

Részletes szakmai beszámoló a F49164 jelű OTKA pályázathoz

Cím: Koleszterint felismerő monoklonális IgG ellenanyagok karakterizálása

Témavezető: Dr. Cervenak László

Bevezetés

A pályázat célja az általunk előállított, koleszterint felismerő, IgG izotípusú monoklonális ellenanyagok részletes jellemzése, leukociták és endotél sejtek működésére gyakorolt hatásuk vizsgálata.

Régóta ismert, hogy a szervezet képes olyan ellenanyagokat termelni, amelyek nagy affinitással kötődnek a koleszterinhez. Nyulak, egerek és egészséges emberek szérumában kimutatható koleszterinnel reagáló ellenanyag (ACHA), azonban termelődése, szabályozása, valamint fiziológiás/patológias jelentősége kevésbé felderített, annak ellenére, hogy a kontrollokhoz képest különbség mutatható ki szívbetegek és stroke-os betegek ACHA szintjében [1]. Az ismereteink hiánya leginkább két metodikai okra vezethető vissza. Egyrészt, nehéz megőrizni a koleszterint, mint antigént mikroszkópos és szilárdfázisú enzim-immunassay (ELISA) vizsgálatokban; a legtöbb fixálási módszer vagy kioldja a koleszterint a membránokból és lipoproteinekből, vagy módosítja az epitóp szerkezetét. Másrészt, eddig az irodalomban csak két, IgM izotípusú monoklonális ACHA-t írtak le [2,3]. Az IgM izotípusú ellenanyagokat nehezebb tisztítani, mint az IgG-eket, kevésbé alkalmasak affinitás meghatározásra, könnyebben bomlanak le tárolás alatt, és nagy méretük megnehezíti a diffúziót.

Elsőként hoztunk létre IgG izotípusú monoklonális ACHA-kat hibridóma technika segítségével, koleszterin tartalmú liposzómákkal immunizált egerek B sejtjeiből. Két klónt választottunk ki (AC1 és AC8), amelyek nagy affinitással kötődnek koleszterinhez, ELISA módszerrel vizsgálva. Jelen OTKA pályázat célja ezen új monoklonális ellenanyagok pontos és részletes karakterizálása az alábbi célkitűzések szerint:

- Nagy mennyiségű monoklonális ACHA tisztítása hibridóma sejt kultúra felülűszóból
- A koleszterin/ tisztított mACHA-k affinitásának meghatározása
- A tisztított mACHA-k epitópspecificitásának feltérképezése különböző szterolok segítségével
- A mACHA-k lipoprotein (LDL, VLDL, HDL) felismerésének analízise
- A mACHA-k sejtekhez (endotél, leukocita) való kötődésének vizsgálata
- A mACHA-k endotél sejtek működésére gyakorolt hatásának tanulmányozása

1. Célkitűzés

Nagy mennyiségű monoklonális ACHA (mACHA) tisztítása hibridóma sejt kultúra felülűszóból

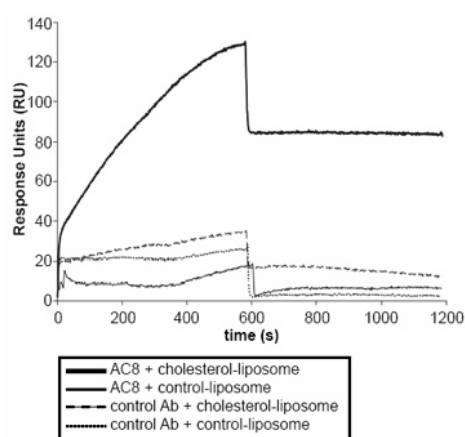
A karakterizáláshoz és a további kísérletekhez szükséges ellenanyagot két metodikával állítottuk elő. A karakterizáláshoz költséghatékonyabb módszerrel, hibridóma felülűszóból indultunk ki. A felülűszót Protein G kapcsolt Sepharose 4B oszlopon, affinitás-kromatográfiával tisztítottuk (pH gradiens segítségével), majd a tisztítás hatásfokát PAGE módszerrel határoztuk meg. Minden preparátumunk min. 95%-os tisztaságú IgG-t tartalmazott, ami messzemenően megfelel az irodalmilag elvárható tisztaságnak. Amikor a

sikeres karakterizálás után (ld. 2., 3. és 4. célkitűzésnél) kiderült, hogy mACHA-k számos kedvező tulajdonsággal rendelkeznek, nagy mennyiségű ellenanyag előállítását végeztünk egér aszciteszből, a fentihez hasonló tisztítással, amelyet megelőzött egy ammónium-szulfátos kicsapási lépés.

