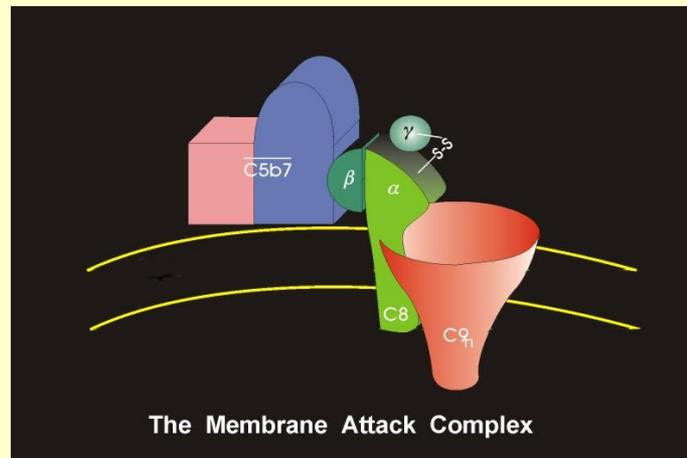


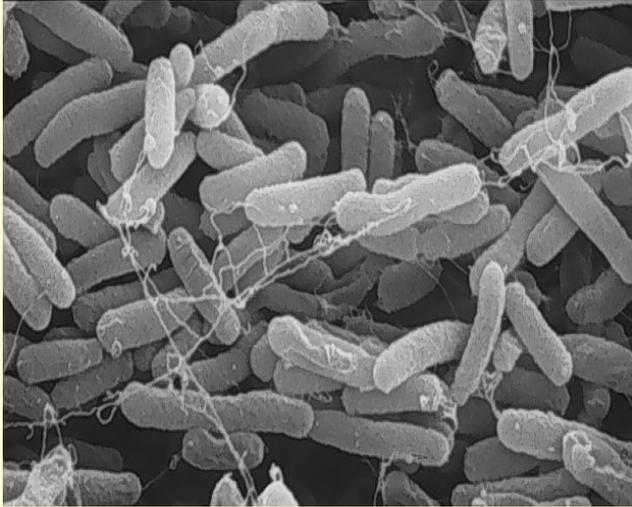
Система комплемента как часть иммунной системы



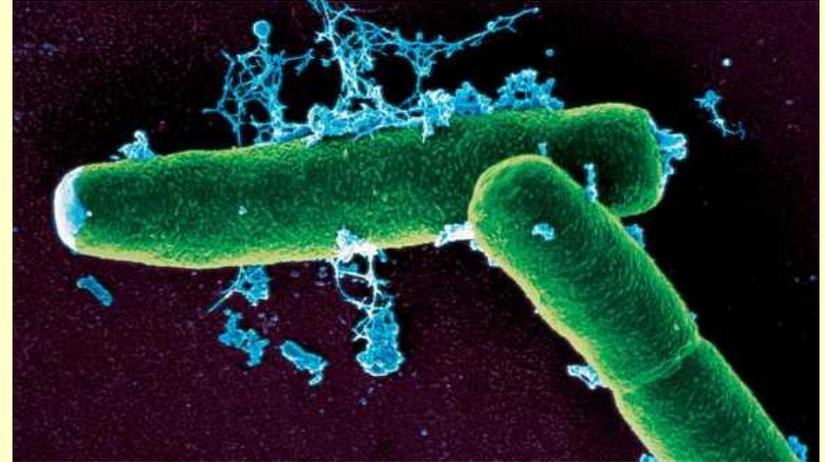
Мария Гуревич

Кафедра клеточной биологии и биологии развития

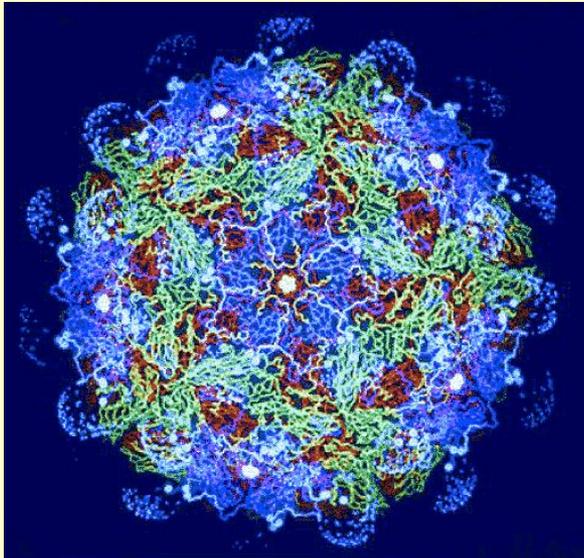
Лаб. Проф. Цви Фишельзона



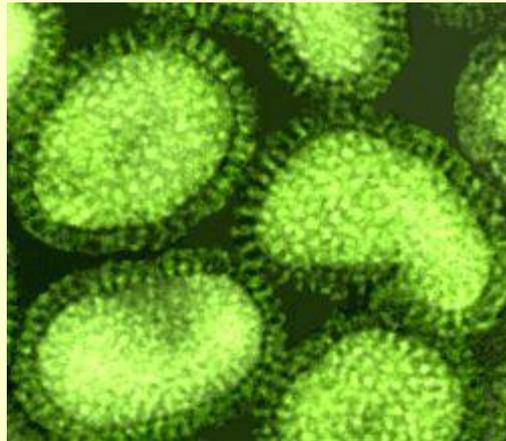
E. coli



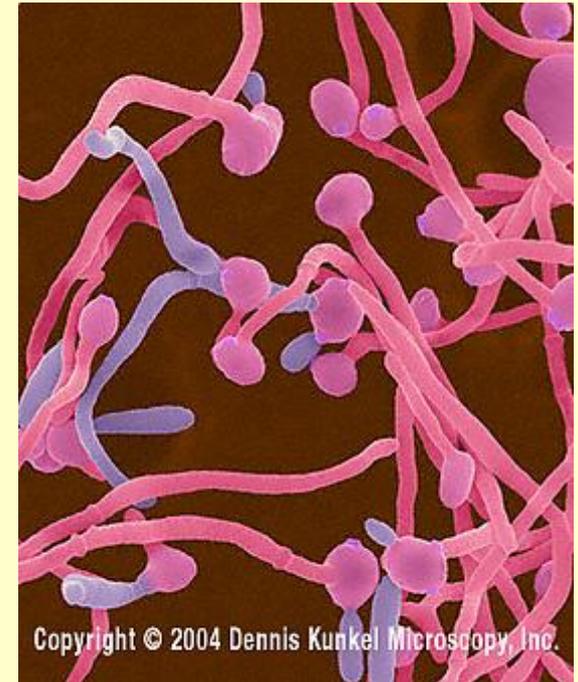
Anthrax



foot and mouth virus



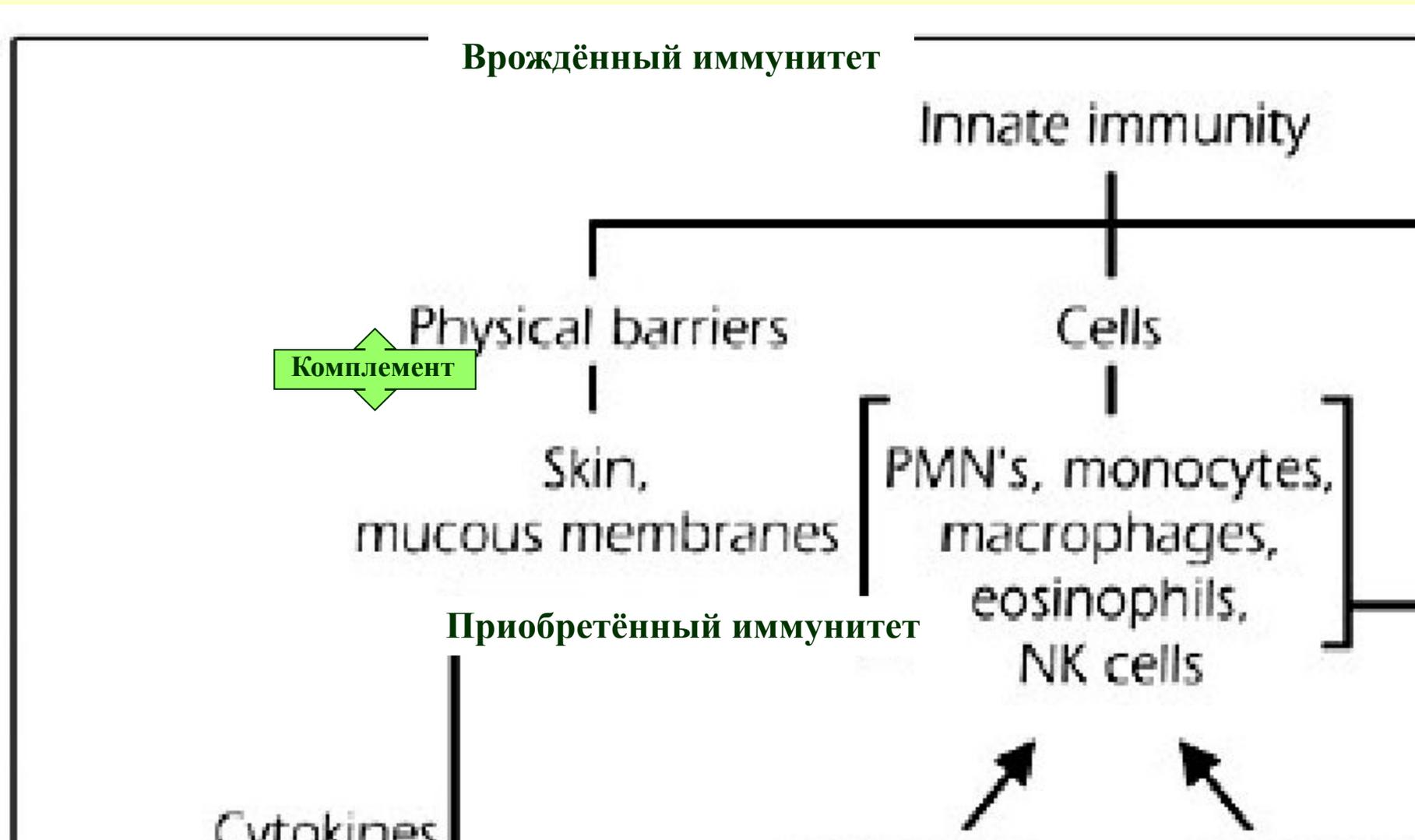
Influenza virus

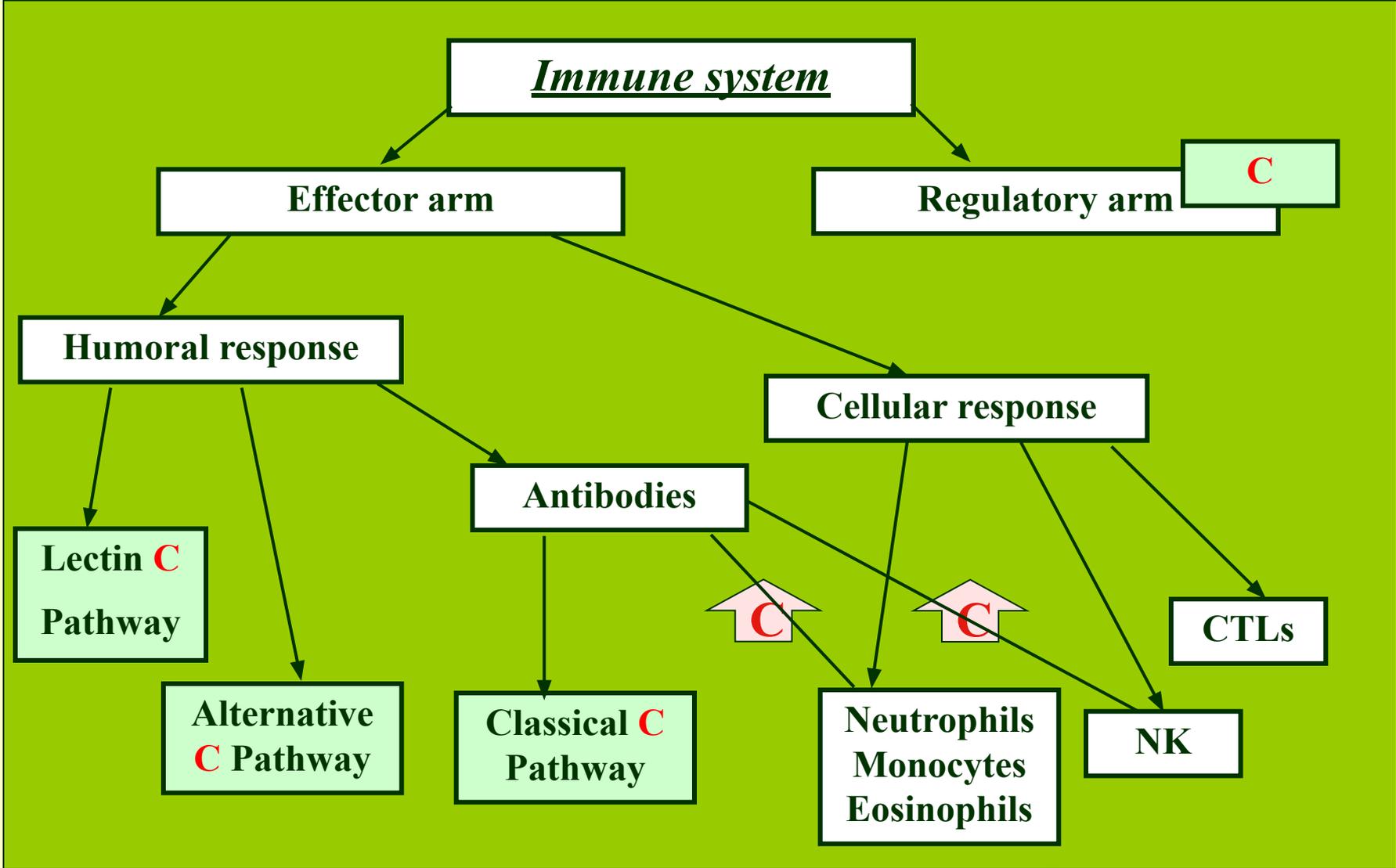


Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Candida albicans

Иммунная система





Система комплемента

- Впервые была обнаружена в 1889 г. как составляющая нормальной сыворотки, чувствительная к высоким температурам и *дополняющая* функции антитела в процессе разрушения бактерий. Подобная активность была признана «дополняющей», «комплементирующей»; отсюда и название
- На сегодняшний день известны более 30 белков, составляющих систему комплемента, часть из которых растворимые и часть мембранные, функционирующие в качестве отлаженной системы защиты организма, являющиеся частью как врождённого так и приобретённого иммунитета
- Белки комплемента составляют систему, которая узнаёт, связывает и ликвидирует патогенных агентов и чужеродные клетки с высокой эффективностью и специфичностью

Система комплемента

Функции:

- **Лизис:** клеток, бактерий (грам-негативных), паразитов, вирусов
- **Опсонизация** комплексов *антиген-антитело* с помощью продуктов расщепления комплемента (C3b/iC3b/C4b) с целью последующего фагоцитоза
- **Immune clearance** – удаление иммунных комплексов из циркуляции
- **Активация воспалительных процессов** с помощью продуктов расщепления комплемента (анафилотоксины). Хемотаксис лейкоцитов, нейтрофилов.
- **Дегрануляция** тучных клеток и базофилов (освобождение гистамина)
- **Регуляция деятельности В клеток** (производство антител, селекция внутри селезёнки)
- **Активация Т клеток**
- **Апоптоз:** *Удаление апоптотических клеток (C1q)

*про- и анти-апоптотические функции комплемента

Что делает комплемент?

<u>Activity</u>	<u>Active component</u>
Cell killing	C5b-9 (MAC)
Opsonization	iC3b, C3b, C4b
Chemotaxis	C5a
Inflammation	C3a, C4a, C5a
IC adherence	C3b

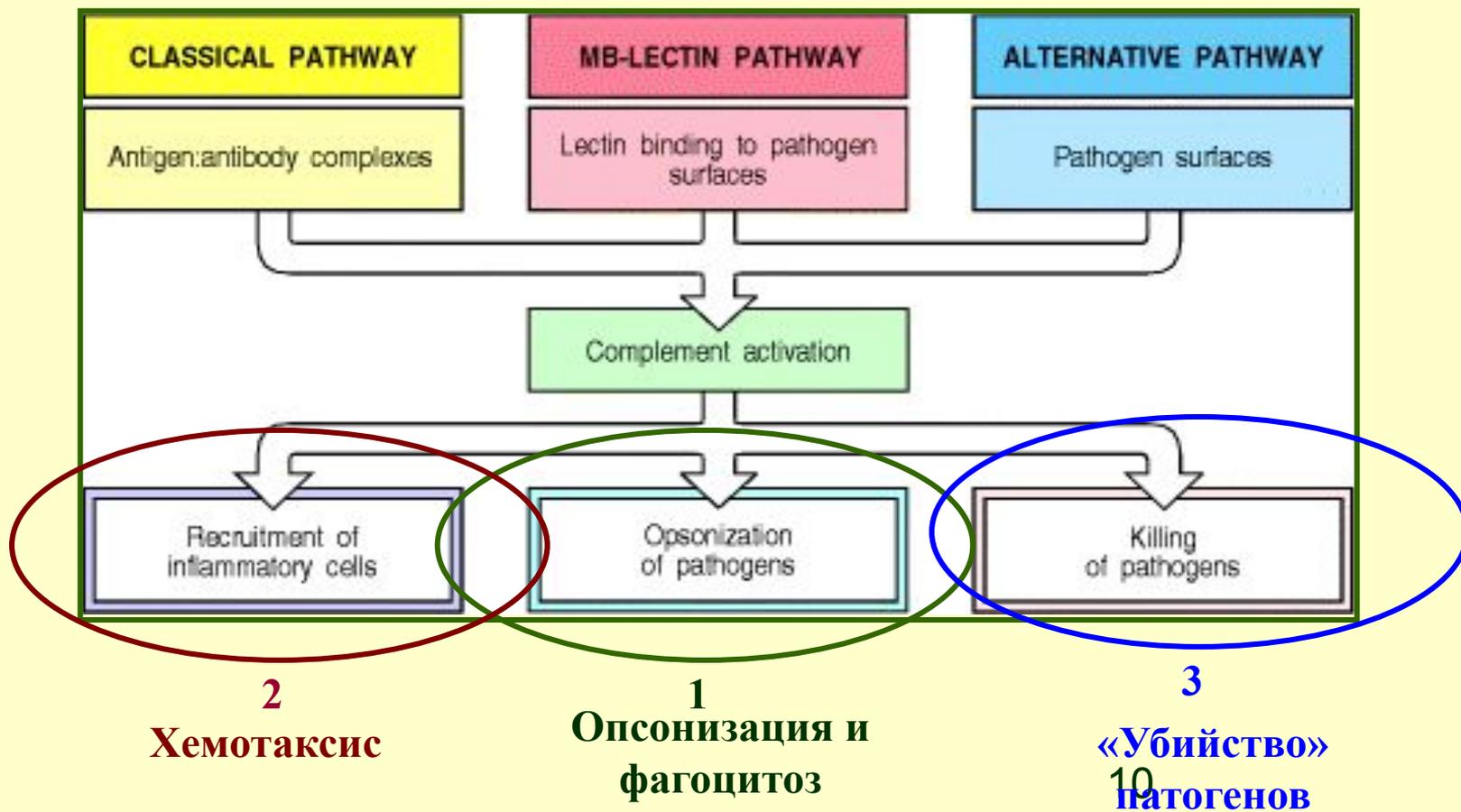
Компоненты комплемента

- Протеины и гликопротеины, составляющие систему комплемента, синтезируются в основном гепатоцитами печени, а также кровяными моноцитами, макрофагами и эпителиальными клетками желудочно-кишечного и мочевого трактов
- Компоненты комплемента составляют 15% от фракции всех глобулинов в сыворотке и циркулируют в ней, находясь в инертной неактивной форме
- Большая часть белков являются протеазами, которые проходят активацию после расщепления → активированная протеаза расщепляет последующий белок и так далее
- Существуют три отличных друг от друга пути, через которые происходит активация комплемента на поверхности микроорганизмов:
 - * классический (classical)
 - * альтернативный (alternative)
 - * лектиновый (lectin)

