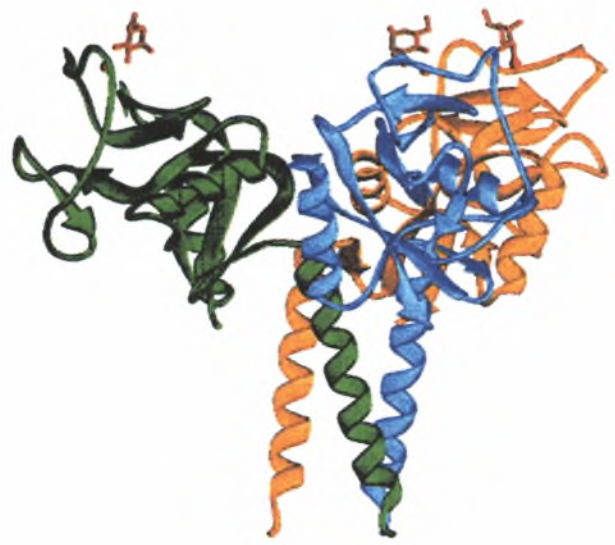


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Αριθμ. 25/07/2002
Αριθ. Πρωτ. 2390

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
“ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ”

14

ΟΡΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ
ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗΣ
ΜΕ ΤΗ ΜΑΝΝΟΖΗ ΛΕΚΤΙΝΗΣ
(MANNAN BINDING LECTIN, MBL)



Δημήτριος Νικούλης
Πτυχιακή εργασία

ΛΑΡΙΣΑ
Ιούλιος 2002



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 1790/1

Ημερ. Εισ.: 3-2-2003

Δωρεά:

Ταξιδιωτικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2002

ΝΙΚ



Διευθυντής: Νικόλαος
Παυλάκης

ΛΑΡΙΣΑ
Ιούλιος 2002

Επιβλέπων:
ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας

ca. 110. 14/2002

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ Ο προσδιορισμός των τιμών αναφοράς της συγκέντρωσης της MBL στον ορό στο πληθυσμιακό δείγμα που προσέρχεται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ Μελετήθηκαν 380 φαινομενικώς υγιή άτομα και των δύο φύλων, ηλικίας μεταξύ 1 μηνός και 91 ετών (μέσος όρος \pm SD = 39,4 \pm 27,2 έτη), που νοσηλεύτηκαν στο Νοσοκομείο κυρίως για προγραμματισμένες χειρουργικές επεμβάσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις μετρήθηκε η συγκέντρωση της CRP, για να αποκλειστεί η τυχόν ύπαρξη αντίδρασης οξείας φάσης. Επίσης, αποκλείστηκαν βρέφη και παιδιά με συμπτώματα ή υποψία ανοσοανεπάρκειας. Το υλικό χωρίστηκε σε εννέα υποκατηγορίες ανά ηλικιακή δεκαετία και τα βρέφη κάτω του ενός έτους εξετάστηκαν ξεχωριστά. Οι μετρήσεις της MBL έγιναν με ανοσονεφελομετρία με τη χρήση του νεφελομέτρου BN II (Dade-Behring). Ο απαιτούμενος αντι-MBL αντιορός, οι οροί βαθμονόμησης και οι οροί ελέγχου προμηθεύτηκαν, επίσης, από την ίδια εταιρία. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τις κατάλληλες μεθόδους χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 8.0.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Η συγκέντρωση της MBL στον ορό βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις εξεταζόμενες ηλικιακές ομάδες (ANOVA $F=1,65$, $p=0,001$). Η μέση τιμή (\pm SD) στο σύνολο των εξετασθέντων ατόμων ήταν 2.6966 \pm 1.3248 mg/dL και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης ήταν 2,5630-2,8303 mg/dL με σχεδόν φυσιολογική κατανομή. Οι χαμηλότερες μέσες τιμές παρατηρήθηκαν σε άτομα της τρίτης και της έκτης δεκαετίας (2,0129 και 1,979 mg/dL, αντιστοίχως). Δεν παρατηρήθηκαν ακραίες τιμές (extremes) ή τιμές εκτός των κατωτέρων ορίων (outliers) αλλά παρατηρήθηκαν 9 ακραίες τιμές ή και τιμές ανώτερες των ανωτέρων ορίων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ Η μελέτη εξασφαλίζει ένα αξιόπιστο διάστημα αναφοράς, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της MBL στον ορό σε ασθενείς του Νοσοκομείου μας. Τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι η ηλικία πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, όταν η συγκέντρωση της MBL θα χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς σκοπούς. Δεδομένου ότι η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης αυτής είναι ασυμπτωματική στους ενήλικες, το αποτέλεσμα της μελέτης έδειξε ότι αυτή η κατάσταση είναι εξαιρετικά σπάνια στη συγκεκριμένη περιοχή της Ελλάδας.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

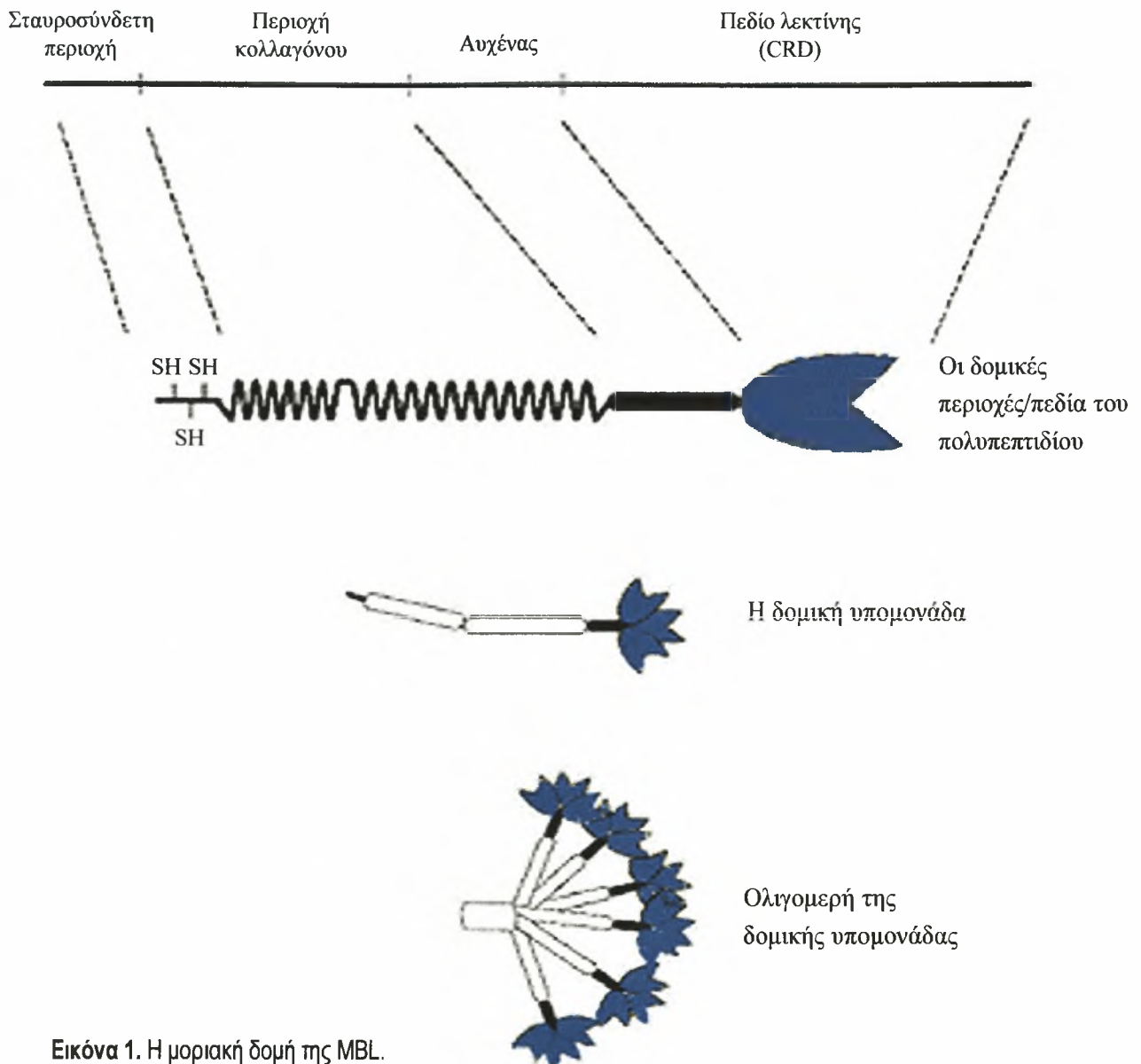
1. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ MBL

Οι κολεκτίνες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, το μόριο των οποίων περιέχει μια περιοχή κολλαγόνου και μια περιοχή λεκτίνης συνδεδεμένης με υδατάνθρακες.¹ Στον άνθρωπο, είναι γνωστά τέσσερα μέλη αυτής της ομάδας των πρωτεϊνών, η MBL, οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες SR-A και SR-D και η πρωτεΐνη CL-L1, που εντοπίζεται στο κυτοσόλιο των ηπατοκυττάρων.² Σε βοείους ιστούς έχουν βρεθεί δύο επιπλέον κολεκτίνες, η συγκολλητίνη και η CL-43.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των κολεκτινών αποτελούνται από υπομονάδες, οι οποίες συνίστανται από τρεις πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Καθεμιά από αυτές τις αλυσίδες περιέχει μια αμινοτελική σταυροσύνδετη περιοχή, η οποία εμπεριέχει δύο ή τρεις κυστεΐνες ακολουθούμενες από μια περιοχή μεταβλητού μήκους αποτελούμενη από κολλαγόνο, μια αυχενική περιοχή και ένα καρβοξυτελικό πεδίο λεκτίνης ή πεδίο αναγνώρισης των υδατανθράκων (CRD) (εικ. 1).

