

## A szerinfoszforiláció szabályozó szerepe a B sejtek immunoreceptor tirozin alapú aktiváló motívumok által közvetített jelátvitelében.

A II típusú IgG kötő Fc receptorok (Fc $\gamma$ R1Ib) régóta ismert B sejt szabályozó funkciója az utóbbi évek során újra a figyelem középpontjába került. Az antigént és IgG-t tartalmazó immunkomplexek a B sejtekhez kötődve B sejt receptor (BCR)-Fc $\gamma$ R1Ib aggregátumokat hoznak létre, ahol a BCR keresztkötés által aktivált *lyn* protein tirozin kináz foszforilálja az Fc $\gamma$ R1Ib immunreceptor tirozin alapú inhibitoros motívumát (ITIM). A foszforilált ITIM (pITIM) ezt követően SH2 doménekekkel rendelkező jelátviteli fehérjéket köt meg, ilyen a foszfátidil inozitol 5-foszfátáz (SHIP), és a fehérje tirozin foszfátáz SHP2. Ezek aktiválódása a sejtmembrán foszfátidil inozitol 3,4,5 triszfoszfát (PIP3) szintjének csökkenését eredményezi, ami a továbbiakban a sejten belüli szabad [Ca<sup>2+</sup>], valamint az Akt és az extracelluláris szignálok által szabályozott kináz (Erk) aktiválódásának csökkenéséhez, s végül az ellenanyag termelés gátlásához vezet. A B sejteknek ez az autokrin szabályozási lehetősége fontos szerepet játszhat auto-antitestek termelésének gátlásában, s így az immunválasz szabályozásában. Autoimmun betegek egy csoportjánál (szisztémás lupus erithematosusban) összefüggést találtak az Fc $\gamma$ R1Ib polimorfizmusa és a betegség kialakulása között. Kimutatták azt is, hogy Fc $\gamma$ R1Ib-génkiütött egerekben (a megfelelő genetikai háttér mellett: DBA1 egértörzsben) anti-DNS ellenanyagok és lupusz-szerű tünetek jelennek meg, és vesekárosodást okozó, immunkomplexek által előidézett gyulladás alakul ki. A szisztémás autoimmun betegségek hátterében álló patomechanizmus felderítésére irányuló munkában az Fc $\gamma$ R1Ib által szabályozott folyamatok kutatása előtérbe került.

Korábban kimutattuk, hogy emberi limfocitákban a BCR által kiváltott sejtaktiválás eredményeképpen az Fc $\gamma$ R1Ib maga is szerin foszforiláció áldozatává válik, amelynek funkcionális jelentősége nem ismert. Leírták azt is, hogy a szerin foszforilációja egy tirozin foszforilációs hely közelében gátolhatja az utóbbi által közvetített jelátviteli folyamatokat. A humán Fc $\gamma$ R1Ib sejten belüli doménje - az egértől eltérően - a membrán közelében tartalmaz egy szerin maradékot is, olyan motívum közelében, amelyhez hasonlóak az irodalmi adatok alapján dokkoló helyül szolgálhatnak a mitogén aktivált kinázok (MAPK) számára. E motívumok közös sajátossága, hogy a több pozitív töltésű aminosavból álló szekvenciát hidrofób aminosavak vesznek körül.

**Jelen vizsgálataink célja az Fc $\gamma$ R1Ib intracelluláris doménje szerint tartalmazó, sejtmembrán-közeli szekvencia részlete és a MAPK kölcsönhatásának, valamint az Fc $\gamma$ R1Ib szerinen történő foszforilációja funkcionális következményeinek felderítése volt, továbbá szerettük volna jobb betekintést nyerni az Fc $\gamma$ R1Ib által szabályozott folyamatokba.**

Szerin tartalmú motívum ebben a pozícióban csak a humán Fc $\gamma$ R1Ib-ben található meg, az egér B sejtek Fc receptoráiban nincs jelen. Feltételeztük, hogy a potenciális foszforilációs helyként számításba jövő motívum részt vesz az emberi B sejtek Fc $\gamma$ R1Ib -től függő, immunkomplexek által közvetített szabályozásában.

YCRKKRIS<sup>253</sup>ALPGYPECREMGETLPEK PANPTNPDEADKVG AENTIT  
Y<sup>292</sup>SLLMHPDA

**1. ábra.** Az emberi Fc $\gamma$ R1Ib intracelluláris doménjének aminosav szekvenciája. A 253szerin körüli motívumot reprezentáló peptid (RK-PG): kék, az ITIM-nek megfelelő szekvencia: lila, az Fc $\gamma$ R1Ib1-ben található inzert: aláhúzott, dőlt betű. A sárgával kiemelt szakaszok mutatják a szerint és tirozint egyaránt tartalmazó hosszú peptidet felépítő szekvenciát (az első és utolsó két aminosav alapján RK-HP).

Vizsgálatainkat több szinten folytattuk. Egyrészt Fc $\gamma$ R11b-t expresszáló B sejtvonalon (BL41 Burkitt limfóma) vizsgáltuk a mitogén aktivált kinázok (MAPK) kötődését az Fc $\gamma$ R11b –hez, valamint ennek következményeit. Másrészt különféle Fc $\gamma$ R11b –vel transzfektált sejteket hoztunk létre, amelyek eddig nem álltak rendelkezésre, a humán Fc $\gamma$ R11b funkciójának tanulmányozására. Továbbá a receptor intracelluláris szakaszainak megfelelő, szintetikus foszfopeptidek segítségével vizsgáltuk az Fc $\gamma$ R11b–hez kapcsolódó molekulákat, és e foszfopeptidek jelátviteli utakra kifejtett hatását. Az IgG CH2 domén rész-szekvenciájának megfelelő szintetikus peptidok segítségével meghatároztuk az Fc $\gamma$ R11b–hez kötődő legkisebb, funkcionálisan még aktív ligandumot. Végül megvizsgáltuk B sejtekben a MAPK aktivitás és a receptor leválás („Fc $\gamma$ R11b shedding”) esetleges összefüggését.

## MAPK dokkoló hely az Fc $\gamma$ R11b-on

In vitro kináz assay-ben nyert eredményeink szerint a BCR-en keresztül stimulált sejtekben az enzimatisan aktív Erk MAPK kapcsolódik az Fc $\gamma$ R11b –hez. Az Erk1/2-re specifikus ellenanyaggal való próba azt mutatta, hogy többféle aktív Erk kötődött az Fc $\gamma$ R11b –hez a BCR/Fc $\gamma$ R11b kereszt-kötött mintákban. Fc $\gamma$ R11b negatív sejtől (ST486) izolált kontrol minta nem mutatott enzimaktivitás növekedést BCR stimulust követően. Az Fc $\gamma$ R11b–Erk1/2 asszociációt a feltételezett MAPK dokkoló helynek megfelelő szintetikus peptiddel próbáltuk blokkolni. Az RKKRIS<sup>253</sup>ALPG peptid mind foszforilált, mind foszforilálatlan formában gátolta nemcsak az Erk1/2, hanem más MAPK-ok (85kDa, 56kDa) kötődését is a receptorhoz, ami arra utal, hogy ez a motívum valóban MAPK-ok dokkoló helye az Fc $\gamma$ R11b-on. Arra vonatkozólag, hogy a MAPK foszforilálja-e a receptort *in vivo* körülmények között, pillanatnyilag nincs közvetlen bizonyítékunk.