Растворимые белки комплемента

Pathway	Component	MW	No. of chains	Chromosomes location (human)	Serum concentration (µg/ml)	
Classical	Clq	460,000	6x3	1	80	
	Clr	83,000	1	12	50	
	Cls	83,000	1	12	50	
	C2	102,000	1	6	25	
	C4	206,000	3	6	600	
	C3	185,000	2	19	1,300	
	C1 1HN	110,00	1	11	200	
	C4bp	500,000	7x1	1	250	
	Alternative	C3	190,000	2	19	1,300
		Factor B	93,000	1	6	200
Factor D		24,000	1	X?	1	
Factor H		150,000	1	1	500	
Factor I		88,000	2	4	34	
Properdin		224,000	4x1	X	20	
Lectin		MBL	32,000	1	10	1
	MASP-1	93,000	2	3	6	
	MASP-2	76,000	2	1	?	
Terminal	C5	190,000	2	9	70	
	C6	120,000	1	5	60	
	C7	110,000	1	5	55	
	C8	154,000	3	1	55	
	C9	72,000	1	5	60	
	S protein	75,000	1	17	500	
Regulator	SCPN	280,000	2x2	?	30	

Три способа защиты от инфекции:

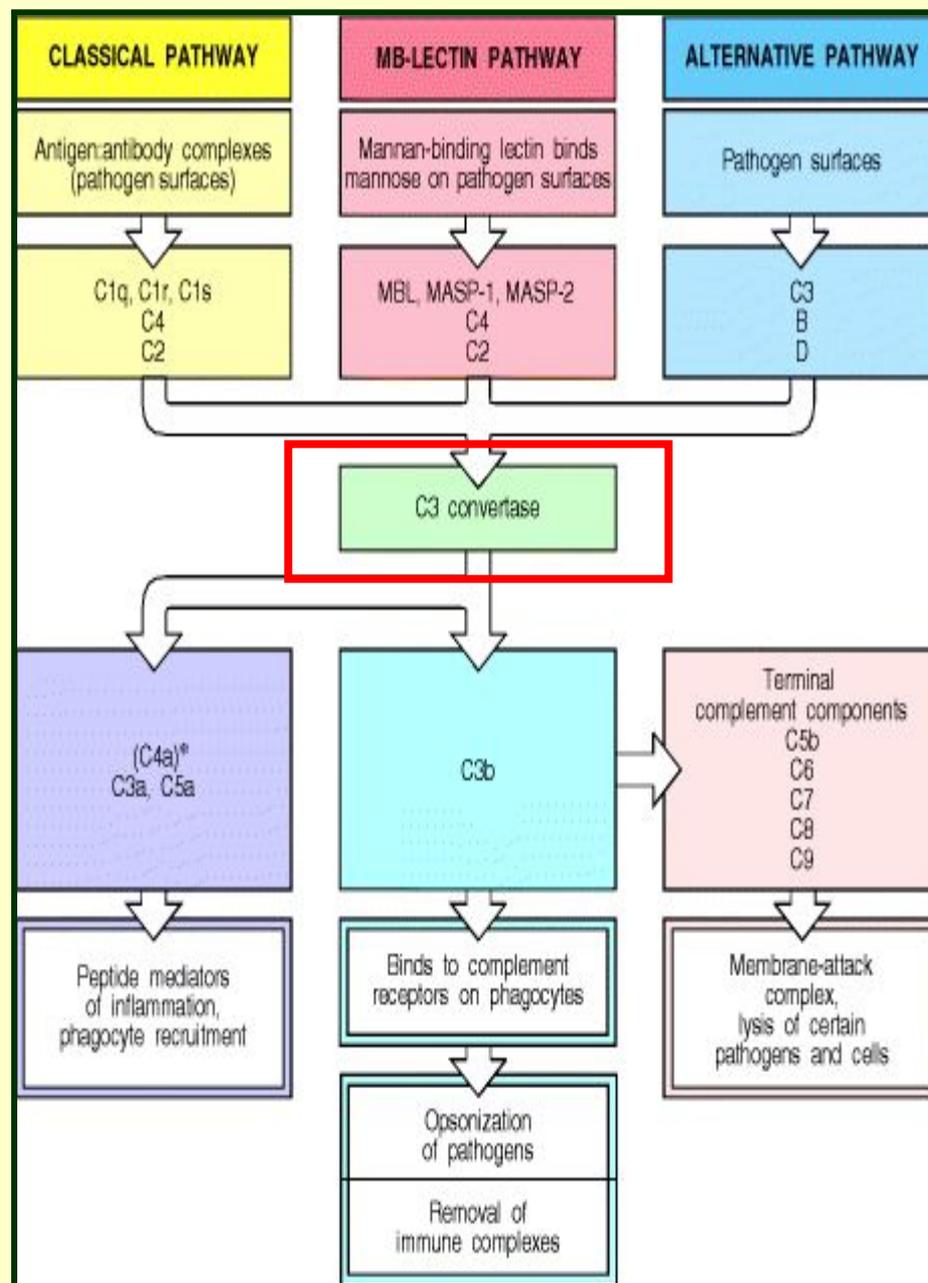


Ранние события всех трёх путей активации это ряд реакций расщепления, завершает которые образование **C3 конвертазы**, которая расщепляет **C3** на **C3b** и **C3a**.
 Образование **C3 конвертазы** - место встречи всех трёх путей комплемента и начала основных эффекторных функций.

C3b привязывается ковалентно к поверхности бактерий и опсонизирует их, в результате чего фагоциты могут их «проглотить».

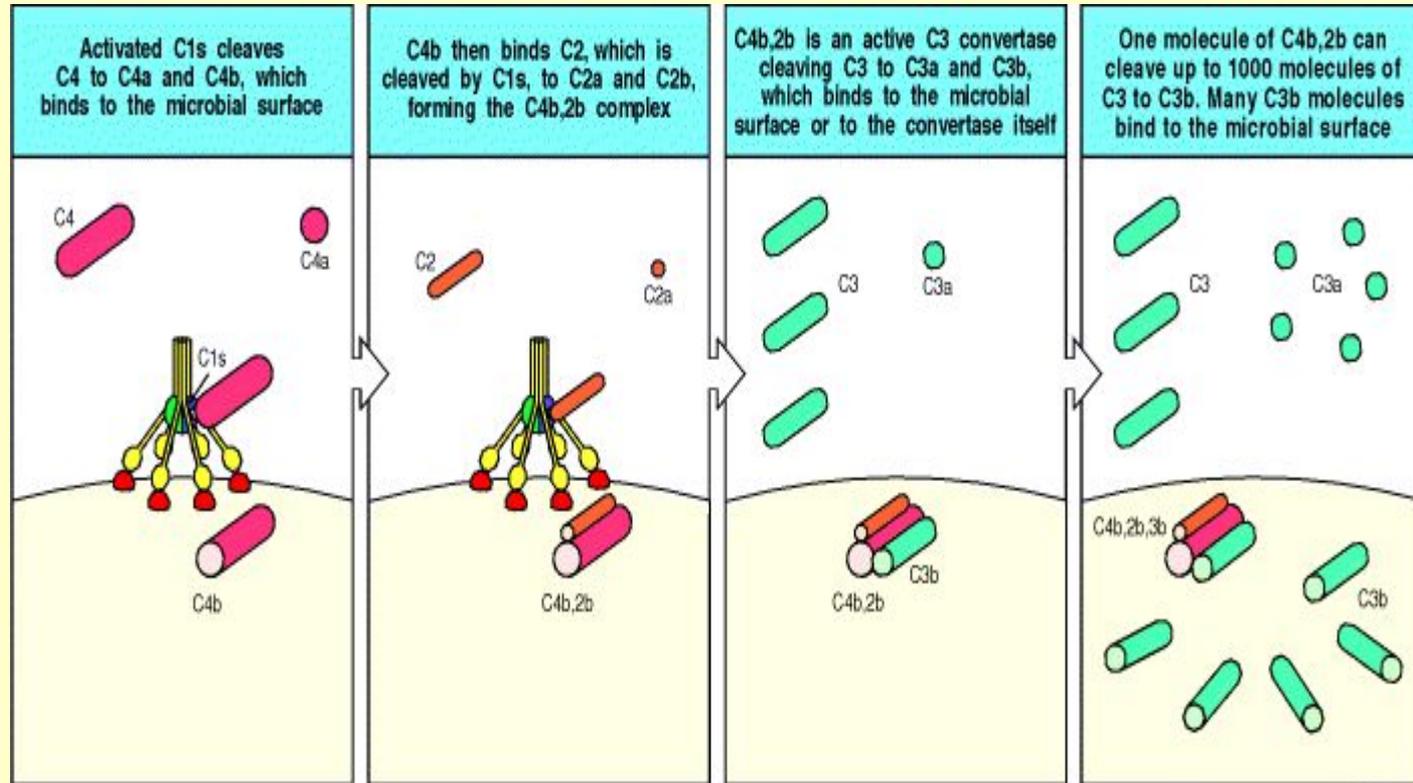
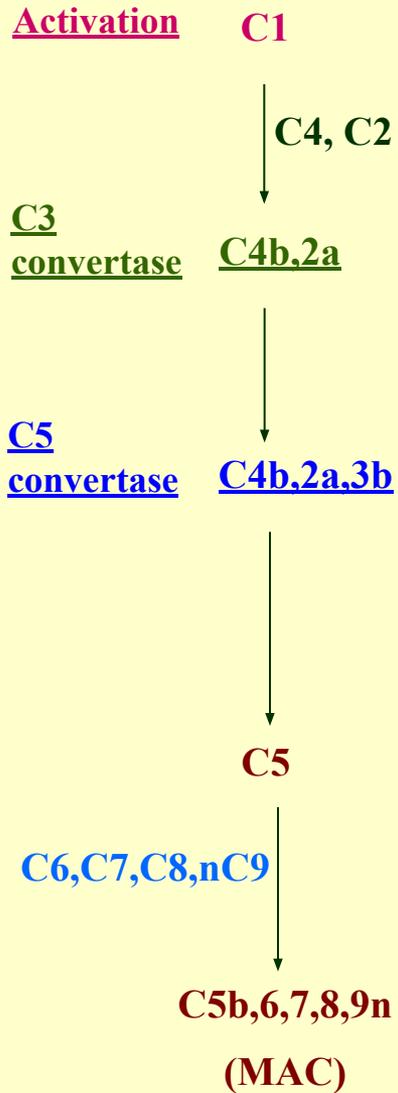
C3a - пептид, который является посредником воспалительных реакций. **C5b** и **C5a** появляются в результате расщепления **C5** с помощью **C5 конвертазы**.

C5a также является сильным посредником воспалений. **C5b** приводит в действие поздние события, в результате конечные компоненты собираются в комплекс атакующий мембрану, способный разрушить мембрану бактерии.



Классический путь активации

Classical pathway



Lectin pathway

MBL/ficolin MASP

Activation

C3
convertase

C4, C2

C4b,2a

C5
convertase

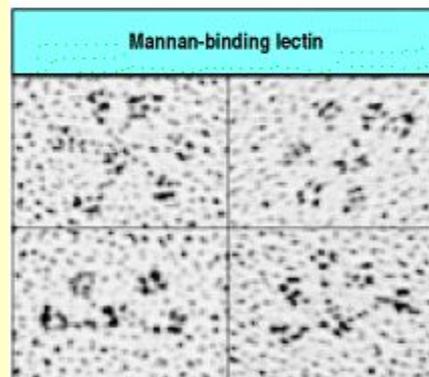
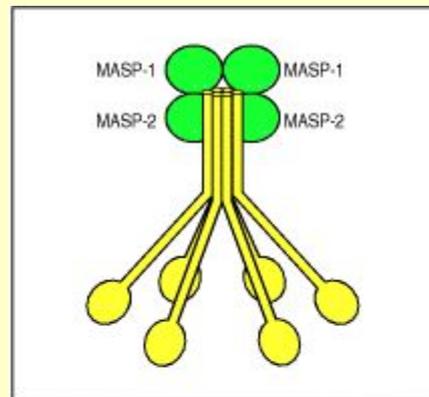
C4b,2a,3b

C5

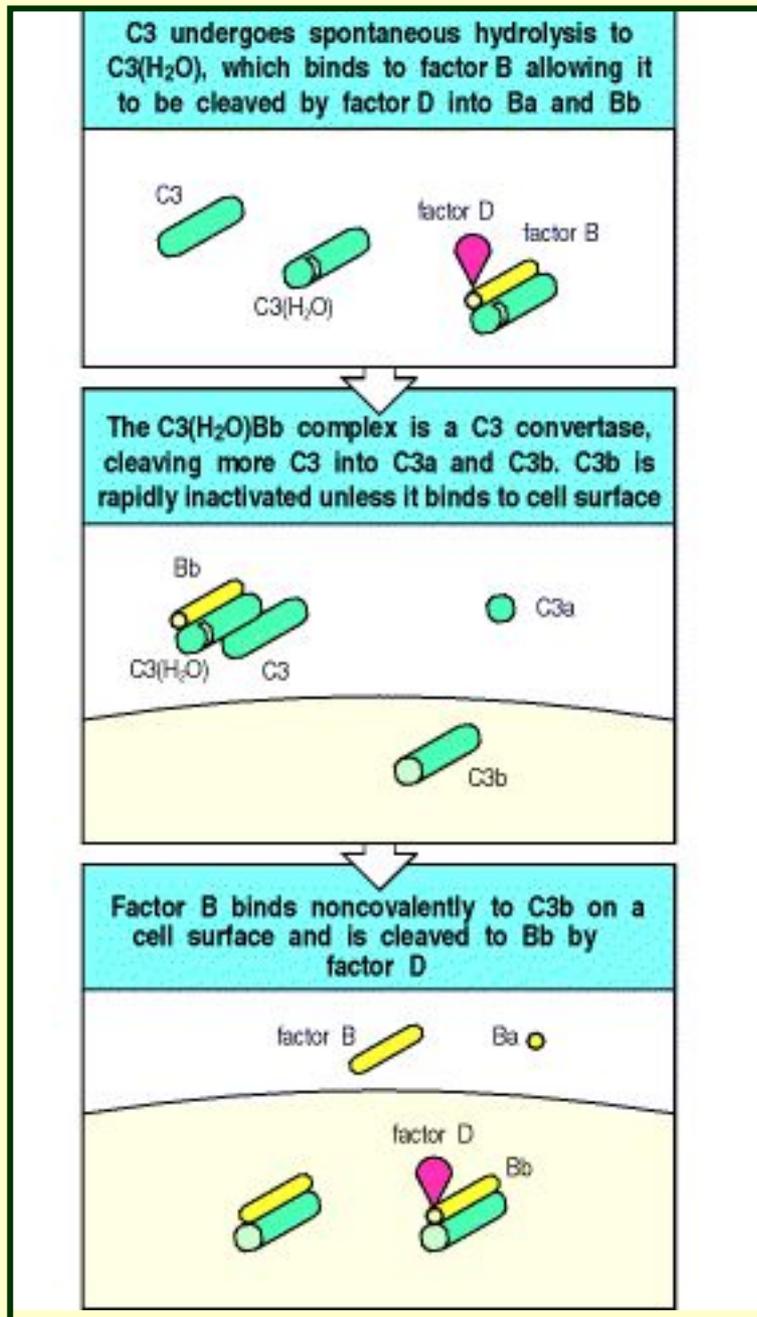
C6,C7,C8,nC9

C5b,6,7,8,9n
(MAC)

Mannan-binding lectin



I.



Alternative pathway



↓
B, D

C3b, Bb

↓

C3b, Bb, 3b

↓

C5

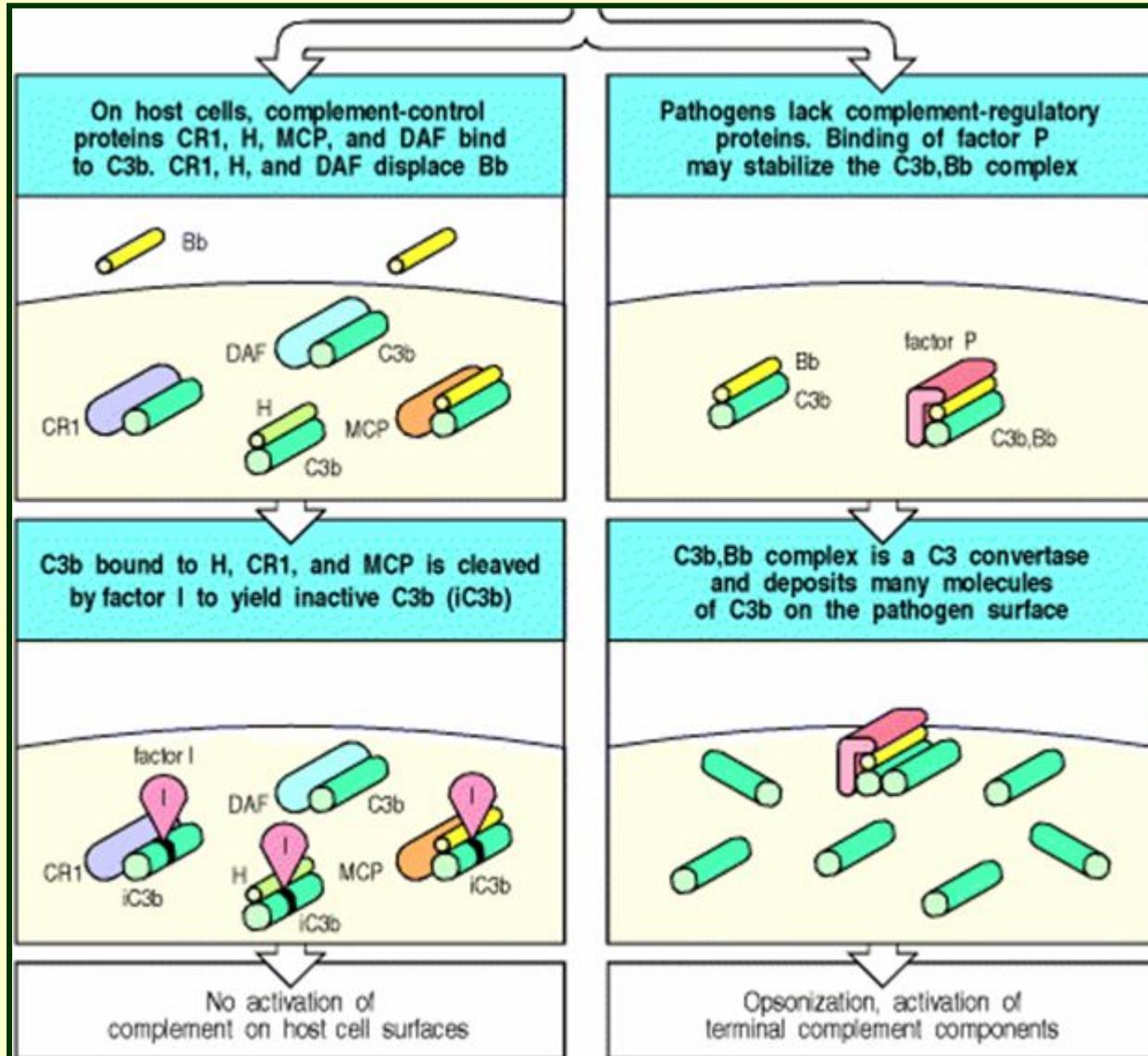
↓

C6, C7, C8, nC9

C5b, 6, 7, 8, 9n

(MAC)

II.



