

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM, SZENT-GYÖRGYI ALBERT
ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS ALLERGOLÓGIAI KLINIKA
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

**A humán peptidek által közvetített T sejt pozitív szelekció
akadályozza a nem saját peptidek felismerését**

Koncz Balázs

PhD értekezés tézisei

Témavezető:

Dr. Manczinger Máté



Szeged

2021

KÖZLEMÉNYEK

A tézishez kapcsolódó közlemények

I. Balázs Koncz, Gergő M. Balogh, Benjamin T. Papp, Leó Asztalos, Lajos Kemény, Máté Manczinger: Self-mediated positive selection of T cells sets an obstacle to the recognition of nonself. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2021). DOI: 10.1073/pnas.2100542118. IF: 11.205, SCImago Journal Rank: Q1 / D1.

Egyéb közlemények

II. Máté Manczinger, **Balázs Koncz**, Gergő Mihály Balogh, Benjamin Tamás Papp, Leó Asztalos, Lajos Kemény, Balázs Papp & Csaba Pál. Negative trade-off between neoantigen repertoire breadth and the specificity of HLA-I molecules shapes antitumor immunity. *Nature Cancer* (2021). DOI: 10.1038/s43018-021-00226-4.

III. Párniczky A, Lantos T, Tóth EM, Szakács Z, Gódi S, Hágendorn R, Illés D, **Koncz B**, Márta K, Mikó A, Mosztbacher D, Németh BC, Pécsi D, Szabó A, Szücs Á, Varjú P, Szentesi A, Darvasi E, Eröss B, Izbéki F, Gajdán L, Halász A, Vincze Á, Szabó I, Pár G, Bajor J, Sarlós P, Czimmer J, Hamvas J, Takács T, Szepes Z, Czakó L, Varga M, Novák J, Bod B, Szepes A, Sümegi J, Papp M, Góg C, Török I, Huang W, Xia Q, Xue P, Li W, Chen W, Shirinskaya NV, Poluektov VL, Shirinskaya AV, Hegyi PJ, Bátovský M, Rodriguez-Oballe JA, Salas IM, Lopez-Diaz J, Dominguez-Munoz JE, Molero X, Pando E, Ruiz-Rebollo ML, Burgueño-Gómez B, Chang YT, Chang MC, Sud A, Moore D, Sutton R, Gougol A, Papachristou GI, Susak YM, Tiuliukin IO, Gomes AP, Oliveira MJ, Aparício DJ, Tantau M, Kurti F, Kovacheva-Slavova M, Stecher SS, Mayerle J, Poropat G, Das K, Marino MV, Capurso G, Małecka-Panas E, Zatorski H, Gasiorowska A, Fabisiak N, Ceranowicz P, Kuśnierz-Cabala B, Carvalho JR, Fernandes SR, Chang JH, Choi EK, Han J, Bertilsson S, Jumaa H, Sandblom G, Kacar S, Baltatzis M, Varabei AV, Yesly V, Chooklin S, Kozachenko A, Veligotsky N, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Antibiotic therapy in acute pancreatitis: From global overuse to evidence based recommendations. *Pancreatology* (2019). DOI: 10.1016/j.pan.2019.04.003. IF: 3.996, SCImago Journal Rank: Q1 / D3.

IV. **Balázs Koncz**, Erika Darvasi, Dalma Erdősi, Andrea Szentesi, Katalin Márta, Bálint Erőss, Dániel Pécsi, Zoltán Gyöngyi, János Girán, Nelli Farkas, Maria Papp, Eszter Fehér, Zsuzsanna Vitális, Tamás Janka, Áron Vincze, Ferenc Izbéki, Veronika Dunás-Varga, László Gajdán, Imola Török, Sándor Károly, Judit Antal, Noémi Zádori, Markus M Lerch, John Neoptolemos, Miklós Sahin-Tóth, Ole H Petersen, and Péter Hegyi. LIFESStyle, Prevention and Risk of Acute PaNcreatitis (LIFESPAN): Protocol of a Multicentre and Multinational Observational Case-Control Study. *BMJ Open*. (2020). DOI: 10.1136/bmjopen-2019-029660. IF: 2.692, SCImago Journal Rank: Q1 / D2.