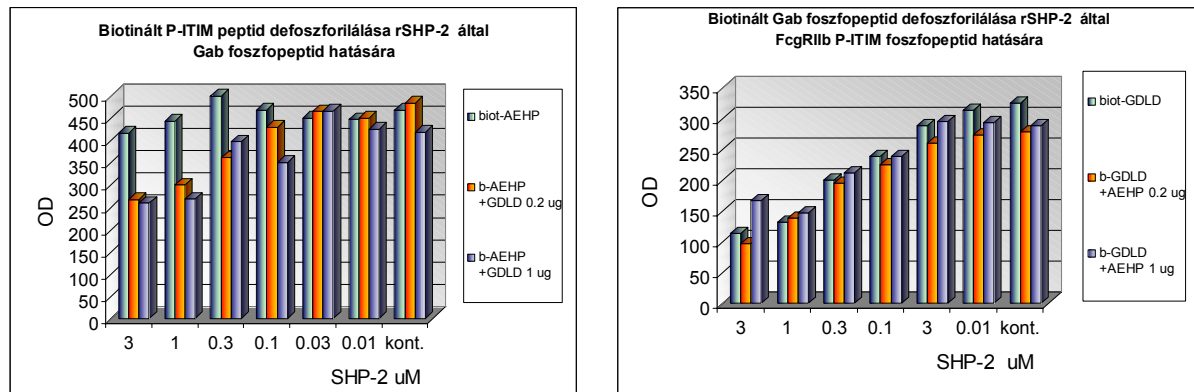
A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a RKKRIS<sup>253</sup>ALPG peptid kötődik-e és milyen körülmények között a MAPK-okhoz. Az avidinnel fedett Sepharose gyöngyökre felkötött peptid kizárólag aktivált B sejtek detergenssel nyert kivonatából kötötte meg a p85, p56 és p42/44 MAPK-okat, függetlenül foszforiláltságától. Okadánsav foszfatáz gátló jelenlétében a kötődés jelentős mértékben felerősödött. Az okadánsavról ismert, hogy amellett, hogy a PP1 és PP2a foszfatázok specifikus gátlószere, s így megakadályozza az Erk defoszforilációját, aktiválhatja is az Erk1/2-t. Ez az eredmény tehát megerősíti, hogy csak az aktív, foszforilált formában levő Erk kapcsolódik a megfelelő docking motívumhoz, továbbá azt mutatja, hogy a kötődés foszfatázok ellenőrzése alatt áll. **Elsőként igazoltuk tehát, hogy aktív MAP kinázok valóban kötődnek az Fc $\gamma$ R11b -n levő dokkoló helyhez (RKKRISAL) és így az aktivált B sejtekben foszforilálhatják magát a receptort és/vagy más, ahhoz kötődő fehérjét.**

## Szintetikus Fc $\gamma$ R11b foszfopeptidekhez kötődő fehérjék azonosítása, a foszfopeptidek SHP-2 aktiváló hatása

Elkészítettük a szerin és tirozin aminosavakat is tartalmazó Fc $\gamma$ R11b peptideket (l. 1. ábra), amelyekben a szerin, vagy a tirozin, vagy mindkét aminosav foszforilálva volt, illetve egyik aminosav sem volt foszforilált. A peptidekkel sikerült különféle fehérjéket kihúzni aktivált B sejtek detergens extraktumából. Fehérjefestés alapján a foszfopeptidekhez kötődő fehérjéket találtunk 50, 70, 85 és 110 kDa molekulatömeg tartományban. Megállapítottuk, hogy a foszfortirozint tartalmazó peptidekhez lényegesen több fehérje kapcsolódott. Kizárólag a foszfortirozint tartalmazó peptidekkel lehetett kimutatni tirozinon foszforilált fehérjék kapcsolódását, a csak foszfoszerint tartalmazó peptidekkel nem. A RK-HP foszfopeptidhez kötődött fehérjék között korábbi eredményeinkkel megegyezően azonosítottuk a *lyn* protein tirozin kinázt, az SHP-2 foszfatázt, a Grb 2 asszociált binder (Gab1) adaptor fehérjét, valamint a foszfatidil inozitol 3-kinázt (PI3-K). Megfigyeltük, hogy a foszfoszerint és

foszfotirozint egyaránt tartalmazó peptidhez kevesebb *lyn* kötődött, mint a csak a foszfotirozint tartalmazóhoz, ami arra utal, hogy a szerin foszforilációja szabályozhatja a Fc $\gamma$ R1Ib-től függő gátlás alapfeltételét, az Fc $\gamma$ R1Ib ITIM tirozinon történő foszforilációját. A szerin foszforilációjának hatására a foszfopeptid ITIM motívumával kölcsönhatásba lépő többi molekula kötődésében mennyiségi különbségeket nem találtunk (SHP-2, PI3-K, Gab1).

Megvizsgáltuk a foszfopeptidek hatását az SHP-2 tirozin foszfatázra, amely az általunk korábban felállított modell szerint felelős az Fc $\gamma$ R1Ib által közvetített B sejt gátlásért (2. ábra).



**2. ábra.** SHP2 foszfatáz aktiválása pITIM és Gab1 foszfopeptidek által. Rekombináns SHP2-t GST fúziós fehérje formájában állítottuk elő. A foszfatáz aktivitásának mérésére ELISA alapú rendszert állítottunk be. Az SHP2 aktivitást biotinnal jelölt foszfopeptidekkel szemben vizsgáltuk, amelyeket avidinnal fedett ELISA lemezhez kötöttünk, majd a tirozin foszforiláció mértékét anti-foszfotirozín ellenanyag segítségével mértük vissza.

Kimutattuk, hogy a foszfatázt a Gab1 DG-LD peptide hatékonyan aktiválja, míg a pITIM (AE-HP) csak kevéssé. Amikor a két peptidet együtt adtuk, a Gab1 peptid fokozta az SHP-2 pITIM-re kifejtett hatását, vagyis Gab1 peptid aktiválja a foszfatázt, míg a pITIM szubsztrátként szerepel. A két foszforilált motívum együttműködik az SHP-2 aktiválása során, aminek az Fc $\gamma$ R1Ib-től függő gátlás során lehet finomszabályozó szerepe.

Összehasonlítottuk a különböző foszforilációs formájú RK-HP peptideket is a fent leírt foszfatáz assay-ban. A szerint és tirozint is foszforilált formában tartalmazó Fc $\gamma$ R1Ib peptid kissé jobban aktiválta az SHP2-t mint a csak foszfotirozint tartalmazó, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

Az Fc $\gamma$ R1Ib szerin foszforilációjának további vizsgálata céljából nyulakban ellenanyagot állítottunk elő a KHL hordozóra kötött **RKKRISALPG** foszfopeptiddel szemben, majd megvizsgáltuk mit ismer fel a kimerített, tisztított ellenanyag F(ab) $_2$  fragmense. Az ellenanyag gyenge reakciót mutatott a receptorral, de számos más fehérjét is felismert a B sejtek lizátumában, így a nagy mértékű nem specifikus háttér reakció miatt a továbbiakban az ellenanyagot nem tudtuk alkalmazni.

## **Az Fc $\gamma$ R1Ib kötőhelyének térképezése az IgG molekulán**

A Fc $\gamma$ R1Ib-n keresztül történő sejtstimulációhoz a receptorhoz kötődő legkisebb, még hatékony ligandumot szeretnénk azonosítani. Ezért a humán IgG1 CH2 doménje szekvenciájának a kapocsrégió felőli részét átlapoló 8 tagú szintetikus peptid segítségével térképeztük. Azonosítottuk azt a legrövidebb peptidet, amely kötődött mind B sejteken, mind monocitákon kifejezett Fc $\gamma$ R1Ib-hez, és felismerte a szolubilis rekombináns Fc $\gamma$ R1Ib-t is ELISA rendszerben. A ligandumkötődés vizsgálatához előállítottunk Fc $\gamma$ R1Ib –vel transzfektált B sejtvonalat, (S2B), az eredetileg Fc $\gamma$ R1Ib negatív ST486 Burkitt limfoma sejtekből. Ez a szintetikus peptid (<sup>256</sup>TPEVTC(Acm)VVDVSHEDP<sup>271</sup>), melynek kötődési affinitása  $K_D = 6 \mu\text{M}$ , biotinált formában avidinnel kereszt-kötve gátolta a BCR által indukált Ca<sup>2+</sup> jelet B sejtekben, továbbá monocita sejtvonal (Monomac) sejtekből TNF $\alpha$  és IL-6 gyulladási citokinek felszabadulását váltotta ki. A Monomac sejtek Fc $\gamma$ R1Ia-t fejeznek ki, melynek extracelluláris doménjei csaknem azonosak az Fc $\gamma$ R1Ib –val, de az intracelluláris doménjük eltér. A Fc $\gamma$ R1Ia aktiváló típusú receptor, ligandum által történő kereszt-kötése citokinek felszabadulását eredményezheti. A citokintermeléshez vezető jelút egyik fontos eleme az Erk foszforiláció. Eredményünk szerint a biotinált TP peptid avidinnel való kereszt-kötés után alkalmas ERK aktiváció kiváltására. Ugyanakkor a nem komplexben levő peptid nem volt képes gátolni az aggregált Ig által kiváltott választ, feltehetőleg a komplex kisebb mérete, és a kötődés alacsonyabb affinitása miatt. Az általunk azonosított peptid komplex formában alkalmas az Fc $\gamma$ R1Ib-n keresztüli szignalizáció további vizsgálatára.