DAF/CD55

MCP/CD46, CR1

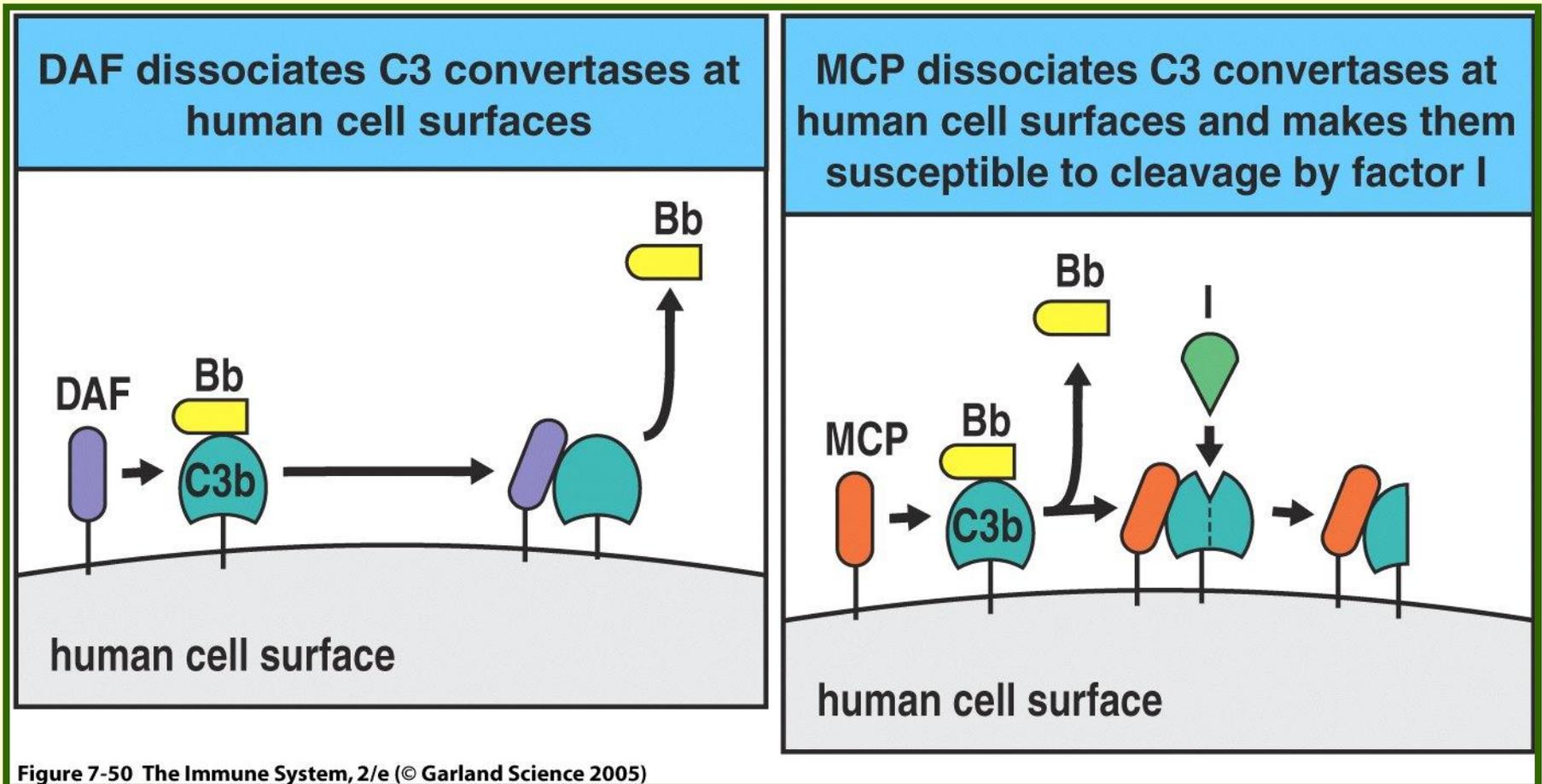


Figure 7-50 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

Factor H

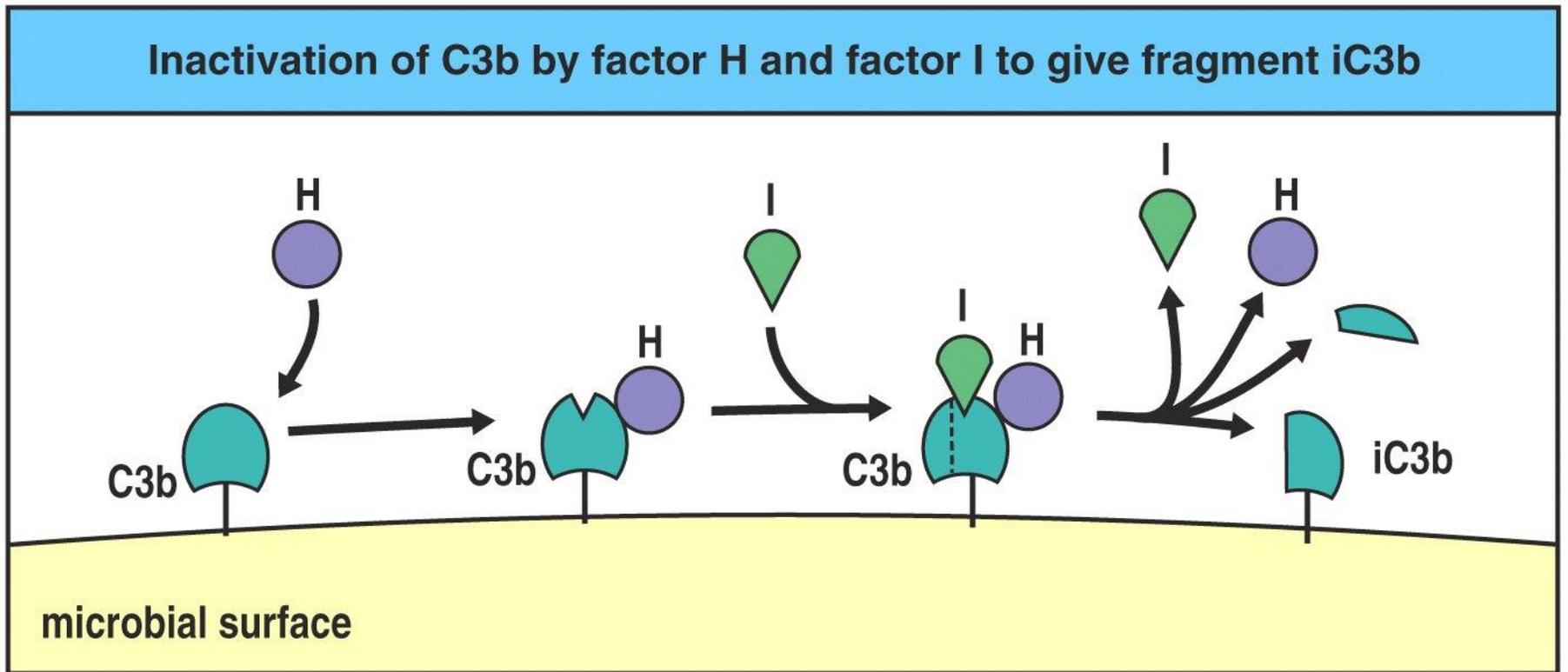
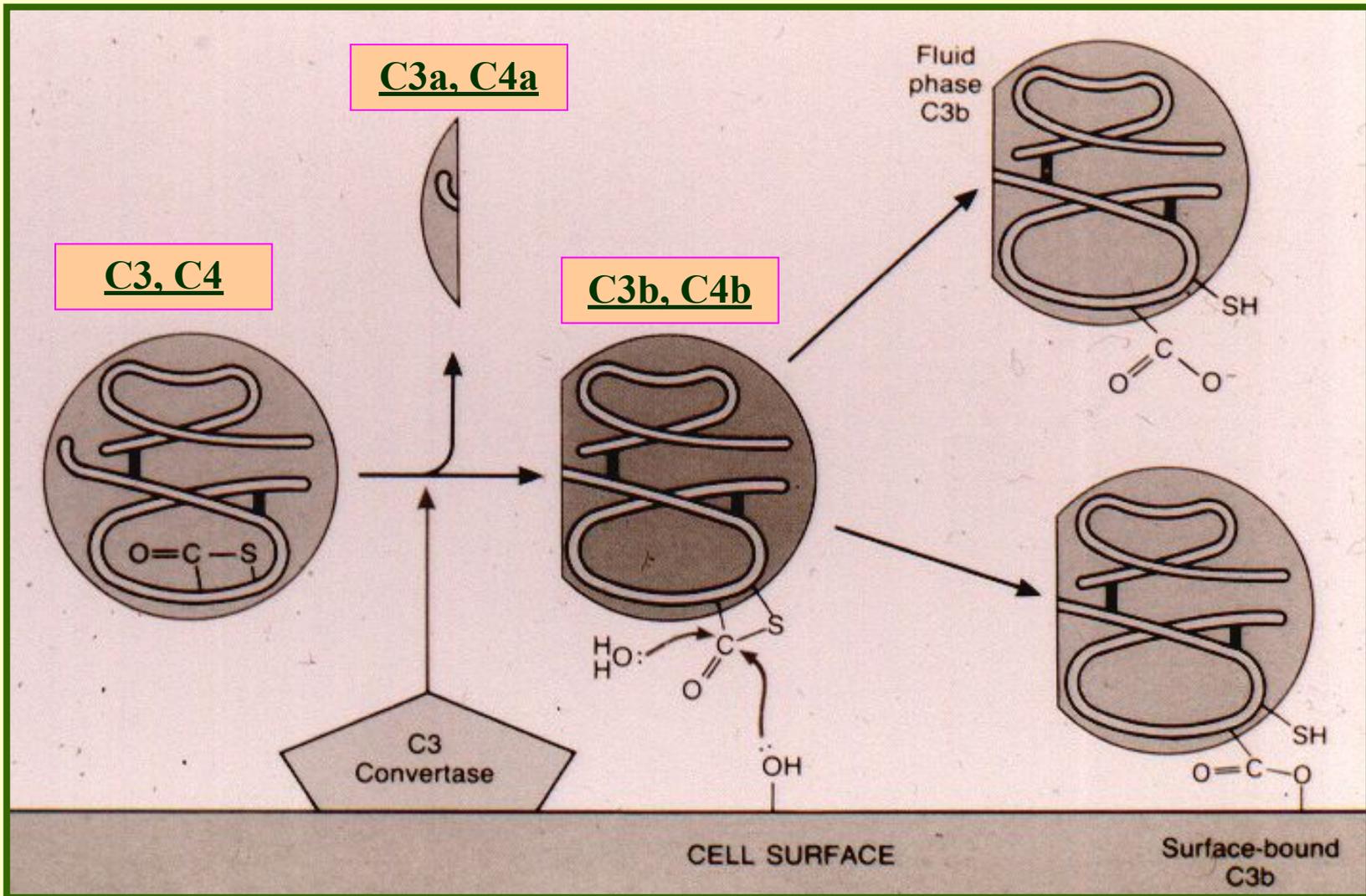


Figure 7-49 part 2 of 2 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

Тиоэфирная связь в белках: C3b и C4b



Classical pathway

Activation

C1

↓ C4, C2

C3
convertase

C4b,2a

↓

C5
convertase

C4b,2a,3b

↓

Lectin pathway

MBL/ficolin MASP

↓ C4, C2

C4b,2a

↓

C4b,2a,3b

↓

Alternative pathway

C3b ←^{C3} **C3(H₂O)Bb** ←^{B,D} **C3(H₂O)**

↓ B, D

C3b,Bb

↓

C3b,Bb,3b

↓

C5

C6,C7,C8,nC9

C5b,6,7,8,9n

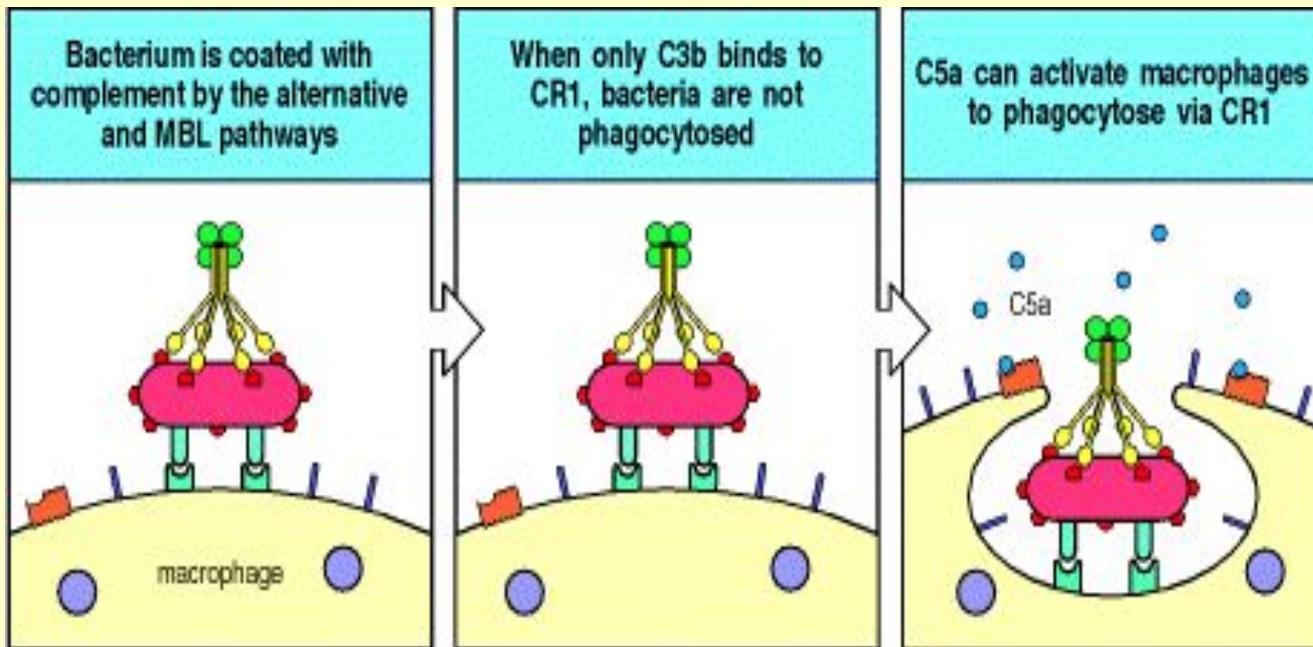
(MAC)

I. Фагоцитоз: рецепторы комплемента

Receptor	Specificity	Functions	Cell types
CR1 (CD35)	C3b, C4b iC3b	Promotes C3b and C4b decay Stimulates phagocytosis Erythrocyte transport of immune complexes	Erythrocytes, macrophages, monocytes, polymorphonuclear leukocytes, B cells, FDC
CR2 (CD21)	C3d, iC3b, C3dg Epstein- Barr virus	Part of B-cell co-receptor Epstein-Barr virus receptor	B cells, FDC
CR3 (CD11b/ CD18)	iC3b	Stimulates phagocytosis	Macrophages, monocytes, polymorphonuclear leukocytes, FDC
CR4 (gp150, 95) (CD11c/ CD18)	iC3b	Stimulates phagocytosis	Macrophages, monocytes, polymorphonuclear leukocytes, dendritic cells
C5a receptor	C5a	Binding of C5a activates G protein	Endothelial cells, mast cells, phagocytes
C3a receptor	C3a	Binding of C3a activates G protein	Endothelial cells, mast cells, phagocytes

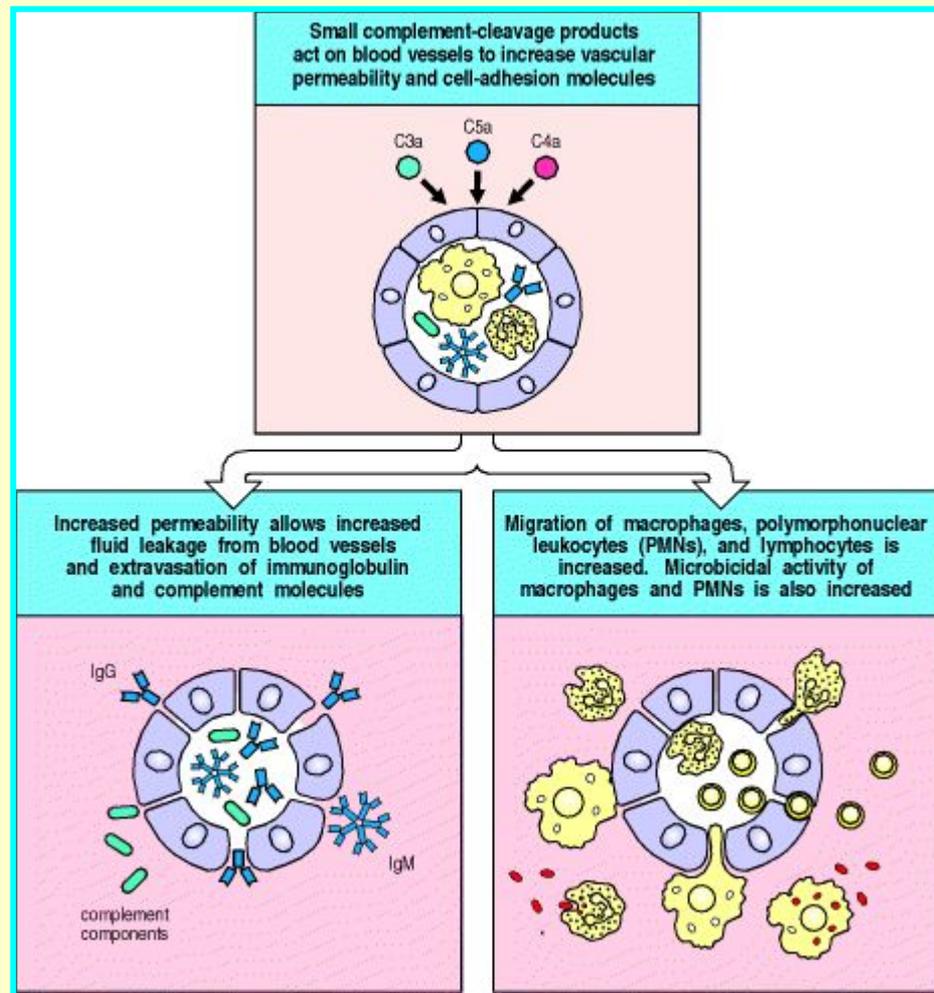
I. Фагоцитоз: рецепторы комплемента

- 1) CR1-C3b
 - 2) C5aR-C5a
- } → *Фагоцитоз*



II. Воспаление

- Маленькие фрагменты комплемента – C3a, C4a, C5a - активируют специфические рецепторы и вызывают локальные воспаления.
- Если производятся в больших кол-вах, либо впрыскиваемые системно, вызывают общий коллапс циркуляции, похожий на шок синдром, напоминающий системную аллергическую реакцию которая затрагивает IgE анафилактический шок.
- Из всех 3 наиболее устойчивым является C5a, он обладает самой высокой специфической биологической активностью.
- Все 3 вызывают сокращение гладкой мускулатуры, увеличение сосудистой проницаемости, но C5a и C3a также действуют на эндотелиальные клетки кровяных сосудов и индуцируют выражение молекул адгезии.
- C3a и C5a могут активировать тучные клетки, вызывая высвобождение гистамина.

