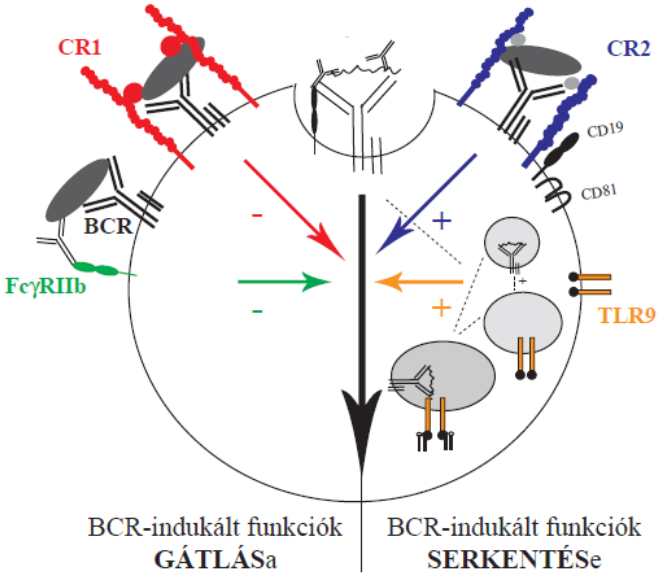
Doktori értekezés tézisei

A komplement- és a Toll-szerű receptorok kifejeződése és szerepe emberi B-sejteken fiziológiás és autoimmun körülmények között - az adaptív és a természetes immunválasz kapcsolata



Kremlitzka Mariann

Témavezető:
Prof. Erdei Anna, DSc

Biológiai Doktori Iskola
Immunológia doktori program
Programvezető: Prof. Erdei Anna D.Sc.

ELTE TTK, Biológiai Intézet
Immunológiai Tanszék, Budapest

2014

Bevezetés

A fertőzések során kialakuló immunkomplexek a fiziológiás immunválasz nélkülözhetetlen elemei. Az immunkomplexeket felismerő komplement- és a Toll-szerű receptorok a veleszületett immunitás részeként fontos szerepet játszanak a patogének ellen irányuló gyulladásos folyamatok kialakulásában, valamint az adaptív immunválasz szabályozásában is. Bár e receptorok jelentőségét a B-sejtes immunválasz irányításában számos kísérletes állatmodell bizonyítja, pontos szerepük az emberi autoimmun folyamatok kialakulásában és kórlefolyásában nem ismert.

Doktori dolgozatom fő célja, hogy közelebb kerüljünk annak megértéséhez, miként szabályozzák a komplement- és a Toll-szerű receptorok a B-sejtes immunválaszt fiziológiás és autoimmun körülmények között.

Célkitűzések/ I.

A CR1 (CD35) és a CR2 (CD21) megjelenése és szerepe egészséges egyének és RA-ban szenvedő betegek B-sejtjein

Az 1-es és a 2-es típusú komplementreceptorok (CR1 és CR2) szerepét a B-sejtek funkcióinak szabályozásában számos, a kollagén-indukált artritisz kísérletes állatmodelljében szerzett eredmény bizonyítja. Habár az emberek esetében is igazolt, hogy a CR1 és a CR2 sejtfelszíni kifejeződése nagymértékben csökken a reumatoid artritiszben (RA-ban) szenvedő betegek B-sejtjein, a receptorok megjelenését és szerepét a különböző humán B-sejt alpopulációkon eddig még nem vizsgálták. Így célul tűztük ki, hogy

- összehasonlítsuk a CR1 és a CR2 megjelenését $CD19^{+}CD27^{-}$ naív, $CD19^{+}CD27^{+}$ memória B-sejteken és a $CD19^{+}CD27^{high}$ plazmablasztokon egészséges egyénekben és RA-ban szenvedő betegek esetében;
- megvizsgáljuk a CR1 keresztkötésének hatását a B-sejtek BCR-indukált osztódására és ellenanyagtermelésére egészséges egyénekben és RA-ban szenvedő betegekben.

Célkitűzések/ II.

Kölcsönhatás a BCR, a TLR9 és a CR1 között

A komplement- és a Toll-szerű receptorok (TLR-ek) a veleszületett immunitás nélkülözhetetlen elemei, melyek kiemelkedő szerepet játszanak az adaptív immunválasz szabályozásában is. Mivel a két rendszer egyidejű aktiválódásának következményeit és a receptorok közötti kölcsönhatás jelentőségét emberi B-sejteken eddig még nem vizsgálták, célul tűztük ki, hogy:

- megvizsgáljuk a CR1 keresztkötésének hatását az emberi B-sejtek BCR- és/vagy TLR9-indukált funkcióira;
- tanulmányozzuk a CR1 szabályozó szerepét az emberi B-sejtek BCR-en és/vagy TLR9-en keresztül kiváltott jelátviteli folyamataiban.

