

**Az OTKA által támogatott T43613 pályázat keretében a TH-sejtek és az antigénbemutató sejtek között kialakuló kapcsolatot (immunológiai szinapszis, IS) kívántuk több oldalról is analizálni.** Egyrészt vizsgálni kívántuk a polarizálódott TH1 és TH2 sejtek, illetve prekursoraik (TH0) közötti sejtbolói (a fenotípust meghatározó molekuláris) különbségeket, másrészt eltérő eredetű antigénbemutató sejtek összehasonlítását terveztük jellegzetes sejtfelszíni molekuláik expressziója, az antigénbemutató képesség és az adott sejt típusra jellemző egyéb funkciók (pl. fagocitózis-képesség) szempontjából.

Az első, alapvető célkitűzésünk az volt, hogy létrehozzunk egy olyan egér modell-rendszert, melyben a prekursor illetve nem polarizált (TH0) és a jellemzően TH1 és TH2 sajátosságokkal bíró helper T-limfocita sejtek differenciálódásával járó folyamatok, és az ezzel kapcsolatos celluláris változások nyomkövethetők legyenek. Ennek egyik motivációja az volt, hogy számos, az immunrendszer kóros működésével együttjáró kórképpel kapcsolható a megváltozott „TH1/TH2 egyensúly”, többek között több autoimmun eredetű betegségben is.

Mivel a T-limfociták érése és differenciálódása során bebizonyosodott, hogy a sejtek plazmamembránjában található „lipid raftok” megjelenése és expressziója akár „*de novo* szfingomielin szintézis” által is szabályozott [**R1**, **R2**], és ismert továbbá, hogy ezen membrán mikrodomének jelentős szabályozó funkciókat töltenek be -többek között - a T-sejtes immunválasz során, így egy másik lényeges célkitűzésünk annak feltárása volt, hogy miként befolyásolják a különböző APC és TH sejtek membránjának raft-mikrodoménjei (a membrán-koleszterin illetve gangliozid-tartalom néhány kiemelt – az APC - TH kapcsolatban feltehetően kulcsszerepet játszó - sejtfelszíni molekula raft-asszociáltságát.

#### ◆ Egér TH-hibridómák előállítása és fenotípusának jellemzése:

A pályázat első évében a KLH („keyhole limpet haemocyanin”) -val immunizált BALB/c egerekből (az antigénbemutató sejt-ként (APC) használt sejt vonalainkkal megegyező MHC-haplotípusú törzs) származó, *in vitro*, a TH1 illetve TH2 differenciációnak kedvező citokin környezetben reaktivált CD4<sup>+</sup> nyirokcsomó T-limfociták és timóma sejtek fúziójával sikerült KLH-specifikus TH-hibridómákat előállítanunk.

A létrehozott hibridómák közül öt klón bizonyult hosszútávon megbízhatónak, ezeket választottuk ki a további vizsgálatokhoz és jellemeztük részletesen. Ezek mindegyikének felszínén stabilan kimutathatóak voltak a tervezett - aktivációt igénylő kísérletekhez fontos - CD3, CD4 és CD28 molekulák, valamint a sejtek KLH jelenlétében tenyésztett APC-vel aktiválhatóak voltak.

A kiválasztott hibridómákat, első lépésként késői, citokin-termelő képességük alapján soroltuk be TH1, TH2 és TH0 típusúak.

A fúziót megelőző differenciáció környezete	Hibrid-klónok	Aktivációt követő citokin termelő képesség				TH fenotípus
		GM-CSF	IL-2	IL-4	IFN $\gamma$	
→ TH2 (IL-2 + IL-4 + anti-IFN $\gamma$ )	3/13	+	-	+	-	TH2
	5/11	+	-	+	+	TH0
→ TH1 (IL-2 + IFN $\gamma$ + anti-IL-4)	2/13	+	+	+	++	TH0
	7/5	+	+	+++	-	TH2
	7/6	+	+	-	+++	TH1

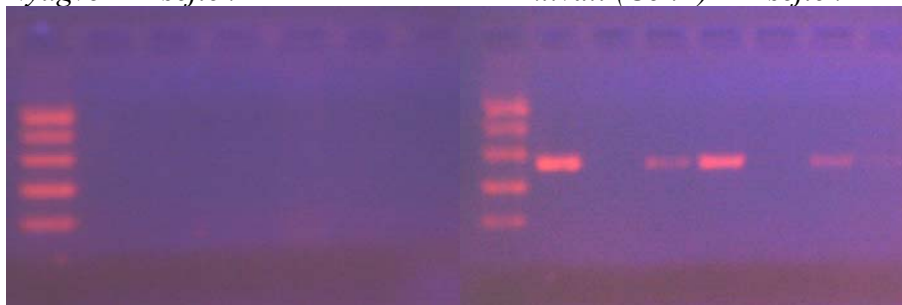
További célunk az volt, hogy az előállított sejtvonalakat transzkripcionális szinten is jellemezzük. A TH1 és TH2 típusú sejtekre jellemző *Tbet* és *IFN $\gamma$*  illetve a *GATA-3* és *IL-4* expresszió RT-PCR módszerrel történő vizsgálatához irodalmi adatok alapján [R3] terveztünk és szintetizáltunk primereket.