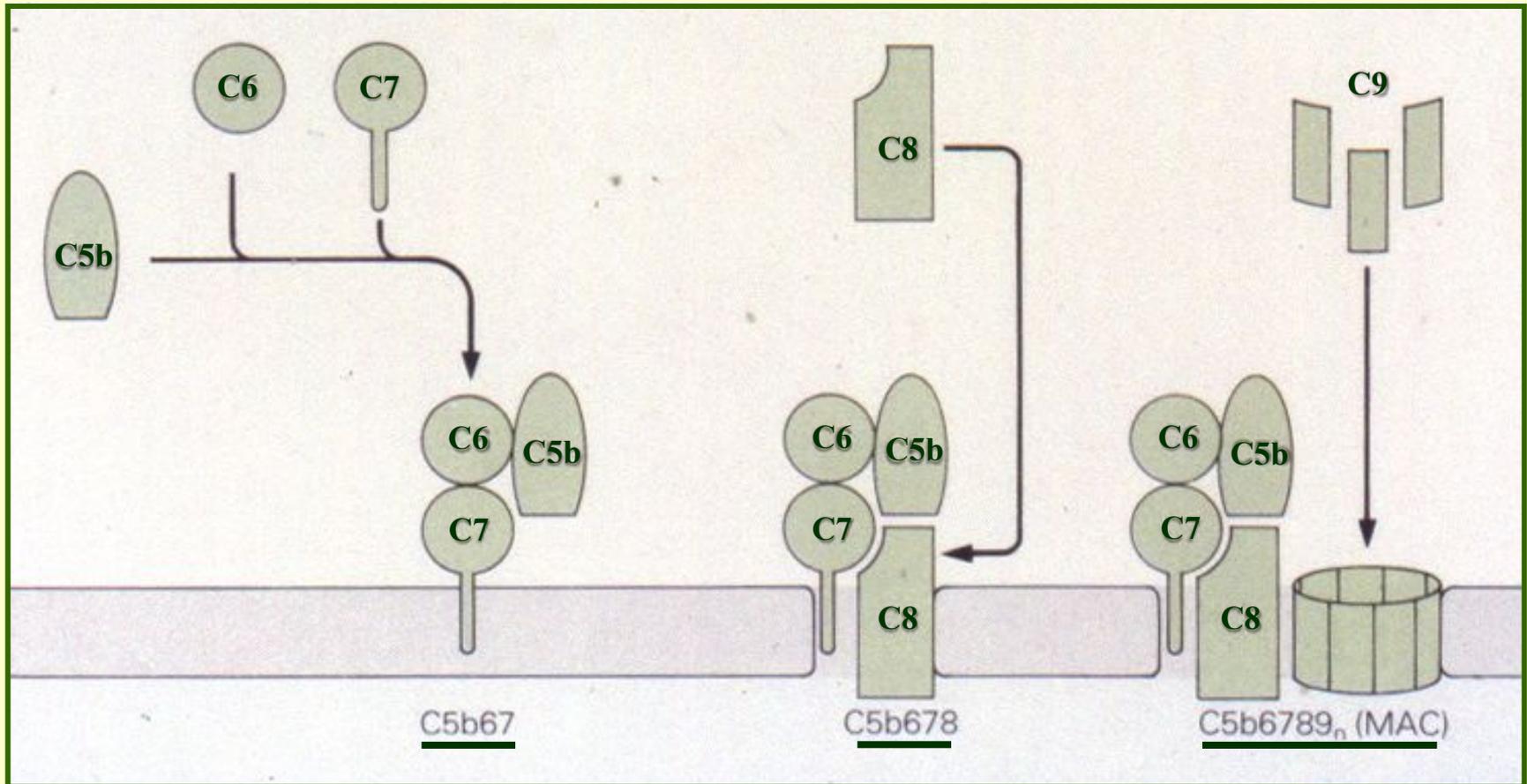


III. МАК - Конечные белки компонента

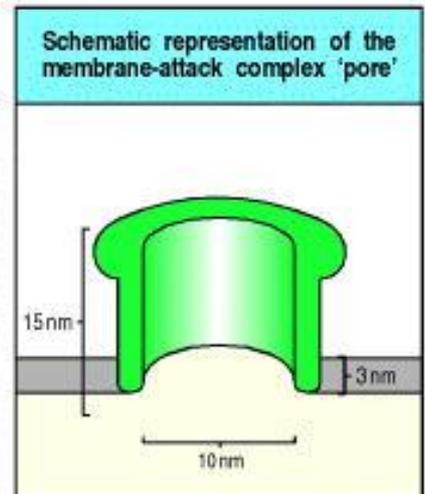
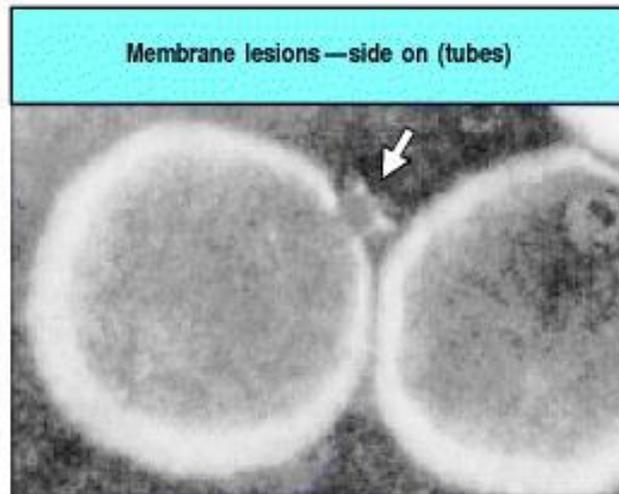
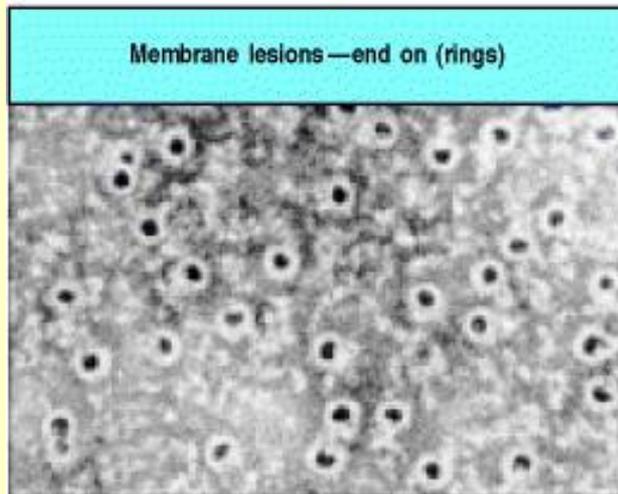
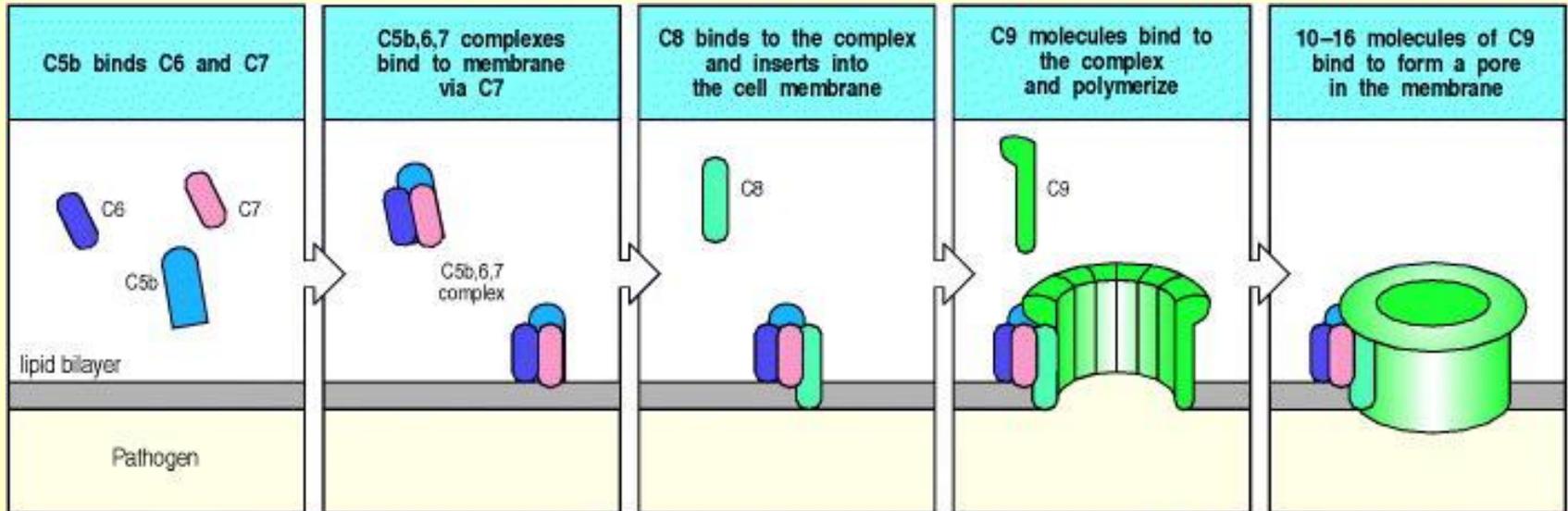
The terminal complement components that form the membrane-attack complex		
Protein	Concentration in serum ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Function
C5	85	On activation the soluble C4b fragment initiates assembly of the membrane-attack complex in solution
C6	60	Binds to and stabilizes C5b. Forms a binding site for C7
C7	55	Binds to C5b,6 and exposes a hydrophobic region that permits attachment to the cell membrane
C8	55	Binds to C5b,6,7 and exposes a hydrophobic region that inserts into the cell membrane
C9	60	Polymerization on the C5b,6,7,8 complex to form a membrane-spanning channel that disrupts the cell's integrity and can result in cell death

Figure 7-43 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

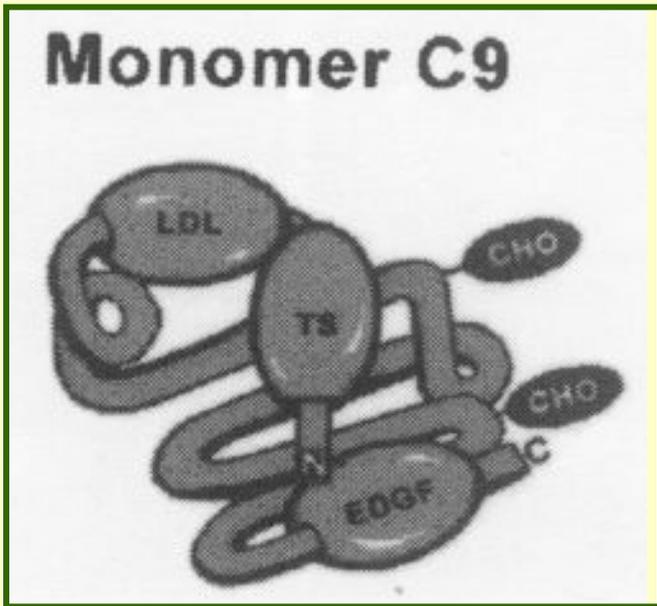
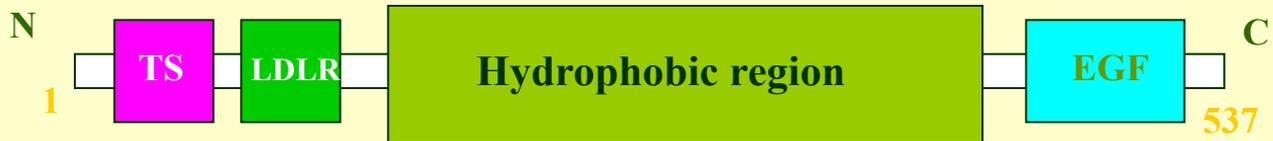
Образование комплекса C5b-9



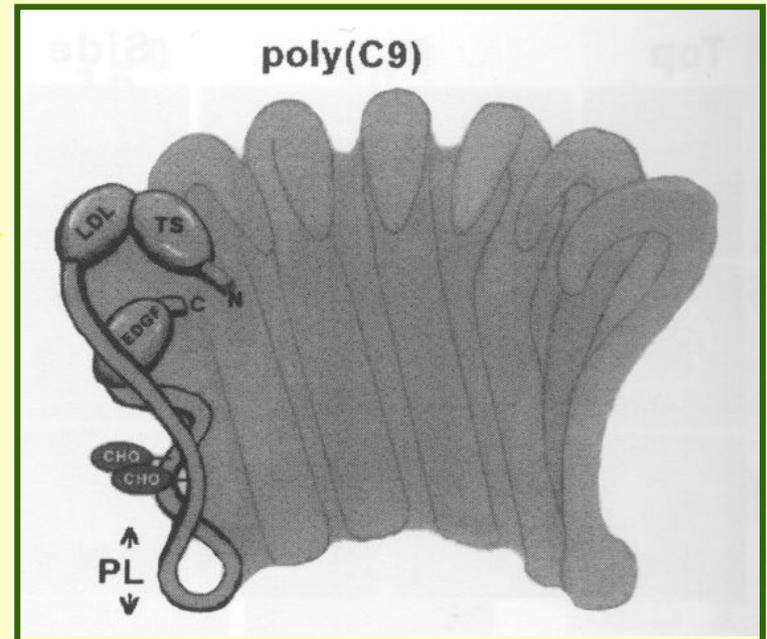
MAC



C9 – «палач» системы комплемента



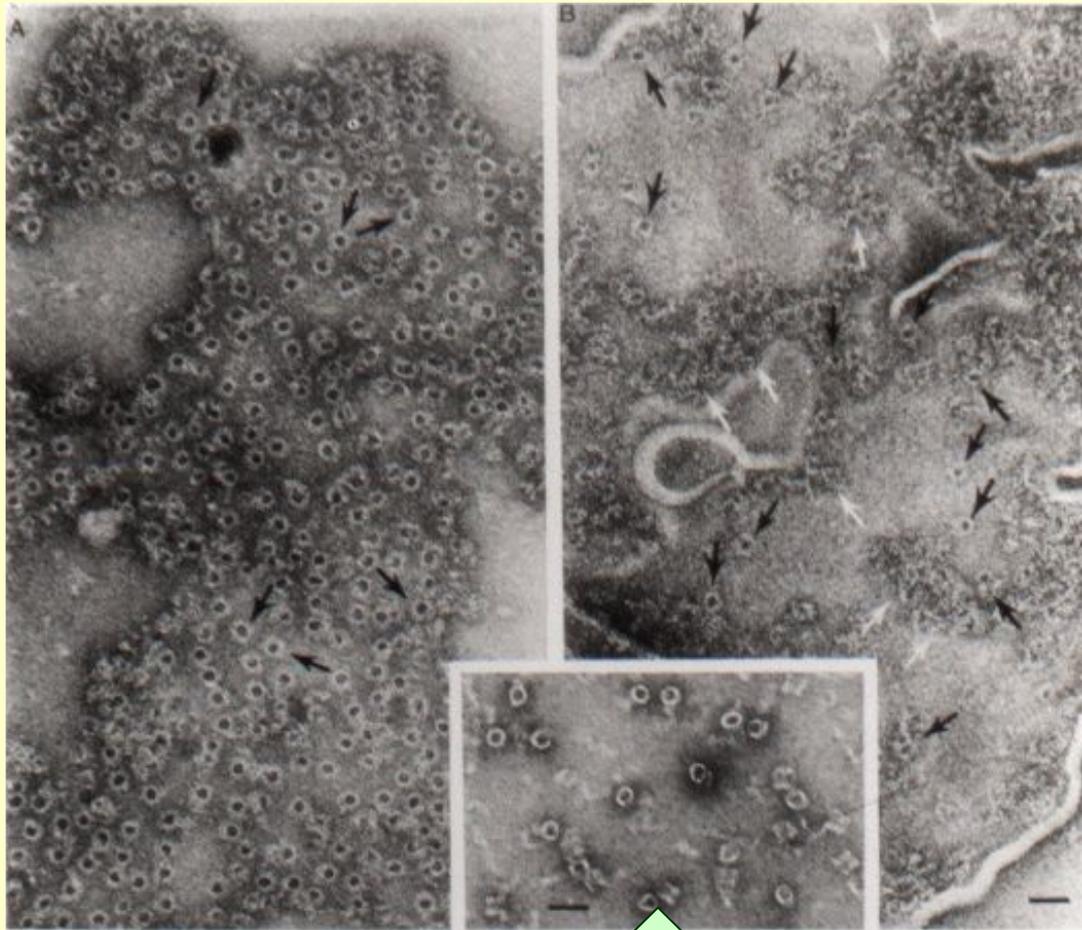
C5b-8
C5b-8,9n



Гидрофильный белок

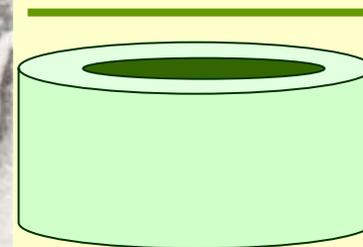
Гидрофобный белок

Комплексы атакующие мембрану приводят к повреждению клеточной мембраны, разбуханию клетки и, в итоге, к осмотическому лизису клетки



