervezetünk védelme a kórokozók ellen. A komplementrendszer mintázatfelismerő molekulái patogénekhez kötődve, vagy a folyton keletkező, C3b-homológ C3(H₂O) azonnal beindítják a komplementkaskádót. A felszabaduló anafilatoxinok (C3a, C5a) a fertőzés helyére vonzzák a fagocitákat, a keletkező opszoninok (C3b, C4b) pedig azok fagocitikus hatékonyságát növelik. A kaskád végén kialakuló membránkárosító komplex pedig a patogének líziséhez vezethet.

A patogének fertőzésük sikerének érdekében az őket eliminálandó folyamatokat akadályozniuk, gátolniuk kell. Mivel a komplementrendszer azonnal aktiválódik, a patogének annak működését számos ponton akadályozó mechanizmusokat fejlesztettek ki. A szakdolgozat főképp a *Staphylococcus aureus* komplementrendszer előli menekülési stratégiáit mutatja be.

A patogén a komplementrendszer működését különböző szinteken gátolhatja. A komplementkaskád klasszikus úton történő aktivációját a *S. aureus* az ellenanyagok helytelen orientációban való megkötésével (SpA), illetve hasításával akadályozza. Utóbbihoz Ig-kötő (SSL-10, Sbi) és plazminogénkötő (Sbi, Efb) fehérjék szükségesek. A hasítást a plazmin végzi, melynek a gazdaszervezet plazminogénjéből való képződését a SAK segíti.

Különböző mechanizmussal ugyan, de a C3b szintjét csökkenti a C3-konvertáz enzimet gátló SCIN és Efb is, valamint a ClfA és az Sbi, melyek az I-faktor, illetve a H-faktor megkötésére képesek. Az anafilatoxin C5a gyulladáskeltő hatását a CHIPS, a C5 hasítását pedig az SSL-7 blokkolja.

Számos patogén nem csak komplementrendszer előli meneküléséhez, hanem magához a fertőzés kialakításához, sejtekbe való behatolásához is a gazdaszervezet bizonyos fehérjéit (például a komplementreceptorokat) veszi igénybe.

A különböző menekülési stratégiák ismerete vakcinák, gyógyszerek fejlesztése szempontjából fontos. A patogének immunrendszer előli menekülést biztosító molekuláit hatástalanító gyógyszerek mellett ígéretes lehetőséget kínálnak maguk a patogének fehérjéi is, melyek a komplementrendszer túlzott mértékű aktiválódása következtében kialakuló autoimmun betegségekből lennének alkalmazhatóak.

9. Summary

The most important role of the immune system is to protect the host against pathogens. The pattern recognition molecules of the complement system, when binding to foreign surfaces, or the constantly generated C3b-homologue C3(H₂O), can immediately initiate the complement cascade. The released anaphylatoxins (C3a, C5a) recruit the phagocytes to the sites of infections and the nascent opsonins (C3b, C4b) enhance their phagocytic efficiency. At the end of the cascade a membrane attack complex can be formed, which may cause the lysis of pathogens.

For the effective infection, the pathogens have to hinder the mechanisms which try to eliminate them. Because the complement system is immediately activated, the pathogens acquired many different ways to hinder its proper functioning. The thesis mostly discusses the complement evasion strategies of the pathogenic *Staphylococcus aureus*.

The pathogens can block the mechanisms of the complement system in many different level. *S. aureus* can prevent the initiation of the classical complement pathway by binding the immunoglobulins in an inappropriate orientation (SpA) or by cleaving them. Ig-binding (SSL-10, Sbi) and plasminogen binding (Sbi, Efb) proteins are necessary for the cleavage. The immunoglobulins are cleaved by plasmin, which is transferred from the host's plasminogen with the help of SAK.

SCIN and Efb reduce the level of C3b via interfering with different mechanism with the C3-convertase, while ClfA and Sbi lower the C3b level by binding factor I and its cofactor factor H, respectively. CHIPS blocks the proinflammatory effect of the anaphylatoxin C5a and the cleavage of C5 is blocked by SSL7.

Many pathogens use the host's certain proteins (for example the complement receptors) not only to evade the complement system, but also for infecting the organism and invading its cells.

Knowing the different evasion strategies of the pathogens is important for developing new vaccines and medicines. Besides the medicines that target the evasion molecules of the pathogens, the proteins of the pathogens themselves offer a great possibility, because they could be used for the treatment of autoimmune diseases caused by excessive complement activation.

