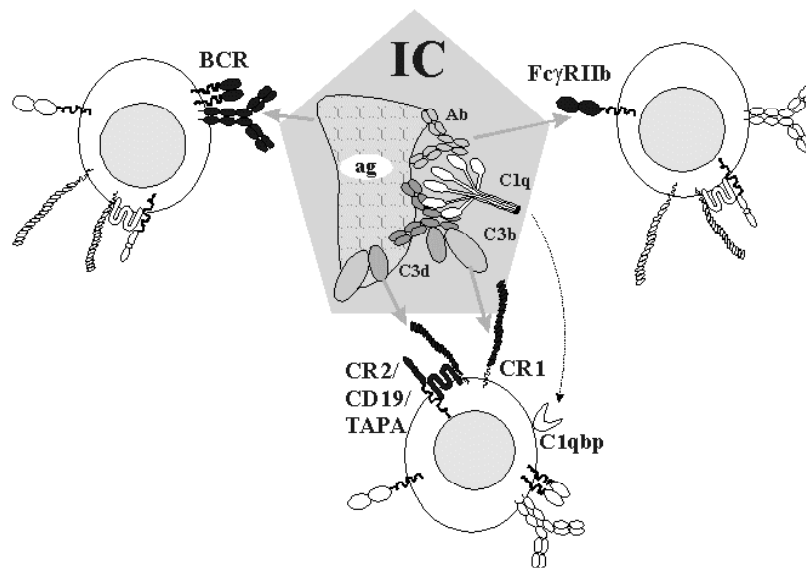


Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Immunkomplex-kötő receptorok kifejeződése és szerepe B-limfocitákon fiziológiás és autoimmun állapotokban

Isaák Andrea



Témavezetők:

Prof. Erdei Anna D.Sc. és Prof. Gergely János D.Sc.

Biológiai Doktori Iskola

Immunológia doktori program

Programvezető: Prof. Erdei Anna D.Sc.

ELTE TTK, Biológiai Intézet

Immunológiai Tanszék, Budapest, 2008

Bevezetés

Immunkomplexek képződése és eliminálása az immunhomeosztázis fenntartásának fontos eleme. Az immunrendszer nem megfelelő, ill. túlzott működése következményeként azonban az immunkomplexek kóros folyamatok előidézői is lehetnek. A B-sejt receptorhoz (BCR), Fc γ - és komplementreceptorokhoz kötődve a komplexek öszszetételétől függően eltérően modulálják a BCR-en keresztül kiváltott sejtaktivációt. Antigén-specifikus B-sejteken a CD19 molekulával komplexben megjelenő CR2 (CD21) pozitívan, míg a CR1 (CD35) és az Fc γ RIIb (CD32) receptorok negatívan szabályozzák a BCR-en keresztül kiváltott jelátvitelt.

Az utóbbi években igazolódott, főként a B-sejt depléciót célzó terápiák alkalmazásával, hogy a B-sejteknek kitüntetett szerepük van az autoimmun betegségek kialakulásában. Patogén szerepüket döntően autoantitest-termelésük, részben pedig ettől független mechanizmusok révén fejtik ki. Citokintermelésük által befolyásolják T-sejtek, valamint dendritikus sejtek működését. Állatmodellekkel végzett kísérletek igazolják, hogy az Fc γ - és komplementreceptorok expressziójában vagy funkciójában bekövetkező zavarok hajlamosító tényezőknek tekinthetők a betegség kialakulásában. Emberben az IC-kötő receptorok szerepe a B-sejt tolerancia fenntartásában nem teljesen tisztázott, miként az sem, hogy az eltérő differenciáltságú állapotban lévő B-sejt alpopulációkban hogyan befolyásolnak különböző sejt-funkciókat.

A B-sejt-tolerancia megszűnésének többféle lehetséges módját igazolták az utóbbi években SLE-ben. A B-sejt-tolerancia elvesztését T-sejtektől független mikrobiális eredetű poliklonális aktiváció is előidézheti, mely folyamat során a B-sejtekben is kifejeződő TLR-9 receptornak döntő szerepe van. Feltételezik, hogy egy gyulladásozó környezetben a bakteriális ill. emlős eredetű DNS az autoreaktív B-sejtekben a TLR-9 és a BCR keresztükötése révén képes hozzájárulni a B-sejt tolerancia megszűnéséhez. DNS-tartalmú immunkomplexek jelenléte SLE-ben felveti azt a kérdést is, hogy milyen módon modulálják a gátló IC-kötő receptorok az antigen által a BCR-en ill. a TLR-9 receptoron közvetített aktivációs jeleket.

Feltételezhetően fontos szerepük van az SLE kialakulásában és fenntartásában a memória B sejteknek is. Azt, hogy a különböző IC-kötő receptorok kifejeződése és funkciója miként változik az egyes alpopulációk esetében, eddig még nem vizsgálták sem autoimmun betegek, sem egészséges egyének esetében.