Transmembrane channel
Membrane lipids
rearrangement
Loss of membrane integrity

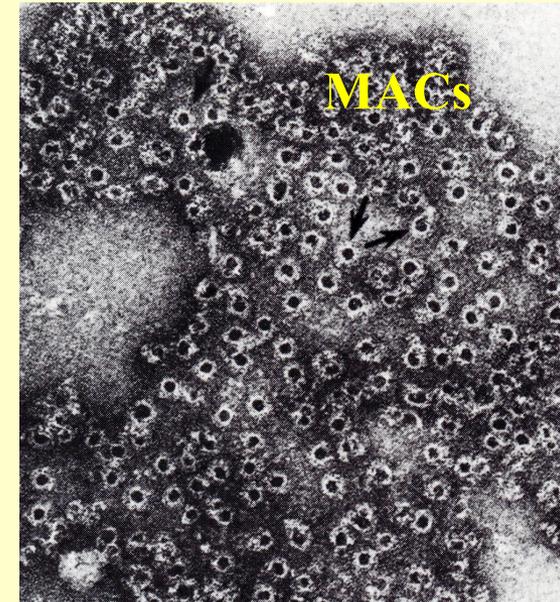
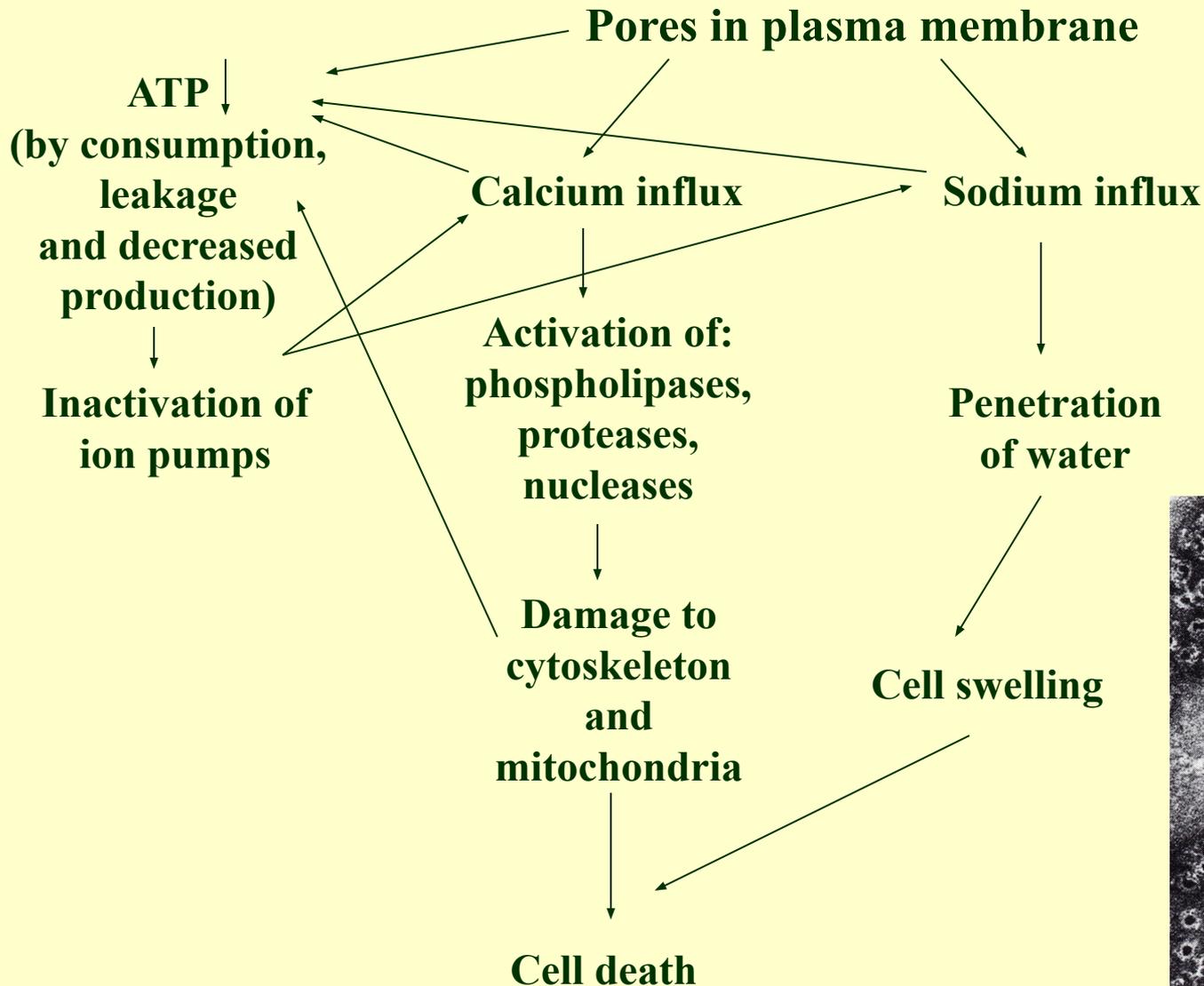
21 nm



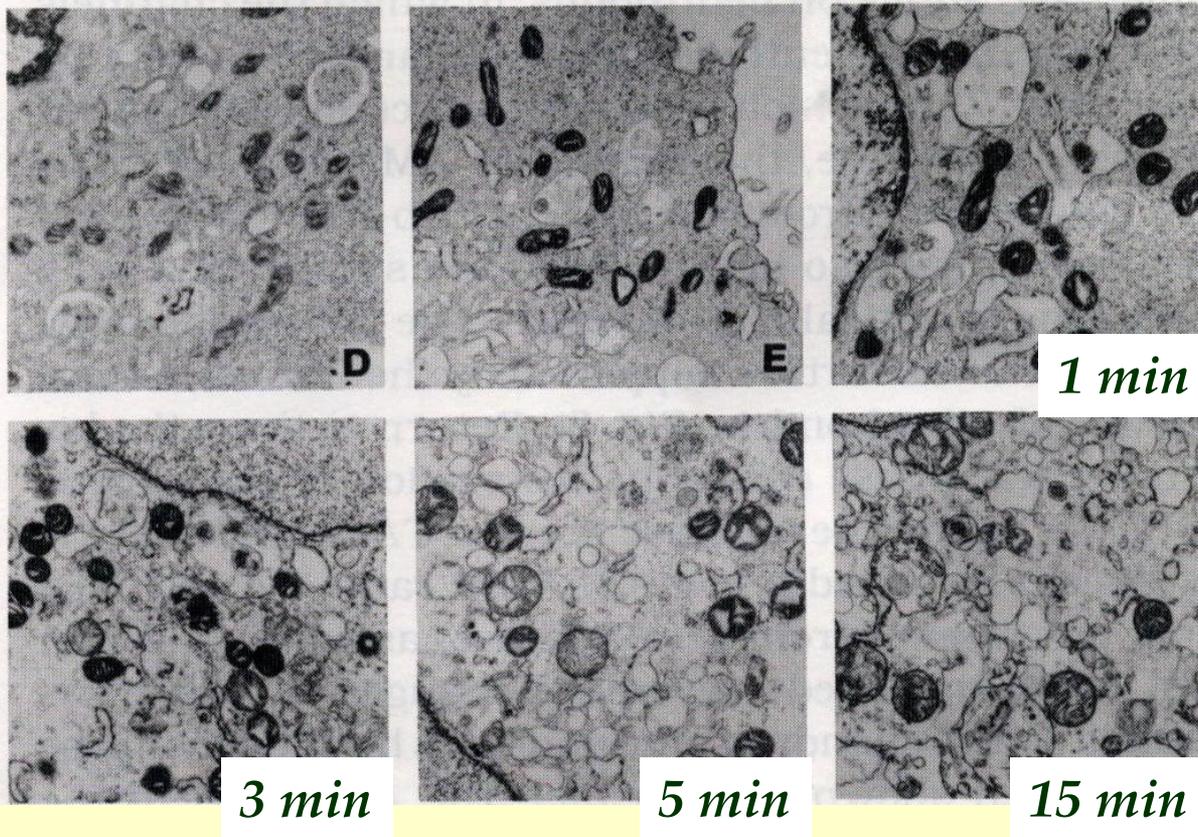
15 nm

PolyC9

Necrosis



Mitochondria are damaged within 5 min of MAC attack



Papadimitriou et al. J. Immunol. 147: 212, 1991

Complement in pathogenesis

Alzheimer's disease (Rogers et al., 1992)

Allotransplantation (Pruitt and Bollinger, 1991)

Asthma (Regal et al., 1993)

ARDS (Robbins et al. 1987)

Arthus reaction (Szalai et al., 2000)

Bullos pemphigoid (Liu et al. 1995)

Burn injuries (Gallinaro et al, 1992)

Crohn's disease (Ahrenstedt et al., 1990)

EAE (Davoust et al., 1999)

EAN (Vriesendorp et al., 1995)

Forssman shock (Higgins et al., 1997)

Glomerulonephritis (Couser et al., 1985)

Haemolytic anemia (Schreiber and Frank, 1972)

Hemodialysis (Amadori et al., 1983)

Hereditary angioedema (Gadek et al., 1980)

Ischemia/reperfusion injuries (Kilgore et al., 1994; Weiser et al., 1996)

IC-induced vasculitis (Cochrane, 1984)

Multiple system organ failure (Heideman and Hugli, 1984)

Multiple sclerosis (Williams et al., 1994)

Myasthenia gravis (Piddlesden et al., 1996)

Post-CBP inflammation (Pekna et al., 1993)

Psoriasis (Rosenberg et al., 1990)

Rheumatoid arthritis (Wang et al., 1995)

Septic shock (Hack et al., 1992)

SLE (Buyon et al., 1992)

Stroke (Huang et al., 1999)

Vascular leak syndrome (Hack et al., 1994)

Xenotransplantation (Dalmaso, 1992)

Complement in pathogenesis

Complement deficiencies:

Homozygous deficiencies in any of the early components (C1q, C1r, C1s, C4, C2) increase in immune-complex diseases: SLE, Glomerulonephritis, Vasculitis.

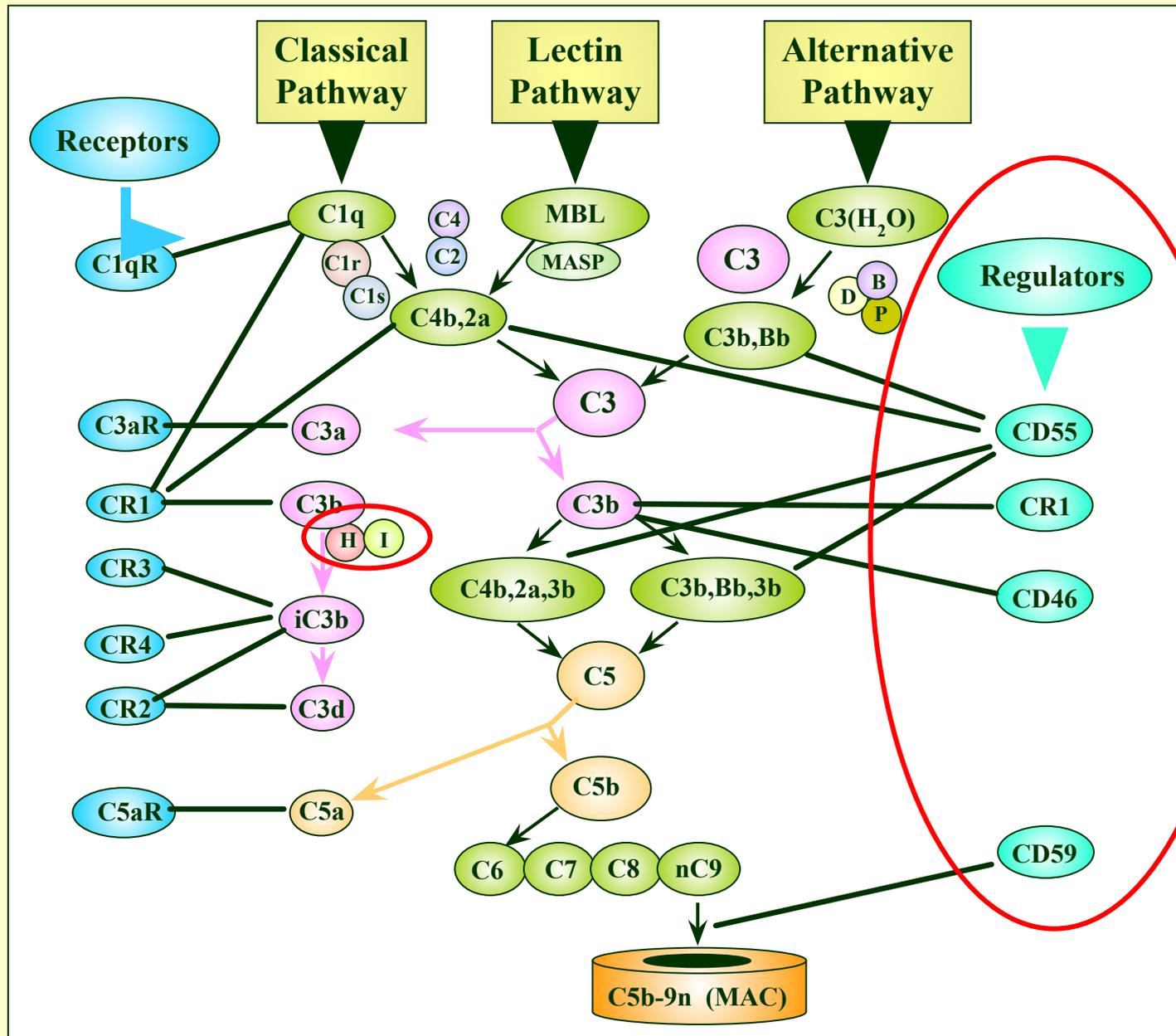
Deficiency in C5-C9 leads to susceptibility to *Neisseria* species (Gonorrhoea, bacterial meningitis)

Deficiency in C1 inhibitor-autosomal dominant disease: Hereditary angioedema

Factor H, C1q esterase - Hereditary angioedema

Deficiency in DAF and HRF proteins-hemolytic anemia

Регуляция системы комплемента



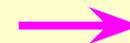
Регуляция системы комплемента

❖ Soluble complement regulatory proteins:

- Factor H, Factor I, C4bp, Properdin,
- S protein (Vitronectin), Clusterin (SP40,40), C1INH

❖ Membrane complement regulatory proteins:

- Complement receptor-1 (CR1, CD35)
- Decay accelerating factor (DAF, CD55)
- Membrane cofactor protein (MCP, CD46)
- CD59-Protectin





Complement resistance of tumor cells:

basal and induced mechanisms

Fishelson et al., 1999, Mol Imm

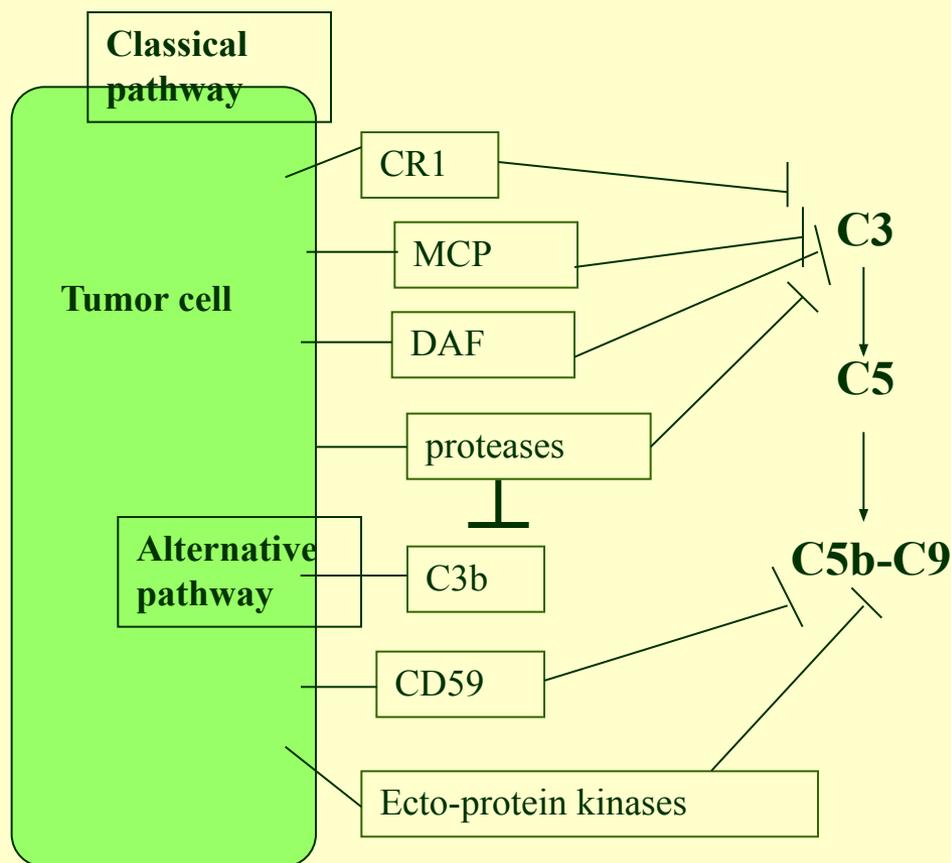
- **Эффект комплемента на опухолевые клетки неоднократно демонстрировался, тем не менее однозначных доказательств анти-раковых функций показано не было.**
- **В опытах произведенных на мышах лишенных иммунной системы, которым были внедрены человеческие опухолевые клетки, и были использованы антитела против этих клеток, было показано прямое участие комплемента в их уничтожении.**
- **Маннан - связывающий белок (МВР) узнаёт и связывается с олигосахаридами на поверхности клеток human colorectal carcinoma.**
- **Рекомбинантный вирус вакцинии, несущий ген МВР обладает ингибирующей рост активностью, как было продемонстрировано на клетках human colorectal carcinoma, которые были трансплантированы мышам, лишённым иммунной системы.**

- Известно, что клетки, обладающие ядрами, отличаются друг от друга в чувствительности к комплементу, эти различия принято приписывать к различным механизмам защиты, которая производится с помощью регуляторов комплемента.
- Механизмы, ответственные за устойчивость клетки к комплементу принято делить на 2 вида: основной и индуцируемый
 - *основной* - конститутивный, постоянно экспрессируемые белки как мембранные так и секретлируемые
 - *индуцируемый* - приходит в действие после стимуляции клеток с помощью цитокинов, гормонов, лекарственных препаратов или же дозами комплемента, которые не являются литическими.