## **Fc $\gamma$ R1Ib–vel transzfektált sejtek előállítása, az Fc $\gamma$ R1Ib–től függő funkciók tanulmányozása vad típusú és ser/ala cserét tartalmazó receptorral transzfektált sejtekben**

Az Fc $\gamma$ R1Ib szerin foszforilációja szerepének további vizsgálatára olyan vektorokat állítottunk elő irányított mutagenézissel, amelyek az Fc $\gamma$ R1Ib1-ben ser/ala cserét tartalmaznak. A vad és mutáns Fc $\gamma$ R1Ib1-geket tartalmazó vektorokkal Fc $\gamma$ R1Ib negatív B sejteket (ST486) transzfektáltunk. Az irányított mutációt és a transzfektánsokat a párizsi Laboratoire d'Immunologie Cellulaire & Clinique INSERM U. 255 Institut Biomédical des Cordeliers INSERM Marc Daeron által vezetett laboratóriumával kollaborációban készítettük el.

### *Mutáció létrehozása*

Az eredetileg FcR negatív ST486 sejtvonalat transzfektáltuk vad típusú illetve a mutációt hordozó pNT emlős expressziós vektorral. A mutáns receptor hordozó konstrukciót a vad típusú gént tartalmazó vektorból állítottuk elő a Promega cég által forgalmazott „Gene editor” nevű helyspecifikus mutációs készlettel. A módszer lényege, hogy a pontmutációt hordozó oligonukleotid mellett egy ún. szelekciós oligonukleotidot is hibridizáltunk a kiindulási vektor azonos láncához, mely megváltoztatja a vektorban lévő antibiotikum-rezisztenciáért felelős gént. Így a megváltozott rezisztenciájú és egyben a kívánt mutációt hordozó klónok speciális antibiotikum keverékkel szelektálhatóak.

### *Immunprecipitációs vizsgálatok - a fehérjefoszforiláció összehasonlítása vad típusú és ser/ala mutáns Fc $\gamma$ R1Ib-rel rendelkező B sejtekben*

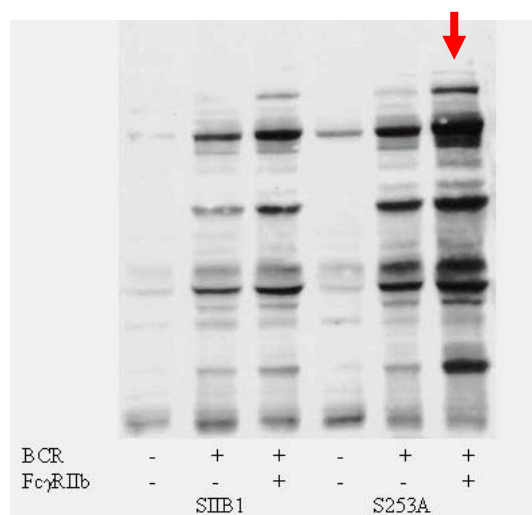
Jelátvitelben szerepet játszó molekulák esetében több esetben is igazolták, hogy egy adott molekula szerin foszforilációja negatívan befolyásolja a molekula tirozin-foszforiláció indukálta funkcióját. Az Fc $\gamma$ R1Ib intracelluláris részén elhelyezkedő, általunk leírt MAPK-kötő motívumban levő szerin szerepének tisztázására elkészítettünk két transzfektált sejtvonalat az eredetileg FcR negatív ST486 humán Burkitt lymphoma sejtekből. Az SIIB1 elnevezésű sejt a vad típusú receptort hordozta, míg az S253A az említett (253-as pozícióban levő)

szerin helyett alanint tartalmazó receptort fejezte ki. A két receptor működését, a hozzájuk kapcsolódó molekulákat hasonlítottuk össze.

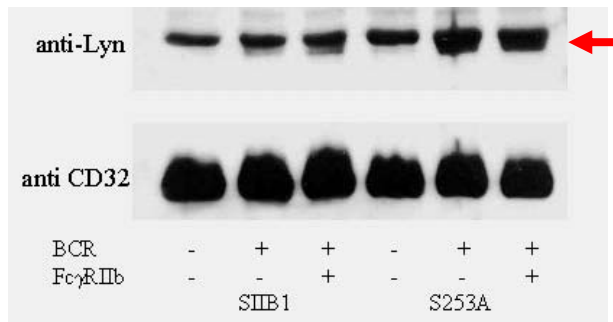
Immunprecipitáció és Western blot technika segítségével vizsgáltuk, hogy a 253-as szerint nem tartalmazó mutáns receptort expresszáló S253A sejtek esetében a receptor működése, és receptorhoz asszociált molekulák mennyiben térnek el a vad típust kifejező SIIB1 sejtekhez képest. Kontroll (nem stimulált), B-sejt receptoron (BCR) keresztül stimulált és BCR-Fc $\gamma$ R1Ib keresztkötött mintákat hasonlítottunk össze a kétféle sejtípus esetében. A BCR-en keresztüli aktivációt egér anti humán IgM-mel és kecske anti egér IgG-vel végeztük. A BCR-Fc $\gamma$ R1Ib keresztkötött minták esetében ez előzőekhez képest még egér anti humán CD32-t adtunk a sejtekhez. A stimulálást 2-5 percig 37°C-on végeztük, majd a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Ezt követte a sejtek lízise detergenst (Triton X-100) és proteáz ill. foszfatáz gátlókat tartalmazó pufferben. Az így nyert lizátumokat protein G agarozon immobilizált ellenanyagokkal inkubáltuk. A kötődött fehérjéket poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd nitrocellulóz membránra vittük át. A membránt specifikus ellenanyagokkal blottoltuk a fehérjék azonosítása céljából.

Anti-foszfotirozinnal precipitált mintákat anti-foszfotirozin ellenanyaggal blottolva azt tapasztaltuk, hogy a BCR-Fc $\gamma$ R1Ib keresztkötött minták esetében az S253A sejtek intenzívebb tirozinfoszforilációs mintázatot mutatnak (3. ábra). Ugyanígy a mutáns Fc receptor hordozó sejtek esetében nagyobb mennyiségű Lyn Src kináz asszociálódott a receptorhoz (4. ábra). Ez egybevág korábbi eredményünkkel, amelyben a fokozott lyn kötődést mutattunk ki a foszfoszerint nem tartalmazó, foszfotirozin tartalmú Fc $\gamma$ R1Ib foszfopeptidehez. Az is megfigyelhető volt, hogy a p85 Erk izoforma, illetve a 41-42 kDa-os Erk1/2 nagyobb mértékben asszociálódott a S-A mutációt hordozó S253A sejtek Fc receptorához (5. ábra). További, a receptor jelátvitelében fontos általunk vizsgált fehérjék Fc $\gamma$ R1Ib-höz való kötődése nem mutatott eltérést a vad típusú és a mutáns receptor között.

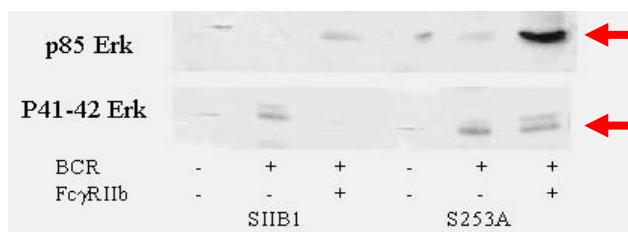
Vizsgáltuk az Erk és az Akt kinázok aktivációjának kinetikáját is az említett két sejtípus esetében. A sejtekben különböző ideig idéztünk elő BCR-en keresztüli aktivációt, illetve BCR-Fc $\gamma$ R1Ib keresztkötést. A kétféle receptort hordozó sejtek Erk és Akt aktivációjának kinetikája nem mutatott lényeges eltérést.



