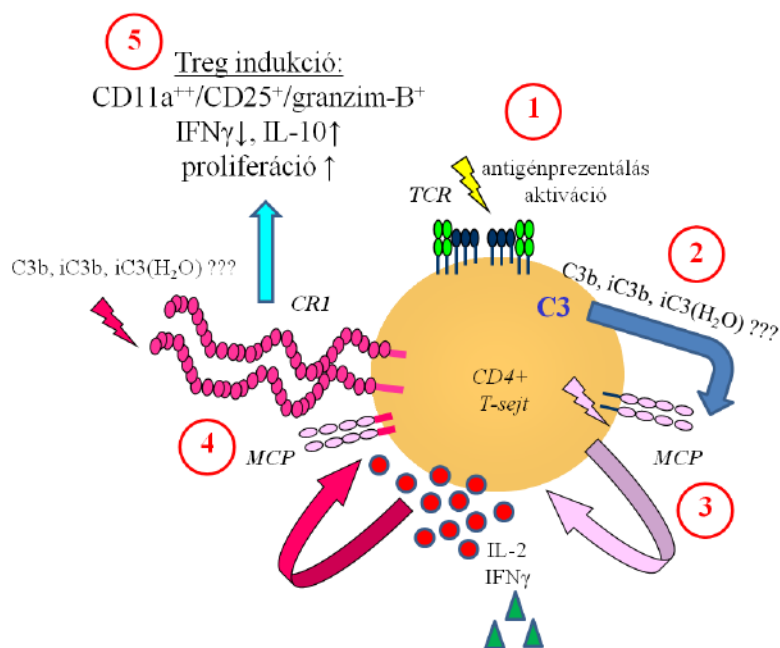


Doktori értekezés tézisei

Az 1-es típusú komplementreceptor (CR1/CD35) kifejeződése és szerepe emberi T-sejteken



Török Katalin

Témavezető: Prof. Erdei Anna, tanszékvezető egyetemi tanár

ELTE TTK Biológiai Intézet
Immunológia TanszékELTE TTK Biológia Doktori Iskola
Doktori Iskola Vezető: Prof. Erdei Anna
Immunológia Program
Programvezető: Prof. Erdei Anna

2014

Bevezetés

Munkánk során az adaptív immunrendszer elemei közé tartozó T-limfociták és a veleszületett immunitás egyik fontos elemének, a komplementrendszernek a kapcsolatát vizsgáljuk. Egyre több olyan publikáció jelenik meg a szakirodalomban, amely a - mind evolúciós szempontból, mind pedig funkcióját tekintve egymásra épülő - veleszületett és adaptív immunitás egymásra ható, egymás működését szabályozó, szoros kapcsolatának egy-egy részletét tárja fel.

Az egyes típusú komplementreceptor (CR1/CD35) funkcióját tekintve munkacsoportunk bizonyította, hogy – a már ismert, a komplementrendszer működésének szabályozásában való részvétel mellett – gátolja a B-sejt receptoron (BCR) keresztüli aktivációt mind fiziológiásan, mind autoimmun betegségek esetében. Kimutattuk azt is, hogy SLE-ben (Systemic Lupus Erythemathosus) a memória B-sejteken nem jelenik meg a CR1 fokozott mennyiségben – szemben a fiziológiás körülményekkel -, amely eltérésnek szerepe lehet az autoimmun folyamat patogenezisében. T-limfocitákon a CR1 megjelenése, kifejeződésének körülményei és a komplementreceptor funkciói tisztázatlanok. Ugyanakkor feltételezhető, hogy a CR1 a hatását T-sejteken - hasonlóan a B-limfocitákhoz - szintén az aktivációs folyamatok gátlásának közvetítésével fejti ki.

A komplementrendszer elemei tehát - főként a harmadik komponensének (C3) aktivációs termékei - a limfociták felszínén kifejeződő receptorokhoz kötődve, a veleszületett immunitás során betöltött szerepükön túlmenően - fontos, a limfociták aktiválódását szabályozó folyamatokat is közvetítenek. Ezek nemcsak fiziológiásan, de immunpatológiai szempontból is nagy jelentőségűek lehetnek, továbbá a folyamat egyes elemei újabb terápiás beavatkozás célpontjául szolgálhatnak. Ezért fontos e folyamatok molekuláris mechanizmusának minél jobb megismerése és megértése.