Célkitűzések/ III.

A Syk szerepe az emberi B-sejtek TLR9-indukált jelátviteli folyamataiban

A TLR9-en keresztül elinduló, ún. konvencionális jelátviteli folyamatok a MyD88 adaptor fehérjén keresztül NF-κB aktivációhoz vezetnek. Habár a Syk a legtöbb immunreceptor szignalizációs útvonalának nélkülözhetetlen eleme, szerepe a Toll-szerű receptorok jelátvitelében még nem tisztázott. Így célunk volt annak megállapítása, hogy

- a TLR9 képes -e a Syk közvetlen aktiválására és hogy a kináz gátlása milyen hatással van a B-sejtek TLR9-indukált funkcióira;
- a CpG oligonukleotidok milyen mechanizmussal aktiválják a Syk tirozin-kinázt.

Alkalmazott módszerek

- B-sejtek izolálása vérből és mandulából
- Sejtproliferáció vizsgálata (CFSE and ^{3}H-timidin beépülés)
- Citokintermelés mérése (FlowCytomix módszer)
- Plazmablaszt differenciáció (FCM)
- ELISPOT (Ig-termelő sejtek detektálása)
- ELISA (Ig-termelés mérése)
- Áramlási citofluorimetria
- Fluoreszcens sejtválogatás
- Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia
- Emberi C3 izolálása (FPLC módszer)
- Western Blot

Eredmények és megbeszélésük / I.

A CR1 hatékonyan gátolja az RA-ban szenvedő betegek B-sejtjeinek funkcióit

- Kimutattuk, hogy az aktív RA-s betegek és egészséges donorok memória B-sejtjeinek CR1 expressziója szignifikánsan magasabb, mint a naív B limfocitáké. Ezzel ellentétben a CR2 megjelenése csökken a memóriasejtté történő differenciálódás során, ami bizonyítja a két receptor eltérő szabályozását emberi B limfociták esetében. Korábbi eredményekkel összhangban igazoltuk, hogy emberi plazmablasztokon a CR1 és a CR2 kifejeződése alacsony szintű. Kimutattuk továbbá, hogy az egészséges donorok és az RA-s betegek receptor expressziójának eltérése nem az egyes B-sejt alpopulációk eltérő arányából adódik, és a receptor expresszió mértéke nem korrelál a betegség aktivitásával.
- Eredményeink alapján a CR1 ligandum általi keresztkötése dózis-függően gátolja a B-sejtek BCR által kiváltott proliferációját, valamint ellenanyagtermelését. Ez a gátló hatás - a csökkent CR1 expresszió ellenére - az RA-ben szenvedő betegek esetében is kimutatható, vagyis a receptor aggregációja szignifikánsan csökkenti a BCR-indukált B-sejt funkcióikat, hasonlóan az egészséges kontrollokhoz.

A funkcionális vizsgálatok eredményei az expressziós adatokkal összhangban egyértelműen igazolják, hogy a CR1 és a CR2 ellentétes hatású emberi B-sejtek esetében, és e receptorok kiemelten fontos szerepet játszanak a B-sejtek funkcióinak immunkomplexek általi finom szabályozásában fiziológiás és patológiás folyamatok során egyaránt.

Eredmények és megbeszélésük / II.

A CR1 keresztkötése gátolja a B-sejtek TLR9-indukált osztódását és citokintermelését, de nem befolyásolja azok plazmablaszt irányú differenciálódását

- Kimutattuk, hogy a CR1 keresztkötése nem csak a BCR-indukált B-sejt aktivációt gátolja, hanem kiemelkedő szerepet játszik a TLR9-en keresztül kiváltott B-sejt funkciók szabályozásában is. Megállapítottuk, hogy a CR1 receptorok keresztkötése dózis-függő módon gátolja a B-sejtek CpG-indukált osztódását, valamint citokintermelését.
- Bizonyítottuk, hogy a CR1 ligandum-kötése nem befolyásolja a B-sejtek TLR9-indukált differenciálódását, de meglepő módon a receptorok keresztkötése fokozza a B limfociták BCR- és TLR9-indukált plazmablaszt irányú differenciálódását.
- Elsőként igazoltuk, hogy a CR1 keresztkötése olyan "kulcsszerepet betöltő" jelátviteli molekulák defoszforilációját váltja ki, mint a Syk, valamint a különböző MAPK-ok, és így hatékonyan gátolja a BCR- és a CpG-indukált B-sejt aktiváció kezdeti lépéseit.