Célkitűzések

1. Mivel autoimmun egérmodellekben végzett kísérletek eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy az Fc γ -és komplementreceptoroknak fontos szerepük van az SLE kialakulásában, egészséges donorokból ill. SLE-s betegekből származó B-sejteken kívántuk összehasonlítani ezen IC-kötő receptorok expressziós mintázatát. Továbbá terveztük megvizsgálni, hogy a betegség aktivitása hogyan befolyásolja e receptorok megjelenését.
2. Az Fc γ RII és a komplementreceptorok (CR1/CR2) kifejeződését különböző B sejt alpopulációkon eddig egészséges donorokban sem vizsgálták. Ez alapján célul tűztük ki, hogy a CD27 mint memória B sejt marker és a sejtfelszíni Ig expressziója alapján elkülönített naív, IgM⁺ és izotípusváltáson átesett IgM⁻ memória B-sejteken ill. plazmablasztokon vizsgáljuk az IC-kötő receptorok expresszióját.
3. Munkacsoportunk korábbi eredménye szerint az 1-es típusú komplementreceptor humán B-sejteken gátló hatású a BCR által kiváltott proliferációra. Ennek továbbvizsgálása érdekében kívántuk összehasonlítani a CR1 receptor gátló szerepét egészséges donorokból származó naív és memória B-sejteken, valamint hatását SLE-s betegekből nyert B-sejteken.

4. Célunk volt annak megállapítása is, hogy a CR1 kereszt kötése a megfelelő citokinek jelenlétében hogyan befolyásolja egészséges donorokból szeparált memória B-sejtek BCR-indukált plazmablaszt differenciációját.

5. Tervünk volt továbbá, hogy megvizsgáljuk a CR1 receptor moduláló hatását egy antigéntől független aktivációs útvonalra, melyet a TLR-9 receptoron keresztül CpG oligonukleotidok segítségével váltottunk ki.

Alkalmazott módszerek

- ELISPOT
- Áramlási citofluorimetria
- ELISA
- Western-blot
- Fehérje mRNS meghatározása RT-PCR-rel
- Sejtproliferáció vizsgálata H³ timidin beépülésének mérésével
- SDS poliakrilamid gélelektroforézis
- C3 preparálása HPLC-vel
- B-sejt tisztítás, memória B sejt szeparálás
-

Eredmények

1. Egészséges donorokból és SLE-ben szenvedő betegekből származó B-sejteken vizsgáltuk az IC-kötő Fc γ -és komplement receptorok sejtfelszíni megjelenését. Mind az Fc γ RII mind a komplement receptorok expressziójában szignifikáns csökkenést találtunk SLE-s betegekből származó B-sejteken. A CR1 és az Fc γ RII receptorok esetében a betegség aktivitása nagymértékben befolyásolta a sejtfelszíni megjelenést, a CR2 receptor vizsgálatokor azonban nem volt szignifikáns eltérés az aktív és az inaktív csoport között. Az SLE-s csoportban az aktivitástól függetlenül elkülöníthető egy csoport, amely betegeken a CR2 kisebb mértékben fejeződik ki a B sejteken.

2. Egészséges donorokból származó IgM⁺ és izotípusváltáson átesett IgM⁻ memória B-sejteken a gátló CR1 és az Fc γ RII megjelenése fokozott mértékű volt a naív sejtekhez hasonlítva. Míg a CR1 esetében e tekintetben nem találtunk különbséget az IgM⁺ és IgM⁻ memória populáció között, addig az Fc γ RII expressziója magasabb volt az IgM⁺ memória sejteken. A CR2 esetében nem találtunk receptor up-regulációt a memória sejtek populációjában.

Aktív SLE-ben szenvedő betegeket vizsgálva azt találtuk, hogy a CR1 és az Fc γ RII gátló receptorok memória sejtekre jellemző fokozott megjelenése hiányzik; szintjük a naív sejteken található expresszió mértékével azonos. A CR2 csökkenés azonban a naív és a memória

populációt egyaránt érintette. Az irodalommal megegyezően a $CD27^{high}/sIg^{low}$ plazmablaszt populáció arányában nagymértékű növekedést tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest. Az IC-kötő receptorok megjelenése ezeken a sejteken az egészséges donorok esetében tapasztaltakhoz hasonlóan minimális. Longitudinális vizsgálataink arra utalnak, hogy az SLE-ben szenvedő betegekben található receptorcsökkenés a CR1 és az Fc γ RII esetében átmeneti jellegű.

3. Funkcionális vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy egészséges donorokból izolált memória B-sejtek BCR indukált proliferációja a naív sejtekhez képest kevésbé gátolható a CR1 receptor keresztkötése által. Ebben szerepe lehet a memória sejteken található általunk kimutatott CR1 up-regulációnak is. SLE-s betegekből izolált csökkent CR1 expressziót mutató B-sejteket vizsgálva a kontrollhoz képest nem találtunk különbséget a CR1 által kiváltott gátlás mértékében.

4. In vitro körülmények között IL-2/IL-10 citokinek jelenlétében BCR keresztkötés hatására a memória B-sejtek egy része $CD27^{high}/sIg^{low}$ fenotípusú ellenanyag termelő plazmablaszt sejtekké differenciálódik. A differenciáció mértékében nem volt szignifikáns különbség az IgM és az IgG memória populáció között. Megállapítottuk, hogy míg a naív és a memória B-sejtek BCR-indukált proliferációját a CR1 receptor keresztkötése gátolja, addig a receptor aggregációja nem befolyásolta a BCR-indukált plazmablaszt differenciációt.