A gén expressziók vizsgálata azt mutatta, hogy a TH differenciálódás során a citokin környezettől függetlenül - legalábbis kezdetben - **minden sejtben konstitutív módon expresszálódik a GATA-3**. Az IL-4 nyugvó állapotban csak a 7/5 sejtekben expresszálódott, aktiváció hatására viszont mindegyik hibridómában kimutatható volt. A *Tbet* transzkripció faktor a 7/6 sejtekben aktiváció nélkül is gyengén detektálható volt, ezzel szemben az IFN $\gamma$  mRNS-e az IFN $\gamma$ -t jelentős mennyiségben termelő 7/6 sejtekben is csak stimuláció után volt jól kimutatható. Aktivációt követően - gyengébben ugyan, de többé-kevésbé - expresszálódott a többi sejtben is. Szükséges megjegyezni, hogy a különböző módon történő aktivációk - antigén specifikusan vagy TCR kereszt kötéssel APC jelenlétében illetve mitogénekkal (ConA, PHA) - eltérő hatékonysággal indukálták az egyes citokinek expresszióját illetve szekrécióját.

Példaként az IFN $\gamma$  expresszió vizsgálatának eredményét mutatjuk be:

Nyugvó TH-sejtek

Aktivált (ConA) TH-sejtek



M 7/5 7/6 2/13 3/13 5/11 M +K -K 7/5 7/6 2/13 3/13 5/11

A nyugvó és aktivált  $T_H$  hibridómák IFN $\gamma$  expressziója és annak intenzitása

A továbbiakban megvizsgáltuk olyan sejt felszíni antigének megjelenését, melyek vagy az irodalom alapján [R4, R5] differenciáltan jellemzőek a TH1 illetve TH2 sejtekre, vagy aktivációs, homing, effektor képességeivel illetve membrán raft jellemzőivel kapcsolatosak.

Az antigén specifikus aktivációs szignálkaszád megindításában alapvetően fontos CD3 és CD4 expressziójának mértékében nem találtunk nagy különbségeket. Az APC B7-

ligandumok által nyújtotta ko-stimulációt fogadó CD28 is mindegyik sejten jelen volt, de a 7/6 és 7/5 sejteken sokkal kisebb számban. Szuboptimális stimulációs körülmények között mindegyik sejt aktivációja függött az APC-n lévő B7 molekulák hozzáférhetőségétől függetlenül attól, hogy a B7-1 vagy a B7-2 volt jelen. *In vitro* rendszerünkben a lép TH-sejtek polarizációja sem mutatott összefüggést azzal, hogy a B7-1 vagy a B7-2 volt hozzáférhető az APC-n. A szintén a B7 ligandumokhoz kötődő, aktivált illetve effektor sejteken megjelenő és elsősorban gátló szignálokat közvetítő CTLA-4 is azonos denzitásban volt kimutatható mindegyik vizsgált sejtünkön. Az aktivációs és a gátló jeleket közvetítő CD28 illetve CTLA-4 bár eltérő affinitással, de ugyanazért a két ligandumért verseng (B7-1 illetve B7-2), és számos irodalmi adat mutat összefüggéseket egyes autoaggresszív folyamatok és a B7 ligandumok differenciált hozzáférhetősége között [R6]. Ezért folyamatban vannak olyan vizsgálataink melyek a T-sejteken a CD28 és CTLA-4, az APC-n pedig a B7-1 és B7-2 membrán raftokban való lokalizációjának illetve ko-lokalizációjának felderítésére irányulnak és ennek a sejttípussal, aktivációval, effektor aktivitással való összefüggéseinek tisztázására irányulnak.

A programozott sejthalál beindításában fontos szerepet játszó CD95 (Fas) molekula igen alacsony mértékben a 7/6 és 2/13 sejteken fejeződött ki, a citolitikus effektor képességek szempontjából vizsgált, apoptózist indukáló CD95L pedig alig mérhetően, és csak a TH1 fenotípusú 7/6 sejteken. Az egyes differenciálódott TH sejttípusok apoptózis iránti érzékenységének pontos felderítése még további funkcionális vizsgálatokat igényel, melyek laboratóriumunkban folyamatban vannak.

A 'homing tulajdonságok' jellemzéséhez első közelítésben néhány jól ismert adhéziós molekula és kemokin-receptor sejtfelszíni expresszióját vizsgáltuk. Sem nyugvó, sem aktivált állapotban egyik sejttípus sem expresszált CD54 (ICAM-1)-et, CD11a (LFA-1)-at, L-szelektin ligandumot és CD138-at, CD43 és CD44 viszont mindegyiken kimutatható volt. A naiv, nyugvó sejtekére jellemző CD62L expressziót találtunk a 3/13 sejteken ami aktivációt követően a kimutathatóság határára csökkent. Az irodalmi adatok alapján aktivációkor a raftokhoz asszociálódó és így a TH1 differenciációban résztvevő [R7] CD49d (VLA-4) egyedül a 7/5 sejteken volt megbízhatóan detektálható, aktivációt követően. A kemokinreceptorok közül a CXCR4-et és a CCR5-öt követtük, melyeket a differenciálódott TH2 illetve TH1 sejtekre jellemzőnek tartanak az irodalomban [R8]. A CXCR4-et mindegyik sejtünk kifejezte, a TH2 irányba történő differenciáltatásból származó 3/13 és 5/11 valamint a TH2-nek karakterizált 7/5 sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben. (A CCR5-öt nem tudtunk kimutatni. Ez lehet az IL-12 szignál hiányának következménye de valószínűleg inkább a vásárolt reagens hibája - ez az ellenanyag más tesztekben is következetesen negatív eredményt adott - ezért nem vonható le belőle semmilyen lényeges következtetés). Általában elmondhatjuk, hogy az általunk kiválasztott adhéziós molekulák megjelenése alapján nem találtunk markáns különbségeket a sejteink között. Lehet, hogy néhány másfajta molekula esetében találtunk volna jellemző különbséget, de az is lehet, hogy mivel az általunk kifejlesztett sejtvonalak lényegében azonos feltételek között aktiválódtak és differenciálódtak, *a TH1 illetve TH2 polarizációt elősegítő citokin környezet önmagában nincs különösebb befolyással az adhéziós mintázatra.*