Η περιοχή του κολλαγόνου της ανθρώπινης MBL περιέχει οκτώ περιοχές δυνητικής υδροξυλίωσης και τέσσερις περιοχές δυνητικής Ο-γλυκοσυλίωσης. Με το σχηματισμό μιας α-έλικας σπειροειδούς δομής στην αυχενική περιοχή ξεκινά ο τριμερισμός των πολυπεπτιδίων για το σχηματισμό της δομικής υπομονάδας, η οποία περιέχει μια περιοχή κολλαγόνου και τρία C-τελικά πεδία λεκτίνης. Η υπομονάδα σταθεροποιείται με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων, στη N-τελική σταυροσύνδετη περιοχή.³ Στην κυκλοφορία, η ανθρώπινη MBL βρίσκεται από διμερή έως εξαμερή μορφή με ελικοειδή εμφάνιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.⁴ Μελέτες έχουν δείξει ότι στην ανασυνδυασμένη MBL-A στον ορό ποντικού οι δομικές υπομονάδες συνδέονται ομοιοπολικά με δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις υπομονάδες στις N-τελικές σταυροσύνδετες περιοχές,^{3,5} ενώ οι ενδομοριακές δυνάμεις που ενώνουν τις υπομονάδες της MBL-C στον ορό του ποντικού σε ένα μεγάλο σύμπλοκο δεν είναι μόνο ομοιοπολικές.⁵

Για τη δημιουργία συμπλόκων της MBL με υδατάνθρακες απαιτείται ασβέστιο. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής των περιοχών της λεκτίνης από ανασυνδυασμένη MBL-A αρουραίου συμπλοκοποιημένες με έναν ολιγοσακχαρίτη δείχνει καθαρά την άμεση συμμετοχή του ασβεστίου στη σύνδεση, σχηματίζοντας συντονισμένους δεσμούς στις 3- και 4-OH ομάδες του συνδεδεμένου σακχάρου.⁶ Έτσι, η MBL συνδέεται με πολλούς μονοσακχαρίτες, π.χ. N-ακετυλογλυκοζαμίνη, μανόζη, N-ακετυλομανοζαμίνη, L-φρουκτόζη, και γλυκόζη αλλά δεν συνδέεται με την γαλακτόζη.¹



Εικόνα 1. Η μοριακή δομή της MBL.

Η σταθερά διάστασης της CRD περιοχής με τον υδατάνθρακα είναι πολύ ασθενής (10^{-3} M).⁷ Οι πολλαπλές CRD-περιοχές εμφανίζουν τετραμερή δομή στο μόριο της MBL επιτρέποντας μεγάλη ικανότητα σύνδεσης με τα επαναλαμβανόμενα σύμπλοκα υδατανθράκων ή συμπληρώνουν τις θέσεις σύνδεσης με τον κατάλληλο υδατάνθρακα σε μεγάλη συγκέντρωση. Η ανάλυση της δομής του τριμερούς της MBL με ακτίνες X δείχνει ότι οι CRD-περιοχές έχουν διάστημα 45° και για το λόγο αυτό υπαγορεύουν την επαναλαμβανόμενη φύση του συνδέτη επιτυγχάνοντας μεγάλη σύνδεση.⁸ Η K_D για την ανθρώπινη MBL συνδεόμενη σε μανόζη ή γλυκοζυλιωμένη λευκωματίνη ορού βοός έχει εκτιμηθεί ότι είναι 10^{-9} M.^{9,10} Με αυτόν τον τύπο σύνδεσης επιτυγχάνεται η αναγνώριση διαφόρων μικρομορίων αλλά και μακρομορίων,¹¹ με αποτέλεσμα η MBL να συνδέεται με μεγάλο εύρος μικροοργανισμών (συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών, μυκήτων και παρασίτων) παρουσιάζοντας επαναλαμβανόμενες υδατανθρακικές δομές πάνω στην επιφάνειά της.^{1,12,13}

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η MBL δεν σχηματίζει σύμπλοκα με επιφάνειες κυττάρων του οργανισμού, επειδή στην πλειονότητά τους οι γλυκάνες που υπάρχουν στα ανώτερα θηλαστικά, καταλήγουν σε σιαλικό οξύ ή επειδή στην επιφάνεια των ζωικών κυττάρων δεν υπάρχουν επαναλαμβανόμενες υδατανθρακικές δομών.

2. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ MBL ΣΤΟΝ ΟΡΟ

2.1. Δομικές μεταλλάξεις του γονιδίου της MBL

Η δομή της MBL στην κυκλοφορία είναι πολύ σταθερή,¹⁴ αν και η συγκέντρωσή της από άνθρωπο σε άνθρωπο κυμαίνεται από 50 ng/mL έως 3 µg/mL. Αυτή η μεγάλη διακύμανση οφείλεται στην ύπαρξη τεσσάρων αλλοτύπων που οφείλονται σε μεταβολές του εξονίου 1 του γονιδίου της καθώς και αρκετών πολυμορφισμών στην περιοχή του προαγωγέα. Μερικοί από αυτούς τους γονοτύπους εμπλέκονται στη μείωση των επιπέδων της MBL. Απλές μεταβολές στις βάσεις των κωδικονίων 54 και 57 του εξονίου 1 έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της γλυκίνης από ασπαρτικό οξύ και της γλυκίνης με γλουταμικό οξύ στις θέσεις 34 και 37 της ώριμης πρωτεΐνης, αντιστοίχως.^{15,16} Αυτές οι μεταβολές διασπούν τις Gly-X-Y επαναλήψεις της περιοχής του κολλαγόνου. Μελέτες σε ανασυνδυασμένη MBL-A αρουραίου με μεταβολές ομόλογες με την ανθρώπινη αλληλουχία έδειξαν ότι αυτές οι μεταβολές μεταβάλλουν τους μεταξύ των αλυσίδων δισουλφιδικούς δεσμούς μέσα στην N-τελική σταυροσύνδετη περιοχή.¹⁷ Πειράματα με CHO-κύτταρα που εκφράζουν αυτούς τους δύο τύπους μεταλλάξεων έδειξαν ότι για τα χαμηλά επίπεδα της MBL στην κυκλοφορία εμπλέκονται αυτές οι δύο αλληλουχίες, οι οποίες στον άνθρωπο εμποδίζουν την έκκριση.¹⁸ Άλλες μελέτες, χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους, έδειξαν ότι η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη MBL που περιέχει το μεταλλαγμένο κωδικόνιο 54 και ο «άγριος» τύπος της MBL εκκρίνονται σταθερά και ομοιόμορφα.^{19,20,21} Οι Naito et al²² έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα της MBL στην κυκλοφορία ατόμων που έχουν το μεταλλαγμένο κωδικόνιο 54 μπορεί να οφείλονται σε μεγάλη αναστροφή της συγκέντρωσης της μεταλλαγμένης μορφής στον ορό, σε σύγκριση με τον «άγριο» τύπο της MBL. Μια σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 1 έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της κυστεΐνης από αργινίνη στη θέση 32 της ώριμης πρωτεΐνης και αναφέρεται ως η μετάλλαξη του κωδικονίου 52. Εφόσον αυτή η αντικατάσταση δεν επηρεάσει την ακολουθία Gly-X-Y, η παρουσία της επιπλέον κυστεΐνης διαλύει τα ολιγομερή με την παραγωγή και προσθήκη δισουλφιδικών δεσμών.¹⁷ Το καλούπι της δισουλφιδικής γέφυρας στην N-τελική περιοχή έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζεται από αυτήν την αντικατάσταση. Τα χαμηλά επίπεδα της συγκέντρωσης της MBL στην κυκλοφορία ατόμων ομόζυγων για κάποια από τις τρεις αυτές μεταλλάξεις έχει δειχθεί ότι έχουν μικρότερο μοριακό βάρος από τον «άγριο» τύπο της MBL. Τα ετερόζυγα άτομα παράγουν κυρίως τον με μεγάλο μοριακό βάρος «άγριο» τύπο MBL αλλά και μικρές ποσότητες από τον χαμηλού μοριακού βάρους τύπο.²³ Οι αλληλουχίες που περιέχουν τα μεταλλαγμένα κωδικόνια 52, 54 ή 57 έχουν χαρακτηριστεί ως D, B και C, αντιστοίχως, ενώ η αλληλουχία του «άγριου» τύπου έχει χαρακτηριστεί ως A.²⁴ Η συχνότητα αυτών των μεταλλάξεων στον πληθυσμό διαφέρει μεταξύ

των διαφορετικών εθνικοτήτων.²⁵ Για παράδειγμα, στους Δανούς καυκάσιους οι αλληλουχίες B και C έχουν βρεθεί στο 13 και στο 2% του πληθυσμού, αντιστοίχως, ενώ η οι συχνότητες στους Κενυάτες είναι 3 και 23%, αντιστοίχως. Η συχνότητα της D αλληλουχίας είναι 5% και στους δύο πληθυσμούς.

2.2. Ο πολυμορφισμός του προαγωγέα

Η αναγνώριση των μεταβολών του προαγωγέα έδειξε ότι τα επίπεδα της MBL στο πλάσμα διαμορφώνονται ακόμα και στο επίπεδο της μεταγραφής.²⁶ Η αντικατάσταση των νουκλεοτιδίων στη θέση 550 (από γουανίνη σε κυτοσίνη) και στη θέση 221 (από γουανίνη σε κυτοσίνη) έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του H(G) από L(C) και του Y(G) από X(C), αντιστοίχως. Άλλη μια αντικατάσταση στο 5'-άκρο της αμετάφραστης περιοχής του εξονίου 1 (θέση +4) έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του P(C) από Q(T). Αρκετές άλλες μεταβολές στον προαγωγέα έχουν περιγραφεί αλλά δεν έχει βρεθεί να επιδρούν στα επίπεδα της MBL.²⁷ Οι απλότυποι HY, LY και LX έχει βρεθεί ότι συνδέονται με υψηλές, μεσαίες και χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα, αντιστοίχως.²⁶ Λόγω των ασταθών συνδέσεων μεταξύ ορισμένων τύπων της MBL μόνο επτά απλότυποι έχουν ταυτοποιηθεί (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC και HYPD).²⁷ Επιπροσθέτως, ο HXPA απλότυπος έχει αναφερθεί ότι υπάρχει σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο.²⁸