Cumulative impact factor: 17,893

BEVEZETÉS

Az adaptív immunfelismerés alapjai

A 20. század második felében az immunrendszer elsődleges célját a saját-nem saját megkülönböztetésén alapuló elméletekkel magyarázták, melyek szerint az immunrendszer legfőbb feladata, hogy különbséget tegyen saját és nem saját struktúrák között. Ez alapján az az idegen struktúrák immunválaszt váltanak ki, szemben az élőlény saját anyagaival. Ezt árnyalta a 90-es években *Matzinger* által bevezetett veszélyelmélet, mely az immunrendszer legfontosabb feladatát a veszély észlelése és a káros anyagokkal szembeni védekezésben határozta meg. Azt állítja, hogy a saját anyagok is képesek kiváltani immunválaszt, ha azok veszélyesek (pl. sejt szintű stressz esetén ez játszódik le), és nem saját anyagokkal szemben is lehet tolerancia a válasz, ha azok nem veszélyesek (pl. kommenzalista baktériumok). Mindent összevetve, ha az immunrendszer hatékonyan képes felismerni azokat a sejteket, amelyek mutáns fehérjéket vagy kórokozókat tartalmaznak, nagyobb eséllyel fogja azokat elpusztítani.

Az immunrendszer két alrendszerre osztható – veleszületett és adaptív – melyek különbözőképpen, de összehangoltan működnek. A veleszületett immunitás már a fertőzés egészen korai szakaszában készen áll a védekezésre, ugyanakkor a legtöbb fertőzés esetében önmagában nem elegendő a fertőzés legyőzéséhez. Ezért az adaptív immunrendszer is bekapcsolódik a harcba, amely specifikusan és nagyon hatékonyan reagál a betolakodókra. Az antigének kulcsszerepet játszanak az adaptív immunválaszban. Ezek kórokozókból vagy emberi sejtekből származó olyan molekulák, melyek immunválaszt váltanak ki. Az adaptív immunválasz specifikus az antigénre és hosszantartó védelmet (immunitást) nyújt az adott kórokozóval szemben.

A T sejt aktiváció alapfeltétele az immunológiai szinapszis kialakulása. Ez a struktúra a peptid és a humán leukocita antigén közös komplexéből (pHLA), a T sejt receptorból (TCR), adhéziós molekulákból és ellenőrző receptorokból alakul ki. Az adaptív immunválasz során a HLA molekuláknak fontos szerepe van a peptid megkötésében és sejt felszíni bemutatásában. A HLA gének nagymértékű változatosságot mutatnak: több mint 20 ezer HLA allélt azonosítottak máig. A HLA-I molekulák, melyek a sejten belüli normál és módosult peptid, valamint a sejten belüli kórokozók peptidjeinek bemutatását végzik, minden magvas sejten expresszálódnak. A leginkább a B sejtekben, mieloid dendritikus sejtekben és monocitákban expresszálódó HLA-II molekulák az extracelluláris molekulák és extracelluláris kórokozók peptidjeinek bemutatásáért felelősek.

Mivel tézisemben a HLA-I molekulák bemutatására fókuszálok, az ehhez kapcsolódó antigén bemutatási útvonalat részletezem. A proteaszómák és a citoszol aminoszintetáz enzimek 8-11 (leggyakrabban 9) aminosav hosszúságú darabokra hasítják a saját ill. a sejtbe bejutott kórokozók fehérjéit. A HLA-I molekulák peptiddel való feltöltése az endoplazmatikus retikulumban zajlik, a kialakult pHLA-I komplex a sejtmembránba horgonyzódik. Egy peptid HLA-I általi bemutatása nagyjában függ az őt kódoló gén expressziójától.

Az adaptív immunfelismerés elengedhetetlen feltétele, hogy a T sejt repertoár tartalmazza a megfelelő antigén specifikus T sejteket. Ha van a repertoárban antigén-specifikus citotoxikus T sejt (CTL), kialakulhat az immunológiai szinapszis. Egészséges állapotban a sejt felszínén bemutatott peptidektől függ az immunválasz: tolerancia alakul ki azokkal a sejtekkel szemben, melyek csak saját peptideket mutatnak be felszínükön, míg az immunrendszer eltávolítja az idegen vagy veszélyes peptideket hordozó sejteket (fertőzött sejtek, tumorsejtek). Ha egy antigénnel szemben nincs megfelelő specifikus T sejt a T sejt repertoárban, erre az antigénre nem alakul ki immunválasz.