**3. ábra.** Szerin/alanin cserét tartalmazó Fc $\gamma$ R1Ib-ral transzfektált sejtekben BCR-Fc $\gamma$ R1Ib keresztkötést követően a tirozinon foszforilált fehérjék mennyisége növekszik. Anti-foszfotirozin immunprecipitált minták, anti-foszfotirozin immunoblot.



**4. ábra.** Szerin/alanin cserét tartalmazó FcγRIIb-ral transzfektált sejtekben BCR-en keresztül aktivált mintákban az FcγRIIb-hez kapcsolódó *lyn* mennyisége megnőtt. Anti-CD32 immunprecipitációval izolált mintákat Lyn, illetve kontrollként CD32 specifikus ellenanyagokkal vizsgáltuk az immunoblotton.



**5. ábra.** Szerin/alanin cserét tartalmazó FcγRIIb-ral transzfektált sejtekben (S253A) BCR-FcγRIIb keresztkötést követően megfigyelhető a 85 kDa és a 41/42 kDa Erk fokozott kötődése az FcγRIIb-hez. Anti-CD32 immunprecipitátum, anti-pan-Erk ellenanyaggal blottolva.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a ser/ala csere mellett több *lyn* kapcsolódik a tirozinon foszforilált FcγRIIb-hez, ami fokozott BCR-indukált fehérje tirozin foszforilációt tesz lehetővé B sejtekben. A vad típusban jelenlevő szerin a BCR-en keresztül érkező jel hatására foszforilálódik és feltehetőleg az aktivációs küszöb emelésével mintegy „féken tartja” sejtaktivációt. Ugyanakkor a vad és mutáns receptorokat hordozó sejtekben a BCR/FcγRIIb keresztkötés által kiváltott Ca<sup>2+</sup> jelet összehasonlítva, illetve az Erk és Akt foszforiláció vizsgálatakor nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, ami arra utal, hogy a szerin foszforilációja nem befolyásolja az FcγRIIb-től függő [Ca<sup>2+</sup>] szabályozást, Erk illetve Akt aktiválódást.

#### Apoptózis vizsgálatok

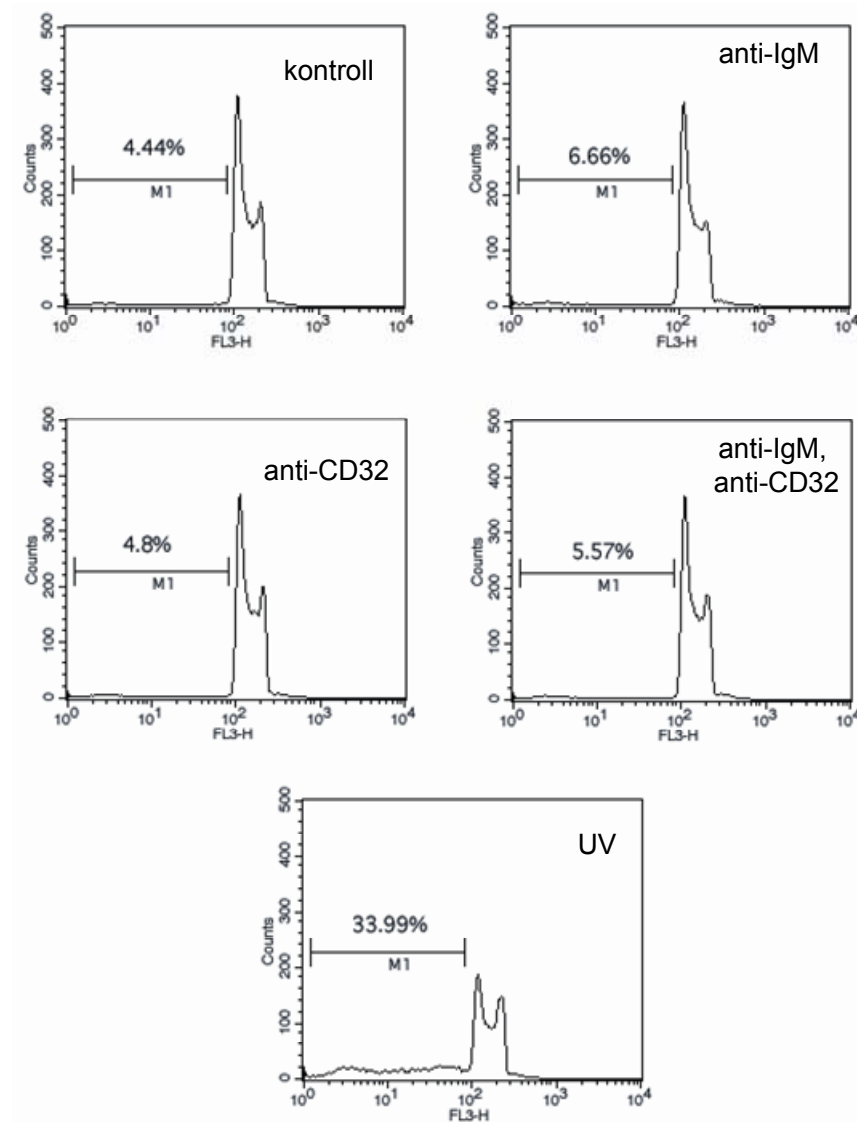
Az irodalomban fellelhető adat, hogy az FcγRIIb anti-CD32 ellenanyaggal történő keresztkötése apoptózist indukálhat egér B sejteken. Vizsgáltuk, hogy a mutáns és a vad típusú FcγRIIb-t hordozó két sejtvonal az S11B1 illetve az S253A esetében milyen hatása van a receptoron belüli mutációnak (a 253-as szerin hiányának) az FcγRIIb-n keresztüli apoptózis indukciójában. A sejteket anti-humán CD32 ellenanyaggal inkubáltuk egy éjszakán át, majd másnap propidium jodidos festéssel áramlási citofluoriméteren követtük az apoptotizáló sejtek arányát. Kísérleteink során azonban bebizonyosodott, hogy a vizsgált két sejtben (és egyéb humán B-sejtvonalakban) az FcγRIIb keresztkötése nem indukál apoptózist (6. ábra).

Vad típusú- és Ser>Ala mutáns Fc $\gamma$ R1Ib-transzfektált ST486 sejteket ( $2,5 \times 10^5$  sejt/1 ml/lyuk) 24 órán át 37 °C-on inkubáltunk ellenanyaggal fedett 24-lyukú sejtenyésző lemezen az alábbi elrendezésben:

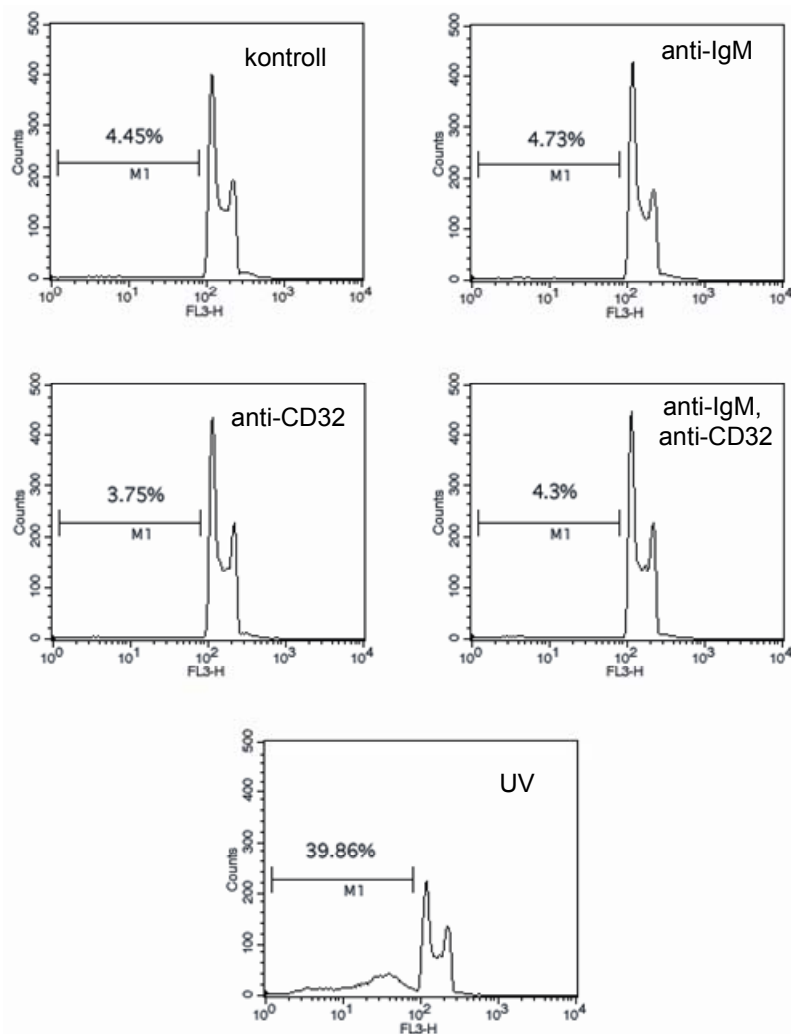
- kontroll (ellenanyag nélkül)
- anti-humán IgM, 2  $\mu$ g/ml coat
- anti-humán CD32, 10  $\mu$ g/ml coat
- anti-humán IgM (2  $\mu$ g/ml), anti-humán CD32 (10  $\mu$ g/ml) coat
- pozitív kontroll (ellenanyag nélkül, 25 sec UV-besugárzás)

A sejteket egyszeri mosást követően további 5 órán át + 4 °C-on DNS-extraháló, propidium-jodid-tartalmú hipotóniás citrát-pufferben inkubáltuk. Végül áramlási citométeren mértük a propidium-jodid fluoreszcencia intenzitását (FL3 csatorna, 10000 sejt/minta) és meghatároztuk a csökkent DNS-tartalmú szubdiploid sejtpopuláció százalékos arányát.

### vad típusú Fc $\gamma$ R1Ib-transzfektált ST486



### **Ser>Ala mutáns Fc $\gamma$ RIIb-transzfektált ST486**

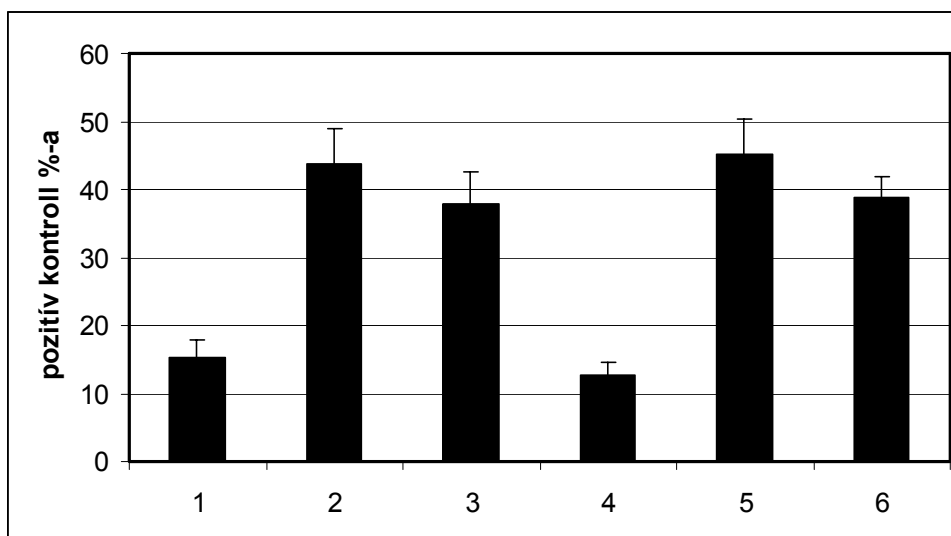


**6.ábra.** DNS-fragmentáció vizsgálata Fc $\gamma$ RIIb-transzfektált humán ST486 B-sejtvonalon. Az Fc $\gamma$ RIIb keresztkötése nem indukál DNS fragmentációt. M1:szubdiploid sejtek.

#### *NF $\kappa$ B* aktiválódás

Azt is vizsgáltuk, milyen hatással van a szerin mutációja az Fc $\gamma$ RIIb NF $\kappa$ B aktivációt befolyásoló tulajdonságára. A sejteket a különböző kezeléseket után (BCR stimuláció, BCR-Fc $\gamma$ RIIb keresztkötés) lecentrifugáltuk, majd enyhe detergenses hipotóniás oldatban sejtmagot izoláltunk belőlük. A sejtmagokat nagyobb koncentrációjú és magasabb sótartalmú oldattal feltártuk, és a sejtmagba transzlokálódott aktiválódott NF $\kappa$ B transzkripciós faktor mennyiségét vizsgáltuk a Chemicon cég által forgalmazott ELISA rendszerrel. Adataink alapján nem mutatkozik lényeges különbség a két sejttípus között.



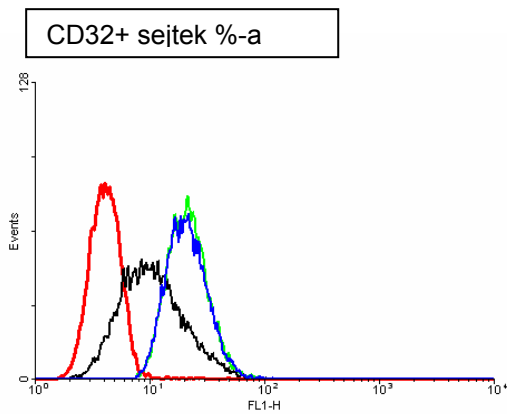


**7. ábra.** Az SIIB1 és S253A sejtek NFB aktivációjának összehasonlítása. 1: SIIB1 nem stimulált, kontroll; 2: SIIB1 BCR stimulált; 3: SIIB1 BCR-Fc $\gamma$ RII keresztkötött; 4: S253A nem stimulált, kontroll; 5: S253A BCR stimulált; 6: S253A BCR-Fc $\gamma$ RII keresztkötött. Az értékek a cég által biztosított pozitív kontroll minta értékeinek százalékában vannak feltüntetve.

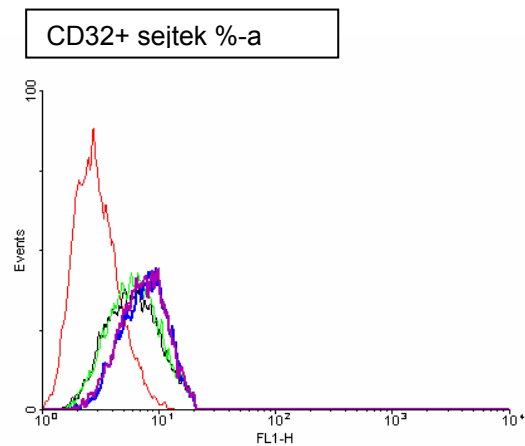
## Fc $\gamma$ RIIb leválás („shedding”) és a MAPK

Korábban munkacsoportunk leírta, hogy aktivált B sejteken megjelenik egy sejtfelszíni tripszinszerű szerin proteáz, melynek szerepe van az Fc $\gamma$ RII sejtfelszínről való leválásában. Munkánk során vizsgáltuk, vajon a szerin tartalmazó MAPK-kötő motívumnak milyen szerepe van a receptor expresszió szabályozásában. Nemrégiben Margaret M. Chou és munkacsoportja is leírta, hogy az Erk MAPK szerepet játszik az MHC I molekula endoszomális transzportjának és így sejtfelszíni kifejeződésének regulálásában (Robertson S.E. et al. Mol Biol Cell 2006 17:645-657). Kísérleteinkben az U0126, a MEK (a MAPK aktiválásáért felelős kináz) specifikus gátlószere alkalmazásával kikapcsoltuk a MAPK közvetített szabályozó funkciót. Különböző B-sejtvonalak sejteit és mandulából izolált primer sejteket inkubáltunk az említett gátlószerezrel, majd áramlási citofluorimetriával FITC-cel jelölt anti-humán CD32 ellenanyag segítségével mértük a receptor sejtfelszíni kifejeződésének mértékét.