5 A CR1 által közvetített gátlás mértékét megvizsgáltuk egy antigéntől független aktivációs út esetében is. Azt találtuk, hogy metilálatlan CpG motívumokat tartalmazó oligonukleotidok által indukált B-sejt proliferációt a CR1 receptor keresztükötése nem befolyásolta sem a naív sem a memória B-sejt populációban. CpG jelenlétében csak IgM termelő plazmablaszt differenciáció következett be, amelyet a CR1 receptor aggregációja a proliferációhoz hasonlóan nem befolyásolt. SLE-s betegekből nyert B-sejtek CpG jelenlétében nem differenciálódtak IgM termelő plazmablasztokká, aminek hátterében az IgM típusú memóriasejtek arányának drasztikus csökkenése állhat.

Összességében elmondhatjuk, hogy aktív SLE-ben szenvedő betegek B-sejtjein a gátló CR1 és Fc γ RII receptorok csökkenése a memória populáción mért up-reguláció hiányából, valamint az IC-kötő receptorokat minimálisan kifejező plazmablaszt populáció felszaporodásából adódik. Funkcionális vizsgálataink továbbá arra utalnak, hogy fziológias körülmények között az 1-es típusú komplementreceptoron közvetített gátlásnak a memória B-sejtek antigénfüggő homeosztázisában lehet szerepe, a késői differenciációs folyamatokat azonban nem befolyásolja.

Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények

Erdei, A., J.Prechl, **A.Isaak**, E.Molnár
Regulation of B-cell activation by complement receptors CD21 and CD35.
Curr Pharm Des. 2003;9(23):1849-60. Review (IF:5,385)

Isaák A, Prechl J, Gergely J, Erdei A.
The role of CR2 in autoimmunity.
Autoimmunity. 2006 Aug; 39(5):357-66. Review. (IF:2,887)

Gergely P Jr, **Isaák A**, Szekeres Z, Prechl J, Erdei A, Nagy ZB, Gergely J, Poór G.
Altered expression of Fcγ and complement receptors on B cells in systemic lupus erythematosus.
Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun; 1108:183-92. Review. (IF:1,731)

Isaák A, Gergely P Jr, Szekeres Z, Prechl J, Poór G, Erdei A, Gergely J.
Physiological up-regulation of inhibitory receptors FcγRII and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients
Int Immunol. 2008 Feb;20(2):185-92. Epub 2008 Jan 8. (IF:3,29)

Andrea **Isaák**, Mariann Kremlitzka, Anna erdei
Peripheral and tonsillar B cells differ in their CR1 (CD35) expression and function
Manuscript in preparation

Egyéb közlemények

Molnár, E., J. Prechl , **A. Isaak**, A.Erdei
Targeting with scFv: immune modulation by complement receptor specific constructs.
J. Mol Recognit. 2003 Sep-Oct;16(5):318-23. Review.

Prechl J, Molnár E, Szekeres Z, **Isaák A**, Papp K, Balogh P, Erdei A.

Murine CR1/2 targeted antigenized single-chain antibody fragments induce transient low affinity antibodies and negatively influence an ongoing immune response.

Adv Exp Med Biol. 2007; 598:214-25.

Papp K, Szekeres Z, Terényi N, **Isaák A**, Erdei A, Prechl J.

On-chip complement activation adds an extra dimension to antigen microarrays.

Mol Cell Proteomics. 2007 Jan; 6(1):133-40. Epub 2006Oct 27.

Publikált absztraktok

Molnár,E., J. Prechl, **A. Isaák**, E.Csomor, K. Papp, A.Erdei

The Role of C3-Binding Receptors (CD21/CD35) in the Survival of Murine B Lymphocytes

15th European Immunology Congress-EFIS 2003 (poster)

Immunology Letters 2003, Vol. 87, (1-3) 117. (abstract)

Erdei,A., J. Prechl, **A. Isaák**, M. Józsi, Zs. Bajtay, E. Molnár, P. Gergely, Jr., Gy. Poór and J.Gergely

Regulation of B-cell activation by complement receptors CR1 (CD35) and CR2 (CD21)- possible involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases

Autoimmunity Reviews, Volume 3, Issues 7-8, November 2004, Pages 624-625

Szekeres, Zs. , **A. Isaák**, J. Prechl and A. Erdei

Generation of a fusion protein containing DNA-like peptide and a single chain antibody

The FEBS Journal 2005, Vol. 272 ,Supplement 1.

Prechl, J.,E., Molnár, **A. Isaák**, K. Papp, A. Erdei

Targeting Antigen to CR1/CR2 by Single Chain Antibody Fragments Results in Low Affinity IgM Response Without the Induction of Memory

15th European Immunology Congress-EFIS 2003 (poster)

Immunology Letters 2003, Vol.87, (1-3) 302.(abstract)