A membránmikrodének összetételének vizsgálatára tervezett későbbi kísérleteinkhez megvizsgáltuk még a lipid raftok markereként használható CD90 (Thy-

1), és a „chlatrin-coated pit” membrán doménekhez kapcsolódó CD71 (transzferrin-receptor) megjelenését is. Mindkét marker kifejeződött mindegyik sejtünkön, bár differenciáltan.

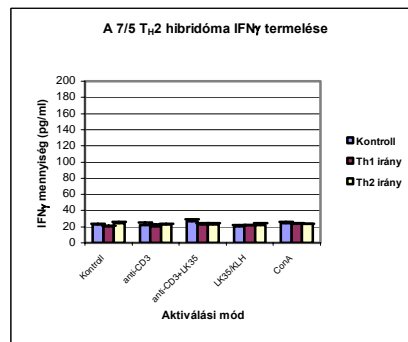
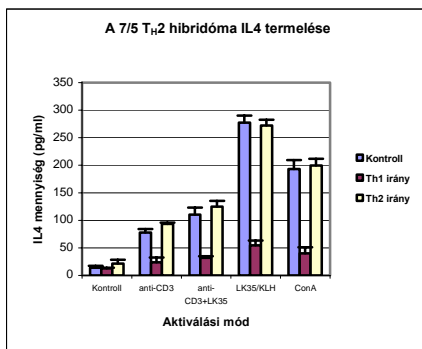
**◆ A létrehozott TH-hibridómák fenotípus-stabilitásának illetve tovább differenciálthatóságának vizsgálata:**

Ezekben a kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy sejtjeinket a TH2 vagy TH1 differenciációnak kedvező közegben vagyis IL-4 + anti-IFN $\gamma$  illetve IFN $\gamma$  + anti-IL-4 jelenlétében hosszabban tenyésztve változik-e azok aktivációra indukálható jellemző citokin termelő képessége. Bár a kereskedelemben hozzáférhető, rendelkezésünkre álló reagensek segítségével csak igen kis mértékű IL-4R $\alpha$  és IFN-R $\alpha$  lánc expressziót tudtunk a sejtek felszínén detektálni, a több hetes tenyésztés jól mérhető változásokat okozott a citokintermelő képességek terén. Eredményeink azt mutatták, hogy az IL-4-et nyugvó állapotban is expresszáló és mindegyik alkalmazott stimulusra szekretálni képes 7/5 (TH2) sejtek IL-4 termelő képességét nem növelte meg az IL-4 jelenléte, viszont az IFN- $\gamma$  jelenléte jelentős gátlást okozott ugyan, de IFN- $\gamma$  termelés nem volt kiváltható. Hasonló eredményt kaptunk a 3/13 (TH2) sejtek esetében is. Ezzel ellentétben az IL-4 jelenlétében tenyésztett 7/6 (TH1) sejtekben csak minimális IL-4 szekréciónak volt indukálható és az IFN- $\gamma$  szekréciónak csökkenése is csak szuboptimális aktiváció esetén volt tapasztalható.

A 2/13 (TH0) sejtek citokintermelő képessége egyik esetben sem változott szignifikáns mértékben. Az 5/11 sejtek (TH0) IL-4 termelő képességét a kimutatási határ alá csökkentette az IFN- $\gamma$  jelenléte a tenyésztés alatt, ezzel szemben igen jelentős mértékben megnőtt ilyenkor az optimális stimulációt követő IFN- $\gamma$  szekréciónak.

**A részletes karakterizálás alapján tehát a továbbiakban a 7/6 klónt TH1, a 3/13 és 7/5 klónokat TH2, a 2/13 és 5/11 klónokat pedig TH0 modell-sejtként definiálhatjuk.**

A sejtkarakterizáció illusztrációjaként a 7/5 (TH2) sejtek esetében mutatjuk be a szendvics ELISA módszerrel mért citokin mennyiségeket.



*A 7/5 TH<sub>2</sub> hibridóma IL-4 és IFN- $\gamma$  termelése aktivációt követően, TH1 illetve TH2 irányú differenciálódásnak kedvező citokin környezetben történő nevelés után.*

*Ezek az adatok - együttesen a génexpressziók vizsgálatának eredményeivel - egyrészt alátámasztják azt az elképzelést, mely szerint a TH-2 irányú fejlődés egyfajta specifikus differenciációs szignál hiányában létrejövő ún. 'default út' is lehet [R9], másrészt arra is rámutatnak, hogy a génexpressziók arányának vizsgálata nem feltétlenül tükrözi a valódi, effektor citokin szekrécióban megnyilvánuló TH1/TH2 arányt [R10]. Érdemes lenne ugyanakkor a későbbiekben megvizsgálni, hogy a hosszabb távon polarizációt elősegítő környezetben tartott hibridómák esetében változik-e a GATA-3 illetve a Tbet expressziója ami a végleges elköteleződés irányába mutatna.*