2.3. Η συγκέντρωση της MBL στον ορό

Η μέση τιμή της MBL στο πλάσμα, στους Δανούς καυκάσιους, έχει αναφερθεί ότι είναι 1,2 μg/mL για άτομα ομόζυγα στην αλληλουχία του «άγριου» τύπου.²⁹ Ωστόσο, τα επίπεδα της MBL στο πλάσμα κυμαίνονται από 0 έως 5 μg/mL. Στην ίδια μελέτη, ο μέσος όρος για άτομα ετερόζυγα για τη μετάλλαξη του κωδικονίου 54 έχει βρεθεί ότι είναι 0,2 μg/mL (εύρος 0–1,2 μg/mL). Παρόμοιες τιμές έχουν βρεθεί και σε νεότερη μελέτη.¹⁶ Η μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται σε άτομα με ίδιους δομικά απλότυπους μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στην ύπαρξη διαφοροποιήσεων στον προαγωγέα. Είναι ενδιαφέρον ότι ο απλότυπος LX έχει κύρια επίδραση στα επίπεδα της MBL. Έτσι, άτομα ομόζυγα ως προς τον απλότυπο LXA έχουν τα επίπεδα του μέσου όρου της κυκλοφορούσας MBL συγκρινόμενα με γονότυπους που έχουν δύο δομικές μεταλλαγές,^{26,30} αν και αυτό δεν δείχθηκε στη μεταγενέστερη μελέτη της πρώτης ομάδας.³¹ Πρέπει να σημειωθεί ότι, ακόμη και αν συνυπολογιστούν όλοι οι απλότυποι, υπάρχει αξιοσημείωτη διακύμανση (μέχρι και 6 φορές πάνω από το μέσο όρο) μεταξύ ατόμων με ίδιους γονότυπους.³⁰ Αυτό συμφωνεί με την αύξηση, μέχρι και 2,5 φορές πάνω από το μέσο όρο, μεταξύ διαφορετικών ποντικών του ίδιου γένους που προέκυψαν από στενή διασταύρωση.⁵

Η περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου της MBL περιέχει αρκετά στοιχεία προς απάντηση στην οξεία φάση.^{32,33} Σε συνάρτηση με αυτό το γεγονός, τα κυκλοφορούντα επίπεδα της MBL έχει βρεθεί ότι αυξάνουν 1,5-3 φορές σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις και σε ασθενείς που υποφέρουν από ελονοσία.³⁴ Επίσης, τα επίπεδα της MBL σε

ποντίκια, τα οποία υποβάλλονταν σε ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις LPS ή καζεΐνης παρουσίασαν αύξηση στο πλάσμα έως και πάνω από δύο φορές.⁵ Σε σύγκριση με την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, η αύξηση της MBL που παρατηρήθηκε και στις δύο μελέτες, την κατατάσσουν στις ασθενείς πρωτεΐνες οξείας φάσης.

3. Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΤΗΣ ΛΕΚΤΙΝΗΣ

3.1. Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την MBL

Η ανάλυση της MBL του ανθρώπινου ορού και της MBL του ορού του ποντικού αποκάλυψε την ύπαρξη της MASP (αναφέρεται ως P100 στα ποντίκια).^{35,36} Αργότερα, ανακαλύφθηκε άλλη μια σερινοπρωτεάση σχετιζόμενη με την MBL που ονομάστηκε MASP-2,³⁷ καθώς και μια μικρότερη πρωτεΐνη με 19 kDa, που ονομάστηκε MBL-σχετιζόμενη πρωτεΐνη 19 kDa (MAP19)³⁸ ή μικρή MBL-σχετιζόμενη πρωτεΐνη (sMAP).³⁹ Η πολυπλοκότητα του πρώτου παράγοντα της οδού της λεκτίνης, που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ήταν άγνωστη μέχρι που κλωνοποιήθηκε μια τρίτη σερινοπρωτεάση (MASP-3).⁴⁰

Οι σερινοπρωτεάσες της MBL είναι πρωτεΐνες με δομικές περιοχές ιδανικές για την ενεργοποίηση των μορίων C1r και C1s της κλασικής οδού της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.^{41,42,37} Μια N-τελική CUB-περιοχή (CUB-I) ακολουθούμενη από έναν επιδερμικό παράγοντα ανάπτυξης (EGF), άλλη μια CUB-περιοχή (CUB-II) και δύο συμπληρωματικές περιοχές πρωτεϊνικού ελέγχου (CCP-περιοχές), γνωστές και ως μικρές ομόλογες αλληλουχίες (SCRs). Οι C-τελικές περιοχές των σερινοπρωτεασών (SP) είναι ομόλογες με τις σερινοπρωτεάσες της οικογένειας των χυμοτροψινογόνων. Το καταλυτικό κέντρο αποτελείται από His, Asp και Ser και εντοπίζεται να αλληλεπιδρά με δύο εξαμερείς β-κυλινδρικές δομές. Ένα μικρό ενδιάμεσο τμήμα χωρίζει την SP περιοχή από τις προηγούμενες πέντε περιοχές. Αυτό το τμήμα περιέχει ένα συντηρημένο πεπτιδικό δεσμό Arg-Ile. Διαχωρίζοντας αυτόν τον πεπτιδικό δεσμό παράγεται μια ενεργός σερινοπρωτεάση αποτελούμενη από μια A-αλυσίδα από τις πρώτες πέντε περιοχές και το ενδιάμεσο τμήμα και μια ενζυματική B-αλυσίδα, οι οποίες συγκρατούνται μαζί με δισουλφιδικό δεσμό. Παρόλη την ομολογία στην αρχιτεκτονική δομή, οι Endo et al⁴³ πρότειναν την ύπαρξη δύο διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών MASPs στα σπονδυλωτά: ο TCN-τύπος και ο AGY-τύπος. Ο πρώτος τύπος περιέχει τις MASPs οι οποίες έχουν την ενεργό περιοχή σερίνης που κωδικοποιείται από το TCN κωδικόνιο (το N δηλώνει A, G, C ή T), μια σερινοπρωτεάση η οποία κωδικοποιείται από ένα διασπασμένο εξόνιο και από ένα βρόγχο ιστιδίνης. Η ανθρώπινη MASP-1 ανήκει στον TCN-τύπο. Η άλλη ομάδα έχει μια ενεργό περιοχή σερίνης που κωδικοποιείται από το AGY κωδικόνιο (το Y δηλώνει τα νουκλεοτίδια T ή C), μια απλή περιοχή εξονίου που κωδικοποιεί την περιοχή σερινοπρωτεάσης και εμποδίζει τη συμμετοχή της κυστεΐνης στη διαμόρφωση του βρόγχου ιστιδίνης. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τις ανθρώπινες MASP-2 και MASP-3 και τα μόρια C1r και C1s της κλασικής οδού του συμπληρώματος. Ο TCN-τύπος περιέχει

χαρακτηριστικά, τα οποία βρέθηκαν σε τρυψίνη και χυμοτρυψίνη, ο AGY-τύπος έχει προταθεί ότι έχει απόκλιση από τον TCN-τύπο.⁴³

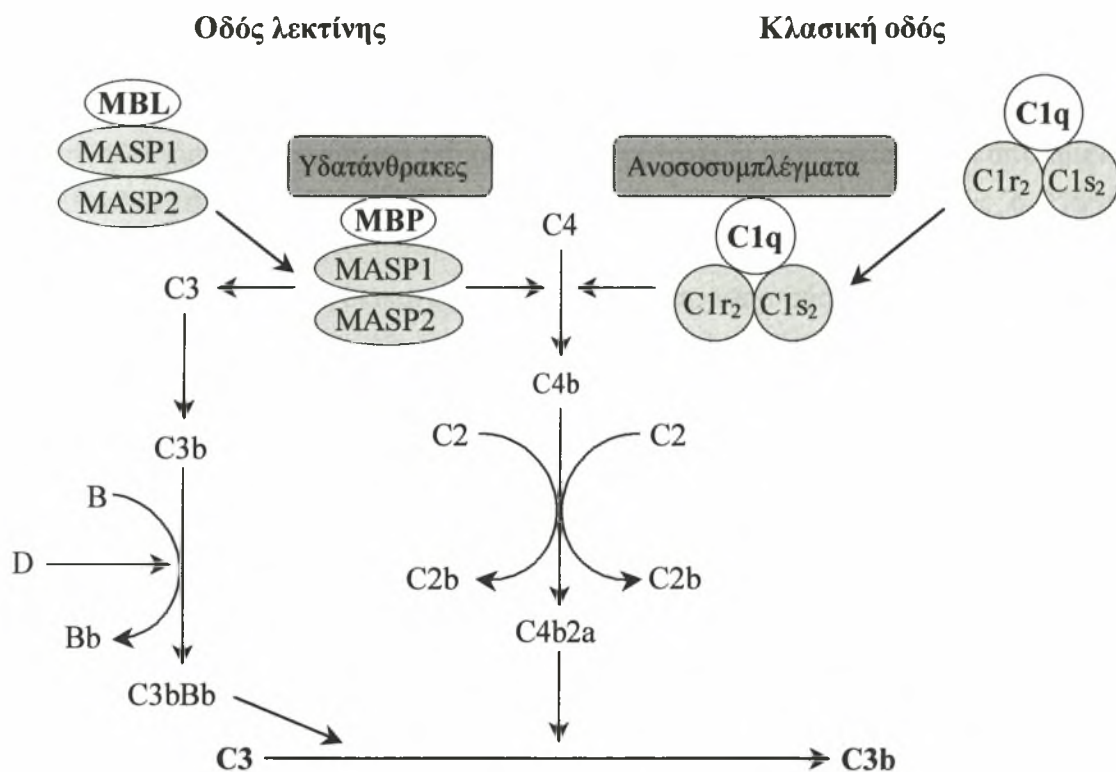
3.2. Πρωτεολυτικές δράσεις των σχετιζόμενων με την MBL πρωτεασών