Hivatkozásjegyzék

Folyóiratok:

- Ajees A. A., Gunasekaran K., Volanakis J. E., Narayana S. V. L., Kotwal G. J. és Murthy H. M. K. (2006): **The structure of complement C3b provides insights into complement activation and regulation.** *Nature*. 444, 7116: 221–5.
- Anderson A. S., Miller A. A., Donald R. G. K., Scully I. L., Nanra J. S., Cooper D. és Jansen K. U. (2012): **Development of a multicomponent Staphylococcus aureus vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors.** *Human vaccines & immunotherapeutics*. 8, 11: 1585–94.
- Andrews S. M., és Pollard A. J. (2014): **A vaccine against serogroup B Neisseria meningitidis: dealing with uncertainty.** *The Lancet Infectious Diseases*. 3099, 13: 1–9.
- Bajtay Zs., Speth C., Erdei A. és Dierich M. P. (2004): **Cutting Edge: Productive HIV-1 Infection of Dendritic Cells via Complement Receptor Type 3 (CR3, CD11b/CD18).** *The Journal of Immunology*. 173, 8: 4775–4778.
- Bestebroer J., Aerts P. C., Rooijackers S. H. M., Pandey M. K., Köhl J., van Strijp J. A. G. és de Haas C. J. C. (2010): **Functional basis for complement evasion by staphylococcal superantigen-like 7.** *Cellular Microbiology*. 12, 10: 1506–1516
- Bottazzi B., Doni A., Garlanda C. és Mantovani A. (2010): **An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm.** *Annual review of immunology*. 28. 157–83.
- Chen H., Ricklin D., Hammel M., Garcia B. L., McWhorter W. J., Sfyroera G., Wu Y., Tzekou A., Li S., Geisbrecht B. V., Woods V. L. és Lambris J. D. (2010): **Allosteric inhibition of complement function by a staphylococcal immune evasion protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 41: 17621–6.
- Datta P. K., és Rappaport J. (2006): **HIV and complement: hijacking an immune defense.** *Biomedicine & pharmacotherapy*. 60, 9: 561–8.
- Daum R. S., és Spellberg B. (2012): **Progress toward a Staphylococcus aureus vaccine.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 54, 4: 560–7.
- Ehrnthaller C., Ignatius A., Gebhard F. és Huber-Lang M. (2011): **New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system.** *Molecular medicine*. 17, 3-4: 317–29.
- English P. (2013): **Vaccination against meningitis B: is it worth it?** *Drugs in context*. 2013. 212246.
- Foster T. J. (2005): **Immune evasion by staphylococci.** *Nature reviews. Microbiology*. 3, 12: 948–58.

Frank M. M. (2001): **Annihilating host defense.** *Nature medicine.* 7, 12: 1285–1286.

Garcia B. L., Ramyar K. X., Ricklin D., Lambris J. D. és Geisbrecht B. V (2012): **Advances in Understanding the Structure, Function, and Mechanism of the SCIN and Efb Families of Staphylococcal Immune Evasion Proteins.** *Advances in experimental medicine and biology.* 946. 1–18.

Gros P., Milder F. J. és Janssen B. J. C. (2008): **Complement driven by conformational changes.** *Nature reviews. Immunology.* 8, 1: 48–58.

Hair P. S., Echague C. G., Sholl A. M., Watkins J. A., Geoghegan J. A., Foster T. J. és Cunnion K. M. (2010): **Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of Staphylococcus aureus and decreases complement-mediated phagocytosis.** *Infection and immunity.* 78, 4: 1717–27.

Hammel M., Sfyroera G., Ricklin D., Magotti P., Lambris J. D. és Geisbrecht B. V (2007): **A structural basis for complement inhibition by Staphylococcus aureus.** *Nature immunology.* 8, 4: 430–7.

Harris S. L., Zhu D., Murphy E., Mcneil L. K., Wang X., Mayer L. W., Harrison L. H., Jansen K. U. és Anderson A. S. (2011): **Preclinical evidence for the potential of a bivalent fHBP vaccine to prevent Neisseria meningitidis serogroup C disease.** *Human Vaccines.* 7. 68–74

Haupt K., Reuter M., van den Elsen J., Burman J., Hälbig S., Richter J., Skerka C. és Zipfel P. F. (2008): **The Staphylococcus aureus protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b.** *PLoS pathogens.* 4, 12: e1000250.

Héja D., Harmat V., Fodor K., Wilmanns M., Dobó J., Kékesi K. A., Závodszy P., Gál P. és Pál G. (2012): **Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2.** *The Journal of biological chemistry.* 287, 24: 20290–300.

Horstmann R. D., Sievertsen H. J., Knobloch J. és Fischetti V. A. (1988): **Antiphagocytic activity of streptococcal M protein : Selective binding of complement control protein factor H.** 85, March 1988: 1657–1661

Huber-Lang M., Sarma J. V, Zetoune F. S., Rittirsch D., Neff T. A., McGuire S. R., Lambris J. D., Warner R. L., Flierl M. A., Hoesel L. M., Gebhard F., Younger J. G., Drouin S. M., Wetzel R. A. és Ward P. A. (2006): **Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway.** *Nature medicine.* 12, 6: 682–7.