2. Célkitűzés

A koleszterin/ tisztított mACHA-k affinitásának meghatározása

Az affinitás meghatározásához két módszert alkalmaztunk. Először koleszterin-fedett ELISA lemezen meghatároztuk az ellenanyagok fél-maximum reaktivitását, amelyből kitűnt, hogy az AC8 erősebben kötődik a koleszterinhez. Emiatt, bár a karakterizálás számos módszerét mindkét mACHA-ra elvégeztük, kísérleteink nagy részében az AC8-ra koncentráltunk. SPR módszerrel vizsgálva is csak ez utóbbinál sikerült az affinitást meghatározni (1. ábra). A k_{off} disszociációs sebesség $1,6 \pm 0,5 \times 10^{-5} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$, a k_{on} asszociációs sebesség $205 \pm 8 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ volt, amelyből a számított disszociációs állandó (K_D) $78 \pm 27 \text{ nM}$ -nak adódott [4]. Ez egy közepesen nagy affinitást jelent nem-fehérje antigének esetén.



3. Célkitűzés

A tisztított mACHA-k epitópspecifitásának feltérképezése különböző szterolok segítségével

Lényeges kérdés, hogy az irodalomban az IgM izotípusú mACHA-khoz hasonlóan, vagy attól eltérően reagálnak ellenanyagaink különböző szterol alapvázú molekulákkal, illetve más lipidekkel. Ennek megválaszolására 7 szterol és 4 nem-szterol típusú lipiddel fedtünk ELISA lemezeket, majd mértük ellenanyagaink reaktivitását (ld. [5], table 1.). Megállapítottuk, hogy csak a szabad 3'-β-OH csoportot tartalmazó szterolokat ismer fel mindkét ellenanyagunk, de bizonyos funkciós csoportok megléte gátolja a szterol/mACHA kapcsolódást. Így a 25-OH-koleszterinnel egyik ellenanyagunk sem reagált szabad 3'-β-OH csoportja ellenére. Nem-szteroid lipidekkel semmilyen reakciót nem figyeltünk meg.

4. Célkitűzés

A mACHA-k lipoprotein (LDL, VLDL, HDL) felismerésének analízise

Erősen hidrofób tulajdonságuk miatt sem a koleszterin, sem a többi általunk vizsgált szabad 3'-β-OH csoportot tartalmazó szterol nem található meg oldott formában szervezetünkben. A koleszterin extracelluláris transzportja lipoproteinekkal történik. Ezért kíváncsiak voltunk, vajon a mACHA-k képesek-e reagálni különböző lipoproteinekkal. Kompetitív ELISA módszerrel kimutattuk, hogy mind a HDL-lel, mind az LDL-lel, mind pedig a VLDL-lel reagálnak ellenanyagaink. Ellentétben az irodalomban leírt IgM mACHA-kkal, a mi IgG3

ellenanyagainknak mindhárom lipoproteinhez közel hasonló volt az affinitásuk (Izd.[5], fig.2.). A kötődést tovább igazoltuk FRET módszerrel, ahol a lipoproteinekbe beépülő Bodipy-C₅-HPC és Alexa555-AC8 ellenanyagunk között nagy energiáttranszfert ($E_{\max} \sim 0,4$) tudtunk kimutatni, így igazoltuk, hogy a lipoproteinek lipid része az ellenanyag célpontja.

