

Doktori értekezés tézisei

**A limfociták effektor funkcióinak szabályozása: Szteroid
membránlipidek és hormonok szerepe**



Espárné Schneider Andrea

Témavezető: Dr. Matkó János

ELTE TTK Biológiai Doktori Iskola

Doktori Iskola Vezető: Prof. Dr. Erdei Anna

Immunológiai Program

Programvezető: Prof. Dr. Erdei Anna

ELTE TTK Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék

Budapest, 2014.

Bevezetés

A biológia és orvostudomány előrehaladtával az emberiség egyre jobban megismerhette a szervek/szervrendszerek működését és az egyes élettani folyamatok mindinkább feltáruuló molekuláris részleteit. „*Diabolus in singulis est*”- mondhatni az „ördög a részletekben lakozik”. Az igazságért azonban néha érdemes visszatekinteni a nagyobb egységek felé. Példaként említhetjük az immunfolyamatok szabályozását, amely az immun-, endokrin- és központi idegrendszerek kétirányú, kölcsönös kapcsolatai révén sokkal komplexebb, mint gondolnánk.

Ismert, hogy egyes autoimmun betegségek jelentős megoszlásbeli különbséget mutatnak a nemek között. Többek között ez hívta fel a figyelmet az ösztrogén (17β -ösztradiol, röviden E2) immunrendszerre gyakorolt esetleges hatására. Noha tényként kezelhetjük, hogy az ösztrogén aktuális mennyisége hatással van az immunrendszerre és befolyásolja az immunválasz kimenetelét, a hatásmechanizmus részletei még korántsem tisztázottak. Ám a tért hódító hormon tartalmú orvosságok, fogamzásgátlók és hormonpótló

terápiák biztonságos alkalmazása érdekében elengedhetetlen ezen folyamatok részletes megismerése.

Célkitűzések

1) Munkcsoportunk korábban kimutatta, hogy az E2-BSA (marha szérum albuminnal kovalensen konjugált, membrán impermeábilis E2) kötődik a limfociták membránjához és gyors, nem-genomiális hatásokat indukál bennük. Így elsődleges terveink között szerepelt ezen ligandum membrán receptorának/receptorainak (mER) karakterizálása, ill. a klasszikus receptorok esetleges membrán asszociált formáinak kimutatása.

2) Adatbázisból terveztük a szex szteroid-kötő motívummal rendelkező fehérjék szűrését, majd ezek ösztrogénkötő képességének vizsgálatát. Továbbá terveink között szerepelt az ismert ösztrogén receptorok hidrofobicitási tulajdonságainak elemzése, amely alapján következtethettünk azok esetleges transzmembrán lokalizációs képességére.

3) A membrán ösztrogén receptor (mER) a funkcionális szerepe még nem ismert, ezért vizsgálni kívántuk a mER működésének dinamikáját (internalizációs, reciklizáció). Terveink között szerepelt továbbá a nőstény egerek ciklusának hormonkezeléssel történő szinkronizálása, majd áramlási citofluorimetria segítségével annak eldöntése, hogy a változó hormonszint hatással van-e a különböző ösztrogén receptorok expressziós mintázatára.

4) Mivel irodalmi adatok alapján a sejtmembrán koleszterin tartalma limitálólag hat az eritrociták és mesterséges modell rendszerben a liposzómák passzív E2 „felvételére” is, ezért vizsgálni kívántuk, hogyan viszonyul a mER a plazmamembránban lévő, dominánsan koleszterinben gazdag lipid raftokhoz.

5) A különböző ösztrogén receptorok feltehetően eltérő jeleket közvetítenek a sejtek számára, így nagyban meghatározó lehet az egymáshoz viszonyított expressziós arányuk. Ezért szeretnénk volna feltárni a citoplazmatikus- és membrán receptorok fehérje szinten kimutatható expressziós mintázatát az egyes limfocita alpopulációkban, ill. a

genomiális- és nem-genomiális utak közötti kapcsolat jobb megértése érdekében céljaink között szerepelt az mER-en keresztül közvetített E2 jelnek a klasszikus receptorok celluláris eloszlására/lokalizációjára kifejtett hatásának vizsgálata is.