Célkitűzések

Kutatócsoportunk vizsgálatainak középpontjában a komplementrendszer, illetve a komplementreceptorok immunsejtek működését befolyásoló hatása áll. A csoport munkájának emberi B-sejtek funkcióival kapcsolatos eredményei, valamint a legújabb szakirodalmi adatok alapján fontosnak tartjuk, hogy minél jobban megismerjük a humán T-limfociták komplementtel való kölcsönhatásának mechanizmusát és következményeit is. Dolgozatom célja, hogy feltárjuk az egyes típusú komplementreceptor, a CR1 (CD35) emberi T-sejteken való kifejeződésének körülményeit, valamint a receptor C3-eredetű ligandumai keletkezésének módját és funkcióját az adaptív immunválasz során. Célunk továbbá annak felderítése, hogy van-e kapcsolat a CR1 és az MCP (CD46) T-sejteken betöltött funkciója között – elsősorban a Treg sejtté való differenciálódás tekintetében -, mivel mindkét receptor fő liganduma a C3b fehérje.

Célkitűzéseink tehát a következők:

- A CR1 mRNS szintű megjelenésének vizsgálata emberi T-limfocitákon, reverz-transzkriptáz PCR (RT PCR) alkalmazásával.
- A CR1 fehérjeszintű megjelenésének kimutatása emberi T-limfocitákon, áramlási citometriával és konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal.
- A T-sejtek általi C3-termelés kimutatása mRNS- és fehérje-szinten.
- A CR1 ligandumának – a C3b-nek és az iC3b fragmentumnak – detektálása a T-sejtek felszínén áramlási citometriával és immunprecipitációval.
- A CR1 molekula és a T-sejtek felszínén megjelenő C3-fragmentumok azonosítása és funkcióinak megállapítása, az alábbiak szerint :
 - A késői aktivációs marker, az LFA-1 α -lánc expressziójának vizsgálata áramlási citometriával T-sejteken, amelyeket anti-CD3-mal aktiváltunk CR1-specifikus ellenanyag és a CR1 ligandumának (C3b illetve aggregált C3) jelenlétében.
 - A Treg sejtekre jellemző markerek megjelenésének követése áramlási citometriával Th sejteken, amelyeket anti-CD3-mal aktiváltunk CR1-specifikus ellenanyag és a CR1 ligandumának (C3b illetve aggregált C3) jelenlétében.
 - A CR1-specifikus ellenanyag és a CR1 ligandumának (C3b illetve aggregált C3) jelenlétében anti-CD3-mal aktivált T-sejtek proliferációjának követése triciált timidin beépülésének mérésével.

- A CR1-specifikus ellenanyag és a CR1 ligandumának (C3b illetve aggregált C3) jelenlétében anti-CD3-mal aktivált T-sejtek IFN γ és IL-10 termelésének meghatározása a sejtek felülúszójából, *Flow Cytomix kit* segítségével.
- Annak felderítése, hogy milyen kapcsolat van a két T-sejt felszíni membránstruktúra, a CR1 (CD35) és az MCP (CD46) között, mivel mindkettő természetes liganduma a C3b. Ezért megvizsgálom, hogy a CR1-en keresztüli stimulus hogyan befolyásolja a CD46 által közvetített Treg sejté váló differenciálódást.
- Végül célom a CR1 pozitív Th sejtek *in vivo* lokalizációjának meghatározása immunhisztokémiai módszerrel, tonzillából készített metszeteken.

Alkalmazott módszerek

- T-sejtek izolálása emberi vérből és garatmandulából (Cell Sorter, MACS) sejttenyésztés, sejtaktiválás
- dendritikus sejtek differenciáltatása emberi monocitákból
- allogén antigén-prezentációs rendszer
- áramlási citofluorimetria (FACS)
- T-sejtek U937 sejtekhez történő adherenciájának vizsgálata
- citokintermelés meghatározása (Flow Cytomix)
- T-sejtek proliferációjának meghatározása ^3H -timidin beépülése alapján
- reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT PCR)
- a C3 fehérje izolálása emberi szérumból, FPLC módszerrel
- a C3 fehérje hőaggregálása
- ellenanyag tisztítása hibridoma sejtek felülúszójából
- T-sejtek sejt felszíni fehérjéinek jelölése biotinnal
- immunprecipitáció, SDS-PAGE és Western blott
- garatmandula-metszetek immunhisztokémiai vizsgálata

Eredmények és megbeszélésük I:

A CR1 megjelenése humán T-sejteken

A T-sejtek CR1 kifejeződésére irányuló első vizsgálatok több mint harminc évre nyúlnak vissza, azonban az eredményeket tekintve a szakirodalom mégsem egységes. Ezért tartottuk fontosnak, hogy újravizsgáljuk az emberi T-sejteken a CR1 megjelenését és szerepét az újabb eredmények tükrében, a ma alkalmazható eszközök és módszerek alkalmazásával. A CR1 mRNS-ének kifejeződését és a fehérje sejtfelszíni megjelenését - mind a segítő (Th), mind a citotoxikus (Tc) T-sejt alpopulációk sejtejein egyértelműen bizonyítottuk. Ugyanakkor – hasonlóan a néhány korábbi publikációban leírtakhoz - mi is jelentős eltéréseket találtunk a CR1 sejtfelszíni kifejeződésének százalékos arányát illetően fiziológias körülmények között, illetve *in vitro* aktivációt követően. Ezeket az eltéréseket több kutatócsoport donorfüggettséggel magyarázza, mi azonban arra a megállapításra jutottunk, hogy ezen kívül más tényező is hozzájárulhat a jelentős egyéni különbségekhez. Többször tapasztaltunk ugyanis FACS-os méréseink során a teljes vizsgált populáción kismértékű CR1-expressziót, vagy nem egyértelműen azonosítható CR1⁺ alpopulációkat. Emiatt mi nem a CR1⁺ T-sejtek számának változását tüntettük fel *in vitro* aktiváció hatására, hanem Δ MFI-t számoltunk – ami a specifikus ellenanyag és az izotípus-kontroll kötődéséből adódó fluoreszcencia eloszlások auto-fluoreszcenciával korrigált középértékeinek különbsége – és így végeztük el a statisztikai analízist. Hangsúlyozzuk, hogy többféle monoklonális és poliklonális anti-humán CR1 ellenanyaggal vizsgáltuk a CR1 megjelenését a T-sejtek felszínén, és mindig hasonló eredményeket kaptunk.

Korábbi eredményeink és irodalmi adatok alapján felmerült, hogy az aktivált T-sejtek megtermelhetik a CR1 ligandumát, a C3b-t, aminek kötődése szintén befolyásolhatja a receptor ellenanyaggal történő kimutathatóságát. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a sejtekhez adott C3b kötődése már kis koncentrációban is csaknem felére csökkentette a FACS-szal detektált jelet. Következő lépésként ezért megvizsgáltuk, hogy a T-sejtek termelnek-e C3-at, és ha igen, az visszakötődhet-e a sejtmembránra. Igazoltuk, hogy az aktivált T-sejtek C3 fehérjét termelnek, amely döntően iC3b formában mutatható ki a sejtfelszínen.

Eredményeink tehát egyértelműen bizonyítják, hogy az endogén iC3b fragmentum hozzákötődik a sejtfelszínen aktiváció hatására fokozottan expresszálandó CR1-hez, és ez befolyásolja a komplementreceptor ellenanyaggal történő kimutathatóságát.

Eredmények és megbeszélésük II:

Az aktivált T-sejtek által termelt C3 és hatásai

Miután igazoltuk, hogy az aktivált T-limfociták mRNS szinten kifejezik a C3-at, megvizsgáltuk, hogy megjelenik-e a fehérje a sejt felszínén. Az iC3b neoepitópját felismerő ellenanyaggal jelentős mértékű iC3b depozíciót mutattunk ki az aktivált T-sejteken, amelyet más módszerrel és különböző ellenanyagok felhasználásával is megerősítettünk. Mivel az iC3b fragmentum a CR3 illetve CR4 integrin-típusú receptorok fő liganduma, megvizsgáltuk e receptorok megjelenését is, és azt találtuk, hogy a CR3 expressziója megnő aktiváció hatására mind a segítő, mind a citotoxikus T-limfociták felszínén, míg a CR4-é teljesen redukálódik. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy az aktivált T-sejteken elsősorban a CR3 integrinnek van funkcionális szerepe. Így a sejtadhézió vizsgálatához a CR3-at erősen expresszáló U937 humán monocita eredetű vonal sejtjeit alkalmaztuk, és az aktivált, a felszínükön iC3b-t hordozó T-sejtekkel való kölcsönhatást vizsgáltuk. Az adhéziót kialakító molekulák azonosítása érdekében a T-sejteket előkezeltük az iC3b neo-epitópját felismerő monoklonális ellenanyaggal, illetve a CR3 ligandumköti helyére specifikus TMG-6-5 monoklonális ellenanyaggal. *Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a T-sejtek felszínén megjelenő iC3b-fragmentum adhéziós molekulaként szolgál,* mivel az alkalmazott antitestek – elsősorban az anti-iC3b – szignifikánsan gátolták a T-sejtek U937-sejtekkel való konjugációját. Ezek után arra is kíváncsiak voltunk, hogy lehet-e az endogén iC3b-nek szerepe az antigénprezentáció folyamatában, hiszen a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtek, a DC-k felszínén jelentős számú CR3 molekula van jelen. Monocitákból *in vitro* körülmények között DC-t differenciáltattunk, amelyeket anti-CD3-mal előzetesen aktivált allogén T-sejtekkel tenyésztettünk együtt. A C3-fragmentumok szerepének vizsgálatához poliklonális anti-C3 F(ab')₂ fragmentumot, az iC3b neoepitópját felismerő ellenanyagot és a CR3 ligandumköti helyére specifikus ellenanyagot alkalmaztunk. A kokultúra összeállítása előtt vagy a T-sejteket, vagy a DC-eket, vagy mindkét sejtpopulációt kezeltük az antitestek keverékével, majd a T-sejtek proliferációját ³H-timidin beépülésének mérésével követtük.