5. Célkitűzés

A mACHA-k sejtekhez (endotél, leukocita) való kötődésének vizsgálata

Koleszterinben rendkívül gazdag területek a sejtek plazmamembránjának raft és caveola mikrodoménjei. Raftok vizsgálatára elfogadott rendszerek különböző leukocita modellek (T sejt, monocita stb.) [6]. Az endotélsejtekben pedig caveolák figyelhetők meg nagy mennyiségben [7]. Minthogy ezen sejt típusoknál a koleszterin anyagcsere megzavarása (akár a szintézis gátlása pl. statinokkal, akár a koleszterin kivonása metil- β -ciklodextrinnel vagy filipinnel) funkcionális következményekkel jár, ezért kiemelkedő jelentőségűnek ítéltünk meg annak eldöntését, hogy a mACHA-k képesek-e kötődni a koleszterinhez a sejtek membrán mikrodoménjeiben. Modellként egér T és B limfocitákat, valamint humán T limfocitákat, monocitákat és endotélsejteket alkalmaztunk. Áramlási citométerrel (FACS) és konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (CLSM) vizsgálva a sejteket megállapítottuk, hogy mindegyik leukocitához kötődnek a mACHA-k, azonban ez a kötődés gyenge, és gyorsan disszociál (összhangban a 2. célkitűzésnél bemutatott gyors k_{off} sebességi állandóval). Azonban lényegesen erősebb jelölődés volt kimutatható, ha a leukociták felszínét előkezeltük papainnal, ami a sejtmembrán fehérjék leemésztésével sztérikusan felszabadította a raftban lévő koleszterin epitópokat (Izd.[5], fig.3.) Érdemes megjegyezni, hogy a mACHA kötődés és a különböző sejt típusokban megfigyelhető raftok eltérő mennyisége között szoros korreláció volt. CLSM-ot használva kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk, amiből megállapítottuk, hogy a mACHA a raftokban található Cav-1 és Thy1 proteinekkel valamint a raft-markernek használt koleratoxin-B-vel (CTXB) erősen kolokalizál, míg nincs kolokalizáció más sejtalkotókkal (mag, Golgi, mitokondrium) ill. rafton kívüli membránfehérjékkel (CD2) (Izd. [5], fig.4). További bizonyítékot szolgáltat a kötődés specificitására, hogy a raftok koleszterintartalmának csökkentése (koleszterin-oxidáz, ill. filipin kezelés) a mACHA-k kötődését gátolta.

Endotélsejteket vizsgálva azonban nem találtunk kötődést. Többféle módszert alkalmazva (inkubációs idő és hőmérséklet változtatása, jelölés direkt jelölt ill. szekunder ellenanyag segítségével) sem tudtunk kimutatni mACHA-t a HUVEC sejtek felszínén sem hagyományos fluoreszcens mikroszkópiával, sem CLSM-pal. Szintén nem vezetett kötődéshez a sejtek papainos emésztése, ami leukociták esetében jól működött.

6. Célkitűzés

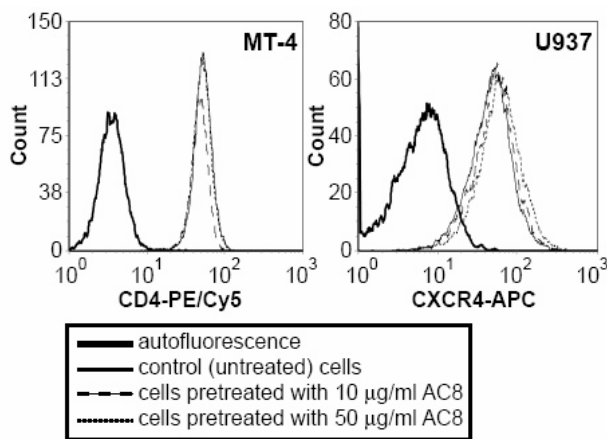
A mACHA-k endotélsejtek működésére gyakorolt hatásának tanulmányozása

Annak ellenére, hogy nem találtunk kötődést az endotélsejtekhez, megvizsgáltuk, hogy a mACHA-k befolyásolják-e az endotélsejtek életképességét. Ezt megelőzően összetett citotoxicitási tesztrendszert állítottunk be endotél sejteken [8], valamint az endotélsejtek funkcionális vizsgálatáról sok saját és irodalmi adatot gyűjtöttünk, ami egy hazai folyóiratban került publikációra [9]. (Ez az összefoglaló, bár fel van tüntetve benne az OTKA támogatás, nem járt költségekkel a jelen OTKA pályázat rovására. A publikáláskor még nem volt ismert, hogy a mACHA-k nem kötődnek az endotélsejtekhez, és így az itt felhalmozódott elméleti tudás nem kerül az OTKA pályázatban felhasználásra.) A citotoxicitási tesztben egyik mACHA sem bizonyult toxikusnak az endotélsejtek számára 24 óra alatt.