A T sejt receptorok leginkább a peptidszekvenciák T sejteknek kitett aminosavait látják

A peptid-HLA-TCR komplexben a peptid néhány aminosavának kiemelt szerepe van a HLA kötésben, és ezek rejtve maradnak a TCR előtt, míg más aminosavak főként a TCR-rel való kötések kialakításában vesznek részt. Egy tanulmány kimutatta, hogy egy 9 aminosav hosszúságú peptid (nonamer) esetében a 4-8 pozícióban lévő aminosavak jelentősen több kapcsolatot alakítanak ki a TCR-rel, mint az 1-3 és a 9. pozícióba lévők. Ez alapján analízisemben a peptidek *Bremel* és *Homan* által bevezetett TCEM (T cell exposed motif) régiójára fókuszáltam, mely egy 9 hosszúságú aminosavban a 4-8 pozíció aminosavait jelenti.

A T sejt repertoár kialakulása

A T sejt repertoár a magzati fejlődés során formálódik, és a születésre már közel kialakul. A pozitív és negatív szelekciós folyamatok kulcsfontosságúak egy funkcióképes, és a saját peptidekkel szemben toleranciát mutató T sejt repertoár kialakulásához. Habár a TCR-ek keletkezése egy véletlenszerű szomatikus rekombináció eredménye, az érett T sejt repertoár, mely egy részhalma az összes lehetséges T sejtnek, távol áll a véletlenszerűtől, mivel a cél egy olyan T sejt populáció kialakítása, amely hatékony a kórokozók elleni küzdelemben. A szelekciós folyamatokat nagyjában meghatározzák a csecsemőmirigy antigén bemutató sejtjeinek felszínén megjelenő HLA-kötött saját peptidek.

A T sejt prekursor sejtek (röviden thymocyták) CD4 és CD8 koreceptort is kifejező dupla pozitív sejtekké alakulnak át számos sejten belüli inger eredményeként. A pozitív szelekció során azok a T sejtek, melyek képesek megkötni a csecsemőmirigy kérgi epitélisejtjeinek (cTEC) felszínén megjelenő saját peptid – HLA-I komplexet, tovább fejlődnek citotoxikus T sejt irányba. A kötést kialakítani nem képes T sejtek elpusztulnak. Fontos hangsúlyozni, hogy a TCR-ek ligandjai a saját peptid - HLA komplexek. A cTEC-ben egy sajátos fehérjehasító rendszer, a timoproteaszóma biztosítja az egyedi peptidkészletet a CTL-ek pozitív szelekciójához. A timoproteaszóma hasítás során keletkezett peptidek alacsony affinitást mutatnak a TCR-hez, ugyanakkor a CD8+ T sejtek jelentős csoportját gerjesztik. Egy nemrég megjelent tanulmány meghatározta a timoproteaszóma aminosav preferenciáit annak hasítási helye közelében. Kísérletek bizonyították azt is, hogy a timoproteaszóma alapvető fontosságú a megfelelő számú CTL pozitív szelekciójához.

A pozitívan szelektálódott T sejtek a velőállományba vándorolnak, ahol a negatív szelekció során elpusztulnak azok a T sejtek, amelyek nagyon erősen kötik a HLA - saját peptid komplexeket. Az önreaktív T sejtek további kontrollját a perifériás tolerancia mechanizmusok biztosítják: az önreaktív T sejtek válaszképtelenné válnak vagy apoptózissal elpusztulnak a perifériás szervekben.

A nem saját peptidek immunogenitása és a T sejtek keresztreaktivitása

Hogyan képesek a T sejtek különbséget tenni saját és nem saját, veszélyes és ártatlan anyagok között? Egy peptidre adott T sejt választ számos tényező befolyásol. Az egyik legfontosabb, hogy mennyire hasonlít a saját vagy a kommenzális antigénekre. Számos tanulmány megmutatta, hogy a saját antigénekre nagyon hasonló peptideknek alacsonyabb az immunogenitása, amely jelenség a T sejtek negatív szelekciójának eredménye. Fontos kiemelni, hogy a TCR-ek általában nem csak egyetlen peptidre specifikusak, hanem a peptidek egy csoportjára (a jelenséget keresztreaktivitásnak nevezik), mely közeli rokon szekvenciákból áll. Mivel a T sejtek keresztreaktívak, a nem saját peptidek egy jelentős része megkülönböztethetetlen a bemutatott saját peptidektől, ezért az ezekre specifikus T sejtek vagy hiányoznak a T sejt repertoárból, vagy tolerancia jellemző velük szemben. Egy fontos különbség a TCR-ek között azon peptidek száma, amelyekre reagálni képesek.