Устойчивость опухолевых клеток к системе комплемента

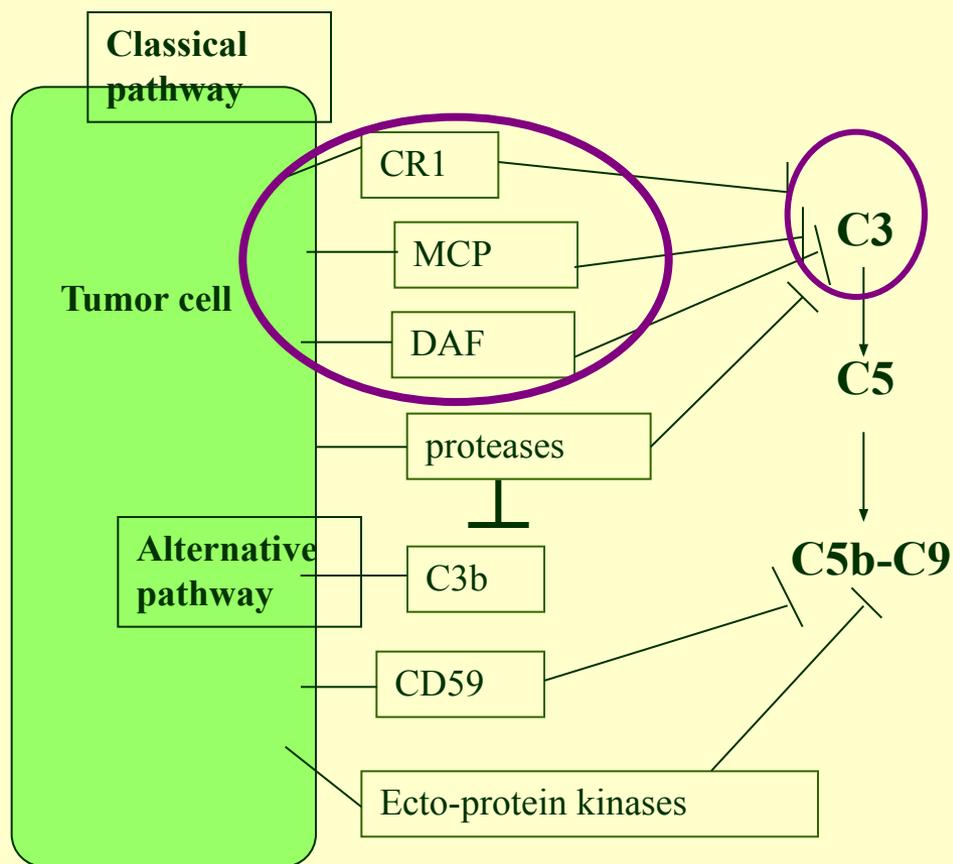
□ Основные механизмы устойчивости к комплементу:

I. экспрессия мембранных белков-регуляторов



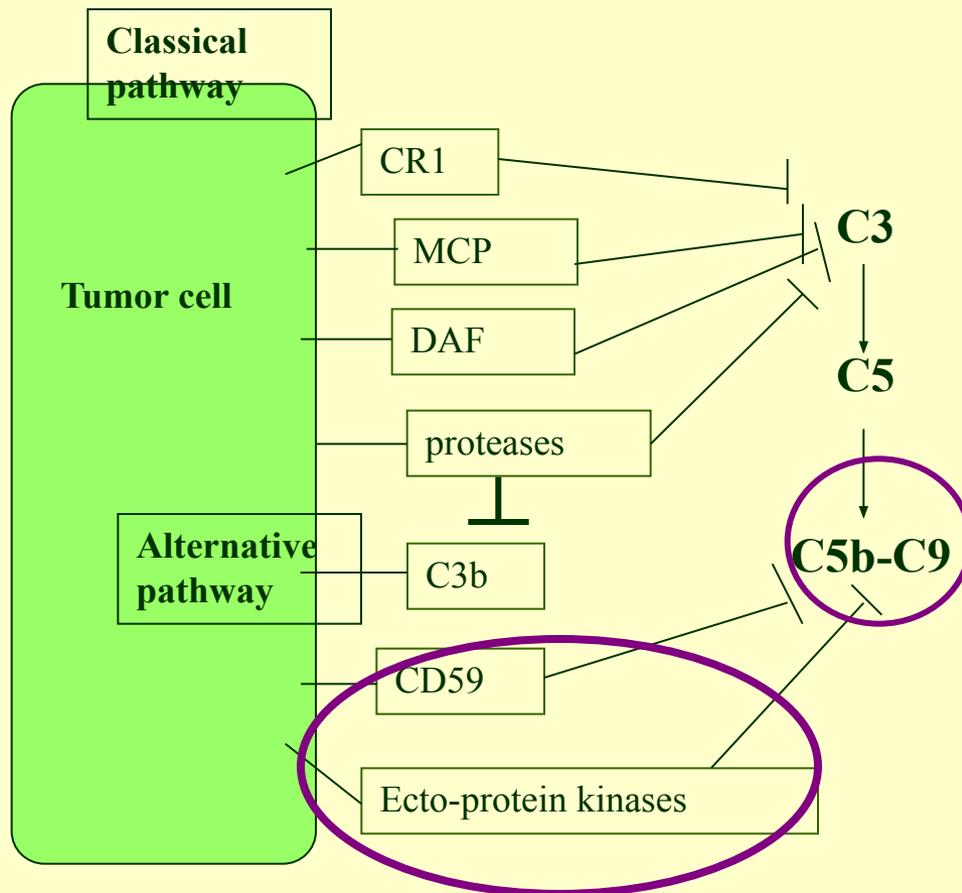
mCRPs (membrane Complement Regulatory Proteins)

Устойчивость опухолевых клеток к системе комплемента



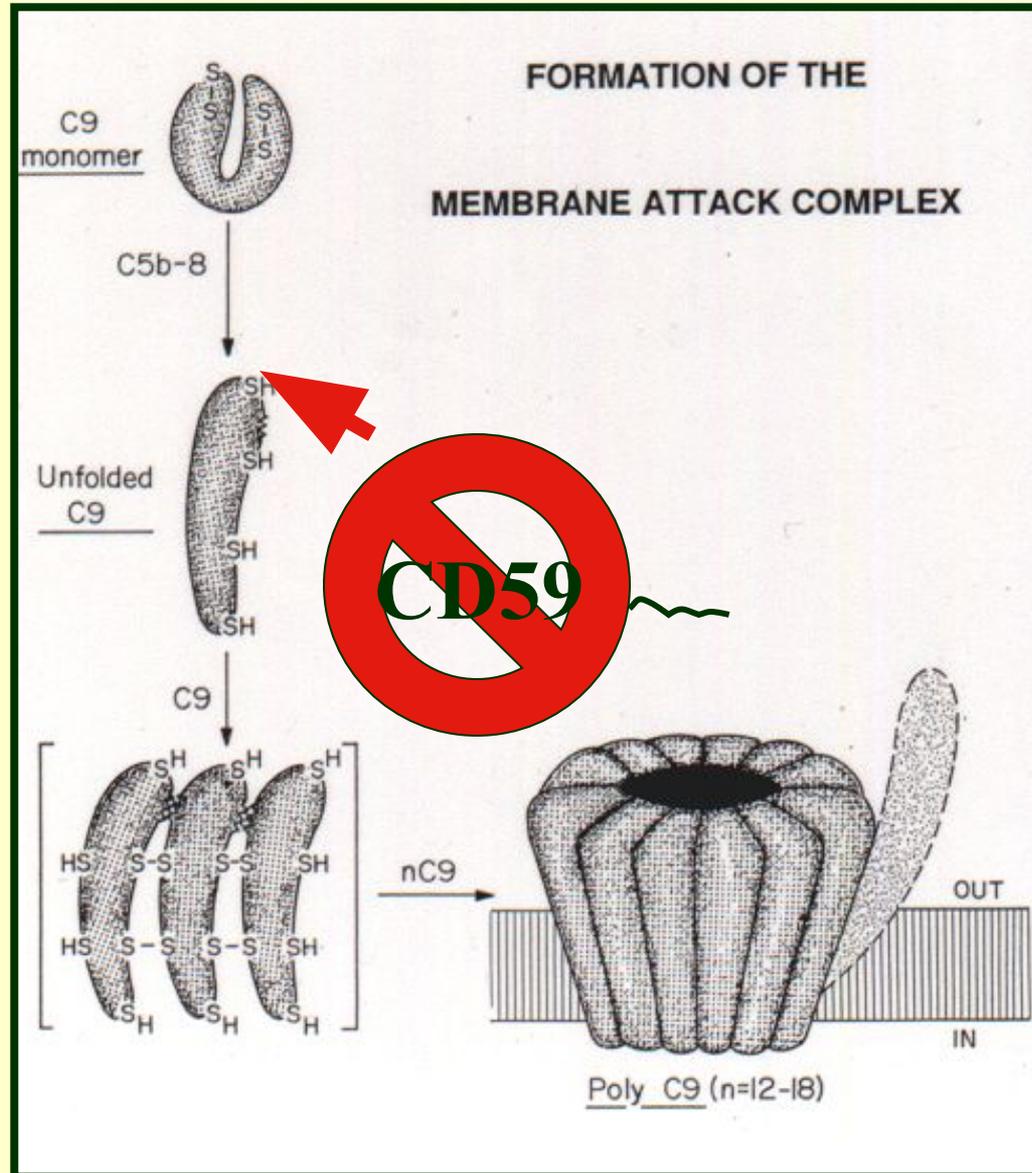
CD46, CD55 - контролируют каскад комплемента на уровне C3, таким образом не давая возможности образоваться анафилотоксинам, а также МАК.

Устойчивость опухолевых клеток к системе комплемента



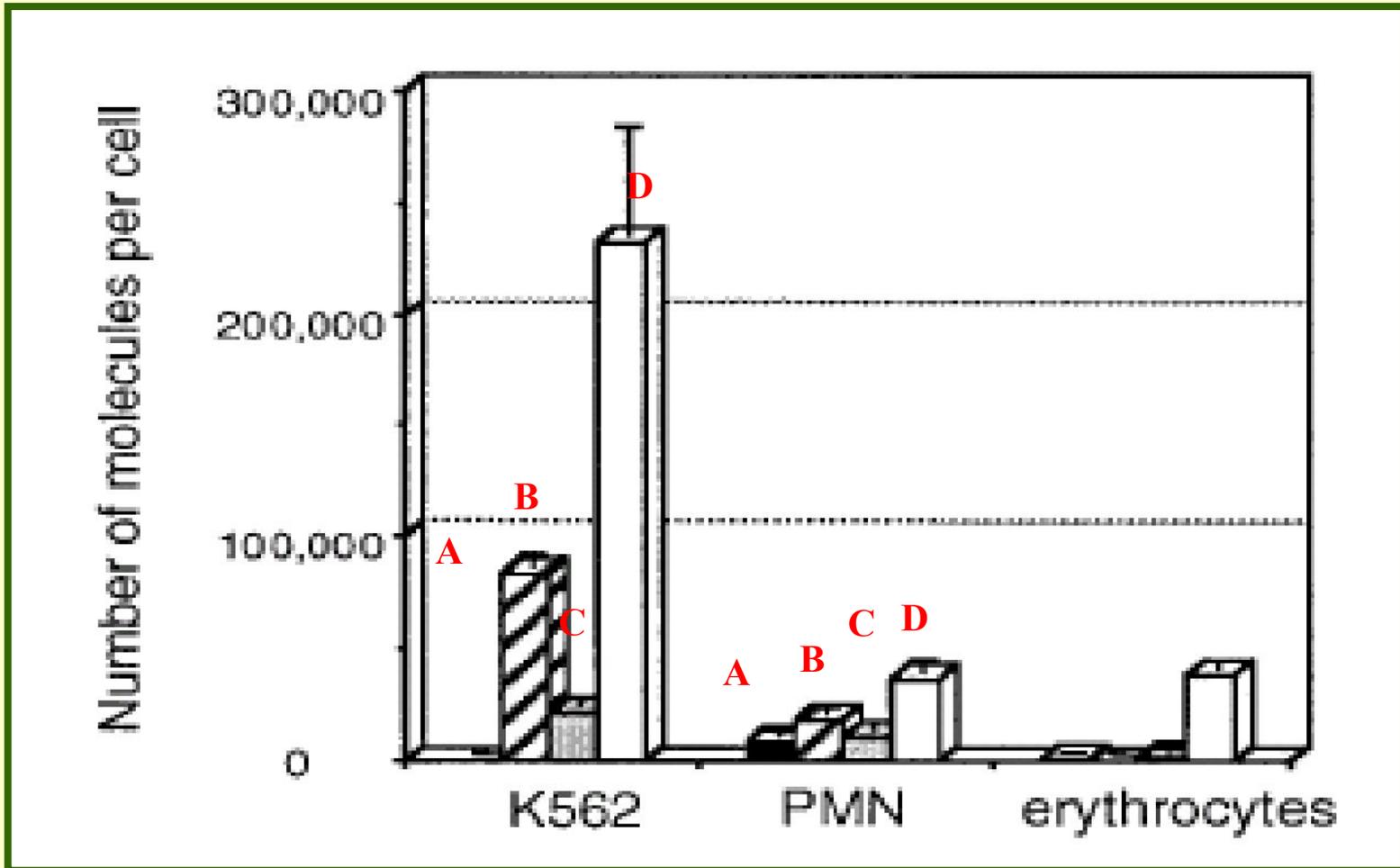
CD59 - связывается с конечными белками комплемента (C8 и C9) и не позволяет возникновения МАК.

CD59 binds to C8 and C9 and prevents further build up of the Membrane Attack Complex



- mCRPs находящиеся на поверхности нормальных и опухолевых клеток и уровень их экспрессии даже в одних и тех же тканях очень отличаются.
- На многих опухолевых тканях была продемонстрирована экспрессия CD46, CD55, CD59. Более того, многочисленные исследования показали, что эти белки выражены в больших количествах, чем на нормальных клетках, т.е. речь идёт о *over expression*.
- В клеточных линиях рака лёгких экспрессия CD55, CD46 и соответственно устойчивость к комплементу выше чем в нормальных клетках тех же тканей.

K562 ERYTHROLEUKEMIC CELLS ARE EQUIPPED WITH MULTIPLE MECHANISMS OF RESISTANCE TO LYSIS BY COMPLEMENT

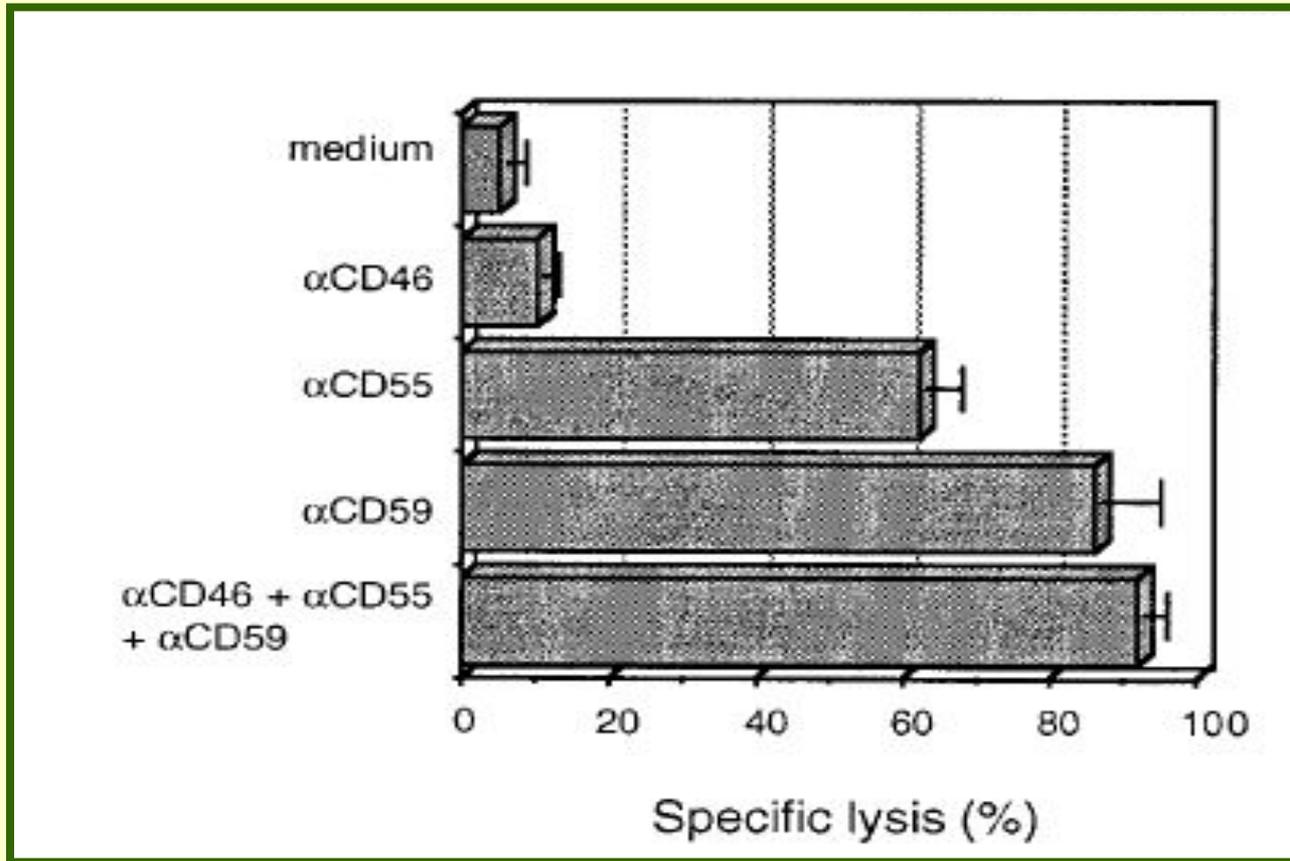


Expression of membrane-bound complement regulators on K562 cells, PMN and erythrocytes. Cells were treated first with MAbs: (A) anti-CD35, (B) anti-CD46, (C) anti-CD55, or (D) anti-CD59, followed by FITC-labeled goat anti-mouse IgG.

Blocking of mCRPs

- Важность mCRPs как механизма устойчивости к комплементу была также показана с помощью экспериментов с блокированием этих белков.
- Нейтрализация mCRPs с помощью специфических моноклональных антител усилила лизис лейкемических клеток, а также желудочно-кишечных клеток и меланоцитов.
- Наиболее резко выраженный эффект на лизис наблюдался в результате блокирования CD59.

Blocking of mCRPs



Effect of neutralization of membrane complement regulatory proteins on complement-mediated cell lysis. Cells were treated with rabbit anti-K562 antiserum in combination with anti-CD59 (BRIC229), anti-CD55 (BRIC110 1 BRIC216) or anti-CD46 (GB24) (10 mg/ml each) IgG and incubated at 37°C with NHS (1:10). Lysis was measured as percent release of TDA-forming fluorescent complexes with Eu31. Results are presented as means \pm 6 SD of triplicates of 1 (out of 4) representative experiment.