Minthogy azonban leukocitákon sikerült kimutatni a mACHA-k kötődését, így a célkitűzést módosítottuk:

A mACHA-k leukociták működésére gyakorolt hatásának tanulmányozása

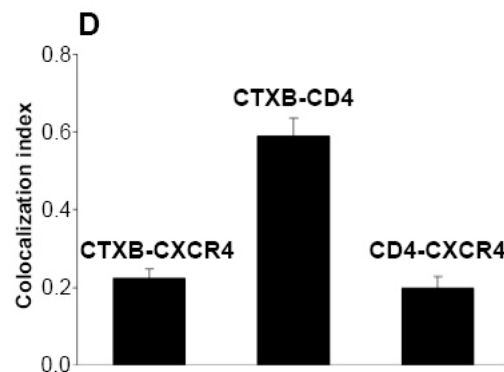
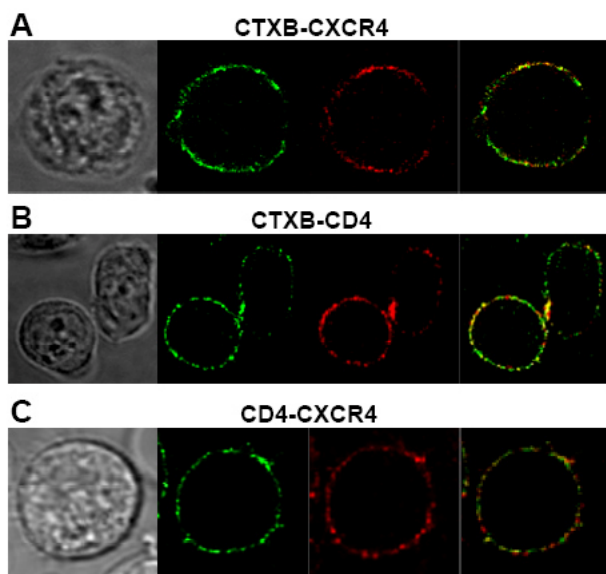
A leukociták működését több modellben is vizsgáltuk (T sejt jelátvitel, monocita/makrofág fagocitózis), de a legjobban körüljárt rendszerünk, ami egyben a legtöbb új információt hordozta a leukociták HIV fertőzésének vizsgálata volt [4]. A HIV, minthogy a gazdasejtből hozott membránnal rendelkezik, szintén hordoz koleszterint a felszínén. Ráadásul, a vírus kapcsolódásához és bejutásához a gazdasejt raftjainak átrendeződése szükséges [10], mert csak így kerülhet megfelelő közelségbe a raftban lokalizált CD4 és a rafton kívüli CXCR4. Első lépésben megnéztük, hogy a mACHA (AC8) gátolja-e az anti-CD4 ellenanyag kötődését MT-4 T sejtekhez, ill. az anti-CXCR4 ellenanyag kötődését U937 monocita sejtekhez (2. ábra). Egyik esetben sem figyeltünk meg gátlást, ezért feltételeztük, hogy a mACHA nem fedti el a HIV receptorait.