**◆ A TH – APC kapcsolat (Immunológiai szinapszis, IS) illetve a membrán raftok tulajdonságainak vizsgálatára kiválasztott APC sejtek jellemzése:**

Valamennyi általunk vizsgált érett/aktivált B-limfocita eredetű sejtvonal felszínén kimutathatók (bár különböző mértékben) az antigén bemutató képesség szempontjából lényeges MHC II, ICAM-1 és B7-családbeli molekulák. Az antigén bemutató képességet vizsgáló tesztekben legjobbnak bizonyult *2PK-3* és *LK-35* sejteken mindkét B7 izoforma jelen van, a T-limfocita aktiválásban gyengébbnek talált *A20*, *TA-3* és *M12-4.1* sejteken csak a B7-2-t (CD86) jelenik meg. A pre-B és éretlen B eredetű *1-305* illetve *38C-13* sejtek, melyeken – bár B7-2-t megjelenítenek - az ICAM-1 adhéziós molekula egyáltalán nem, MHC II pedig csak alacsonyabb mértékben detektálható, és a T-limfocita aktivációt poliklonális aktivátorok esetén sem fokozták. Az *X16C* marginális zóna B-sejtek sem MHC II, sem B7 ligandumokat nem expresszálnak.

A monocita-makrofág eredetű sejtek közül az MHC II, ICAM-1 és B7 molekulákkal egyaránt rendelkező *J774A.1* antigén bemutató képessége is jelentősen alatta maradt a *2PK-3* vagy *LK-35* sejtékének. A *RAW264.7* és *WEHI-3* sejtek jól detektálható mértékben megjelenítenek B7 molekulákat, ugyanakkor MHC II vagy ICAM-1-molekulákat nem.

Egyre több irodalmi adat hívja fel a figyelmet a TH-sejtek funkcionális diverzitása mellett a **makrofágok funkcionális és fenotípusos sokféleségére** is [R11]. Az immunválasz TH polarizációja során a többi effektor sejt is többé-kevésbé polarizálódik. Az általunk vizsgált monocita-makrofág eredetű sejteket néhány jellegzetes, elsősorban B-limfocitákra illetve makrofágokra jellemző sejtfelszíni marker expressziója, valamint funkcionális sajátágaik (antigénbemutató képesség, NO, C3 és TNF- $\alpha$  termelés, valamint fagocitózis) alapján hasonlítottuk össze és igen jelentős eltéréseket találtunk. A CD19+ /CD21+ /B220+ /CD24hi /CD81hi /CD11b- /CD23lo /CD32hi /CD64lo, "B-sejt jellegű" *J774.A1* sejtvonal hatékony antigénbemutató tulajdonságokat mutat, de stimuláció (LPS és/vagy IFN- $\gamma$ ) hatására sem termel NO-ot, C3-at, vagy TNF- $\alpha$ -t detektálható mennyiségben, valamint viszonylag gyengén fagocitál. A CD19- /CD21- /B220- /CD24hi /CD81hi /CD11b+ /CD23- /CD32lo /CD64hi, B1-sejt eredetű *P388D1* sejtek jól fagocitálnak de szintén nem termelnek sem NO-ot, sem C3-at, sem TNF- $\alpha$ -t. A CD19- /CD21- /B220- /CD24- /CD81lo /CD11b+ /CD23- /CD32- /CD64hi, "M1 típusú" *RAW. 264.7* sejtek NO-ot és TNF $\alpha$ -t is termelnek, valamint jó fagocitáló képességekkel is rendelkeznek. A CD19- /CD21- /B220- /CD24- /CD81lo /CD11b+ /CD23- /CD32hi /CD64lo "M2 típusú" *WEHI-3* sejtek C3-at termelnek de sem NO-ot, sem TNF- $\alpha$ -t nem.

Érdekes módon a B-sejtekhez hasonlóan a J774A.1 sejtek membránjában is raft asszociáltak és ko-lokalizáltak találtak a B-limfociták koreceptoraként funkcionáló CD19 /CD21 /CD81 molekulákat [R12]. További vizsgálatok feladata kideríteni ezek funkcióját egy monocita/makrofág eredetű sejt esetében illetve esetleges szerepüket a jó antigén bemutató képesség kialakulásában. Az MHC II molekulák hiányától eltekintve a TCR keresztkötését követően a P388D1 és a RAW.264.7 sejtek képesek voltak a B7 ligandumokon keresztül általi kostimulációs funkciót ellátni, továbbá jó fagocita képességekkel is rendelkeznek. Mindkét tulajdonság membrán koleszterin- és raft-függőnek bizonyult.

Peritoneális makrofágokat szeparáltunk kezeletlen illetve intraperitoneálisan paraffin olajjal, tioglikolátos médiummal és ConA-val kezelt egerekből. Annak ellenére, hogy a kinyert sejtek mindegyik kezelést követően a CD11b (Mac-1) és az F4/80 markerek jelenléte alapján érett makrofágnak bizonyultak és megjelenítettek a felszínükön MHC II valamint B7 molekulákat, nyugvó T-limfociták anti-CD3-mal vagy PHA-val előidézett poliklonális aktivációjának mértékét csak a kezeletlen egerekből származó sejtek növelték kis mértékben. Az *in vivo* előkezelések után preparált peritoneális sejtek bár kis mértékben de inkább gátolták a T-sejt proliferációt. Áramlási citometriával kimutattunk a peritoneumban is, a jó antigén bemutató képességűnek talált J774.A1 sejtvonálhoz hasonlóan *CD21-et és CD19-et megjelenítő (sIg-) nem B-sejteket* néhány százalékban, azonban ezek száma kevés volt ahhoz, hogy további, funkcionális kísérletekhez szeparálni tudjuk őket.