Eredményeink azt mutatják, hogy a MAPK gátlása Fc $\gamma$ RIIb expresszió növekedést okoz a BL41/95 Burkitt lymphoma sejtek és mandulából izolált B-sejtek esetében, mely független attól, hogy BCR-en keresztül stimuláljuk-e a sejteket (8. ábra). Ugyanígy percoll gradiensen tonzillából izolált aktivált B-sejteken is hasonló eredményt kaptunk (9. ábra). Nyugvó mandula B-sejteket IgM specifikus ellenanyag segítségével aktiválva megfigyelhető az aktiváció miatt bekövetkező Fc $\gamma$ RIIb-szám csökkenés. A MAPK gátlása ebben az esetben ezt a csökkent expressziót kompenzálta. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a MAPK-nak szerepe van az Fc $\gamma$ RII expresszió szabályozásában.



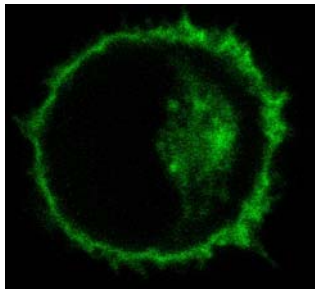
**8. ábra.** A BL41/95 sejtek  $Fc\gamma RII$  expressziójának változása U0126 MEK inhibitor hatására. Piros görbe: negatív kontroll, fekete: anti-CD32 jelölt kontroll, kék: U0126-al kezelt nem stimulált minta, zöld: U0126-al kezelt stimulált minta.



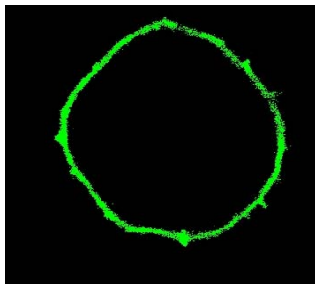
**9. ábra.** Aktivált mandula B-sejtek  $Fc\gamma RII$  expressziójának változása U0126 MEK inhibitor hatására. Piros görbe: negatív kontroll, fekete: anti-CD32 jelölt nem stimulált minta, zöld: anti-CD32 jelölt stimulált minta, kék: U0126-al kezelt nem stimulált minta, lila: U0126-al kezelt stimulált minta.

További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, vajon a MAPK szabályozó szerepe kiterjed-e a receptor internalizációra is. Ebből a célból elkészítettünk olyan konstrukciókat melyek a különböző receptor izoformákat ( $Fc\gamma RIIb1$  és  $b2$ ) GFP (green fluorescent protein) fehérjével fuzionáltnan tartalmazzák. A két gént fúziós polimeráz láncreakciós technikával kapcsoltuk össze, majd egy pNT elnevezésű emlős expressziós vektorba klónoztuk XbaI és SacI restrikciós helyek közé. A fluoreszcens fúziós partner a konstrukcióban a receptor C terminálisához (sejten belüli részéhez) kapcsolódik. Ezeket a vektorokat transzfektáltuk BL41 illetve BL41/95 sejtekbe. Így konfokális mikroszkóp segítségével nyomon követhetjük a receptor sejten belüli transzportjának folyamatát.

BL41/95 sejtek Fc $\gamma$ RIIb1-GFP fúziós fehérjével való transzfektálás után



BL41sejtek Fc $\gamma$ RIIb1-GFP fúziós fehérjével való transzfektálás után



**10. ábra.** A Fc $\gamma$ RIIb1-GFP fúziós fehérjével transzfektált sejtek konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal készült felvétele.

Megfigyelhető, hogy a szerin proteázot kifejező sejtekben (BL4195) a receptor egy része a citoplazmában található, ami egybevetve a korábban tapasztalt felszíni receptor kifejeződés csökkenésével arra utal, hogy az Fc $\gamma$ RIIb1 elhasadását követően az intracelluláris domén a citoplazmába kerül.

## **Sejtmembrán permeábilis Fc $\gamma$ RIIb foszfopeptidek hatása B sejtekben**

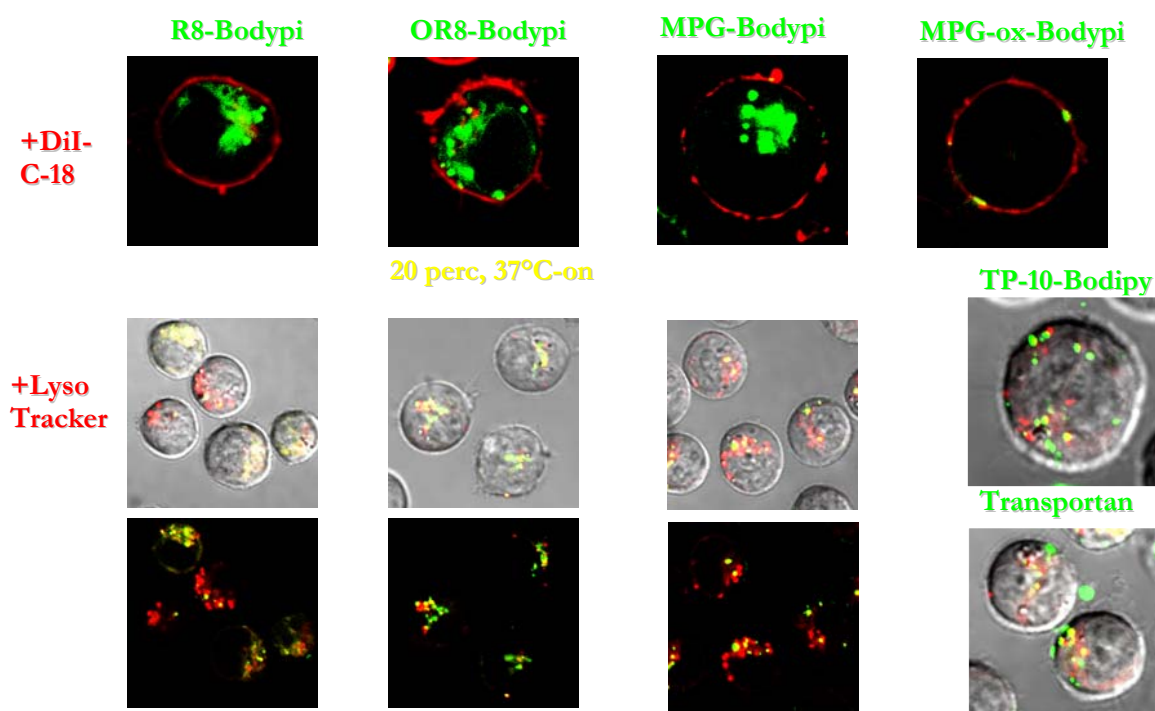
A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az Fc $\gamma$ RIIb2 intracelluláris részét reprezentáló foszfopeptidek milyen jeleket válthatnak ki B sejtekben, például indukálják-e fehérjék tirozin foszforilációját, vagy az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szignált. Először lizofoszfadilil kolinnal permeabilizált B sejteket használtunk modellként, a peptidek így a sejtmembránon átjutva közvetlenül a citoplazmába kerültek. A tirozinon nem foszforilált peptidek hatástalanok voltak. A foszfortirozint tartalmazó szintetikus Fc $\gamma$ RIIb peptid függetlenül attól, hogy a szerin foszforilálva volt-e, jelentős mértékű tirozin foszforilációt váltott ki a B sejtekbe juttatva, ami arra utal, hogy 1) képes volt tirozin kináz(oka)t aktiválni, vagy 2) valamilyen módon felfüggesztette a foszfatázok által fenntartott tirozin foszforiláció gátlást. Ez a rendszer azonban nehezen reprodukálhatónak bizonyult, és a fiziológiástól is távol állt, ezért először sejtmembránon átjutó hordozó peptideket terveztünk és szintetizáltunk, majd ezek segítségével juttattuk be a foszfopeptideket a B sejtekbe.