Έχει δειχθεί ότι η MBL που απομονώνεται από ορό ποντικού (Ra-αντιδρών παράγοντας, RaRF) και από ορό αρουραίου, λαγού και ανθρώπου, είναι ικανή να καταναλώνει τους παράγοντες C4 και C2 του συμπληρώματος.^{44,45} Με βάση τη δομική ομοιότητα μεταξύ C1q και MBL, υποτέθηκε ότι η MBL μπορεί να προσδέεται και να ενεργοποιεί το C1r₂C1s₂ της κλασικής οδού⁴⁴. Χρησιμοποιώντας διαφορετικά *in vitro* συστήματα, δείχτηκε ότι η κεκαθαρμένη MBL ανθρώπου μπορεί να προσδεθεί και να διευκολύνει την ενεργοποίηση του C1r₂C1s₂.^{4,46} Πάντως, περαιτέρω ανάλυση των παρασκευασμάτων MBL από άνθρωπο και ποντικό αποκάλυψε την παρουσία συγκεκριμένης πρωτεάσης της σερίνης, η οποία στην αρχή πιστευόταν ότι επάγει αυτή την ειδικότητα υποστρώματος, την ομοιάζουσα με εκείνη του C1s.^{35,47} Όταν χρησιμοποιήθηκε πλήρης ορός, οι Thiel et al⁴⁸ βρήκαν ότι η MBL κυκλοφορεί σε σύμπλεγμα με συγκεκριμένες MASP-πρωτεάσες, ενώ οι C1r και C1s βρέθηκαν σε συσχέτισμό μόνο με το C1q. Άλλες μελέτες⁴⁹ έδειξαν ότι η MASP (P100) του ποντικού διασπούσε την πρωτεΐνη του ποντικού, όπως το ίδιο έκανε και το ανθρώπινο C4 (με 20 έως 100 φορές πιο ειδική δράση από αυτή της C1s) και σε μικρότερη έκταση το C4 του ποντικού. Οι Matsushita και Fujita⁵⁰ αναφέρουν ότι η ανθρώπινη MASP επίσης μπορεί να διασπάσει το C3. Καθώς μόνο μια MBL σχετιζόμενη πρωτεάση σερίνης αναγνωρίστηκε το 1995, μοιάζει τώρα πιθανό ότι αυτά τα πειράματα εκτελέστηκαν με τη χρήση μίγματος MASPs. Με την αναγνώριση της MASP-2 αποκαλύφθηκε ότι η δράση διάσπασης του C4 ήταν χαρακτηριστικό της MASP-2 και όχι της MASP-1 (πρώην MASP).³⁷ Περαιτέρω μελέτες που έγιναν με ανθρώπινη ανασυνδυασμένη MASP-2 εκφραζόμενη σε κύτταρα θηλαστικών, έδειξαν καθαρά ότι η MASP-2 διασπά τα C4 και C2, ενεργοποιώντας την C4b2b (C3 κονβερτάση).⁵¹ Μια πρόσφατη αναφορά με χρήση χρωματογραφίας διαδοχικής χημικής συγγένειας για την απομόνωση των MASP-1 και -2 από ανθρώπινο ορό, επιβεβαίωσε ότι και οι δύο έχουν την ικανότητα να διασπών το C2.⁵² Επιβεβαιώθηκε, επίσης, ότι η MASP-1 διασπά το C3. Η φυσιολογική δράση της MASP-3 απομένει να καθοριστεί.

3.3. Η οδός της λεκτίνης

Πρώτοι οι Super et al⁵³ έδειξαν ότι η ικανότητα εναπόθεσης των προϊόντων διάσπασης του συμπληρώματος, C3b και C4b, πάνω σε επιφάνειες καλυπτόμενες με μαννόζη, σχετίζεται με τη συγκέντρωση της MBL στην κυκλοφορία. Αυτή η ανεπάρκεια της οψωνινοποίησης, που παρατηρήθηκε στους ορούς με ανεπάρκεια της MBL συνδέθηκε ακολούθως με τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 54.¹⁵ Στη συνέχεια, οι Lipscombe et al²³ έδειξαν ότι άτομα ομόζυγα για τις δομικές μεταλλάξεις, παρήγαγαν μικρές ποσότητες MBL με χαμηλότερο μοριακό βάρος από την MBL «άγριου» τύπου. Τα ετερόζυγα άτομα παρήγαγαν κυρίως υψηλού μοριακού βάρους MBL αλλά

και λίγη χαμηλού μοριακού βάρους MBL. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα της MBL για ενεργοποίηση του συμπληρώματος εξαρτάται σημαντικά από την ολιγομερή μορφή.^{44,4,54} Έτσι, η υψηλού μοριακού βάρους MBL, δηλαδή τα τετραμερή έως εξαμερή των δομικών υπομονάδων, βρέθηκε ότι, σε αντίθεση με τη χαμηλού μοριακού βάρους, είναι ικανή να ενεργοποιεί το συμπλήρωμα (εικ. 2).



Εικόνα 2. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, συγκριτικά, μέσω της κλασικής οδού και μέσω της οδού της λεκτίνης.⁵⁵

4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ MBL ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Εκτός από την οψωνοποίηση με απόθεση προϊόντων διάσπασης του συμπληρώματος στην επιφάνεια του ενεργοποιητή, μέσω της οδού της λεκτίνης, η MBL έχει αναφερθεί ότι δρα και ευθέως ως οψωνίνη.⁵⁶ Η *Salmonella Montevideo*, που εκφράζει μια μαννόζη πλούσια σε Ο-πολυσακχαρίτη, βρέθηκε ότι φαγοκυτταρώνεται από μονοκύτταρα, με τρόπο εξαρτώμενο από την MBL, με τη χρήση τόσο ανθρώπινης (20 mg/mL), όσο και ανασυνδυασμένης MBL (rMBL) εκφραζόμενης σε κύτταρα CHO (1 mg/mL). Άλλη μελέτη έδειξε ότι στέλεχη του ιού της γρίπης Α πλούσια σε μαννόζη, κοντά στη θέση της αιμοσυγκολλητίνης που συνδέεται με το σιαλικό οξύ, συνδέονται με την ανασυνδυασμένη ανθρώπινη MBL, με αποτέλεσμα την επίταση της παραγωγής H₂O₂ από τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα.⁵⁷ Ένα παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε με τη χρήση rMBL «άγριου» τύπου και rMBL με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 54. Χρησιμοποιώντας ανθρώπινη rMBL παραγόμενη στο ίδιο σύστημα έκφρασης, οι Super et al¹⁹ έδειξαν ότι και οι

δύο μορφές iMBL είχαν παρόμοιο δυναμικό επαγωγής για την πρόσληψη της *S. montevideo* από τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι και η «άγριου» τύπου και η μεταλλαγμένη MBL αλληλεπιδρά με έναν υποδοχέα παρόντα στις επιφάνειες των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων.

Αρκετοί υποδοχείς υποψήφιοι για σύνδεση με τη MBL έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία.⁵⁸ Ο υποδοχέας cC1qR ('c' για το κολλαγόνο) βρέθηκε αργότερα να είναι πανομοιότυπος με την ενδοκυτταρική πρωτεΐνη καλρετικουλίνη. Ένας άλλος υποτιθέμενος υποδοχέας, ο gC1qR ('g' για σφαιρική κεφαλή), βρέθηκε στη συνέχεια ότι είναι μιτοχονδριακή πρωτεΐνη. Η κυτταρική εντόπιση αυτών των υποτιθέμενων υποδοχέων θέτει υπό αμφισβήτηση μια φυσιολογικά σχετική με την MBL αλληλεπίδραση. Ένας τρίτος υποδοχέας, ο C1qRp ('p' για φαγοκυτταρικός), έχει αναγνωρισθεί ως δείκτης των εμβρυϊκών προγονικών κύτταρων AA4, μια πρωτεΐνη ενεχόμενη για τη διακυτταρική προσκόλληση. Μια πρόσφατη δημοσίευση πρότεινε ότι ο υποδοχέας 1 του συμπληρώματος (CR1), εκτός από το να δρα ως υποδοχέας για το C3b, δρα επίσης ως υποδοχέας της MBL.⁵⁹ Δείχτηκε ότι η MBL ακόμη και σε αυξημένη συγκέντρωση (20 mg MBL/mL) δεν εκκινούσε τη φαγοκυττάρωση της *S. montevideo* από μη ενεργοποιημένα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMNs). Αν τα PMNs ήταν ενεργοποιημένα με φμπρονεκτίνη, φαγοκυττάρωση της *S. montevideo* ανιχνευόταν, ακόμη και όταν τα βακτήρια οψωνοποιούνταν με φυσιολογική συγκέντρωση (1 mg/mL) MBL. Η φαγοκυττάρωση από απενεργοποιημένα PMNs, επίσης, υποστηρίχθηκε όταν τα βακτήρια οψωνοποιήθηκαν και με MBL (1 mg/mL) και με υπο-οψωνική συγκέντρωση IgG-αντισωμάτων έναντι της *Salmonella*. Αυτά τα αποτελέσματα είναι ανάλογα με τα ευρήματα της αλληλεπίδρασης του CR1 με τις οψωνίνες C4b και C3b και έτσι υποστηρίζουν τη φυσιολογική συσχέτιση αυτής της αλληλεπίδρασης.

Είναι ενδιαφέρον ότι αρκετές κυτταρικές σειρές γλοιώματος μπορούν να προσδένουν την ανθρώπινη MBL με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Σε μια μόνο από αυτές τις κυτταρικές σειρές (1321N1), η πρόσδεση της MBL μπορεί να ανασταλλεί από τη μαννόζη ή το EDTA. Πάντως, φαίνεται ότι καθαρά συμπλέγματα MBL (περιέχοντα MASPs) προσδεμένα σε κύτταρα 1321N1 μπορούν να καταναλώνουν C4 και C3. Είναι ενδιαφέρον, επίσης, ότι βρέθηκε MBL προσδεμένη στην επιφάνεια κακοήθων κυττάρων, γεγονός που διευκολύνει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.⁶⁰ Περαιτέρω μελέτες, πάντως, αναμένονται για να διαφωτίσουν τη δομή και σημασία των θεωρούμενων ως υποδοχέων της MBL.

5. ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ MBL ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Από την πρώτη αναφορά των Super et al⁵³ για τη σχέση μεταξύ υποτροπιαζουσών λοιμώξεων και χαμηλών επιπέδων MBL, ένας μεγάλος αριθμός εργασιών δημοσιεύτηκε πάνω στην συσχέτιση της ανεπάρκειας της MBL και της αυξημένης ευαισθησίας σε ποικίλες λοιμώξεις, όπως επίσης και σε αυτοάνοσα νοσήματα.

Σημειώνεται ότι το 90% των ατόμων με ανεπάρκεια της MBL δεν προσβάλλονται από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Αυτό μάλλον οφείλεται στην λειτουργική αφθονία του συστήματος του συμπληρώματος. Θεωρείται ότι εκδήλωση της ανεπάρκειας της MBL παρατηρείται μόνο όταν συνδυάζεται με χυμική ανοσοανεπάρκεια, επίκτητη ή γενετικά καθορισμένη. Οι Aitoniemi et al⁶¹ βρήκαν ότι παιδιά με ανεπάρκεια της MBL και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις είχαν συνακόλουθη ανεπάρκεια ή παροδική έλλειψη υποτάξεων της IgG.