Beállítottuk a csontvelőből történő *in vitro* makrofág és dendritikus sejt differenciáltatást. A megfelelő sejtpopulációk azonosítására és érettség vizsgálatára a CD11b, CD11c és F4/80, illetve MHC II és B7 markereket választottuk. A dendritikus sejtek esetében a GM-CSF és az IL-4 irodalom alapján általánosan elfogadott kombinációját használtuk. A makrofágok differenciáltatására kétféle protokollt is kipróbáltunk. Mind a GM-CSF, IL-4 és IL-3 kombinációja, mind az M-CSF megfelelő számú makrofág érését eredményezte bár ezek eltérő funkcionális sajátosságokat (NO, C3, TNFalfa termelés) mutattak. Tapasztalataink alapján a sikeres differenciáltatás nagymértékben függött az alkalmazott citokinek minőségétől és mennyiségétől; csak tisztított rekombináns faktorokat használva lehetett megfelelő eredményt kapni. A rendelkezésünkre álló – az eredeti tervek alapján használni kívánt - transzfektált sejtekből származó rekombináns citokineket tartalmazó sejtenyészet-felülűzők erre a célra nem bizonyultak megfelelőnek. Ezért az eredeti támogatási összeg csökkenése miatt ezeket a vizsgálatokat egyelőre nem tudtuk folytatni.

#### ◆ **Anti-koleszterin monoklonális ellenanyag előállítása és karakterizálása:**

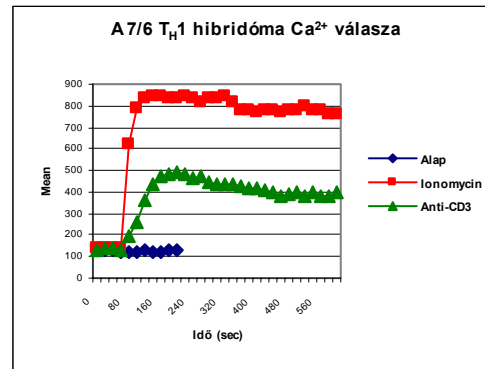
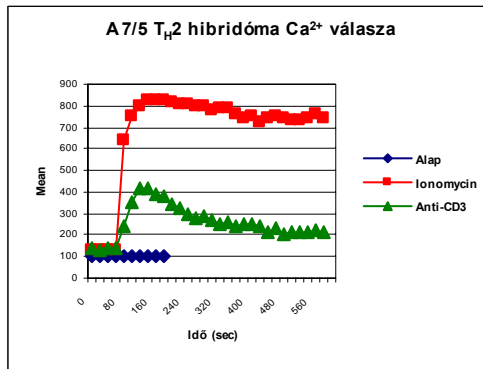
Az MTA-Semmelweis Egyetem Lipid-anyagcsere és Atherosclerosis kutatócsoport Laboratóriumával együttműködésben koleszterin-specifikus egér monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő. Két kiválasztott – sejtes és sejtmentes rendszerben egyaránt részletesen jellemzett - ellenanyagunk (AC1 és AC8) kötődik a membránban a raft-asszociált és a raftoktól független klaszteres koleszterinhez is, valamint detektálható vele a T-sejt aktiválódás hatására bekövetkező raft aggregáció is.

◆ **A TH-hibridómák összehasonlítása az aktivációs szignálok és azok háttérmechanizmusai tekintetében:**

**A.) Kalcium szignál:**

TH1, TH2 és TH0 fenotípusúnak jellemzett hibridómáink kalcium választ vizsgálva a CD3 keresztkötésével, jelentős különbségeket találtunk az azonos aktiváló stimulus esetén mutatott kalciumválasz kinetikájában és amplitúdójában. A TH2 sejtekben sokkal gyorsabban alakult ki a kalcium válasz, ami azonban jóval kisebb amplitúdójú volt és hamarabb csengett le, mint a TH1 sejteknél. A TH1 sejtek kalcium válasza lassabban érte el a maximumot, azonban nagyobb amplitúdójú és kitartottabb volt. A TH0 sejtek kalcium válasza inkább a TH2 hibridómához volt hasonlítható, amennyiben nagyságát és kitartottságát nézzük, ellenben a TH2 sejteknél később érte el maximumát, ami viszont a TH1 fenotípus sajátja.

Példaként a 7/5 és 7/6 hibridómák kalcium választ mutatjuk be.



*A 7/5 TH2 és a 7/6 TH1 hibridóma kalcium válasza anti-CD3 stimulusra (reprezentatív görbék)*

Az antigén specifikus módon kiváltott kalcium választ eddig csak a legjobb antigén bemutató tulajdonságúnak bizonyult LK-35 B-limfómával sikerült vizsgálnunk. Mivel hibridómáink pontos peptid specifikitása nem ismert, a KLH antigénfehérjével történő „bevetés” csak ennél a sejtnek eredményezett megfelelő mértékű aktivációt. Ebben a szinapszis-modellben az antigén bemutató sejt nagyobb választ indukált mint a CD3 keresztkötséssel, ami feltehetően az antigén bemutató sejt APC membránjában történő változásoknak, a megfelelő kostimulációs ligandumoknak a szinapszis helyére történő toborzásának is köszönhető.