Különböző sejtmembrán permeábilis hordozópeptidek összehasonlítása után kiválasztottuk az optimális hordozót. Az 1. Táblázatban felsorolt membrán permeábilis hordozók közül néhány toxikusnak mutatkozott, míg más (MGPOx) nem jutott be a sejtbe. Eredményeink szerint a 8 argininből és oktanoilsavból álló hordozó (OR8) alkalmasnak tűnik peptidek sejtbe juttatására (11. ábra). Ez a hordozó átjut a sejtmembránon és nem toxikus a sejtekre.

|  |  |
|--|--|
| <b>R8C (HIV-1 Tat 48-60)</b>   | <b>RRRRRRRR-C(BODIPY) (-NH<sub>2</sub>)</b>                                |
| <b>Okt-R8C</b>   | <b>Oktanoyl-RRRRRRRR-C(BODIPY) (-NH<sub>2</sub>)</b>                       |
| <b>MPG alfa(-ox)<br/>(HIV-1 gp41 and SV40 NLS<br/>nuclear localisation sequence)</b> | <b>C(BODIPY)-<br/>GALFLAFLAAALSLM(O)GLWSQPKKKRKV<br/>(-NH<sub>2</sub>)</b> |
| <b>Transportan (galanin and<br/>mastoparan)</b>                                      | <b>C(BODIPY)-<br/>GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (-<br/>NH<sub>2</sub>)</b>   |
| <b>TP10</b>  | <b>C(BODIPY)-AGYLLGKINLKALAALAKKIL (-<br/>NH<sub>2</sub>)</b>              |

1. Táblázat. Sejtmembrán permeábilis hordozópeptidek. Összehasonlításuk alapján az Okt-R8 C –t kapcsoltuk az AEHP és RKHP peptidekhez.

**MEMBRÁNPERMEÁBILIS HORDOZÓK VIZSGÁLATA KONFOKÁLIS  
MIKROSKÓP SEGÍTSÉSÉVEL BL 41 SEJTEKEN**

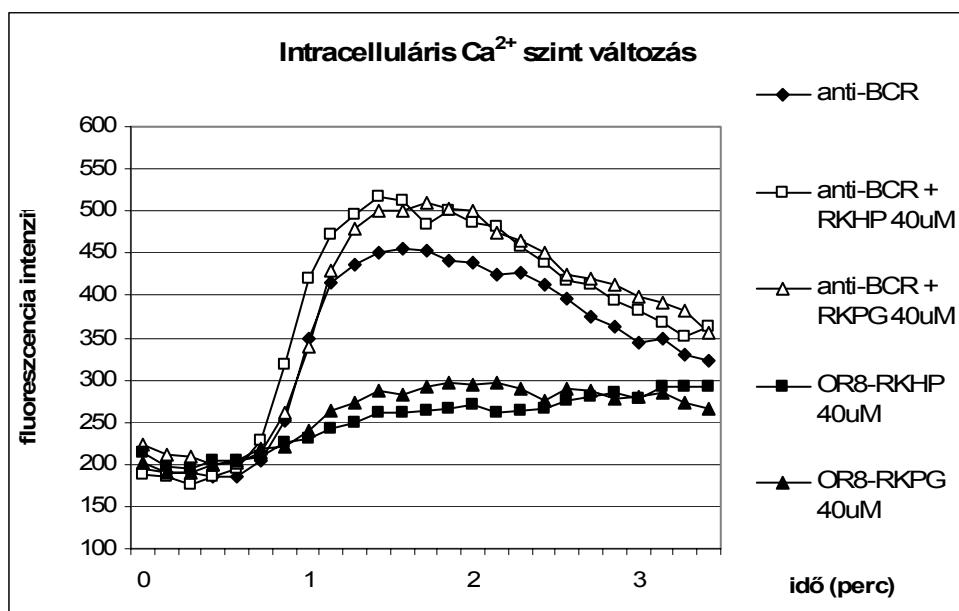


11. ábra. OR8 - Bodipy FL hordozó sejten belüli lokalizációja. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos analízis. A sejtmembránt DiI-C18 reagenssel festettük, a savas lizoszómákat LysoTrackerrel azonosítottuk.

A konfokális mikroszkópos felvétel mutatja, hogy az OR8 átjut a sejtmembránon és a sejtben belül nagyrészt a lizoszómákkal együtt lokalizálódik, ahonnan később a citoszólba kerülhet. A további kísérletekhez az OR8C hordozót kapcsoltuk az RKPG és az RKHP foszfopeptidekhez, és az ilyen módon sejtbe juttatott konstrukciók hatását követtük nyomon B sejtek jelpályáinak vizsgálatával.

### *Fc $\gamma$ R11b foszfopeptidek hatása az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint változásra*

Az OR8-peptid konjugátumok hatására kialakuló intracelluláris szabad Ca<sup>2+</sup> szint változását áramlási citofluometriás módszer segítségével vizsgáltuk humán B-sejtvonalon. BL41 sejteket fluo-3 AM fluoreszcens indikátor festéssel inkubáltuk, amely szabad Ca<sup>2+</sup> jelenlétében jelentős fluoreszcencia emelkedést mutat. A megfestett sejteket 10% FCS tartalmú RPMI 1640 médiumban vettük fel. Ezt követően, az elpusztult sejteket megfestő, propidium jodid festéssel inkubáltuk a sejteket. A mintákhoz az aktiváló ellenanyagot ill. a peptideket a mérés elindítása után 20 másodperccel adtuk. A mérés FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citofluoriméterrel végeztük, argon-ion (488nm) fényforrást alkalmazva.



**12.ábra:** Az OR8-RK-HPnpp (csak tirozinon foszforilált), OR8-RK-PG (szerinen foszforilált) peptidek hatására kialakuló kalcium válasz, ill. a peptidek és az anti-BCR együttes hatása

A foszfoszerint tartalmazó, rövidebb RK-PG peptid és a szerinen nem, de tirozinon foszforilált, hosszabb RKHP peptid egyaránt igen alacsony mértékű Ca<sup>2+</sup> -szint emelkedést indukált 40 $\mu$ M-os végkoncentrációnál. A peptidekkel és anti-BCR-el együtt kezelt sejtekben a válasz additív hatást mutat.

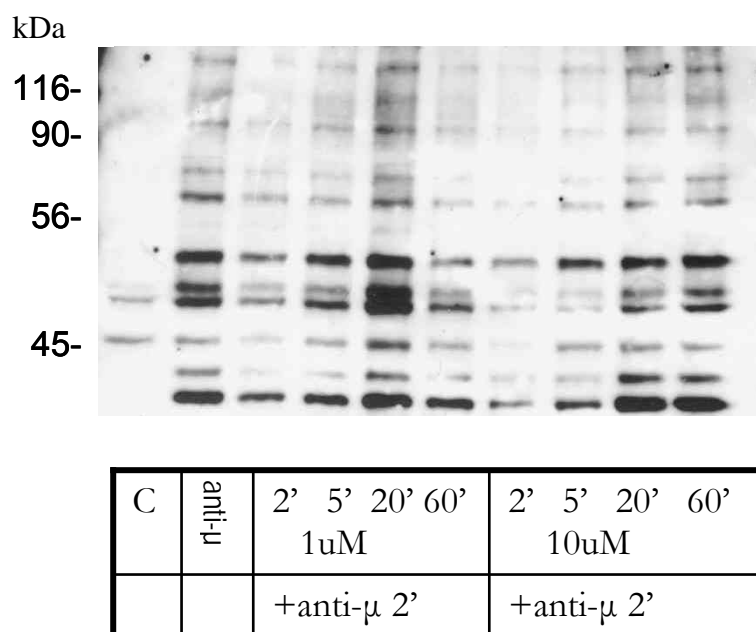
### *A fehérjefoszforiláció vizsgálata*

SDS-PAG elektroforézist követő Western blot analízis segítségével vizsgáltuk az OR8-peptidek hatását a fehérje foszforilációra BL41 sejtekben. A sejteket OR8-peptidekkel

és/vagy anti- $\mu$ -vel történő kezelés után lizáltuk, majd a lizátumot SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk. Ezt követően a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át. A továbbiakban foszfortirozin-specifikus, illetve az Erk és Akt foszforilált/aktivált formájára specifikus elsődleges ellenanyagokkal, majd HRPO-val konjugált másodlagos ellenanyaggal kezeltük a nitrocellulóz membránt. Az előhívást ECL (enhanced chemiluminescence) reagens segítségével végeztük. A kemilumineszcens jelet röntgenfilmen detektáltuk.