Eredményünk szerint a T-sejtek specifikus ellenanyagokkal való előkezélése erősen gátolta a limfociták proliferációját, tehát az aktivált emberi T-sejtek által termelt endogén C3 molekulából keletkező, majd a sejt felszínre visszakötődő iC3b-fragmentum adhéziós molekulaként hatva serkenti az allogén T-sejtek proliferációját.

Eredmények és megbeszélésük III:

A CR1 szerepe T-sejteken

Korábban leírták, hogy a CR1-gyel rokon, a T-sejteken folyamatosan erősen expresszált MCP (CD46) molekula keresztükötése aktivált T-sejtek felszínén regulátor T-sejt (Treg) irányú differenciálódást indukál. Mivel a CR1 és az MCP elsődleges liganduma egyaránt a C3b komplement-fragmentum, arra voltunk kíváncsiak, vajon van-e szerepe a CR1-nek az MCP által indukált Treg differenciálódási folyamatban.

Mivel korábban bizonyították, hogy a CR1 gátolja a T-sejtek anti-CD3-mal indukált aktivációját, elsőként azt tanulmányoztuk, hogy ez a gátlás vajon közvetlenül, vagy közvetett módon valósul-e meg. Ezért megvizsgáltuk a T-sejtek egy késői aktivációs markerének, a CD11a-nak az expresszióját. Mivel azonban nem találtunk csökkenést a kontrollokhhoz képest, feltételezzük, hogy a CR1-en keresztüli stimulus nem közvetlenül gátolja a T-sejtek TCR által mediált aktivációját. Ezért a következőkben a Treg sejtek markereinek expresszióját vizsgáltuk CR1-stimulus hatására, Th-limfociták alkalmazásával.

Eredményeink azt mutatják, hogy a CR1-en keresztüli stimulus hatására az anti-CD3-mal aktivált Th-sejtek – az MCP-vel párhuzamosan – erősebben expresszálják a CD25-öt, továbbá a CD25⁺CD11a⁺⁺ sejteken a CD11a expressziója szignifikánsan magasabb, mint a CD25⁻CD11a⁺⁺ sejteken. Mindez a Treg sejtek megjelenését igazolja. Hasonlóan meggyőző eredményre jutottunk a granzim-B kifejeződését illetően is, ugyanakkor a Foxp3 expressziójának tisztázása további vizsgálatokat igényel.

A különböző citokinek vizsgálata során igazoltuk, hogy a Th-sejtek IFN γ termelése csökken, az IL-10 termelése pedig fokozódik azokban az esetekben, amikor a CR1-et és/vagy az MCP-t - ellenanyaggal vagy ligandummal - specifikusan „célozzuk”. *A monoklonális anti-CR1 illetve anti-CD46 stimulusok együttes hatását vizsgálva arra az eredményre jutottunk, hogy a két receptor működése kapcsolt.* Ugyanis amikor mindkét receptort egyidejűleg stimuláljuk, akkor a mérési eredmények átlagai az egymástól függetlenül stimulált receptorok működése nyomán kapott eredmények átlagértékei közé esnek. Azaz a CR1 szerepet játszik az MCP esetében leírt Treg sejtek által termelt citokinmintázat kialakításában.

A limfociták proliferációját mandulából izolált sejtek esetében ³H-timidin beépüléssel vizsgáltuk, és fokozódást tapasztaltunk azokban az esetekben, amikor a T-sejteket CR1-en illetve MCP-n keresztül specifikus antitesttel vagy ligandummal stimuláltuk az anti-CD3 jelenléte mellett.