**B.) Foszforilációs mintázat**

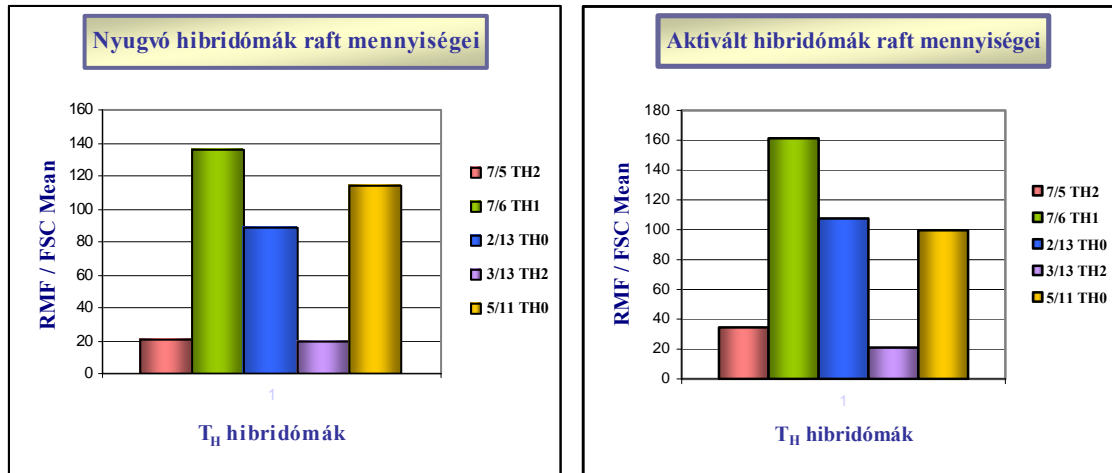
A TH sejtek nyugvó állapotban és aktivációt (CD3 keresztkötséssel) követően vizsgált foszforilációs mintázatában is találtunk eltéréseket. A jól látható foszforilációs változásokat mutató fehérjéket pontosan azonosítani csak úgy tudjuk majd, ha monoklonális ellenanyagok alkalmazásával (Western Blot technikával) feltérképezzük a TCR/CD3 komplex által közvetített jelátviteli pályákon keresztül foszforilálódó ismert,

fontosabb fehérjéket. Ez a további kísérletek feladata lehet majd. Néhány megállapítást viszont ezekből az első kísérletekből is tehetünk a három különböző fenotípusú klón összehasonlítása tekintetében. Sorra véve a jól látható fehérjesávokat megfigyelhető, hogy azok minden TH klónnál hasonló mintázatot mutatnak, jelezvén, hogy a korai (0,5-10 perces aktiváláson belüli) TCR-közvetített jelátviteli eseményekben fontos szignálmolekulák valószínűleg minden TH sejtél hasonlóak. Az időkinetikát tanulmányozva a 2/13 TH0 és a 7/5 TH2 hibridómánál általában azt tapasztaltuk, hogy azok a fehérjék, amik anti-CD3 stimulusra erős foszforilációt mutatnak a kontrollhoz képest, már 0,5-1 perces aktiválás után elérték denzitásuk maximumát, ami 5 perces aktiválás után már erősen csökkent, 10 perc elteltével pedig a legtöbb esetben „lecsengett”, azaz visszatért az aktiválás előtti értékhez. A 7/6 TH1 hibridómánál a foszforoproteinek denzitása/foszforiláltsági szintje általában csak 1-5 perces aktiválás után érte el a maximumát, és több esetben még 10 perc után is erősen foszforilált állapotban volt. Ezek az eredmények jól korrelálnak a kalcium válasz esetében kapottakkal.

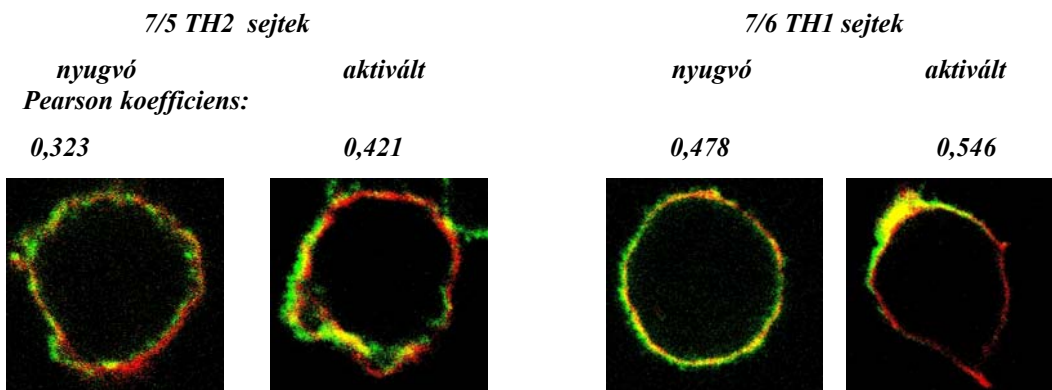
### **C.) A TH-hibridómák membrán tulajdonságainak összehasonlítása:**