Janssen B. J. C., Christodoulidou A., McCarthy A., Lambris J. D. és Gros P. (2006): **Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity.** *Nature.* 444, 7116: 213–6.

Jin T. (2003): **Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with staphylokinase-deficient Staphylococcus aureus strains.** *Journal of Medical Microbiology.* 52, 10: 919–923.

Jongorius I., Köhl J., Pandey M. K., Ruyken M., van Kessel KP M., van Strijp J. A. G. és Rooijackers S. H. M. (2007): **Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules.** *The Journal of experimental medicine.* 204, 10: 2461–71.

- Jongerius I., Puister M., Wu J., Ruyken M., van Strijp J. A. G. és Rooijackers S. H. M. (2010): **Staphylococcal complement inhibitor modulates phagocyte responses by dimerization of convertases.** *Journal of immunology.* 184, 1: 420–5.
- Józsi M., és Zipfel P. F. (2008): **Factor H family proteins and human diseases.** *Trends in immunology.* 29, 8: 380–7.
- Kim H. K., Thammavongsa V., Schneewind O. és Missiakas D. (2012): **Recurrent infections and immune evasion strategies of Staphylococcus aureus.** *Current opinion in microbiology.* 15, 1: 92–99
- Klevens R. M., Morrison M. A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S., Harrison LH, Lynfield R., Dumyati G., Townes J. M., Craig A. S., Zell E. R., Fosheim G. E., McDougal L. K., Carey RB és Fridkin S. K. (2007): **Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States.** *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 298, 15: 1763–71.
- Koch T. K., Reuter M., Barthel D., Böhm S., van den Elsen J., Kraiczy P., Zipfel P. F. és Skerka C. (2012): **Staphylococcus aureus proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b.** *PloS one.* 7, 10: e47638.
- Kopp A., Hebecker M., Svobodová EI és Józsi M. (2012): **Factor H: A Complement Regulator in Health and Disease, and a Mediator of Cellular Interactions.** *Biomolecules.* 2, 4: 46–75.
- Kwieciński J., Josefsson E., Mitchell J., Higgins J., Magnusson M., Foster T., Jin T. és Bokarewa M. (2010): **Activation of plasminogen by staphylokinase reduces the severity of Staphylococcus aureus systemic infection.** *The Journal of infectious diseases.* 202, 7: 1041–9.
- Lambris J. D., Ricklin D. és Geisbrecht B. V (2008): **Complement evasion by human pathogens.** *Nature reviews. Microbiology.* 6, 2: 132–42.
- Laursen N. S., Gordon N., Hermans S., Lorenz N., Jackson N., Wines B., Spillner E., Christensen J. B., Jensen M., Fredslund F., Bjerre M., Sottrup-Jensen L., Fraser J. D. és Andersen G. R. (2010): **Structural basis for inhibition of complement C5 by the SSL7 protein from Staphylococcus aureus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107, 8: 3681–6.
- Law S. K., és Dodds a W. (1997): **The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4.** *Protein science : a publication of the Protein Society.* 6, 2: 263–74.
- Lorenz N., Clow F., Radcliff F. J. és Fraser J. D. (2013): **Full functional activity of SSL7 requires binding of both complement C5 and IgA.** *Immunology and cell biology.* 91, 7: 469–76.
- Meri T., Amdahl H., Lehtinen M. J., Hyvärinen S., McDowell J. V, Bhattacharjee a, Meri S., Marconi R., Goldman a és Jokiranta T. S. (2013): **Microbes bind complement inhibitor factor H via a common site.** *PLoS pathogens.* 9, 4: e1003308.
- Pradeu Thomas, és Cooper Edwin L. (2012): **The danger theory: 20 years later.** *Frontiers in immunology.* 3, September: 287.

- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K. és Lambris J. D. (2010): **Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis.** *Nature immunology.* 11, 9: 785–97.
- Rooijackers S. H. M., Ruyken M., Roos A., Daha M. R., Presanis J. S., Sim R. B., van Wamel W. J. B., van Kessel K. P. M. és van Strijp J. A. G. (2005): **Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases.** *Nature immunology.* 6, 9: 920–927.
- Rooijackers S. H. M., van Kessel K. P. M. és van Strijp J. A. G. (2005): **Staphylococcal innate immune evasion.** *Trends in microbiology.* 13, 12: 596–601.
- Rooijackers S. H. M., Wu J., Ruyken M., van Domselaar R., Planken K. L., Tzekou A., Ricklin D., Lambris J. D., Janssen B. J. C., van Strijp J. A. G. és Gros P. (2009): **Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor.** *Nature immunology.* 10, 7: 721–7.
- Sarma J. V., és Ward P. A. (2013): **New developments in C5a receptor signaling.** 73–82
- Serruto D., Rappuoli R., Scarselli M., Gros P. és van Strijp J. A. G. (2010): **Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci.** *Nature reviews. Microbiology.* 8, 6: 393–9.
- Sjöberg A. P., Trouw L. A. és Blom A. M. (2009): **Complement activation and inhibition: a delicate balance.** *Trends in immunology.* 30, 2: 83–90.
- Skurnik D., Kropec A., Roux D., Theilacker C., Huebner J. és Pier G. B. (2012): **Natural antibodies in normal human serum inhibit Staphylococcus aureus capsular polysaccharide vaccine efficacy.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 55, 9: 1188–97.
- Tham W.-H., Wilson D. W., Lopaticki S., Schmidt C. Q., Tetteh-Quarcoop P. B., Barlow P. N., Richard D., Corbin J. E., Beeson J. G. és Cowman A. F. (2010): **Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107, 40: 17327–32.
- Tjomsland V., Ellegård R., Che K., Hinkula J., Lifson J. D. és Larsson M. (2011): **Complement opsonization of HIV-1 enhances the uptake by dendritic cells and involves the endocytic lectin and integrin receptor families.** *PloS one.* 6, 8: e23542.
- Torreira E., Tortajada A., Montes T., de Córdoba S. R. és Llorca O. (2009): **3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106, 3: 882–7.
- Wiesmann C., Katschke KJ, Yin J., Helmy K. Y., Steffek M., Fairbrother W. J., McCallum S. A., Embuscado L., DeForge L., Hass P. E. és van Lookeren Campagne M. (2006): **Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation.** *Nature.* 444, 7116: 217–20.
- Wright A. J., Higginbottom A., Philippe D., Upadhyay A., Bagby S., Read R. C., Monk P. N. és Partridge L. J. (2007): **Characterisation of receptor binding by the chemotaxis inhibitory protein**

of *Staphylococcus aureus* and the effects of the host immune response. *Molecular immunology*. 44, 10: 2507–17.

Könyvek:

Erdei A., Sármay G. és Prechl J. (2012): **Immunológia**. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest. ISBN: 978-963-226-370-0. **Bevezetés az immunológiába** (25-29. o.) - Erdei A., Gergely J.; **A veleszületett és az adaptív immunitás kialakulása, egymásra épülése** (29-38. o.) - Erdei A.; **A komplementrendszer** (187-210. o.) - Erdei A., Bajtay Zs., Prechl J.

Janeway C. A., Travers, Jr P., Walport M. és Shlomchik M. J. (2001): **Immunobiology**. Garland Science. New York. ISBN: 10: 0-8153-3642-X.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27138/#_A2368_

Köszönetnyilvánítás

E szakdolgozat bizonyos emberek segítségével nem születhetett volna meg, nekik szeretnék köszönetet mondani.

Hogy e témát választottam, témavezetőmnek, Józsi Mihálynak köszönhető. Ő küldte el nekem az első angol nyelvű cikkeket, és mivel azok témája megtetszett, így az ő csoportjával kezdhettem el először dolgozni a BSc második felében. Köszönöm, hogy a sokadik elrontott Western blot után sem törte le lelkesedésem.

Csincsi Ádámnak és Uzonyi Barbarának a laborbeli hangulat jobbá tételéért tartozom köszönettel. Ebbe a csoportba pedig a tanszékvezetőn, Erdei Annán keresztül juthattam el, aki nem csak Józsi Mihályt ajánlta, de a kollégiumnak dedikált Immunológia könyvével egy kisebb kiadástól mentett meg. Hozzá és az immunológia tanszékre Kacs Kovics Imre órái vezettek el, az egyetemre pedig a közös kirándulások és versenyek édesapámmal.

A szakdolgozat megírásához csendes órák és türelem is kellett. Előbbit köszönöm a 409-es blokk lakóinak, utóbbit pedig barátaimnak, barátnőmnek és családtagjaimnak, köztük nővéremnek, aki az angol fejezetet átnézte és érthetőbbé tette.

NYILATKOZAT

Név: Zöldi Miklós

Neptun azonosító: NOVI0T

ELTE Természettudományi Kar, **biológia alapszak**

Szakdolgozat címe: Patogének menekülési stratégiái a komplementrendszer elől

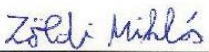
A szakdolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
- más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a szakdolgozat leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2014.05.14.


a hallgató aláírása