6) Vizsgálni kívántuk a membrán permeábilis és impermeábilis E2 ligandum alkalmazásával is az ösztrogén limfociták proliferációjában betöltött szerepét. Ezáltal különbséget téve a mER által közvetített jelek, és az általános - minden receptort érintő - E2 hatások között.

7) *In vitro* rendszerben is vizsgálni kívántuk az E2 és E2-BSA ellenanyagtermelésben betöltött szerepét.

8) Vizsgálni kívántuk, hogy az SHBG-nek, mint hormon szállító fehérjének lehet-e szerepe az E2 limfocitákra gyakorolt hatásában.

Alkalmazott módszerek

- Lépsejtek és timociták izolálása egerekből, ill. ezek populációinak szeparálása MACS és FACS módszerrel

- Nőstény egerek ciklusának szinkronizálása PMSG és HCG oltással
- Belső minták E2 és P4 hormonszintjének meghatározása RIA módszerrel
- Áramlási citofluorimetria (FCM)
- Konfokális lézerpasztázó mikroszkópia (CLSM), kolokalizáció analízis
- Western blot
- ELISA
- [H^3] timidin beépülésen alapuló sejtproliferáció mérése
- Fotohalványodási kinetika mérésen alapuló Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer (pbFRET)

Eredmények

- Feltártuk az ER α , ER β , GPR30 és mER limfocita sejtpopulációkon belüli expressziós mintázatát.
- Kimutattuk, hogy az ER α és ER β plazmamembrán asszociált formában is léteznek, és feltehetően közös raft mikrodoménben helyezkednek el az mER-el.

- Leírtuk, hogy a mER ligandum kötés után aktin citoskeleton által mediált módon, az endo-lizoszómális úton gyorsan internalizálódik, majd reciklizál.
- Ciklus szinkronizált nőstény egereken végzett méréseink alapján az ismert ösztrogén receptorok expressziós mintázata és lokalizációja erős ösztrogén függést mutat.
- Kimutattuk, hogy a mER és a citoplazmatikus ösztrogén receptorok (E2) által mediált folyamatok eltérő hatással vannak a limfocita proliferációra és a T-dependens IgG izotípusú ellenanyagok termelésére. A mER főleg pozitív jeleket közvetít a sejtek számára.
- Limfoid sejtvonalakon és primer sejteken is kimutattuk a megalin expresszióját és az SHBG (szex hormon kötő globulin) kötődését, így a pbFRET eredményeinkkel egybevetve az SHBG valószínűleg egy alternatív membrán ösztrogén receptorként is funkcionálhat.

Megbeszélés

Összegzésül elmondhatjuk, hogy az ösztrogénnek egy komplex, dinamikus receptor hálózatát mutattuk ki

limfocitákban; ebben a három ismert receptor gén családnak (ER α , ER β , GPR30) több különböző citoplazmatikus, vagy membrán-asszociált (módosított) formája vesz részt. Ezek a receptorok egyaránt hathatnak transzkripciós faktorokként a sejtmagba kerülve, ill. plazmamembrán lipid raftokhoz asszociáltan feltehetően gyors ösztrogén indukálta jeleket is közvetíthetnek. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a különböző ösztrogén receptorok lokalizációja erősen függ a mER-en keresztül közvetített E2 jeltől, ez egy közvetett bizonyíték a genomiális és nem-genomiális út közötti kapcsolatra. Feltehetően a fent említett receptor formák eltérő jeleket közvetítenek a sejtek számára; amely az E2-mediálta sejtszintű expressziójuktól és sejten belüli lokalizációjuktól függően különböző módokon valósulhat meg. Ennek a komplex E2-receptor hálózatnak és funkcionális szerepének, valamint az SHBG és annak receptorának - mint új, potenciális E2 jel közvetítőnek - részletesebb feltárása segíthet minket olyan mechanizmusok mélyebb megértésében, mint pl. hogy az E2 miért jelent egyes autoimmun betegségekben rizikófaktort. A további vizsgálatok hozzájárulhatnak olyan biztonságosabb orális

fogamzásgátlók és hormonpótló terápiák kidolgozásához, ahol kevésbé kellene tartani az immunrendszer „kisiklásától”.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Mónika Ádori*, Endre Kiss*, Zsuzsanna Barad, Klaudia Barabás, Edda Kiszely, Andrea Schneider, Erna Sziksz, Dorottya Kövesdi, István M. Ábrahám, János Matkó, Gabriella Sármay. **Estrogen augments the T-cell-dependent but not the T-independent immune response *in vivo* and induces rapid non-classical effects on B- and T-Cells.** Cell Mol Life Sci, (2010) 67:1661–1674 (IF: 7.047)