□ Основные механизмы устойчивости к комплементу:

I. экспрессия растворимых белков-регуляторов

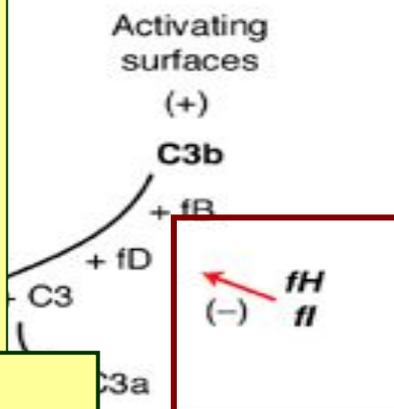
Classical pathway

• Clusterin S-protein - принимают участие во многих биологических реакциях, включая регуляцию конечные этапы активации комплемента, они соревнуются с поверхностью клеток-мишеней за гидрофобные места связывания на комплексе C5b-7. Оба белка были обнаружены в клетках astroglioma neuroblastoma

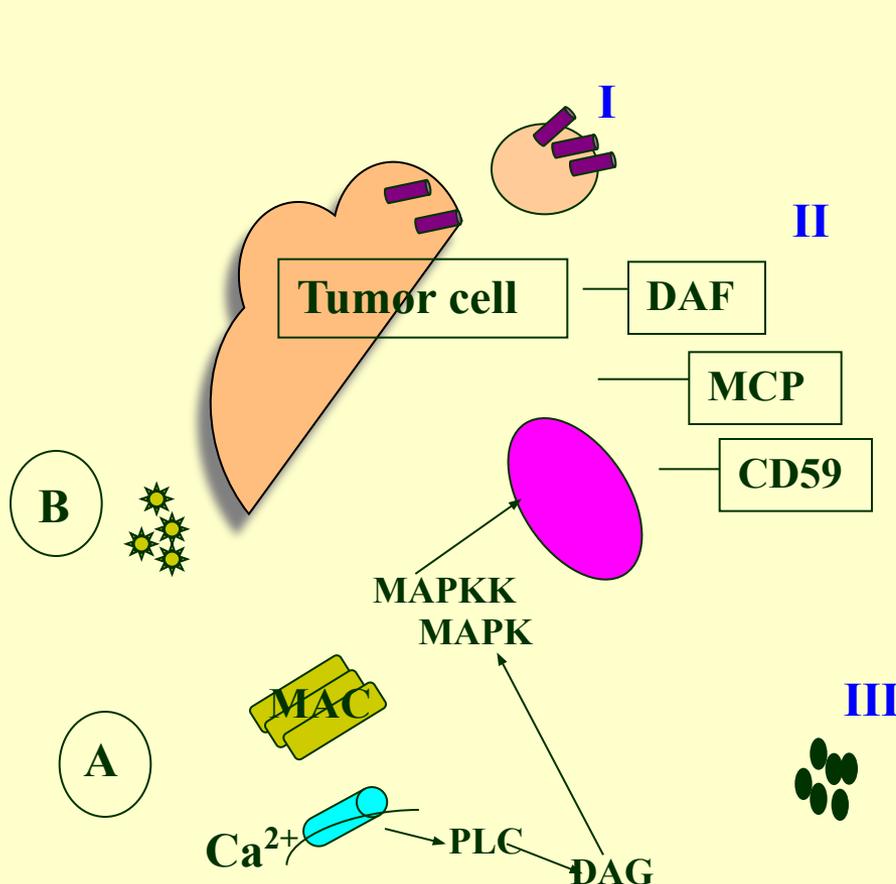
• C1 ингибитор, относится к семье серпинов - ингибиторов протеаз и является единственным известным плазматическим ингибитором C1r и C1s. Очень эффективный ингибитор, его синтез был

fI, fh-фактор I и H- которые расщепляют C3b и C4b, были обнаружены в супернатанте клеток ovarian carcinoma, а также на поверхности клеток glioma и rhabdomyosarcoma

Alternative pathway



Индуцируемые механизмы устойчивости к комплементу



(А)- формиромание МАК на поверхности

(В) - связывание цитокинов, гормонов



(I)- увеличение устойчивости к комплементу может вызвать удаление МАК с помощью экзо- и эндоцитоза

(II) - увеличение экспрессии мембранных регуляторов

(III) - увеличение секреции растворимых ингибиторов комплемента

Induced Complement Protection

Reiter Y., 1992, Eur.J.Immun

- Интересно, что одним из наиболее потенциальных подобных агентов является сам МАК.
- Для того чтобы лизировать клетки обладающими ядрами, есть необходимость в большом количестве каналов МАК, тогда как лизис безядерных клеток например эритроцитов, требует всего лишь один функциональный канал.
- Внедрение сублитического кол-ва МАК в клеточную мембрану как нормальных как и опухолевых клеток вызывает разнообразие биологических эффектов таких как:
 - высвобождение реактивных кислородных метаболитов
 - секрецию про-воспалительных медиаторов
 - вход в клеточный цикл
 - устойчивость к апоптозу
 - увеличение устойчивости к комплементу.
- Этот феномен называемый «индуцируемая комплементом защита» = “induced complement protection”, требует полного формирования МАК, синтеза белков и РНК и свободного внеклеточного кальция.

Induced Complement Protection

- Также было показано, что клетки K562 могут быть защищены от лизиса комплементом с помощью обработки с гормоном лейкорегулин, либо с белками формирующими поры такими как: перфорин, мелитин, экзотоксин стрептококка стрептолизин O.
- Сублитический комплемент, в свою очередь, вызывает устойчивость к лизису перфорином в K562 клетках. Переход в стадию повышенной устойчивости требует приток кальция, активацию цитоплазматической РКС и каскада МАРК также как и синтез белков.
- В первую очередь происходит увеличение кол-ва внутриклеточного кальция, происходит это за счёт того, что внеклеточный кальций проникает внутрь клеток, предположительно через каналы МАК.
- Если увеличение кальция ингибируется с помощью устранения внеклеточного кальция - удаление МАК с клеточной поверхности также ингибируется и лизис комплементом усиливается. Из чего можно сделать вывод, что увеличение кальция необходимо для индукции устойчивости.
- Важность РКС и МАРК была также показана с помощью использования ингибиторов их активности. Их использование увеличило чувствительность клеток K562 к комплементу.

Заключение:

- ▣ **Обработка клеток с помощью суб-литического компонента приводит в действие клеточный механизм, который убирает МАК с поверхности клеток с помощью везикуляции или интернализации.**
- ▣ **Клетки, поврежденные компонентом или другими белками формирующими поры, страдают от большого кол-ва повреждений в многочисленных клеточных органеллах.**
- ▣ **Им требуется активация одного и больше механизмов для восстановления. В итоге способность опухолевых клеток приводить в действие эти механизмы и решает выживет ли клетка атаку компонентом или нет.**
- ▣ **Опухолевые клетки снабжены большим кол-вом различных механизмов, которые придают им компонент - устойчивый фенотип.**



Mortalin/GRP75 promotes release of membrane vesicles from immune attacked cells and protection from complement-mediated lysis

D. Pilzer and Z. Fishelson, 2005, Inter Imm

Белки, участвующие в везикуляции

Method:

K562 cells treated with various (sub-lytic) concentrations of anti-K562 antisera and NHS or HI-NHS*



Supernatants collected, cells separated



Supernatants analyzed by SDS-PAGE



Silver or Coomassie staining



Mass Spectrometry

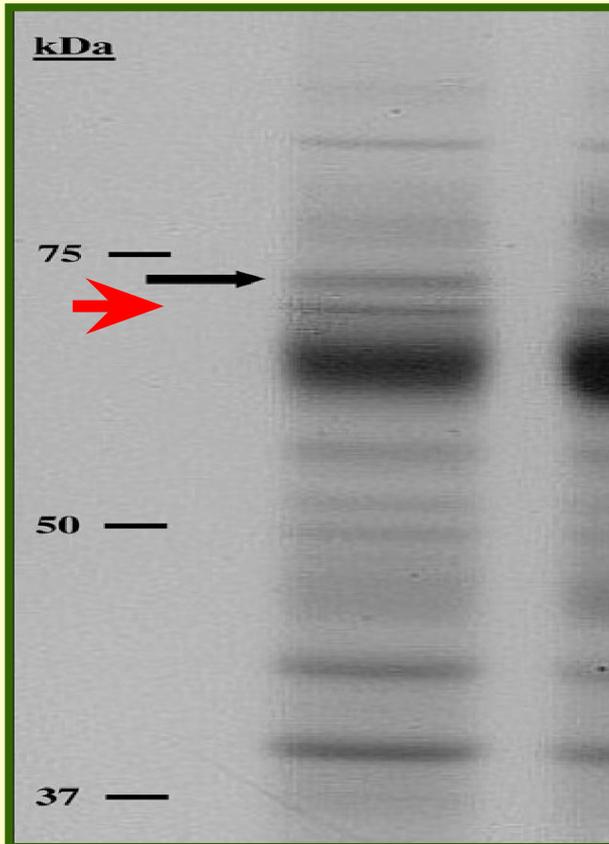
* NHS-normal Human Sera

HI-NHS-Heat Inactivated Normal Human Sera

Результаты:

Mortalin

NHS HI-NHS



- *Морталин* - митохондриальный белок теплового шока, который был обнаружен в митохондриях, цитоплазме, ER и цитоплазматических везикулах.
- Постоянно выражен в клетках, участвует в реакциях на стресс, импорте в митохондрию, его кол-во часто бывает повышено в раковых клетках.
- Находится вместе с C9 внутри внеклеточных везикул, его освобождение зависит от формирования МАК, активации белковой киназы C (PKC) и внеклеточной белковой киназы - ERK.

Mortalin/GRP75 promotes release of membrane vesicles from immune attacked cells and protection from complement-mediated lysis. D. Piltzer and Z. Fishelson, 2005, Inter imm 52

Cytosol

Intracellular trafficking

P53 inactivation

Chaperone

Plasma membrane

IL-1 α receptor
internalization

Mitochondria

Unfolding of proteins
and importing them into
the mitochondria

Mortalin

Tumorigenesis

Stress response

Antigen processing

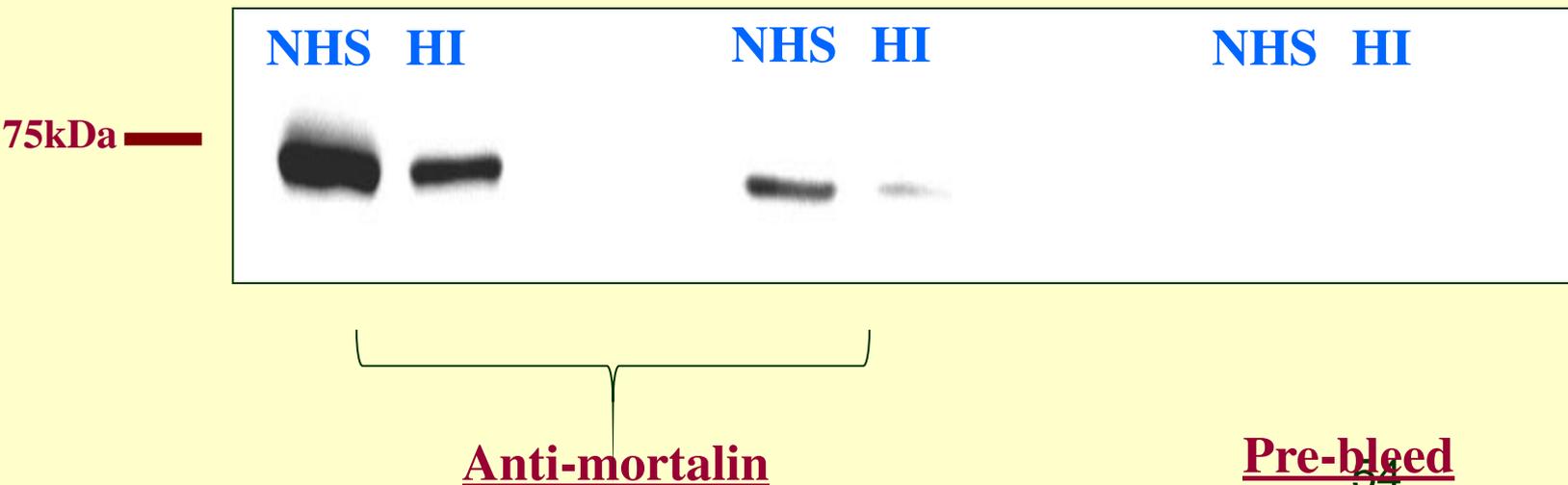
Cell proliferation and differentiation 53

Mortalin is secreted from cells after sub-lytic complement attack

K562 cells treated with sub-lytic complement (anti-K562 Ab+NHS/HI-NHS)

SDS-PAGE of the supernatants

Western Blot with anti-Mortalin rabbit Abs and pre-bleed rabbit sera



Mortalin and C9 are associated with membrane vesicles

K562 treated with sub-lytic complement



Sedimentation at 5000Xg (removal of cell debris)



***Pretreatment of supernatants with triton-x100 (1% or 0.1%)**



Centrifugation at 100, 000Xg (spin down of small vesicles)



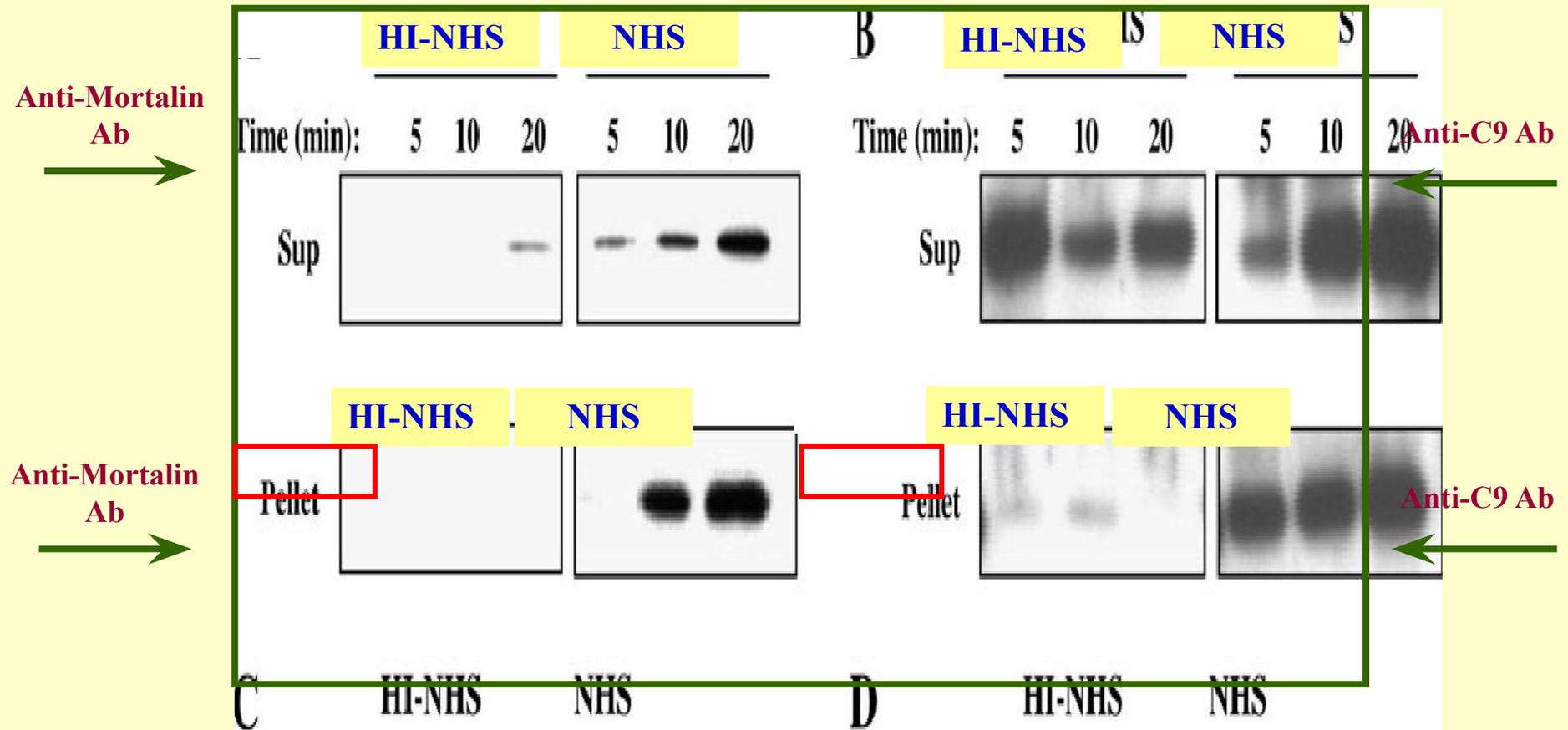
SDS-PAGE of high-speed pellet and supernatants



Western Blot with anti-Mortalin or anti-C9 Abs

*** optional**

Results:



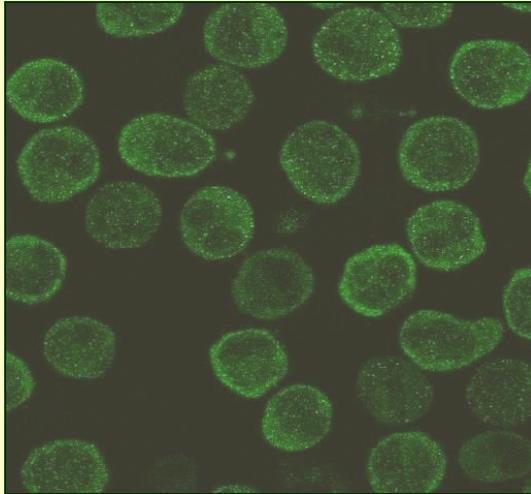
Conclusion: Analysis with anti-mortalin antibodies or with anti-C9 antibodies indicated that both mortalin and C9 released from K562 cells treated with sub-lytic complement could be spun down at 100,000 x g. Pre-treatment of the supernatants with 0.1% Triton-X100, prior to the high-speed centrifugation, resulted in translocation of both mortalin and C9 from the pellet to the supernatant probably due to solubilization of the membrane vesicles bearing mortalin and C9.