Korábbi megfigyelések utaltak arra, hogy a TH1 és TH2 sejtek plazmamembránjaiban a lipid raftok általi kompartmentalizáció lényegesen eltérő lehet. A TH1 sejtek aktivációs tulajdonságai sokkal érzékenyebben függenek a raftok és az általuk kialakított jelátviteli platform integritásától, míg a TH2 sejtek raft-kompartmentalizációja jóval kisebb mértékű, ez nehezebb aktiválhatóságukban és csökkent válaszadó képességükben is megnyilvánul [R13, R14]. Ezeket az adatokat megerősítették saját egér eredetű TH modell sejtjeinken kapott eredményeink is, mivel a cholera toxin B festés alapján nagy különbségeket sikerült kimutatni a membrán raftok mennyiségében. A legmagasabb raft-szint a 7/6 TH1 sejtet jellemezte, míg a két TH2 klónnál szignifikánsan kevesebb raftot detektáltunk. Ugyanakkor a differenciálatlan TH0 sejtek köztes értékeket mutattak (ld. alábbi reprezentatív ábra). Aktiválás hatására, kis mértékben ugyan, de csaknem minden klónnál nőtt a raftok mennyisége. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a stimuláció elsősorban nem a raftok mennyiségében, hanem minőségében (fehérjeösszetételében), lokalizációjában eredményezhet változásokat. A raft mikrodomének nyugvó sejteken ugyanis ugyanúgy jelen vannak, csak aktiváció hatására az azelőtt nem raft-asszociált, de jelátvitelben lényeges molekulák is a raftba toborzódnak. A sejtmembránban található koleszterin jelentős része a detergens-rezisztens frakcióban lokalizálódik, és fontos szerepe van a lipid raftok stabilizálásában [R15]. A 7/6 TH1, a 2/13 TH0 és a 7/5 TH2 nyugvó hibridómákban megvizsgáltuk a membrán koleszterin mennyiségét is az erre specifikusan kifejlesztett fluoreszcensen jelölt ellenanyagunk (AC8) segítségével. Érdekes módon, szemben a G<sub>M1</sub> gangliozidnál tapasztalt jelentős különbségekkel, nem találtunk szignifikáns különbséget a különféle differenciálódási állapotokban a TH sejtek plazmamembrán koleszterin tartalma között.





Jelentős különbségeket kaptunk a TCR/CD3 komplex raft-asszociáltságának mértékében is a TH1 és TH2 polarizált limfocitáink esetében (ld. alábbi reprezentatív ábra).



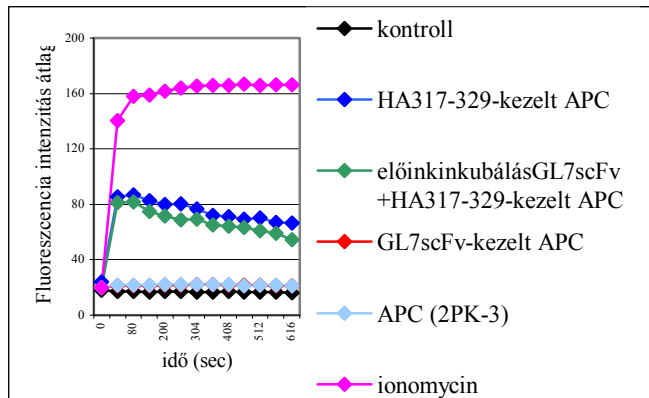
(A bemutatott CLSM képek felvételéhez CTX-B-Alexa647 és anti-CD3-Alexa488 ellenanyaggal történő festést alkalmaztunk)

A TH sejtek antigénspecifikus aktiválásakor a sejtek proliferációjában kulcsfontosságú citokin (IL-2) és citokinreceptor (IL-2R) gének transzkripcióját indukáló NFAT aktiválása szoros összefüggésben áll a sejt kalciumválaszának amplitúdójával és hosszával. Tekintettel a TH0, TH1 és TH2 sejtek kalciumválaszában és raft-expressziójában megfigyelt különbségekre, további vizsgálatokat tervezünk a kalcium szignálokban érintett  $K^+$ , illetve  $Ca^{2+}$  ioncsatornafehérjék expressziójában és aktivitásában rejlő esetleges különbségek feltárására.

### A Ly77 (GL7) molekula funkcionális vizsgálata

A kevésbé karakterizált, de expressziós profilja és szerkezete alapján adhéziós molekulának gondolt Ly77 markert azért kezdtük el ennek a projektnek a keretében is

vizsgálni, mert valamennyi TH-sejtünkön ki tudtuk mutatni, ugyanakkor sem a szomatikus hibridizáció során használt timóma sejtek, sem nyugvó CD4+ T-limfociták nem expresszálják. Mind a B-sejt eredetű sejtvonalak, mind a monocita eredetű sejtek (J774.A1) közül azokat találtuk hatékony antigén prezentálóknak, amelyek szintén expresszálták ezt a markert. A GL7-re specifikus ellenanyag segítségével sikerült egyrészt kis mértékű de szignifikáns kalcium választ indukálni mind az érett LK-35, mind az éretlen 38C-13 B sejtvonalakban valamint az 5/11 TH0 hibridómában. Másrészt a GL7 ellenanyag IgM izotípusából adódó technikai nehézségek elkerülésére kifejlesztett egyláncú (scFv) ellenanyagkonstrukció segítségével kis mértékben gátolni tudtuk TH-sejtek antigén specifikus kalcium választát.



