# Gyulladási folyamatokban fontos szerepet játszó neutrofil granulocita – komplement – extracelluláris mátrix kölcsönhatások feltérképezése

A komplementrendszer és az extracelluláris mátrix kölcsönhatásának különböző gyulladásos betegségekben fontos szerepe van. A komplementaktivációt és gyulladást gátló H-faktor és a vele ellentétesen ható H-faktorral rokon (FHR) fehérjék közötti egyensúly befolyásolja a komplementrendszer és immunsejtek aktivációját, gyulladásos folyamatokat. Fehérje microarray és ELISA segítségével vizsgáltuk, hogy mely extracelluláris mátrix komponensekhez képes kötődni a H-faktor, és a vele rokon FHR1 és FHR5 molekula. Sikerült azonosítanunk olyan mátrix fehérjéket, melyekhez mindhárom tisztított fehérje képes kötődni. Kimutattuk, hogy mind az FHR1, mind az FHR5 dózisfüggő módon gátolja a H-faktor kötődését a mátrix fehérjékhez. A H-faktor csökkent kötődése miatt kisebb mértékű volt a komplementgátló hatás a vizsgált fehérjéken. Ezzel összhangban, egyes mátrix fehérjéket humán szérumban inkubálva, rekombináns FHR5 hozzáadása esetében a komplementaktiváció fokozódását tapasztaltuk. Eddigi eredményeink alapján a tisztított neutrofil granulociták extracelluláris mátrix fehérjékhez kötődését a vizsgált körülmények között a H faktor molekulacsalád komponensei lényegesen nem befolyásolták.

**Szinergia összegző űrlap**

**Gyulladási folyamatokban fontos szerepet játszó neutrofil granulocita – komplement - extracelluláris mátrix kölcsönhatások feltérképezése**

*Fókuszpont: Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Dr. Józsi Mihály, PhD** | **Prof. Dr. Prohászka Zoltán, PhD, DSc** | **Dr. Papp Krisztián, PhD** |
| tudományos főmunkatársMTA-ELTE Lendület Komplement Kutatócsoport | egyetemi tanárSemmelweis Egyetem III. sz. Belklinika, Kutatólaboratórium | tudományos főmunkatárs MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoport |
| mihaly.jozsi@freemail.hu | prohaszka.zoltan@med.semmelweis-univ.hu | pkrisz5@gmail.com |

1. Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódott az alább megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez***.***

A komplementrendszer és az extracelluláris mátrix kölcsönhatásának különböző gyulladásos betegségekben (pl. egyes glomerulonephritisek, atípusos hemolítikus urémiás szindróma [aHUS], időskori makuladegeneráció, reumatoid artritis) játszott szerepe ismert, a patológiás folyamatoknak a részletes mechanizmusa ebből a szempontból azonban csak kevéssé felderített. Feltehetően a szemben a pigment epitélsejtek alatti (Bruch-membrán) és a vesében az endotélsejtek alatti extracelluláris mátrix (ECM) speciális anatómiai viszonyai a fenesztrák révén hozzáférhetőbbé teszik szérumfehérjék, így komplementfaktorok számára ezeket a felszíneket. Sérülés esetén a mátrixok kitettsége fokozódik, ugyanakkor nincsenek rajtuk a sejtekre egyébként jellemző, a komplementaktivációt gátló fehérjék. A szérumból kikötődő H-faktor viszont megakadályozhatja, hogy komplement aktiváció, és ezáltal gyulladásos folyamat (pl. neutrofilek odavonzása és aktiválása a keletkező C5a révén) induljon be az ECM-en. A H-faktor kötődése viszont gátolt lehet, például aHUS-asszociált autoantitestek miatt. A neutrofilek aktivációjuk során egyes esetekben kibocsátják maganyagukat ún. extracelluláris csapdák (NET) formájában, ami részben a komplementaktiváció fokozása, részben a vérlemezkék lekötődése révén gyulladást és mikrotrombózist válthat ki, hozzájárulva a betegségek tüneteihez (feltehetően pl. a trombotikus mikroangiopátiák közé tartozó aHUS esetében).

Saját korábbi eredményeink a H-faktor és FHR-1 neutrofil granulocitákhoz CR3-on keresztül való kötődését és a sejtek aktivációjára gyakorolt hatását mutatják (Losse et al., J Immunol. 2010). A CR3 integrinnek, mint komplement receptornak fontos szerepe van a gyulladásos folyamatokban; részben komplementtel fedett immunkomplexek felismerése révén, részben számos más molekulával való kölcsönhatása révén aktivál gyulladásos sejteket (pl. monocitákat, neutrofileket). A H-faktor és FHR molekulák közötti egyensúly genetikai vizsgálatok alapján meghatározó a fent említett betegségekben, amit új eredmények szerint a H-faktor és az FHR molekulák közötti, különböző felszíneken (pl. extracelluláris mátrix, sejtek, patogének) zajló kompetíció okozhat, miáltal ezek a molekulák befolyásolják a komplementrendszer és immunsejtek aktivációját, gyulladásos folyamatokat (Józsi et al., Trends Immunol. 2015).