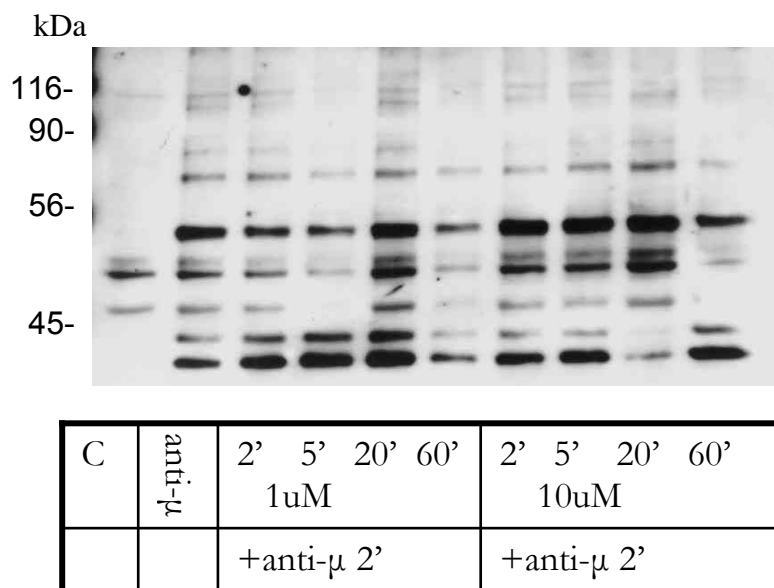
A sejteket különböző ideig kezeltük (2', 5', 20', 60') kétféle, az Fc $\gamma$ RIIb foszforilált motívumait hordozó, membránpermeabilis peptiddel, két különböző koncentrációban (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M). Az OR8-RKPG szerinen foszforilált peptid egy 50 kDa körüli fehérje tirozin foszforilációját váltotta ki, melynek intenzitása a kisebb dózisú (1 $\mu$ M), 20 perces kezelésnél volt a legerőteljesebb. Az OR8-RKHPnpp, szerint nem foszforilált és tirozint foszforilált formában tartalmazó peptid önmagában nem indukálta fehérjék tirozin foszforilációját.

A továbbiakban a sejteket az előzőekben leírtak szerint előkezeltük a két permeabilis peptiddel, majd a peptid-kezelés utolsó két percében anti-BCR-el is stimuláltuk a sejteket. Ezután vizsgáltuk az összes fehérje tirozin foszforilációját, valamint az Erk ill. az Akt molekulák foszforilációját (13. és 14. ábra).



**13.ábra:** Az **OR8-RKPGpe** peptiddel különböző ideig előkezelt, majd **anti-IgM**-mel stimulált sejtekben kialakuló foszforilációs mintázat. WB: anti-foszfortirozin.

**A tirozin foszforiláció** vizsgálata azt mutatta, hogy az **OR8-RKPGpe** foszfopeptiddel való rövid előkezelés jelentősen csökkentette a BCR-en keresztül kiváltott foszforilációs jelet, míg a hosszabb kezelés (20') szelektíven fokozta bizonyos fehérjék -köztük az 50 kDa körüli- foszforilációját. Nagyobb dózisonál (10  $\mu$ M) csak a foszforiláció gátlása érvényesült, ami a kezelési idő előrehaladtával fokozatosan megszűnt (13. ábra). Az **OR8-RKHP npe** peptid, amely csak a foszfortirozint tartalmazta, ettől eltérő képet mutatott. A 20 perces előkezelés ugyan itt is kissé fokozta néhány fehérje tirozin foszforilációját és ez a hatás 60 perc után megszűnt, míg 10 $\mu$ M koncentrációban adva az OR8-RKHPnpe peptid szelektíven, és időtől függő módon fokozta bizonyos fehérjék foszforilációját (14. ábra).



**14.ábra:** Az **OR8-RKHPnpp** peptiddel különböző ideig előkezelt, majd **anti-IgM**-mel stimulált sejtekben kialakuló foszforilációs mintázat. WB: anti-foszfortirozin

**Az Erk aktivációt** vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az OR8-RKHP peptiddel és anti-IgM-el kezelt mintákban erősödött az Erk kináz foszforilációja a csak anti-IgM-el kezelt mintákhoz képest. A legerőteljesebb Erk foszforilációt az 1uM-os peptid dózis 20 perces előinkubálásánál figyelhettük meg. Az előzőhöz hasonlóan az OR8-RKPG + anti-IgM-el kezelt mintákban is megfigyelhető az Erk foszforiláció erősödése, ebben az esetben is főként a 20 perces peptid előkezelést követően. Önmagában a peptidekkel kezelt mintákban nem tudtunk Erk foszforilációt kimutatni és az üres hordozó peptid is hatástalannak bizonyult.

**Az Akt foszforiláció** mértéke nem változott a peptidekkel előkezelt, majd anti-IgM-el aktivált mintákban sem dózis, sem idő függő módon, ill a peptidek önmagukban sem indukáltak Akt foszforilációt.

A sejtmembránon átjutó Fc $\gamma$ R1Ib peptidekkel végzett kísérletek alapján azt mondhatjuk, hogy a foszfopeptidek dózistól és kezelési időtől függő módon képesek beavatkozni mind pozitív, mind negatív módon B sejtek jelátviteli folyamataiba. Az RKHP feltehetőleg az SHP-2 foszfatáz természetes szubsztrátjaival kompetícióba lépve (hiszen az peptid rövid változata, az AEHP peptid jó szubsztrátja a foszfatáznak, l. 2. ábra) gátolja a foszfatáz defoszforiláló hatását és ezen keresztül lehetővé teszi bizonyos sejten belüli jeltovábbító fehérjék tirozin foszforilációjának fennmaradását.

A szerinen foszforilált RKPG peptid ezzel szemben alapvetően gátolja a BCR által kiváltott tirozin foszforilációs jelet. Ez egybevág azzal a korábbi eredménnyel, hogy a szerin helyett alanint tartalmazó Fc $\gamma$ R1Ib mutáns sejtekben nagyobb mértékű fehérje tirozin foszforilációt figyeltünk meg. Az RKPG által okozott tirozin foszforiláció emelést pillanatnyilag nem tudjuk magyarázni.

**Az eredmények azt sugallják, hogy az Fc $\gamma$ R1Ib foszforilált motívumai negatív szerepet játszanak az antigén receptoron keresztül történő B sejt stimuláció során. Míg az ITIM tirozin foszforilációja gátolja a BCR- Fc $\gamma$ R1Ib keresztkötött sejtekben a**

**Ca<sup>2+</sup> jelet, valamint az Erk és az Akt foszforilációját, a BCR-en keresztül elindított sejtaktiváció a MAPK Fc $\gamma$ RIIb-hoz való asszociációját váltja ki. A MAPK dokkoló helyeként jellemzett motívum szerinjének foszforilációja -valószínűleg az aktivációs küszöb emelésével- gátolja a BCR által indukált tirozin foszforilációt. Ez utóbbi hatás érvényesülhet az Fc $\gamma$ RIIb ligandum kötésének hiányában is.**

A projekt kapcsán előállítottunk több reagenst, illetve transzfektált sejtvonalakat, amelyek további kutatómunkát tesznek lehetővé. Az Fc $\gamma$ RIIb-hoz kapcsolódó IgG Fc peptid segítségével lehetőség nyílik további szignalizációs folyamatok vizsgálatára, és B sejt gátló reagensok fejlesztésére, a sejtmembrán permeábilis foszfopeptideket alkalmazni kívánjuk különféle peptidok sejtbejuttatására, a GFP- Fc $\gamma$ RIIb konstrukciót hordó sejtek segítségével pedig a receptor leválás (shedding) és a MAPK aktivitás összefüggéseit, a MAPK-nak a receptor internalizációban betöltött szerepét vizsgálhatjuk.