***Influenza vírus HA-peptid specifikus IP12-7 TH1-sejtek kalcium választának csökkenése az APC GL7scFv-vel történt előkezelésének hatására (reprezentatív ábra)***

Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a GL7 molekulának szerepe lehet az antigén bemutatás során meginduló jelsorozatokban. Ezért konfokális lézerpásztázó mikroszkópia segítségével megvizsgáltuk a GL7 membránlokalizációját és *mindegyik vizsgált sejt esetében jelentős mértékben raft-asszociálnak* mutatkozott

A GL7 homing folyamatokban betöltött szerepének kiderítéséhez scid egerekben egy *in vivo* kísérleti rendszert terveztünk. Előkísérleteink biztatóak voltak, a GL7 scFv kezelés kis mértékben gátolta a GL7+ csontvelői sejtek repopulációját. A kísérletekhez elég jelentős mennyiségű konstrukcióra van szükség, melynek előállítása során sajnos technikai nehézségekbe ütköztünk (stabilitás, oldhatóság). Pillanatnyilag ezeket próbáljuk megoldani.

## Referenciák:

- R1.** Tuosto L, Parolini I, Schroder S, Sargiacomo M, Lanzavecchia A, Viola A (2001) **Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation.** *European Journal of Immunology* 31: 345-349
- R2.** Maldonado RA, Irvine DJ, Schreiber R, Glimcher LH (2004) **A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes.** *Nature* 431: 527-532
- R3.** Bian Y, Hiraoka S-i, Tomura M, Zhou X-Y, Yashiro-Ohtani Y, Mori Y, Shimizu J, Ono S, Dunussi-Joannopoulos K, Wolf S, Fujiwara H (2005) **The capacity of the natural ligands for CD28 to drive IL-4 expression in naive and antigen-primed CD4+ and CD8+ T cells.** *International Immunology* 17:73-83.
- R4.** Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez-A C, Manes S, Viola A (2005) **T cell costimulation by chemokine receptors** *Nature Immunology* 6:465-471.
- R5.** Jansson A, Fagerlind M, Karlsson D, Nilsson P, Cooley M (2006) **In silico simulations suggest that Th-cell development is regulated by both selective and instructive mechanisms.** *Immunology and Cell Biology* 84: 218-226
- R6.** Lenschow DJ, Herold CK, Rhee L, Patel B, Koons A, Quin H-Y, Fuchs E, Singh B, Thompson CB, Bluestone JA (1996) **CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diseases.** *Immunity* 5:285-293.
- R7.** Mittelbrunn M, Molina A, Escibese MM, Yáñez-Mó M, Escudero E, Ursa Á, Tejedor R, Mampaso F, Sánchez-Madrid F (2004) **VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses.** *Immunology* 101: 11058-11063
- R8.** Luther AS, Cyster JG (2001) **Chemokines as regulators of T cell differentiation.** *Nature Immunology* 2:102-107.
- R9.** Perussia B, Loza MJ (2003) **Linear '2-0-1' lymphocyte development: hypotheses on cellular bases for immunity.** *Trends in Immunology* 24:235-241.
- R10.** Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW (2003) **T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3.** *Journal of Immunological Methods* 278: 157-169.
- R11.** Gordon S, Taylor PR (2005) **Monocyte and macrophage heterogeneity.** *Nature Reviews Immunology* 5:953-963.

**R12.** Cherukuri A, Shoham T, Sohn HW, Levy S, Brooks S, Carter R, Pierce SK (2004) **The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts.** *The Journal of Immunology* 172:370-80.

**R13.** Balamuth F, Leitenberg D, Unternaehrer J, Mellman I, Bottomly K (2001) **Distinct Patterns of Membrane Microdomain Partitioning in Th1 and Th2 Cells.** *Immunity* 15: 729-738.

**R14.** Hannier S, Bitegye C, Demotz S (2002) **Early Events of TCR Signaling Are Distinct in Human Th1 and Th2 Cells.** *The Journal of Immunology* 169: 1904-1911

**R15.** Viola A (2001) **Amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains.** *Trends in Immunology* 22: 322-327

Eredményeinkről magyar nyelven folyamatosan beszámoltunk az évenként megtartott MIT vándorgyűléseken, az MBFT kongresszusán Debrecenben és az V. Magyar Sejtanalitikai Konferencián Budapesten 2005-ben, valamint a 36. Membrán-Transzport Konferencián Sümegen 2006-ban. Angol nyelven, kezdeti eredményeinkről a 15. Európai Immunológus Kongresszuson Rhodoson és a 12. "Signal and Signal Processing" EFIS kongresszuson Sopronban 2003-ban, majd 2005-ben a FEBS kongresszuson Budapesten és a 13. "Signal and Signal Processing" EFIS kongresszuson Balatonöszödön, továbbá 2006-ban a 16. Európai Immunológus Kongresszuson Párizsban számoltunk be. Ennek megfelelően 12 magyar nyelvű, 4 angol nyelvű kongresszusi összefoglaló valamint 3 referált folyóiratban megjelent kongresszusi összefoglaló követi nyomon a kísérletek eredményeit. A projekt eredményeiből 6 tudományos diákköri dolgozat (ebből 2 OTDK díjazott) született. Két cikkünk jelent meg 2006-ban a membrán lipid szerveződése és az antigén bemutató képesség összefüggéseiről illetve a kifejlesztett koleszterin specifikus monoklonális ellenanyagok részletes karakterizálásáról. Két további cikkünk pedig a TH hibridómák aktivációs tulajdonságainak összehasonlításáról illetve az antigén bemutató képesség és a monocita/makrofág sejtek fenotípusának és membrán jellemzőinek összefüggéséről pedig előkészületben van.