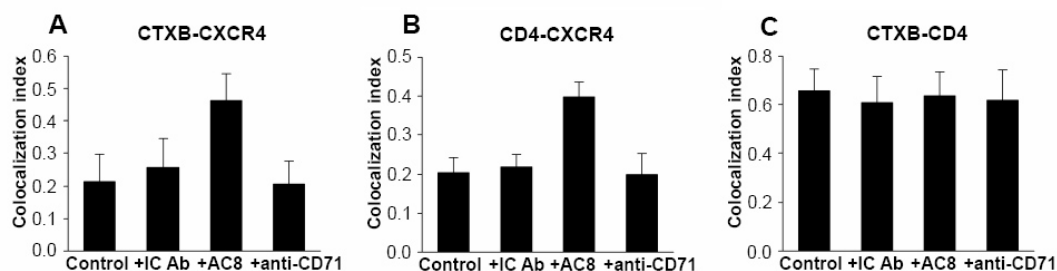
2. ábra

Ezután megvizsgáltuk, hogy miként hat az AC8 a CD4 és a CXCR4 egymáshoz viszonyított helyzetére. Alaphelyzetben a CXCR4 nem mutat kolokalizációt sem a CD4-gyel, sem a raft marker CTXB-vel (3. ábra), azonban AC8 hatására mindkettővel kolokalizál (4. ábra). (A CD4 / CTXB eleve kolokalizálnak, ezen molekulák membránbeli megoszlásán nem változtat az AC8.)

3. ábra

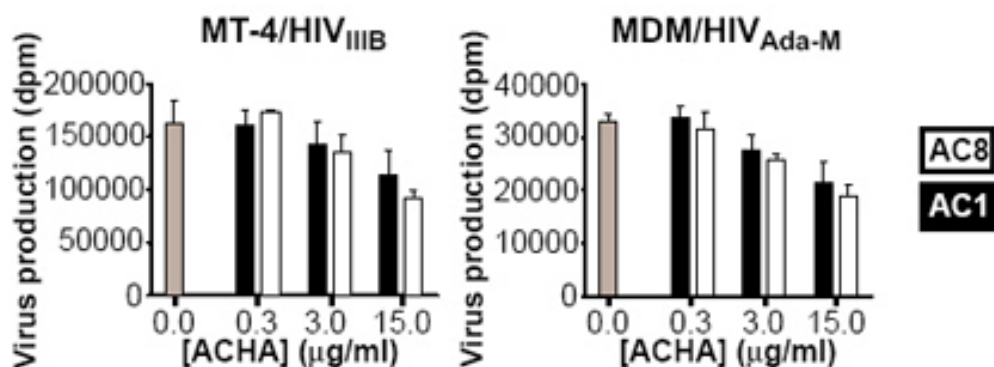


4. ábra



A mACHA-k membrán mikrodomének átrendeződésére gyakorolt hatása arra utalt, hogy érdemes megvizsgálni a HIV / célsejt kapcsolódás gátlását is. MT-4 T sejt vonalat és egészséges, HIV-szeronegatív donorokból preparált, PHA stimulált monocitákat használtunk célsejtként, amelyeket a HIV-1 X4 fenotípusú IIIB törzsével ill. R5 fenotípusú Ada-M törzsével fertőztünk. Amennyiben a sejteket a fertőzés előtt előinkubáltuk különböző koncentrációjú mACHA-kkal, szignifikáns, dóziszfüggő gátlást tapasztaltunk a vírustermelésben (5. ábra).

5. ábra



Érdekes módon a vírus előinkubálása mACHA-val nem eredményezett csökkent vírustermelést, amiből arra következtettünk, hogy a mACHA-k a sejtekhez, és nem a vírusokhoz kapcsolódnak. Ezt a hipotézist az is igazolni látszik, hogy sem az ACHA kimosása fertőzés után, sem a már fertőzött sejtek több napon keresztül folytatott ACHA kezelése nem módosított a csökkent vírustermelésen. (Az ACHA nem befolyásolta a sejtek életképességét. A vírustermelési teszt csak 1 szaporodási ciklust mér, tehát a hosszabb ideig tartó ACHA kezelés csak a vírus sejtekből történő felszabadulását gátolhatta volna, a visszafertőzést a teszt nem méri.)