Andrea E. Schneider, Éva Kárpáti, Kitti Schuszter, Eszter A. Tóth, Endre Kiss, Margit Kulcsár, Glória László, Janos Matko. **A dynamic network of estrogen receptors in murine lymphocytes: fine-tuning the immune response** Journal of Leukocyte Biology (2014) (in press) (IF: 4.568)

Egyéb közlemények:

Máté Maus, David Medgyesi, Endre Kiss, Andrea E. Schneider, Ágnes Enyedi, Nóra Szilágyi, János Matkó, Gabriella Sárma. **B cell receptor-induced Ca²⁺-mobilization mediates F-actin rearrangements and is indispensable for adhesion and spreading of B lymphocytes** Journal of Leukocyte Biology (2013) Apr. 93(4):537-47. (IF:4.568)

Konferencia absztraktok és előadások:

E. Kiss, M. Ádori, Zs. Barad, K. Barabás, E. Kiszely, A. Schneider, D. Kövesdi, I. Ábrahám^{2,4}, G. Sármay^{1,3}, J. Matkó: „Estrogen regulates T-dependent humoral immune response and exerts rapid, non-genomic effects on B- and T lymphocytes.” *15th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System (Balatonöszöd, 2009)*

Schneider Andrea, Kiss Endre, Ádori Mónika, Ábrahám István, Matkó János **Funkcionális membrán ösztrogén receptor Limfocitákon, 39. Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlése, 2010. november 3-5., Szeged**

Schneider Andrea, Kiss Endre, Ádori Mónika, Ábrahám István, Matkó János **Funkcionális membrán ösztrogén receptor Limfocitákon**, „*Universitates Nostrea- Scientia Nostra*”, az *ELTE fenállásának 375. évfordulója alkalmából az Eötvös Loránd Tudományegyetem és a Semmelweis Egyetem közös ünnepi ülése, 2010 november 18., Budapest*

Sármay Gabriella, Ádori Mónika, Kiss Endre, Barad Zsuzsanna, Barabás Klaudia, Kiszely Edda, Schneider Andrea, Sziksz Erna, Kövesdi Dorotty, Ábrahám István, Matkó János **Az ösztrogén fokozza a T-sejt függő, de nem befolyásolja a T-independens immunválaszt, és gyors nem-genomiális változásokat vált ki T- és Bsejtekbén**, *Magyar Farmakológiai Anatómus Mikrocirkulációs Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, 2011. június 8-11., Pécs*

Andrea Schneider, Kitti Schuszter, Endre Kiss, Glória László, János Matkó **Membrane estrogen receptor(s) on lymphocytes: Who are they and can they regulate the immune responses? Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies (1st IMPULSE)**, 2011. szeptember 3-6., Visegrád

Schneider Andrea, Schuszter Kitti, László Glória, Matkó János, **Az ösztrogén szex hormon, mint immunmoduláns: funkcionális membrán receptor limfocitákon** *Centrumban a tudás, TÁMOP konferencia az Eötvös Loránd Tudományegyetemen, 2011. november 24., Budapest*

E. Schneider Andrea, Schuszter Kitti, László Glória, Matkó János, **Limfociták membrán ösztrogén receptora: kapcsolat a genomiális és nem-genomiális útvonalak között**, *41. Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlése, 2012. október 17-19., Debrecen*

Andrea E. Schneider, Éva Kárpáti, Kitti Schuszter, Glória László, János Matkó, **Membrane estrogen receptor(s) on lymphocytes: The linkage between the genomial and non genomial pathway**, *Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies (2nd IMPULSE)*, 2013. August 31-September 3, Mátraháza, Hungary