Eredmények és megbeszélésük IV:

A CR1⁺ Th-sejtek lokalizációja a mandulában

Végül fontos volt annak meghatározása, hogy az *in vitro* vizsgált T-sejt populációnak *in vivo* milyen körülmények között lehet a szerepe, hol helyezkednek el fiziológiásan a CR1⁺ Th-sejtek a tonsillában, a perifériás nyirokszervben. Immunhisztokémiai vizsgálataink során kettős fluoreszcens jelöléssel anti-CD4 és anti-CR1 ellenanyagok felhasználásával azt találtuk, hogy *a CR1⁺ helper T-limfociták a másodlagos nyirokszervek folliculusaiban, illetve a köpeny-zónában találhatók; vagyis ott, ahol közvetlen kölcsönhatásba kerülhetnek a B-sejtekkel, és kifejthetik a már ismert, B-sejt differenciálódást szabályozó funkcióikat.*

Összefoglalás

Eredményeink összegzéseként a következő modellt feltételezzük a Treg sejtek komplement általi indukciójának és működésének magyarázatára. A másodlagos nyirokszervekben a T-sejtek az antigénprezentáció révén aktiválódnak, és – egyéb ismert funkciók ellátása mellett - C3-at termelnek. A C3 molekula vagy spontán hidrolízis, vagy a gyulladás helyszínén aktiválódó komplementrendszer működése, vagy a sejtfelszíni, illetve intracelluláris enzimek általi hasítás eredményeként C3b-vé/iC3b-vé, illetve iC3(H₂O)-vé alakul, és ligandumként a T-sejtek felszínén megjelenő komplementreceptorokhoz kapcsolódik. Az iC3b elsőként a CD46-hoz és a CR3-hoz kapcsolódhat; utóbbin keresztül a proliferációt serkenti, míg a CD46-hoz való kötődés az IFN γ és az IL-2 citokinek termelését fokozza, és fenntartja az aktiválódási folyamatot egészen addig, amíg az IL-2 koncentráció lokálisan el nem ér egy adott, magas küszöbértéket. Ekkorra azonban, az aktivációs folyamatok előrehaladtával már a CR1 is fokozott mértékben expresszálódik a sejt felszínén, és ligandumának kötődése révén a CD46 mellett elősegíti a Treg irányú átkapcsolást. A CR1 intracelluláris része rövid, és mindössze egy tirozin-foszforilációs helyet tartalmaz, míg az MCP citoplazmás része kétféle lehet, és több tirozin foszforilációs hely is van rajta. Feltételezhető, hogy a közös ligandum kötődését követően a CR1 az MCP-vel közös jelátviteli útban vesz részt. Ezt követően a gyulladás helyszínén differenciálódó cTreg-ek elősegítik a B-sejt válasz kiteljesedését, miközben szuppresszálják az aktivált *bystander* T-sejteket, megakadályozva ezzel a krónikus gyulladásos folyamatok elhatalmasodását. Végül a Treg sejtek – IL-2 utánpótlás hiányában – anergiás állapotba kerülnek, majd elpusztulnak.

A CR1 és az MCP molekulák tehát a T-sejtes immunválaszt moduláló hatás közvetítése révén lehetséges terápiás célpontokat jelentenek, aminek krónikus gyulladásos megbetegedések, autoimmun betegségek, illetve a transzplantációs kilökődési reakciók kezelése során lehet jelentősége.

Publikációk

Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények

Török K., Kremlitzka M., Sándor N., Tóth E.A., Bajtay Zs., Erdei A. *Human T cell derived, cell-bound complement iC3b is integrally involved in T cell activation* IMMUNOLOGY LETTERS 143:(1) pp. 131-136. (2012)

Erdei A., Isaák A., Török K., Sándor N., Kremlitzka M., Prechl J., Bajtay Zs. *Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions.*

MOLECULAR IMMUNOLOGY 46:(14 Special Issue) pp. 2767-2773. (2009)

Török K., Bencsik A., Uzonyi B, Erdei A. *The role of complement receptor type 1 (CR1/CD35) in Treg differentiation of CD4+ human T lymphocytes*, sent for publication, (2014)

Publikált absztrakt

Erdei A., Torok K. *Modulation of human T cell function by exogenous and endogenous C3* IMMUNOBIOLOGY 217:(11) p. 1188. 1 p. (2012)

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Balogh A, Ádori M, Török K., Matkó J, László G *A closer look into the GL7 antigen: Its spatio-temporally selective differential expression and localization in lymphoid cells and organs in human* IMMUNOLOGY LETTERS 130:(1-2) pp. 89-96. (2010)