Összegzés

Az általunk korábban létrehozott anti-koleszterin ellenanyagot termelő hibridómákból kiválasztottunk kettőt, amelyek nagy mennyiségben szekretáltak IgG3 izotípusú ellenanyagot, és ezek az ellenanyagok elővizsgálatokban erősen kötődtek koleszterinnel fedett ELISA lemezekhez. Miután megtermeltük és kitisztítottuk a szükséges mennyiségű ellenanyagot, elvégeztük a két ellenanyag (AC1 és AC8) részletes karakterizálását. Megvizsgáltuk az ellenanyagok lipid- ill. ezen belül szteroid specifitását, valamint a koleszterinnel való kapcsolat affinitását. Megtörtént a lipoproteinek és a mACHA-k reakciójának jellemzése is. Vizsgáltuk az ellenanyagok kötődését endotélsejtekhez és különböző leukocitákhoz. Minthogy a mACHA-k csak ez utóbbiakhoz kötődtek, a tervbe vett funkcionális tesztek leukocitákon hajtottak végre. Megfigyeltük, hogy a mACHA-k módosítják a HIV koreceptorként működő CXCR4 membrán lokalizációját, és feltehetően ennek hatására gátolják a HIV bejutását a célsejtekbe.

Eredményeinket 2 nemzetközi és 2 hazai konferencián adtuk elő, valamint 2 megjelent nemzetközi (pályázó egyikben megosztott elsőszerzős, másikban utolsó szerzős), 1 hazai közleményben tettük közzé (összesített impaktfaktor: 8,36), illetve 1 közleményt beküldtünk egy rangos nemzetközi folyóirathoz, ahol az jelenleg elbírálás alatt áll.

Felhasználhatóság, hozzájárulás a kutatási terület fejlődéséhez

A részletesen karakterizált ellenanyagoknak két felhasználási területét látjuk. Az egyik a raft-biológiában ill. lipidológiában eszközként történő alkalmazás. Minthogy több külföldi kutatócsoport is megkeresett minket az ellenanyag kipróbálása ügyében, előkészületeket tettünk nagy mennyiségű mACHA előállításra, valamint kidolgoztunk egy minőségellenőrzési protokollt. A másik terület a HIV biológia alap kutatása lehet. Bár terápiásan maguk a mACHA-k nem valószínű, hogy alkalmazhatóak lennének – minthogy a szervezetben mindenütt előforduló koleszterinnel ill. más szteroidokkal is reagálnak – de a receptorok és koreceptorok biofizikájának felderítése nagyban hozzájárulhat a HIV prevenció és ill. terápiás erőfeszítésekhez.

Referenciák

- [1] A. Horvath, G. Fust, I. Horvath, G. Vallus, J. Duba, P. Harcos, et al. Anti-cholesterol antibodies (ACHA) in patients with different atherosclerotic vascular diseases and healthy individuals. Characterization of human ACHA. *Atherosclerosis* 156 (2001) 185-192.
- [2] D. Perl-Treves, N. Kessler, D. Izhaky, L. Addadi. Monoclonal antibody recognition of cholesterol monohydrate crystal faces. *Chem Biol* 3 (1996) 567-577.
- [3] G.M. Swartz, Jr., M.K. Gentry, L.M. Amende, E.J. Blanchette-Mackie, C.R. Alving. Antibodies to cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 1902-1906.
- [4] Z. Beck, A. Balogh, A. Kiss, E. Izsépi, A. Bíró, G. László, et al. New cholesterol-specific antibodies remodel the surface of HIV-target cells and inhibit their in vitro virus production. *J Lipid Res* Submitted (2009).
- [5] A. Biro, L. Cervenak, A. Balogh, A. Lorincz, K. Uray, A. Horvath, et al. Novel anti-cholesterol monoclonal IgG antibodies as probes and potential modulators of membrane raft-dependent immune functions. *J Lipid Res* (2006).
- [6] M.A. Alonso, J. Millan. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* 114 (2001) 3957-3965.
- [7] G. Bathori, L. Cervenak, I. Karadi. Caveolae--an alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 21 (2004) 67-95.
- [8] M. Oroszlan, E. Herczenik, S. Rugonfalvi-Kiss, A. Roos, A.J. Nauta, M.R. Daha, et al. Proinflammatory changes in human umbilical cord vein endothelial cells can be induced neither by native nor by modified CRP. *Int Immunol* 18 (2006) 871-878.
- [9] L. Cervenak. Az endothelsejtek immunológiai funkciója. *Magyar Immunológia* 6 (2007) 7-15.
- [10] J. Fantini, N. Garmy, R. Mahfoud, N. Yahi. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med* 4 (2002) 1-22.