Ως τώρα, η συσχέτιση μεταξύ ανεπάρκειας της MBL και ευαισθησίας στις λοιμώξεις έχει αξιολογηθεί με την επιλογή ενός αυθαίρετου επιπέδου ανεπάρκειας, που συνήθως αντιστοιχεί στο χαμηλότερο ανιχνεύσιμο επίπεδο της μεθόδου που χρησιμοποιείται. Δεν υπάρχουν κλινικές πληροφορίες που να υποστηρίζουν αυτό τον ορισμό της ανεπάρκειας της MBL και η συγκέντρωση της MBL που οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία μπορεί να διαφέρει σε διαφορετικά νοσήματα. Άλλες μελέτες συγκρίνουν τη συχνότητα ποικίλων MBL αλληλίων μεταξύ της ομάδας μελέτης και επιλεγμένων μαρτύρων. Αυτή η προσέγγιση ερμηνεύεται δύσκολα λόγω της μεγάλης ποικιλίας των επιπέδων MBL που ανευρίσκονται σε διαφορετικά άτομα ταυτόσημων γονοτύπων.³⁰

Το 1995, οι Garred et al⁶² δημοσίευσαν μια μελέτη σε 228 ασθενείς με υποψία ανοσοανεπάρκειας. Αυτοί οι ασθενείς παρουσίασαν κλινικά συμπτώματα, όπως πνευμονικές υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, υποτροπιάζουσες μέσες ωτίτιδες, διάρροια και σηψαιμία. Όταν αναλύθηκε ο γονότυπος της MBL αυτών των ασθενών, βρέθηκε αυξημένη συχνότητα ατόμων ομόζυγων για τις δομικές αλλαγές (8,3% στους ασθενείς έναντι 0,8% σε τυχαία ομάδα μαρτύρων). Δεν υπήρξε αύξηση στη συχνότητα των ετερόζυγων ατόμων μεταξύ των ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων. Οι Summerfield et al⁶³ συνέκριναν τους MBL-γονοτύπους 345 παιδιών που εισήχθησαν στο νοσοκομείο με λοιμώξεις με αυτούς 272 παιδιών που νοσηλεύονταν για άλλες αιτίες και βρήκαν μια σημαντικά υψηλότερη συχνότητα ετεροζυγωτών (133/345 έναντι 60/272) ή ομοζυγωτών (146/345 έναντι 64/272) για μεταλλαγμένα αλληλία της MBL. Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι υπάρχει σημαντική αύξηση της ευαισθησίας σε λοιμώδη νοσήματα σε παιδιά ετερόζυγα και ομόζυγα για μεταλλαγμένα MBL-αλληλία.

Η σημασία των επαγόμενων από την MBL αμυντικών μηχανισμών, σε συνδυασμό με επίκτητη ανοσοανεπάρκεια, διαπιστώθηκε πρόσφατα, όταν βρέθηκε ότι η ανεπάρκεια της MBL σχετίζεται με σοβαρές λοιμώξεις μετά από χημειοθεραπεία.

Ένας αριθμός μελετών υποστηρίζει πιθανή συσχέτιση μεταξύ της HIV-λοίμωξης και της MBL. Αρχικά δείχτηκε ότι η μόλυνση των CD4⁺-λεμφοκυττάρων από τον HIV μπορεί εν μέρει να ανασταλεί (25%) από φυσιολογικές συγκεντρώσεις (1 μg/mL) MBL, ενώ αναστολή 100% παρατηρείται με 50 μg MBL/mL.⁶⁴ Επίσης, έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη gp120 του HIV, που περιέχει ολιγοσακχαρίτες πλούσιους σε μαννόζη, αλληλεπιδρά με την MBL, καθώς και ότι η οδός της λεκτίνης μπορεί να ενεργοποιηθεί από την προσδεδεμένη με την gp110 (HIV-2) και την gp120 MBL. Η συνακόλουθη ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην επιφάνεια του HIV θα

μπορούσε να προάγει την εξουδετέρωση του ιού και, από την άλλη πλευρά, να επάγει μια ανεξάρτητη από το CD4 είσοδο του ιού σε κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς συμπληρώματος.

Όταν οι Nielsen et al¹⁴ προσδιόρισαν τη συγκέντρωση της MBL στον ορό 80 HIV(+) ατόμων, 10% βρέθηκαν να έχουν επίπεδα MBL κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, μια συχνότητα σημαντικά υψηλότερη από αυτή στην ομάδα των φυσιολογικών μαρτύρων (2,4%). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της MBL και του χρονικού διαστήματος από την ανίχνευση των αντι-HIV αντισωμάτων και την ανάπτυξη AIDS, ή από τη διάγνωσή του ως το θάνατο. Σε άλλη μελέτη, καθορίστηκαν οι γονότυποι της MBL σε 96 άντρες προσβεβλημένους από HIV.⁶⁵ Το 8% βρέθηκαν ομόζυγοι για τα μεταλλαγμένα MBL-αλληλία. Αυτό ήταν σημαντικά υψηλότερο από ό,τι στους μάρτυρες. Το κατά πόσο αυτή η αυξημένη συχνότητα μεταλλαγμένων αλληλίων στα HIV(+) άτομα, αντανακλά αυξημένη ευαισθησία στη μόλυνση από τον ιό είναι συζητήσιμο.

Σε αντίθεση με τη μελέτη του Nielsen et al,¹⁴ άλλες δημοσιεύσεις συμπεραίνουν ότι άτομα προσβεβλημένα από HIV, με χαμηλά επίπεδα MBL, έχουν σημαντικά μειωμένο χρόνο επιβίωσης μετά από την εκδήλωση του AIDS⁶⁵ ή ότι ο χρόνος από την ορομετατροπή ως την ανάπτυξη του AIDS και το θάνατο είναι ελαφρά αυξημένος.^{66,67} Τα τελευταία ευρήματα δεν υποστηρίχτηκαν από τους Hundt et al,⁶⁸ οι οποίοι βρήκαν ότι έξι μακροπρόθεσμα μη εξελισσόμενοι είχαν φυσιολογικά επίπεδα κυκλοφορούσας MBL. Κατόπιν τούτων, η επίδραση της MBL στην ευαισθησία προς τη μόλυνση από HIV, στην ανάπτυξη νόσου και στην εξέλιξή της παραμένει υπό συζήτηση.

Αρκετές εργασίες υποδεικνύουν πιθανή σχέση της MBL με το συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Η συχνότητα του B αλληλίου της MBL βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο.^{69,70} Σημαντική συσχέτιση βρέθηκε, επίσης, μεταξύ της συγκέντρωσης της MBL στον ορό και του κινδύνου για συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Μια παρόμοια αύξηση στην ευαισθησία για συστηματικό ερυθματώδη λύκο ανιχνεύτηκε όταν οι Sullivan et al²⁸ ανέλυσαν τον προαγωγέα της MBL και τις δομικές παραλλαγές σε 92 Μαύρους Αμερικανούς ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Η συχνότητα των B και C αλληλίων και ο απλότυπος LX του προαγωγέα, που συνδέονται με χαμηλά επίπεδα MBL στον ορό, βρέθηκε ότι είναι σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από τους Ip et al,⁷¹ οι οποίοι βρήκαν τον απλότυπο LX σε συχνότητα 0,259 σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο έναντι 0,164 των μαρτύρων. Οι Garred et al,⁷² επίσης, σε Δανούς ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο, παρατήρησαν σημαντική αύξηση των ομοζυγωτών για τις παραλλαγές των MBL-αλληλίων, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Δεν παρατηρήθηκε αύξηση, όταν συγκρίθηκε η συχνότητα των ετεροζυγωτών στους δύο πληθυσμούς.

Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το πρόβλημα που δημιουργείται στην οδό της λεκτίνης από την παραγωγή δυσλειτουργικής MBL ή τη μείωση της ποσότητας της κυκλοφορούσας MBL,

προδιαθέτει για συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Όπως δείχτηκε από τους Davies et al,⁷³ ο κίνδυνος για συστηματικό ερυθματώδη λύκο εξαιτίας βλάβης στην οδό της λεκτίνης μπορεί να αυξηθεί επιπλέον παρουσία των C4B ανενεργών αλληλίων. Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία των δυσλειτουργικών καταρρακτών ενεργοποίησης συμπληρώματος στην ανάπτυξη του συστηματικού ερυθματώδους λύκου.

Εξαιτίας της υψηλής συχνότητας των παραλλαγών των MBL-αλληλίων σε διαφορετικούς πληθυσμούς, πιθανολογείται ότι η ανεπάρκεια της MBL θα μπορούσε να προστατεύει έναντι ορισμένων λοιμογόνων παραγόντων. Όταν ο Garred et al⁷⁴ μελέτησαν τη συγκέντρωση MBL σε 56 Κενυάτες Αφρικανούς, βρήκαν 10 που είχαν συγκέντρωση MBL κατώτερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Βασισμένοι σε αυτή την υψηλή συχνότητα ανεπάρκειας της MBL, οι συγγραφείς πρότειναν ότι τα χαμηλά επίπεδα της MBL στην κυκλοφορία μπορεί να προστατεύουν από λοιμώξεις με ενδοκυτταρικούς μικροοργανισμούς που εκφράζουν συνδέτες της MBL στην επιφάνειά τους. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι παράσιτα, όπως οι *Leishmania major* και *L. mexicana*,⁷⁵ το *Trypanosoma cruzi*,⁷⁶ το *Schistosoma mansoni*⁷⁷ και τα *Mycobacterium leprae* και *M. tuberculosis* προσδένουν την MBL.⁷⁵ Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η MBL προσδένει πρωτεοφωσφογλυκάνες από την ενδοκυτταρική *L. Mexicana*.⁷⁸ Η παρουσία MBL στην επιφάνεια των παρασίτων μπορεί να επιτρέψει κυτταρική πρόσληψη είτε απευθείας από κάποιον υποδοχέα της MBL ή μέσω υποδοχέων του συμπληρώματος που εναποτίθενται στο παράσιτο ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης μέσω της οδού της λεκτίνης. Υποστηρικτική του προστατευτικού αποτελέσματος της ανεπάρκειας της MBL είναι η ανεύρεση σημαντικά υψηλότερης συγκέντρωσης MBL σε Αιθίοπες προσβλημένους από *M. leprae* σε σχέση με μη προσβλημένους φυσιολογικούς μάρτυρες.⁷⁵ Έχει δειχθεί, επίσης, ότι άτομα προσβλημένα από φυματίωση είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα MBL από τους μάρτυρες. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση του πιθανού προστατευτικού ρόλου των αλληλίων χαμηλής MBL έναντι λοιμώξεων με ενδοκυτταρικούς μικροοργανισμούς.^{79,80}

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 380 φαινομενικώς υγιή άτομα και των δύο φύλων, ηλικίας μεταξύ 1 μηνός και 91 ετών (μέσος όρος \pm SD = 39,4 \pm 27,2 έτη), που νοσηλεύθηκαν στο Νοσοκομείο για χειρουργικούς κυρίως λόγους (προγραμματισμένες ψυχρές επεμβάσεις, ανεπίπλεκτα τραύματα κ.τ.τ.). Αποκλείστηκαν βρέφη και παιδιά με συμπτώματα ή υποψία ανοσοανεπάρκειας, καθώς και ασθενείς με συμπτωματολογία λοίμωξης ή υποψία κακοήθους νοσήματος. Σε όλες τις περιπτώσεις μετρήθηκε η συγκέντρωση της CRP, για να αποκλειστεί η τυχόν ύπαρξη αντίδρασης οξείας φάσης. Άτομα με συγκέντρωση CRP μεγαλύτερη των 0,5 mg/dL αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Το υλικό χωρίστηκε σε εννέα υποκατηγορίες ανά ηλικιακή δεκαετία και τα βρέφη κάτω του ενός έτους εξετάστηκαν ξεχωριστά (πίν. 1).

ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι μετρήσεις της MBL έγιναν με ανοσονεφελομετρία, με τη μέθοδο του τελικού σημείου και με τη χρήση του νεφελόμετρου BN II της εταιρίας Dade-Behring. Ο απαιτούμενος αντι-MBL αντιορός, οι οροί βαθμονόμησης και οι οροί ελέγχου προμηθεύτηκαν, επίσης, από την ίδια εταιρία.

Όλες οι αιμοληψίες έγιναν το πρωί, μετά από ολονύκτια νηστεία. Οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα ορού, που αποχωρίζονταν με φυγοκέντρηση, εντός 30 min από την αιμοληψία και, μέχρι την ώρα της μέτρησης, φυλάσσονταν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Οι αιμολυμένοι και υπερλιπιδαιμικοί οροί αποκλείστηκαν.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τις κατάλληλες μεθόδους χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 8.0. Η σύγκριση των μέσων τιμών της συγκέντρωσης της MBL μεταξύ των ατόμων των διαφόρων ηλικιών έγινε με ανάλυση μεταβλητότητας (ANOVA) μιας κατευθύνσεως.

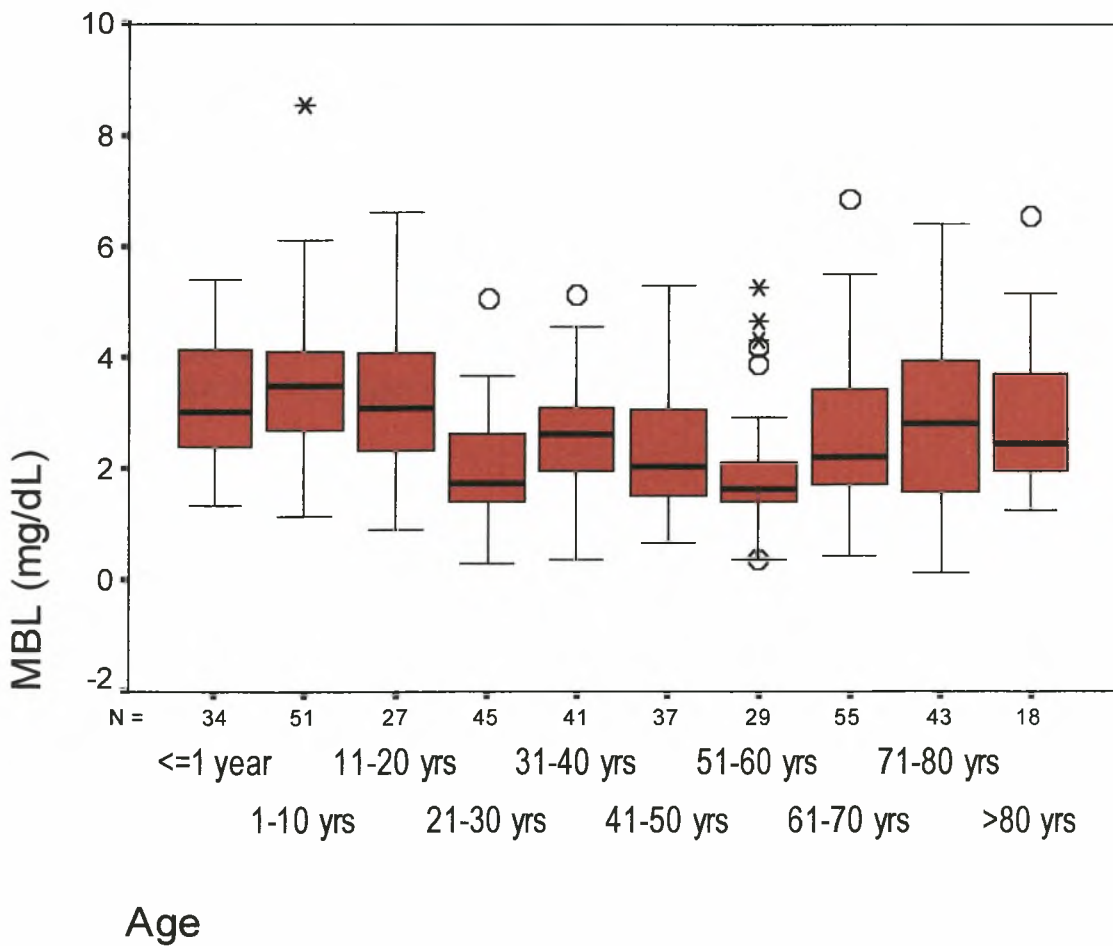
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 1 και στην εικόνα 3.

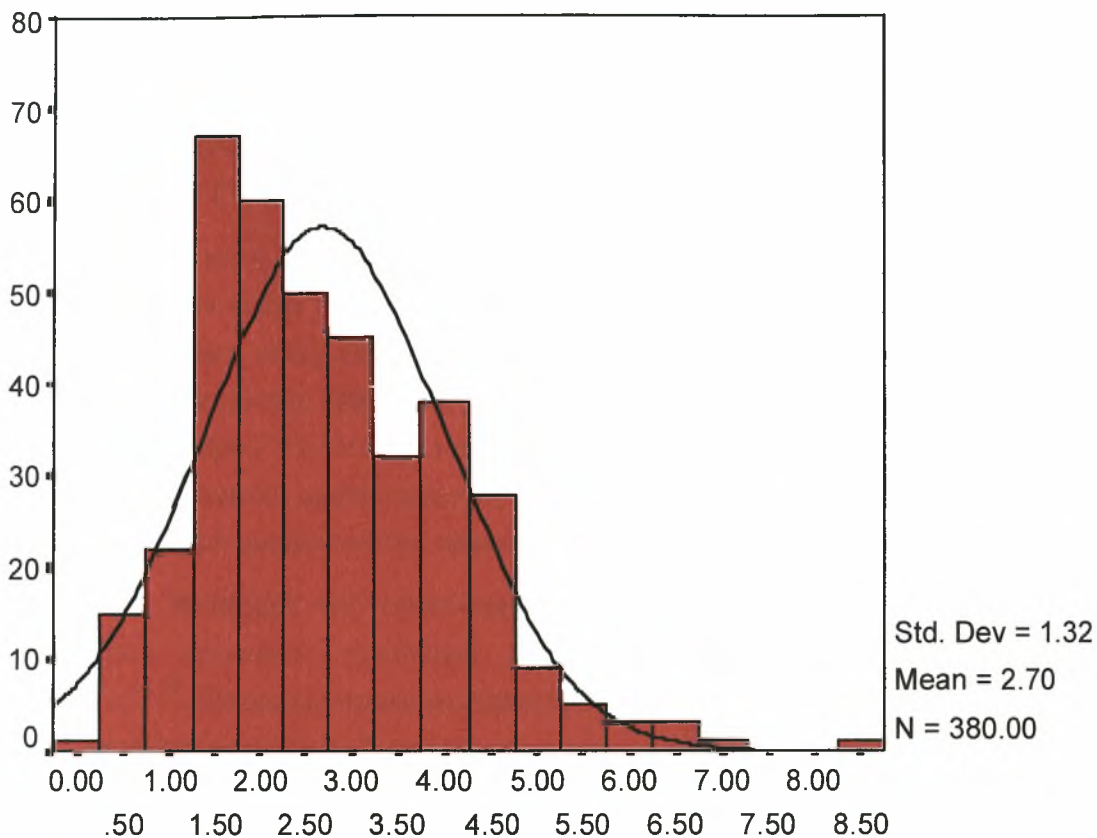
Η μέση τιμή (\pm SD) στο σύνολο των εξετασθέντων ατόμων ήταν 2.6966 \pm 1.3248 mg/dL και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης ήταν 2,5630-2,8303 mg/dL με σχεδόν φυσιολογική κατανομή (εικ. 4). Η συγκέντρωση της MBL στον ορό βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις εξεταζόμενες ηλικιακές ομάδες (ANOVA $F=1,65$, $p=0,001$). Οι χαμηλότερες μέσες τιμές παρατηρήθηκαν σε άτομα της τρίτης και της έκτης δεκαετίας (2,0129 και 1,979 mg/dL, αντιστοίχως). Δεν παρατηρήθηκαν ακραίες τιμές (extremes) ή τιμές εκτός των κατωτέρων ορίων (outliers) αλλά παρατηρήθηκαν 9 ακραίες τιμές ή και τιμές ανώτερες των ανωτέρων ορίων.

Πίνακας 1. Η κατανομή των ατόμων που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης ανά δεκαετία και οι αντίστοιχες τιμές των συγκεντρώσεων της MBL που προσδιορίστηκαν.

Ηλικία (έτη)	Αριθμός	Μέση τιμή	Σταθερή απόκλιση	95% διάστημα εμπιστοσύνης
≤1	34	3,2109	1,1183	2,8207 - 3,6011
1-10	51	3,4347	1,3428	3,0570 - 3,8124
11-20	27	3,2948	1,3907	2,7447 - 3,8449
21-30	45	2,0129	0,9165	1,7375 - 2,2882
31-40	41	2,5544	1,0849	2,2120 - 2,8968
41-50	37	2,3143	1,0994	1,9478 - 2,6809
51-60	29	1,9790	1,2988	1,4849 - 2,4730
61-70	55	2,5824	1,3764	2,2103 - 2,9544
71-80	43	2,7349	1,4165	2,2990 - 3,1708
>80	18	2,9700	1,3586	2,2944 - 3,6456
Σύνολο	380	2,6966	1,3248	2,5630 - 2,8303



Εικόνα 3. Διάγραμμα box and whisker, για την περιγραφική στατιστική των συγκεντρώσεων της MBL στον ορό, στις ηλικιακές ομάδες, στις οποίες διακρίθηκε το υλικό της μελέτης.