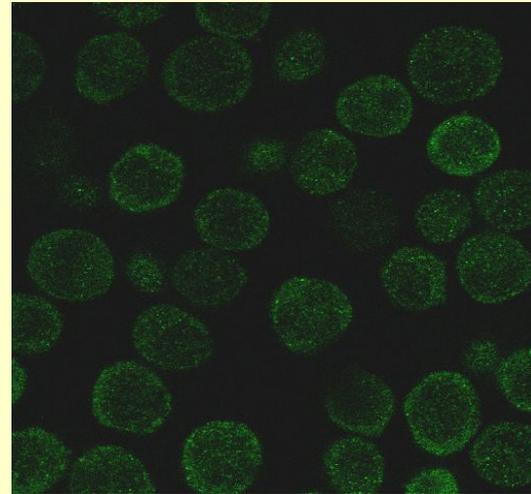
Mortalin is translocated to the cell cortex after sub-lytic complement attack

- Confocal microscopy - 10' after sub-lytic attack

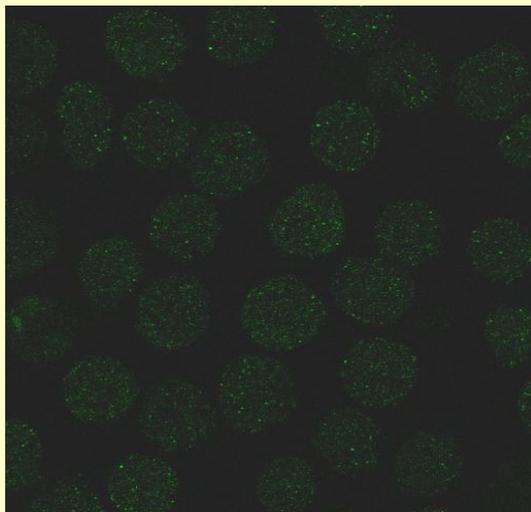
**NHS +
anti-mortalin**



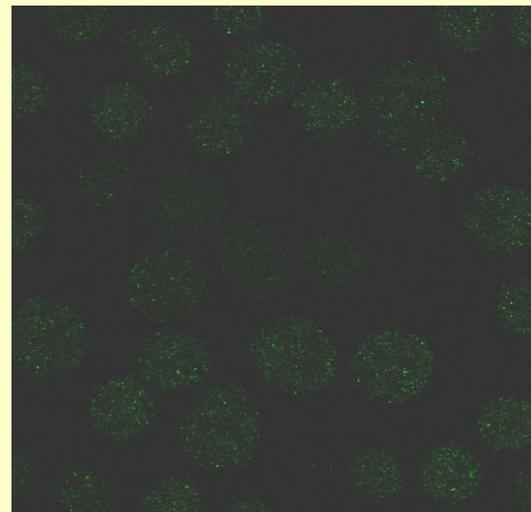
**HI +
anti-mortalin**



NHS + NRS



HI + NRS



Anti-Mortalin Ab lowers cells' protection against complement

◆ Addition of anti-Mortalin Ab to the experiments

K562 cells treated with anti-K562



Treatment with anti-Mortalin Ab



(30' 4°C)

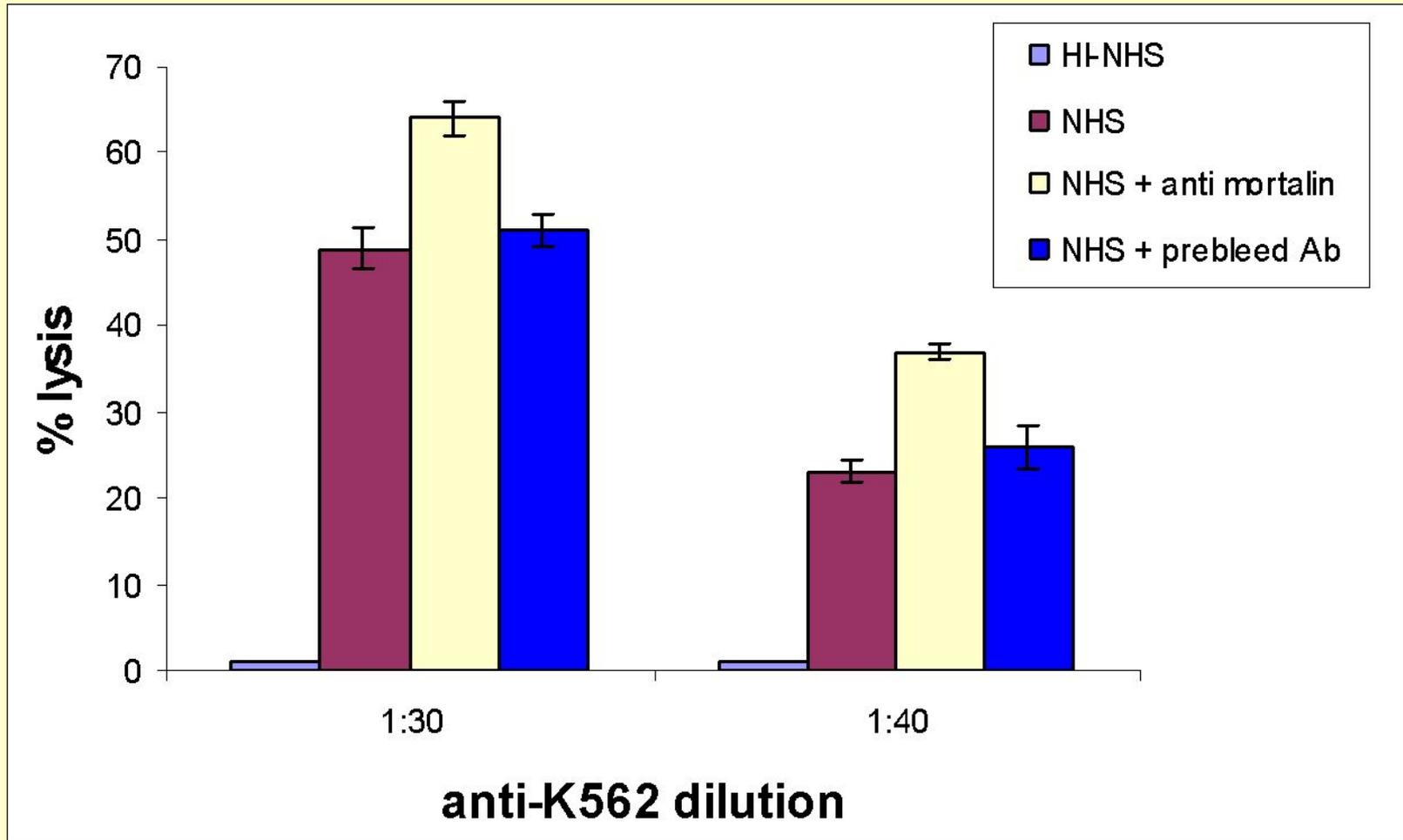
Treatment with NHS or HI-NHS



(60' 37°C)

Count cell lysis (Trypan blue exclusion)

Results:





**Increased sensitivity of early apoptotic cells to
complement-mediated lysis**

**Gitit Attali, Dana Gancz and Zvi Fishelson,
Eur.J.Immun, 2004**

Apoptosis & complement

- **Интеракция белков комплемента с апоптотическими клетками была продемонстрирована, однако эта тема мало изучена.**
- **Апоптотические клетки могут активировать комплемент и связываться с C1q, C3b и MBL.**
- **Существует предположение, что белки комплемента ведут себя как опсонины, помечая апоптотические клетки для ликвидации фагоцитами. Это предположение подтвердилось с помощью использования мышей C1q knock-out которые показали уменьшение способности убирать апоптотические клетки.**
- **Эта работа демонстрирует, что ранние апоптотические клетки, обработанные комплементом, проходят очень эффективный лизис.**
- **Также показано, что повышенная чувствительность апоптотических клеток к лизису комплементом зависит от активации каспаз.**

Ранние апоптотические клетки чувствительны к лизису КОМПЛЕМЕНТОМ

Цель: *проверить интеракцию между ранними апоптотическими клетками и системой комплемента*

Эксперимент: Jurkat T lymphoma cells treated with anti-Fas Ab for 1 h in 37C



Treated with rabbit anti-Jurkat Ab 30' on ice



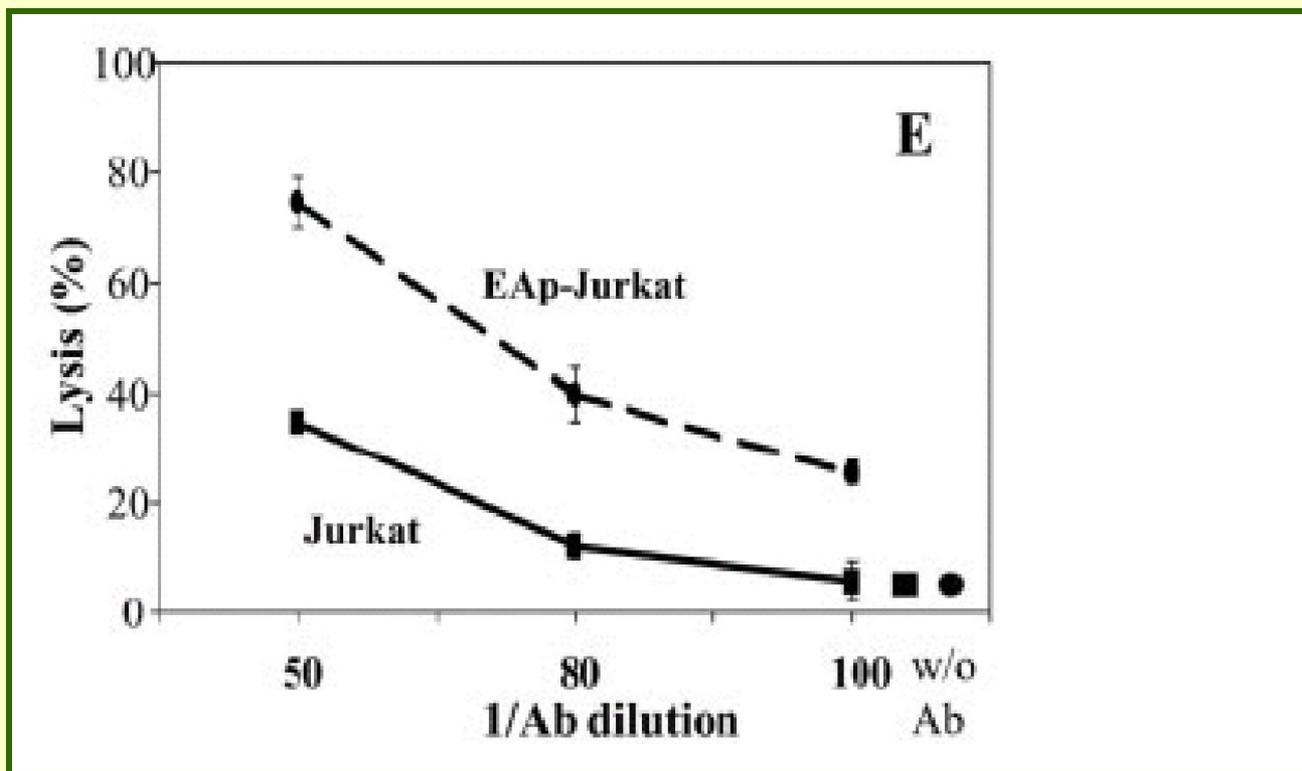
Treated with NHS 60' in 37C



Lysis determined with ^{51}Cr release assay

Ранние апоптотические клетки чувствительны к лизису КОМПЛЕМЕНТОМ

Results:



Вывод: ранние апоптотические клетки более чувствительны к лизису антителом + комплементом, чем клетки не обработанные anti-Fas Ab вызывающим апоптоз.

Повышенная чувствительность к лизису посредством комплемента зависит от каспаз (caspases)

Цель: проверить участвуют ли каспазы к лизису ранних апоптотических клеток

Эксперимент: Jurkat cells treated with caspase inhibitor zVAD 30' 37C



Jurkat cells treated with anti-Fas Ab 1h 37C



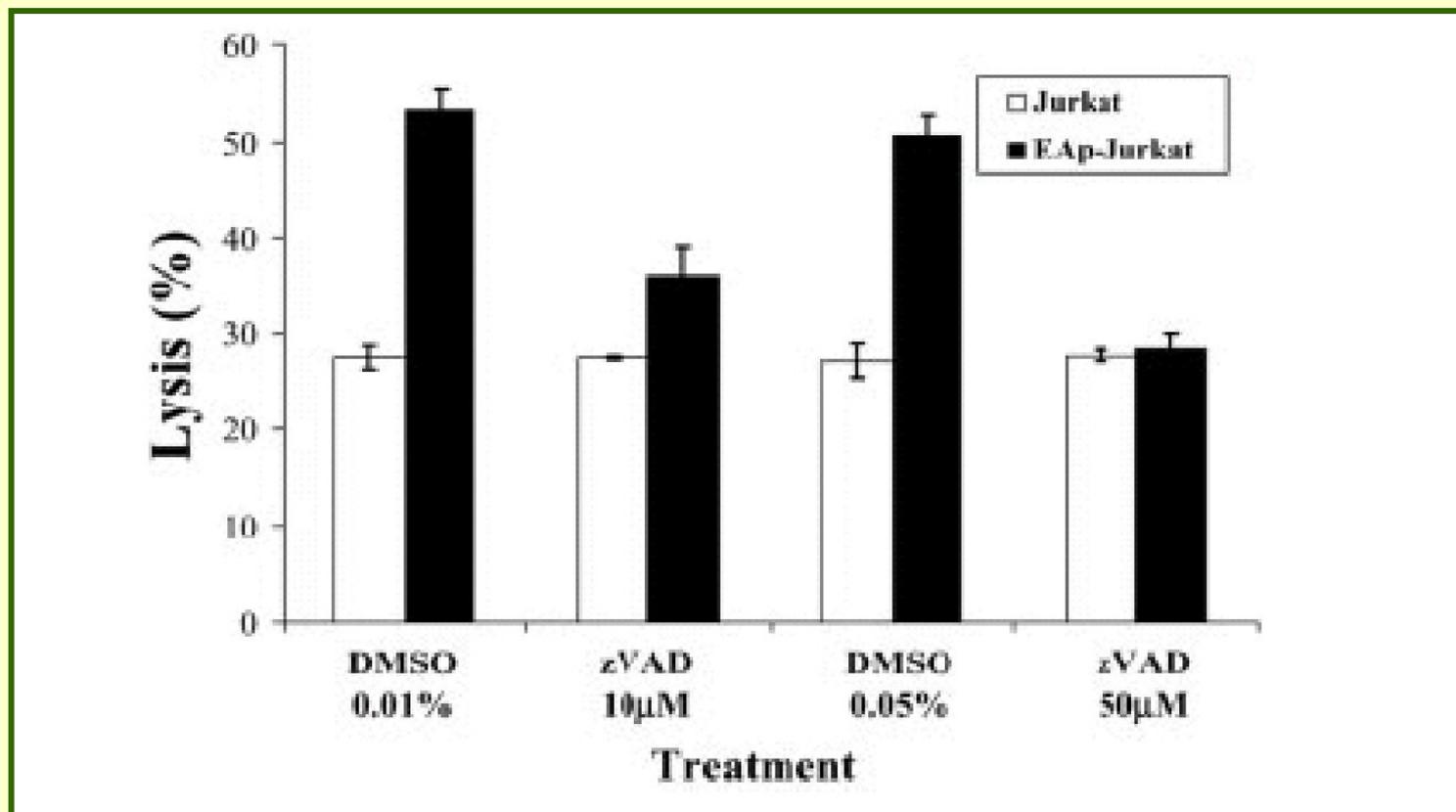
Treated with anti-Jurkat Ab and NHS



Lysis determined with ^{51}Cr release assay

Повышенная чувствительность к лизису посредством комплемента зависит от каспаз (caspases)

Results:



Вывод: 10 µM частично уменьшили гибель клеток, прошедших обработку anti-Fas Ab тогда как 50 µM полностью блокировали увеличенную чувствительность ранних апоптотических клеток к лизису комплементом.

Увеличение экспрессии Bcl-2 связано с устойчивостью к лизису комплементом

□ Анти-апоптотические эффекты Bcl-2 хорошо известны. Этот белок относится к Bcl-2 family и играет очень важную роль в процессе апоптоза, обладает анти-апоптотическими функциями.

Цель: проверить влияние over-expression Bcl-2 в клетках Jurkat на их чувствительность к лизису комплементом.

Эксперимент: Jurkat cells transfected with Bcl-2



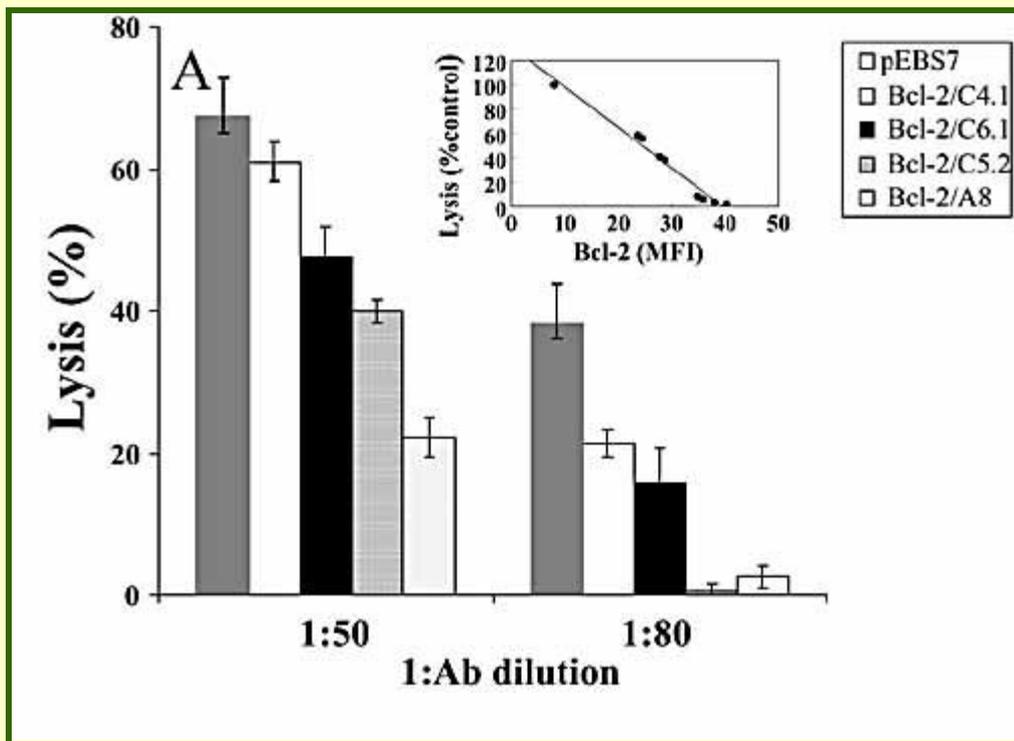
Treated with rabbit anti-Jurkat Ab 30' on ice and NHS 60' in 37C



Percentage of lysis was determined by ^{51}Cr release

Увеличение экспрессии Bcl-2 связано с устойчивостью к лизису компонентом

Results:



Вывод: Наблюдается прямая связь между over-expression Bcl-2 в трансфицированных клетках и устойчивостью этих клеток к лизису. Контрольный вектор pEBS7 показал, что клетки его содержащие наиболее чувствительны к лизису, тогда как остальные трансфектанты показали пониженную чувствительность.

В клетках Jurkat Bcl-2 играет роль защитника от лизиса компонентом.



Спасибо за внимание!