Ezzel együtt egy általánosan elfogadott nézet az immunológiában, hogy egy nem saját peptid minél inkább különbözik az emberi fehérjéktől, annál inkább immunogénebb.

CÉLKITŰZÉSEK

Több tanulmány megmutatta, hogy a T sejtek pozitív szelekciója eredményeként kialakult CD4⁺ és CD8⁺ T sejt repertoár torzul a nagyobb önreaktivitás felé, vagyis azok a T sejtek, amelyek erősebben kötik a saját peptideket, hatékonyabban fogják a nem saját, agonista peptideket is. Másként fogalmazva a pozitív szelekciót irányító saját peptidek tekinthetők egy tesztszettnek, mely azokat a T sejteket válogatja ki, melyek nagy hatékonysággal kötik meg az idegen peptideket is.

Ugyanakkor hipotézisünk szerint a T sejtek pozitív szelekciójának van egy alapvető mellékhatása a nem saját peptidek felismerésére.

Mivel a pozitív szelekciót a saját fehérjék szekvenciái irányítják, a nem saját peptidek egy jelentős része nem lesz felismerhető az immunrendszer által, a T sejtek keresztreaktivitását figyelembe véve sem.

Mivel a T sejtek pozitív szelekcióját a saját peptidek TCEM-jei irányítják, hipotézisünkben az következik, hogy kisebb valószínűséggel fogunk találni specifikus T sejteket a repertoárban azokkal a TCEM-ekkel szemben, melyek (1) nagyon ritkák vagy hiányoznak az humán proteomból, (2) nem expresszálódnak a cTEC-ben, (3) nem jelennek meg a cTEC-ek felszínén.

Ezen kívül a hipotézis számos kérdést vet fel. Létezik-e, hogy egy peptid nagyon különbözik a humán fehérjétől, és ennek következtében nem is felismerhető a T sejtek által? A T sejtek keresztreaktivitása kompenzálhatja-e a T sejtek pozitív szelekciójának ezen mellékhatását? Van-e ennek a jelenségnek valamilyen hatása a fertőzésekre való hajlamra? Tézisemben bizonyítom a hipotézis következményeit (1-3) és megválaszolom a felmerült kérdéseket.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

In vitro adathalmazok

A hipotézist 2 független in vitro adathalmazon teszteltük. Egy online adatbázisból (*Immune Epitope Database – IEDB*) HLA-I-el asszociált allél-peptid párokat gyűjtöttünk (T sejt aktivációs esszék). A végső adatszett szigorú szűrési kritériumok után alakult ki. Mivel a HLA-kötés előfeltétele a T sejt aktivációnak, a peptid HLA-hoz való kötődését 2 különböző módszerrel erősítettük meg:

(1) A peptid és az allél közötti kötést prediktáltuk a jelenleg legpontosabb és legszélesebb körben alkalmazott bioinformatikai szoftverrel (*NetMHCpan*). Az általános ajánlást használtuk, hogy kiválasszuk a kötött peptideket (adatszett 1).

(2) Azért, hogy elkerüljük a számítógépes predikcióval járó torzítást, HLA kötési esszék (IEDB-ről) eredményeit használtuk fel azon peptid-HLA párok esetében, ahol volt erre vonatkozó adat (adatszett 2).

Korábbi munkák rámutattak arra, hogy az IEDB-ben található peptidek esetében lehet egy gyűjtési torzítással számolni (a nagyon hasonló peptidszekvenciák felülreprezentálódnak), amely hatással lehet az elemzés eredményeire. Emiatt a 2. adatszettet tovább szűrve egy nagy diverzitású peptidszettet hoztunk létre egy iteratív módszert alkalmazva, amely kizárta a hasonló szekvenciákat.

A peptideket ezután 2 csoportba osztottuk: azon peptideket, amelyek esetében kizárólag negatív T sejt aktivációs esszék szerepeltek az IEDB-n, **nemimmunogénnek**, míg azokat, amelyek esetében több pozitív esszé volt, mint negatív, **immunogénnek** határoztuk meg. A szűrések eredményeként az 1. adatszett 3380, a 2. 635 peptidet tartalmazott.