MBL (mg/dL)

Εικόνα 4. Η κατανομή των τιμών των συγκεντρώσεων της MBL στον ορό στις ηλικιακές ομάδες που διακρίθηκε το υλικό της μελέτης και στο σύνολο των ατόμων που μελετήθηκαν.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κλινικό ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της MBL στον ορό δημιουργήθηκε από τη στιγμή που η παρουσία διαφόρων αλληλομόρφων της πρωτεΐνης, που χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα, συνοδεύεται από επιρρέπεια στις λοιμώξεις, ιδιαίτερα κατά την παιδική ηλικία⁶¹. Αν και διάφοροι αμυντικοί μηχανισμοί και κυρίως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, μέσω οδών άλλων εκτός εκείνης της λεκτίνης, προλαβαίνουν την εκδήλωση ανάλογης ανοσοανεπάρκειας στους ενήλικες, πρόσφατα δείχτηκε ότι ασθενείς με κακοήθη νοσήματα και ανεπάρκεια της MBL εκδηλώνουν συχνότερα λοιμώξεις μετά από χημειοθεραπεία⁶⁰. Το ενδιαφέρον για αυτούς τους τελευταίους ασθενείς έγινε εντονότερο, επειδή υπάρχει πλέον η δυνατότητα αποκατάστασης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με εξωτερική χορήγηση.

Ο ανοσοεφελομετρικός προσδιορισμός της MBL, για καθημερινή χρήση στην κλινική πράξη, επιτεύχθηκε σχετικά πρόσφατα και, ως εκ τούτου, οι μελέτες προσδιορισμού των ορίων αναφοράς είναι περιορισμένες. Πέραν αυτού, οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα των αλληλομόρφων της MBL μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών. Στην Ελλάδα, μέχρι στιγμής, δεν έχει γίνει σχετική μελέτη.

Το μέγεθος και η αυστηρή επιλογή του υλικού αυτής της μελέτης οδήγησε σε αξιόπιστο προσδιορισμό των ορίων αναφοράς της συγκέντρωσης της MBL στον ορό, για σύγκριση με εκείνα των ασθενών στους οποίους διερευνάται το ενδεχόμενο κάποιας από τις παραπάνω καταστάσεις. Η διεύρυνση, βέβαια, της χρήσης αυτών των ορίων αναφοράς για το σύνολο του ελληνικού πληθυσμού πρέπει να γίνει με σχετική επιφύλαξη, καθόσον ο πληθυσμός της Θεσσαλίας είναι γενετικά αρκετά κλειστός και ενδέχεται να παρουσιάζει διαφορές, τουλάχιστον όσον αφορά τον πολυμορφισμό της συγκεκριμένης πρωτεΐνης^{15,16,17}.

Τα όρια αναφοράς της συγκέντρωσης της MBL στον ορό, που προσδιορίστηκαν, παρουσιάζουν σημαντική επικάλυψη με εκείνα που έχουν δημοσιευθεί για άλλους πληθυσμούς^{16,29}. Εντούτοις, προκαλεί ιδιαίτερη εντύπωση η δυσεξηγήτη διακύμανση των τιμών που παρατηρείται μεταξύ των διαφόρων ηλικιακών ομάδων και η οποία δεν έχει παρατηρηθεί από άλλους ερευνητές.

Εντύπωση, επίσης, προκαλεί το γεγονός ότι, ενώ παρατηρήθηκε ικανός αριθμός ακραίων ανώτερων τιμών, κάτι ανάλογο δεν σημειώθηκε αναφορικά με τις κατώτερες τιμές. Πιθανότατα, το εύρημα αυτό μπορεί να αποδοθεί σε ενδεχόμενη σπανιότητα των αλληλομόρφων, που συνοδεύονται από ανεπάρκεια της MBL, στον πληθυσμό που μελετήθηκε. Αυτό συνηγορεί υπέρ κάποιας πιθανής ιδιομορφίας του θεσσαλικού πληθυσμού ως προς τη γενετική της πρωτεΐνης και υποδεικνύει την ανάγκη λεπτομερέστερης γονοτυπικής ανάλυσης για τον ακριβή προσδιορισμό της.

ABSTRACT

Reference range of the concentration of serum mannan-binding lectin (MBL)

Graduate Thesis

by

Dimitrios Nikoulis

OBJECTIVE To detect the reference values of the concentration of serum MBL in the clinical setting of the University Hospital of Larissa.

MATERIAL-METHOD A group of 380 apparently healthy individuals of both sexes, aged between 1 month and 91 years (mean \pm SD = 39.4 \pm 27,2 years), presented in the Hospital mainly for programmed cold surgery, were studied. Serum CRP concentration was measured in all cases in order to exclude those individuals with acute phase reaction. Infants and children with symptoms and signs suspicious for immunodeficiency were also excluded. The material was divided in nine 10-year age-subgroups while infants lower than 1 year were examined separately. Measurement of MBL was performed by immunonephelometry using the nephelometer BN II (Dade-Behring) as well as the antiserum, calibrators and control samples provided by the manufacturer. Statistical analysis was performed by the appropriate methods using the SPSS 8.0 software.

RESULTS The concentration of serum MBL was found to differ significantly between the examined age-groups (ANOVA F=1.65, p=0.001). The mean value (\pm SD) of the sum was 2.6966 \pm 1.3248 mg/dL and the 95% confidence interval 2.5630-2.8303 mg/dL with nearly normal distribution. The lowest mean values were observed during the 3rd and the 6th decades of life (2.0129 and 1.979 mg/dL respectively). No extremes or outliers were observed lower than the mean-SD value while 9 extremes and/or outliers were detected above the mean+SD value.

CONCLUSION The study provides a reliable reference range to be used for the evaluation of serum MBL concentration in our Hospital. The results signify that age must be taken into account whenever MBL concentration is used for diagnostic reasons. Given the fact that deficiency of this protein is symptomless in the adults, the results of the study show that this situation is extremely rare in this area of Greece.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ HOLMSKOV U, MALHOTRA R, SIM RB, JENSENIUS JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 1994, 15:67-74
- ² HAKANSSON K, REID KB. Collectin structure: a review. *Protein Sci* 2000, 9:1607-1617
- ³ WALLIS R, DRICKAMER K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins. *J Biol Chem* 1999, 274:3580-3589
- ⁴ LU JH, THIEL S, WIEDEMANN H, TIMPL R, REID KB. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J Immunol* 1990, 144: 2287-2294.
- ⁵ LIU H, JENSEN L, HANSEN S, PETERSEN SV, TAKAHASHI K, EZEKOWITZ AB, HANSEN FD, JENSENIUS JC, THIEL S., Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses. *Scand J Immunol* 2001, 53: 489-497.
- ⁶ WEIS WI, DRICKAMER K, HENDRICKSON WA. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 1992, 360: 127-134.
- ⁷ LOBST, ST, WORMALD MR, WEIS WI, DWEK RA, DRICKAMER K. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. *J Biol Chem* 1994, 269: 15505-15511.
- ⁸ SHERIFF S, CHANG CY, EZEKOWITZ RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* 1994, 1:789-794.
- ⁹ KAWASAKI N, KAWASAKI T, YAMASHINA I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J Biochem (Tokyo)* 1983, 94:937-947.
- ¹⁰ LEE RT, ICHIKAWA Y, KAWASAKI T, DRICKAMER K, LEE YC. Multivalent ligand binding by serum mannose-binding protein. *Arch Biochem Biophys* 1992, 299:129-136.
- ¹¹ HOFFMANN JA, KAFATOS FC, JANEWAY CA, EZEKOWITZ RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999, 284:1313-1318.
- ¹² VAN EMMERIK LC, KUIJPER EJ, FIJEN CAP, DANKERT J, THIEL S. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clin Exp Immunol* 1994, 97:411-416.
- ¹³ NETH O, JACK DL, DODDS AW, HOLZEL H, KLEIN NJ, TURNER MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 2000, 68:688-693.
- ¹⁴ NIELSEN SL, ANDERSEN PL, KOCH C, JENSENIUS JC, THIEL S. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin Exp Immunol* 1995, 100:219-222.
- ¹⁵ SUMIYA M, SUPER M, TABONA P, LEVINSKY RJ, ARAI T, TURNER MW, SUMMERFIELD JA. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991, 337:1569-1570.
- ¹⁶ LIPSCOMBE RJ, SUMIYA M, HILL AV, LAU YL, LEVINSKY RJ, SUMMERFIELD JA, TURNER MW. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992, 1:709-715.
- ¹⁷ WALLIS R, CHENG JY. Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. *J Immunol* 1999, 163:4953-4959.
- ¹⁸ HEISE CT, NICHOLLS JR, LEAMY CE, WALLIS R. Impaired secretion of rat mannose-binding protein resulting from mutations in the collagen-like domain. *J Immunol* 2000, 165:1403-1409.
- ¹⁹ SUPER M, GILLIES SD, FOLEY S, SASTRY K, SCHWEINLE JE, SILVERMAN VJ, EZEKOWITZ RA. Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. *Nat Genet* 1992, 2:50-55.