Eredményeink azt igazolják, hogy a CR1 hatékonyan szabályozza a Toll-szerű receptorok funkcióját és jelátviteli folyamatát emberi B-sejteken. Ezzel új kapcsolódási pontot azonosítottunk a komplementrendszer és a Toll-szerű receptorok működése között a humorális immunválasz szabályozásában.

Eredmények és megbeszélésük / III.

A Syk nélkülözhetetlen a B-sejtek CpG-indukált aktivációjához és differenciálódásához

- Kimutattuk, hogy a "klasszikus", MyD88-irányított jelátviteli útvonal mellett a CpG-stimulus a Syk kináz idő- és dózisfüggő foszforilációját okozza nyugvó mandula B-sejtekben. Igazoltuk, hogy ez folyamat a BCR-től függetlenül, a sejtfelszínről indul el.
- Eredményeink azt bizonyítják, hogy a Syk kináz aktivációja nélkülözhetetlen a B-sejtek CpG-indukált funkcióinak kiváltásához, mivel a Syk inhibítor szignifikánsan és dózis-függő módon csökkenti a B-sejtek CpG-indukált proliferációját, valamint citokin- és ellenanyagtermelését.
- Elsőként mutattuk ki, hogy a BCR- és a CpG-indukált jelátviteli útvonalak már a Lyn és Syk kinázok szintjén találkoznak.
- Bizonyítottuk, hogy a CpG oligonukleotidok sejtfelszínhez kötődése a membránközeli Lyn kinázon keresztül a Syk és p38 fehérjék aktivációját okozza MyD88 (TLR9)-függő módon.

Eredményeink arra utalnak, hogy a Syk aktivációja nélkülözhetetlen a CpG-motívumban gazdag oligonukleotidok TLR9-tartalmú endoszómákba szállításához, valamint a TLR9 expresszió hatékony indukálásához, és így a TLR9-által kiváltott hatékony B-sejt aktivációhoz.

Összefoglalás

Összességében elmondhatjuk, hogy fiziológiás körülmények között az 1-es típusú komplementreceptor hatékonyan gátolja a B-sejtek BCR és TLR9-indukált aktivációját egyaránt. Ez a gátlás már a jelátviteli folyamatok kezdeti lépéseiben is megfigyelhető a membrán-közeli kinázok defoszforilációján keresztül.

Mivel a csökkent CR1 expresszió nincs hatással a receptor gátló szerepére, ezért ez a komplemenreceptor új terápiás célpontnak tekinthető a reumatoid artritiszben szenvedő betegek B-sejtjeinek szelektív gátlásában. Eredményeink alapján a CR1 gátló hatása kiemelkedően fontos szerepet játszhat olyan immunkomplexek-által irányított autoimmun betegségek kezelésében, ahol a saját-RNS és -DNS tartalmú immunkomplexek a BCR-en és TLR9-en keresztül hatva okozzák a B-sejtek rendellenes aktivációját.

Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények

1. Kremlitzka M, Polgár A, Fülöp L, Kiss E, Poór Gy, Erdei A
   Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients
   International immunology 25:(1) pp. 25-33. (2013)

2. Kremlitzka M, Mácsik-Valent B, Erdei A
   Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells
   Kézirat elbírálás alatt

3. Erdei A, Isaák A, Török K, Sándor N, Kremlitzka M, Prechl J, Bajtay Z
   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)

Egyéb közlemények

1. Török K, Kremlitzka M, Sándor N, Tóth EA, Bajtay Z, 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)

Publikált absztraktok

1. Kremlitzka M, Valent B, Erdei A
   New insights into the inhibitory function of CR1 on human B lymphocytes; the functional consequences of the crosstalk between BCR, TLR9 and CR1
   Immunobiology 217:(11) p. 1190. 1 p. (2012)

2. Kremlitzka M, Polgár A, Kiss E, Poór Gy, Bajtay Z, Erdei A
   Expression and function of CR1 and CR2 on B cells of rheumatoid arthritis patients
   Molecular immunology 48:(14) pp. 1715-1716. (2011)

3. Erdei A, Kremlitzka M, Isaák A, Poór Gy, Bajtay Z
   Complement-mediated regulation of B-cell function - physiological upregulation of CR1 and Fc gamma RII on memory B cells is lacking in SLE
   Clinical and experimental rheumatology 29:(1) p. 177. 1 p. (2011)

4. Erdei A, Kremlitzka M, Isaák A, Prechl J, Bajtay Z
   Differential expression and function of complement receptor type 1 (CD35) and 2 (CD21) on human B lymphocytes
   Molecular immunology 47:(13) p. 2223. 1 p. (2010)

5. Erdei A, Isaák A, Kremlitzka M, Poór G
   Physiological upregulation of CR1 and Fc gamma RII on memory B cells is lacking in SLE patients, but is not related to the cells' activation state
   Molecular immunology 46:(14) p. 2829. 1 p. (2009)