TCEM gyakoriság, TCEM expresszió és timoproteaszóma hasítási pontszám

A nonamerek esetében a 4. és 8., a 10 hosszúságú peptidek esetében az 5 és 9. pozíció közötti aminosavakat TCEM-ként definiáltuk. A humán proteombeli **TCEM gyakoriságot** minden egyes 5 hosszúságú aminosavszekvenciára (pentamer) meghatároztuk, annak megfelelően, hogy hányszor fordul elő a humán referencia proteomban.

Egy nemrég publikált tanulmány génexpressziós adatokat közölt újszülöttek cTEC-eiből. A mintákat összegezve minden génre meghatároztuk a medián RPKM értékeket. Egy pentamer expresszióját (**TCEM expresszió**) úgy becsültük meg, hogy kigyűjtöttük az adott motívumot

tartalmazó fehérjéket, és kiszámoltuk az őket kódoló gének expressziójának mediánját. Meghatároztuk továbbá a TCEM-ek előfordulását a háztartási fehérjékben is.

Egy korábbi tanulmány összehasonlította a timoproteaszóma és az immunproteaszóma hasítási helye környezetében lévő aminosav preferenciákat. Kifejlesztettünk egy pontszámot, amely megközelítette a timoproteaszóma vágás valószínűségét két aminosav között adott aminosavkörnyezetben. Ez alapján megbecsültük egy peptid kivágódásának valószínűségét. Ezután minden egyes humán fehérjékben előforduló pentamerre meghatároztuk azokat a nonamereket, melyek a TCEM régiójában tartalmazzák az adott pentamer, és kiszámoltuk ezen nonamerek kivágódási valószínűségének a mediánját (timoproteaszóma hasítási pontszám). Az immunproteaszóma hasítási pontszámot hasonlóképpen számoltuk ki. Ez szolgált az analízisben kontrollként.

Szekvencia hasonlóság

A szekvencia hasonlóságot egy bevált módszert használva számoltuk ki. A hasonlóságot egy adott peptid és a hozzá leghasonlóbb - humán fehérjékben előforduló - szekvencia között a BLOSUM62 szubsztitúciós mátrix segítségével határoztuk meg. Először megkerestük az adott peptidhez leghasonlóbb szekvenciát a humán proteomban a *BLAST* szoftverrel, majd egy jól bevált formulát használva kiszámoltuk a két peptid közötti hasonlóságot.

SARS-CoV-2 specifikus T sejtek a repertoárban

27 egészséges egyén *MIRA* (*Multiplex Identification of T-cell Receptor Antigen Specificity*) adatait töltöttük le az *Adaptive Biotechnologies* honlapjáról. Meghatároztuk azokat a HLA-I allél – peptid párokat, amelyek esetében az adott allél hordozása potenciálisan összefügghet egy specifikus naiv CD8⁺ T sejt jelenlétével a T sejt repertoárban. Ezután minden egyénre meghatároztuk, hogy mely peptidekre várunk specifikus T sejteket a repertoárban.

A T sejt keresztreaktivitás szintje

A TCR peptidkötésének vizsgálatához két különböző tanulmányban közzétett adatokat használtunk. Ezekben a kötéserősség változását vizsgálták annak hatására, ha a peptidszekvencia különböző pozícióiban megváltoztatták az aminosavakat. Az elemzést a TCEM részre szűkítettük, és kiszámoltuk az eredeti TCEM és a módosított között a BLOSUM62 hasonlóságot. Felrajzoltuk a ROC görbét és kiszámoltuk a görbe alatti területet (AUC). Az NY-ESO-1 epitóp és a TCR C²⁵⁹ esetében meghatároztuk azt a TCR kötéserősséget, amely alatt a T sejt aktiváció elhanyagolható. Ehhez a módosított NY-ESO-1 epitópok T sejt

aktivációs adatait használtuk, melyek szintén szerepeltek ebben a tanulmányban. Az eredeti kötéseerősség 10%-a alatt határoztuk meg az elégtelen kötést.