-
- ²⁰ KURATA H, CHENG HM, KOZUTSUMI Y, YOKOTA Y, KAWASAKI T. Role of the collagen-like domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of complement and the secretion of this lectin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 191:1204-1210.
- ²¹ MA Y, SHIDA H, KAWASAKI T. Functional expression of human mannan-binding proteins (MBPs) in human hepatoma cell lines infected by recombinant vaccinia virus: post-translational modification, molecular assembly, and differentiation of serum and liver MBP. *J Biochem (Tokyo)* 1997, 122: 810 , 818.
- ²² NAITO H, MA Y, UEMURA K, ARANO Y, KAWASAKI T. Metabolic properties of normal and mutant mannan-binding proteins in mouse plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999a, 256:231-234.
- ²³ LIPSCOMBE RJ, SUMIYA M, SUMMERFIELD JA, TURNER MW. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology* 1995, 85:660-667.
- ²⁴ MADSEN HO, GARRED P, KURTZHALS JA, LAMM LU, RYDER LP, THIEL S, SVEJGAARD A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994, 40:37-44.
- ²⁵ TURNER MW, HAMVAS RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2000, 2:305-322.
- ²⁶ MADSEN HO, GARRED P, THIEL S, KURTZHALS JA, LAMM LU, RYDER LP, SVEJGAARD A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995, 155:3013-3020
- ²⁷ MADSEN HO, SATZ ML, HOGH B, SVEJGAARD A, GARRED P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol* 1998, 161:3169-3175.
- ²⁸ SULLIVAN KE, WOOLEN C, GOLDMAN D, PETRI M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996, 39:2046-2051.
- ²⁹ GARRED P, THIEL S, MADSEN HO, RYDER LP, JENSENIUS JC, SVEJGAARD A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. *Clin Exp Immunol* 1992a, 90:517-521.
- ³⁰ STEFFENSEN R, THIEL S, VANNING K, JERSILD C, JENSENIUS JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J Immunol Meth* 2000, 241:33-42.
- ³¹ GARRED P, PRESSLER T, MADSEN HO, FREDERIKSEN B, SVEJGAARD A, HOIBY N, SCHWARTZ M, KOCH C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999a, 104:431-437.
- ³² EZEKOWITZ RA, DAY LE, HERMAN GA. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med* 1988, 167:1034-1046.
- ³³ TAYLOR ME, BRICKELL PM, CRAIG RK, SUMMERFIELD JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J* 1989, 262:763-771.
- ³⁴ THIEL S, HOLMSKOV U, HVIID L, LAURSEN SB, JENSENIUS JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 1992, 90:31-35.
- ³⁵ MATSUSHITA M, FUJITA T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 1992, 176:1497-1502.
- ³⁶ TAKADA F, TAKAYAMA Y, HATSUSE H, KAWAKAMI M. A new member of the C1s family of complement proteins found in a bactericidal factor, Ra-reactive factor, in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 196:1003-1009.
- ³⁷ THIEL S, VORUP JENSEN T, STOVER CM, SCHWAEBLE W, LAURSEN SB, POULSEN K, WILLIS AC, EGGLETON P, HANSEN S, HOLMSKOV U, REID KB, JENSENIUS JC. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997, 386:506-510.

- ³⁸ STOVER CM, THIEL S, THELEN M, LYNCH NJ, VORUP JENSEN T, JENSENIUS JC, SCHWAEBLE WJ. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol* 1999a, 162:3481-3490.
- ³⁹ TAKAHASHI M, ENDO Y, FUJITA T, MATSUSHITA M. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol* 1999, 11:859-863.
- ⁴⁰ DAHL MR, THIEL S, MATSUSHITA M, FUJITA T, WILLIS AC, CHRISTENSEN T, VORUP-JENSEN T, JENSENIUS JC. A new mannan-binding lectin associated serine protease, MASP-3, and its association with distinct complexes of the MBL complement activation pathway. *Immunity* 2001, 15:1-10.
- ⁴¹ TAKAYAMA Y, TAKADA F, TAKAHASHI A, KAWAKAMI M. A 100-kDa protein in the C4-activating component of Ra-reactive factor is a new serine protease having module organization similar to Clr and Cls. *J Immunol* 1994, 152:2308-2316.
- ⁴² SATO T, ENDO Y, MATSUSHITA M, FUJITA T. Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int Immunol* 1994, 6:665-669.
- ⁴³ ENDO Y, TAKAHASHI M, NAKAO M, SAIGA H, SEKINE H, MATSUSHITA M, NONAKA M, FUJITA T. Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. *J Immunol* 1998, 161:4924-4930.
- ⁴⁴ IKEDA K, SANNOH T, KAWASAKI N, KAWASAKI T, YAMASHINA I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem* 1987, 262:7451-7454.
- ⁴⁵ JI YH, MATSUSHITA M, OKADA H, FUJITA T, KAWAKAMI M. The C4 and C2 but not C1 components of complement are responsible for the complement activation triggered by the Ra-re-active factor. *J Immunol* 1988, 141:4271-4275.
- ⁴⁶ OHTA M, OKADA M, YAMASHINA I, KAWASAKI T. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J Biol Chem* 1990, 265:1980-1984.
- ⁴⁷ JI YH, FUJITA T, HATSUSE H, TAKAHASHI A, MATSUSHITA M, KAWAKAMI M. Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor. *J Immunol* 1993, 150:571-578.
- ⁴⁸ THIEL S, PETERSEN SV, VORUP-JENSEN T, MATSUSHITA M, FUJITA T, STOVER CM ET AL. Interaction of Clq and mannan-binding lectin (MBL) with Clr, Cls, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAp19. *J Immunol* 2000:165:878-887
- ⁴⁹ OGATA RT, LOW PJ, KAWAKAMI M. Substrate specificities of the protease of mouse serum Ra-reactive factor. *J Immunol* 1995, 154:2351-2357
- ⁵⁰ MATSUSHITA M, FUJITA T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. *Immunobiology* 1995, 194:443-448.
- ⁵¹ VORUP-JENSEN T, PETERSEN SV, HANSEN AG, POULSEN K, SCHWAEBLE W, SIM RB ET AL. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immunol* 2000, 165:2093-2100
- ⁵² MATSUSHITA M, THIEL S, JENSENIUS JC, TERA I, FUJITA T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 2000, 165:2637-2642.
- ⁵³ SUPER M, THIEL S, LU J, LEVINSKY RJ, TURNER MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* 1989, 2 :1236-1239.
- ⁵⁴ YOKOTA Y, ARAI T, KAWASAKI T. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. *J Biochem (Tokyo)* 1995, 117:414-419.
- ⁵⁵ ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ. *Ιατρική Ανοσολογία*. Εκδόσεις Παπαζήσης, Αθήνα 2000
- ⁵⁶ KUHLMAN M, JOINER K, EZEKOWITZ RA. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med* 1989, 169:1733-1745.

- ⁵⁷ HARTSHORN KL, SASTRY K, WHITE MR, ANDERS EM, SUPER M, EZEKOWITZ RA, TAUBER AI. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J Clin Invest* 1993, 91:1414-1420.
- ⁵⁸ EGGLETON P, REID KB, TENNER AJ. C1q - how many functions? How many receptors? *Trends Cell Biol* 1998, 8:428-431.
- ⁵⁹ GHIRAN I, BARBASHOV SF, KLINKSTEIN LB, TAS SW, JENSENIUS JC, NICHOLSON-WELLER A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* 2000, 192:1797-1808.
- ⁶⁰ FUJITA T, TAIRA S, KODAMA N, MATSUSHITA M, FUJITA T. Mannose-binding protein recognizes glioma cells: in vitro analysis of complement activation on glioma cells via the lectin pathway. *Jpn J Cancer Res* 1995, 86:187-192.
- ⁶¹ AITTONIEMI J, BAER M, SOPPI E, VESIKARI T, MIETTINEN A. Mannan binding lectin deficiency and concomitant immunodefects. *Arch Dis Child* 1998, 78:245-248.
- ⁶² GARRED P, MADSEN HO, HOFMANN B, SVEJGAARD A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* 1995, 346:941-943.
- ⁶³ SUMMERFIELD JA, SUMIYA M, LEVIN M, TURNER MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997, 314:1229-1232.
- ⁶⁴ EZEKOWITZ RA, KUHLMAN M, GROOPMAN JE, BYRN RA. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med* 1989, 169:185-196.
- ⁶⁵ GARRED P, MADSEN HO, BALSLEV U, HOFMANN B, PEDERSEN C, GERSTOFT J, SVEJGAARD A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997, 349:236-240.
- ⁶⁶ MAAS J, RODA HUSMAN AM, BROUWER M, KROL A, COUTINHO R, KEET I, VAN LEEUWEN R, SCHUITEMAKER H. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study. *AIDS* 1998, 12:2275-2280.
- ⁶⁷ AMOROSO A, BERRINO M, BONIOTTO M, CROVELLA S, PALOMBA E, SCARLATTI G, SERRA C, TOVO PA, VATTA S. Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. *AIDS* 1999, 13:863-864.
- ⁶⁸ HUNDT M, HEIKEN H, SCHMIDT RE. Low mannose-binding lectin serum concentrations in HTV long-term nonprogressors? *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, 16:1927.
- ⁶⁹ DAVIES EJ, SNOWDEN N, HILLARBY MC, CARTH Y D, GRENNAN DM, THOMSON W, OILIER WE. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995, 38:110-114.
- ⁷⁰ LAU YL, LAU CS, CHAN SY, KARLBERG J, TURNER MW. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996, 39:706-708.
- ⁷¹ IP WK, CHAN SY, LAU CS, LAU YL. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum* 1998, 41:1663-1668.
- ⁷² GARRED P, MADSEN HO, HALBERG P, PETERSEN J, KRONBORG G, SVEJGAARD A, ANDERSEN V, JACOBSEN S. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999b, 42:2145-2152.
- ⁷³ DAVIES EJ, TEH LS, ORDI-ROS J, SNOWDEN N, HILLARBY MC, HAJEER A, DONN R, PEREZ-PEMEN P, VILARDELL-TARRES M, OILIER WE. A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. *J Rheumatol* 1997, 24:485-488.
- ⁷⁴ GARRED P, MADSEN HO, KURTZHALS JA, LAMM LU, THIEL S, HEY AS, SVEJGAARD A. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. *Eur. J Immuno-genet* 1992b, 19:403-412.
- ⁷⁵ GARRED P, HARBOE M, OETTINGER T, KOCH C, SVEJGAARD A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet* 1994, 21:125-131.

-
- ⁷⁶ KAHN SJ, WLEKLINSKI M, EZEKOWITZ RA, CODER D, ARUFFO A, FARR A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infect Immun* 1996, 64:2649-2656.
- ⁷⁷ KLABUNDE J, BERGER J, JENSENIUS JC, KLINKERT MQ, ZELCK UE, KREMSNER PG, KUN JF. *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Exp Parasitol* 2000, 95:231-239.
- ⁷⁸ GREEN PJ, FEIZI T, STALL MS, THIEL S, PRESCOTT A, MCCONVILLE MJ. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannose-binding protein. *Mol Biochem Parasitol* 1994, 66:319-328.
- ⁷⁹ BELLAMY R, RUWENDE C, MCADAM KP, THURSZ M, SUMIYA M, SUMMERFIELD J, GILBERT SC, CORRAH T, KWIATKOWSKI D, WHITTLE HC, HILL AV. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *QJM* 1998, 91:13-18.
- ⁸⁰ HOAL-VAN HELDEN EG, EPSTEIN J, VICTOR TC, HON D, LEWIS LA, BEYERS N, ZURAKOWSKI D, EZEKOWITZ AB, VAN HELDEN PD. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Pediatr Res* 1999, 45:459-464.



ΛΗΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

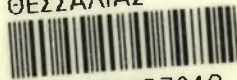
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ**

~~Τηλ.: 74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ

2410 - 565077
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057243