1. Foglalják össze **közérthetően** szinergia programjuk, és közös munkájuk eredményeit

A H-faktor és egyes FHR fehérjék extracelluláris mátrixhoz való kötődése ismert, de részletes vizsgálatok még nem derítettek fényt arra, hogy az ECM mely komponensei felelősek a H-faktor molekulacsalád fehérjéinek kötődésért. Munkánk során az ECM egyes alkotóelemeit (Aggrecan, Biglycan, Decorin, Fibromodulin, Laminin, Vitronectin, Collagen IV, Osteoadherin, PRELP, Fibronectin) nyomtattuk ki nitrocellulózzal fedett chipekre, majd miután tisztított H-faktor, FHR1 vagy FHR5 fehérjéket adtunk a rendszerhez, fluoreszcensen jelölt detektáló ellenanyagokkal határoztuk meg a kötődő fehérjék mennyiségét. Azt találtuk, hogy PRELP, Fibromodulin, Vitronectin, Collagen IV, laminin, osteoadherin komponensekhez mindhárom fehérje képes kötődni. Ezeket a kölcsönhatásokat megerősítettük ELISA rendszerben végzett kísérletekben is. Kimutattuk, hogy az FHR1 és az FHR5 is gátolja a H-faktor kötődését ezekhez a mátrix fehérjékhez. A H-faktor csökkent kötődése miatt kisebb mértékű volt a komplementgátló hatás a vizsgát fehérjéken. Ezzel összhangban, egyes mátrix fehérjéket szérumban inkubálva az FHR5 hozzáadása esetében a komplementaktiváció fokozódását tapasztaltuk. A sejtes mérésekhez összeállítottunk egy mikrofluidikai rendszert, módosított PDMS (polydimethilsyloxane) öntvényekből és hidrogéllel fedett chipekből, melyekre előzőleg kinyomtattuk a vizsgálandó ECM komponenseket. Az autonóm folyadékmozgatáshoz hidrofil tulajdonságú kapilláris oldalfalakra van szükség. Mivel a korábban e célból használt PEO (polyethileneoxide) adalékanyag gyártását váratlanul beszüntették, több gyártó termékét is ki kellett próbálnunk, mire el tudtuk érni újra a kellően hidrofil felszínt anélkül, hogy közben csökkenjen a sejtek vitalitása. A mikrofluidikai rendszert először fiziológiás koncentrációjú FH, FHR1 vagy FHR5 oldattal töltöttük fel, majd emberi vérből tisztított neutrofil granulocitákat adtunk a rendszerhez és meghatároztuk a kialakult komplexekhez kötődő sejtek számát. A sejteket Cell Tracker Green festékkel jelöltük, így tudtunk elérni olyan alacsony hátteret, mely mellett az ImageJ szoftver általunk írt programja automatikusan meg tudta számolni a sejteket. Az ECM komponensek közül elsősorban a fibromodulinhoz és kisebb hatékonysággal a Collagen IV-hez kötődtek a neutrofil granulociták, mely mintázatot a H faktor molekulacsalád komponensei eddigi kísérleteinkben lényegesen nem tudták befolyásolni.

1. Értékeljék és véleményezzék közös munkájukat (sikereiket, nehézségeiket, illetve azon ötleteiket, javaslataikat, amelyeknek köszönhetően a következő programok hatékonysága javulhat)

Eddigi közös munkánkat sikeresnek tekintjük, mivel elértük a fent leírt eredményeket, amiket a közeljövőben tervezünk majd publikálni 2 cikk formájában. A különböző helyszíneken folyó kutatások összeegyeztetése sem jelentett különösebb problémát. Ami munkánk során komoly nehézséget jelentett az az, hogy egy gyártó megszüntette egy számunkra nélkülözhetetlen adalékanyag gyártását, így máshonnan kellett beszerezni az anyagot, ami elég hosszadalmas volt, mert csak nagy nehézségek árán sikerült beszerezni tőlük az átláthatósági nyilatkozatot. Tudjuk, hogy ez túlmutat a MedInProt lehetőségein, csak megemlítenénk, hogy lehetőleg minden fórumon ha lehet jelezni kellene, hogy csökkentsék az adminisztratív terheket a kutatási célokra történő anyagbeszerzéseknél, ezzel jelentősen lehetne javítani a kutatások hatékonyságán.

1. Szabadon fogalmazzák meg a MedInProt kapcsán támogató és/vagy kritikus észrevételeiket

A MedInProt törekvését, hogy elősegítsék különböző egyetemeken dolgozó és akár eltérő területeken jártas kutatók együttműködését nagyon támogatandó kezdeményezésnek tartjuk. A meghirdetett négy fókuszpont viszont talán túlzottan is szűk területeket jelöl ki és lehet, hogy érdemes lenne egy kicsit tágítani ezt a kört. Ugyan más fórumon ezt már talán jeleztük, remek ötletnek tartjuk hogy a MedInProt nyári iskolákat szervezett bizonyos módszerek (MS, NMR) elsajátításának előmozdítására. Javasolnánk, hogy ezeket több szintben szervezzék meg (pl. kezdő, haladó) (az NMR például szerintem nagyon haladó volt) és ha lehet egymás után legyenek ezek a gyakorlatok.

Eredmények szakmai megjelenése:

* A Magyar Immunológiai Társaság 45. Vándorgyűlésén (Velence, 2016. október 19-21,) 2 poszteren mutattuk be az eredményeket (l. csatolt absztraktok)