Az intracelluláris kórokozók TCEM-jeinek meghatározása és a HLA asszociációs adatok elemzése

Letöltöttük az *UniProt* adatbázisból 50 jól ismert intracelluláris kórokozó referencia proteomját. Meghatároztuk a proteomokban előforduló összes nonamer TCEM régióját, és ezek gyakoriságát a humán proteomban, expresszióját a cTEC-ben, valamint a proteaszómális hasítási pontszámokat a korábban ismertetett módon. np-TCEM-ként definiáltuk azokat a TCEM-eket, amelyek kevesebb mint 4-szer fordulnak elő a humán proteomban, vagy alacsony az expressziójuk a cTEC-ben, vagy alacsony a timoproteaszóma vágási pontszámuk. Ezek után prediktáltuk az összes nonamer és a leggyakoribb HLA allélok közötti kötést a *NetMHCpan* szoftverrel. Minden allél – kórokozó párra meghatároztuk a kötött peptideket figyelembe véve az np-TCEM-ek arányát a kórokozó proteomjában.

A fertőző betegségek és a HLA allélok közötti asszociációk azonosítására szakirodalmi keresést végeztünk. A metaanalízisekre fókuszáltunk, hogy a legmegbízhatóbb HLA asszociációs adatokat gyűjtsük össze. HLA asszociációs metaanalíziseket találtunk hepatitis B-re, hepatitis C-re, dengue vírusra és humán papillomavírusra. Mivel a tanulmányok allélcsoportokra vagy szerotípusokra közöltek eredményeket, nem pedig egyedi allélokra, az np-TCEM-ek arányát a bemutatott peptidekben a következőképpen határoztuk meg. Szerotípus adatok esetén az adott szerotípushoz tartozó allélok értékeinek átlagát rendeltük. Allélcsoportok esetén az allélkatalógusban (*Common and Well-Documented Alleles Catalog*) gyakoriként megjelölt allélok értékeinek átlagát rendeltük.

EREDMÉNYEK

A T sejtek pozitív szelekciójának hatása a peptidek immunogenitására

Hipotézisünk 3 következményét párhuzamosan vizsgáltuk meg 2 nem átfedő in vitro T sejt aktivációs adatszetten. Az 1. adatszett nagyszámú peptidet tartalmazott, míg a 2. adatszett azt biztosította, hogy az eredményeinket nem befolyásolja a számítógépes predikció vagy a hasonló szekvenciák jelenléte.

Hipotézisünk egyik következménye, hogy ha a TCEM nagyon ritka a humán proteomban, a specifikus T sejtek kis valószínűséggel élnek túl a pozitív szelekciót a cTEC-ek környezetében, és potenciálisan hiányozni fognak a T sejt repertoárból. Következésképpen azok a motívumok, amelyek nagyon ritkák vagy nem találhatóak meg a humán proteomban, kevésbé lesznek immunogének. Eredményeink ezt igazolták, mivel az immunogén és nem-immunogén peptidek TCEM gyakorisága szignifikánsan különbözött mindkét adatszett esetében: az immunogén peptidek gyakoribb TCEM-eket tartalmaztak. Az eredmény azt sugallja, hogy az immunogenitáshoz szükséges a TCEM megfelelő számú előfordulása a humán proteomban.

Hipotézisünkéből az is következik, hogy ha a TCEM-et kódoló gének expressziója kicsi vagy kimutathatatlan, nem teszik lehetővé a specifikus T sejtek pozitív szelekcióját. Ezzel együtt azokra a TCEM-ekre sem várunk immunválaszt, amelyek a nagymértékben expresszált háztartási fehérjékben gyakoriak, mivel az ezekre a TCEM-ekre adott immunválasz blokkolt lesz a centrális és perifériás tolerancia mechanizmusok miatt. Várakozásainknak megfelelően a cTEC-ben alacsony vagy magas expressziót mutató TCEM-ek kevésbé aktiválták a T sejteket, a közepes csoporthoz viszonyítva.

A cTEC-ben egy specifikus proteaszóma, a timoproteaszóma állítja elő a peptidek legnagyobb részét a T sejtek pozitív szelekciójához. Ha egy peptid alacsony valószínűséggel keletkezik a timoproteaszómális hasítás eredményeként, kis esélye lesz, hogy a sejt felszínén megjelenjen a HLA molekulákkal komplexben, még ha magas is az expressziója a sejtben. Eredményeink azt mutatták, hogy az immunogén peptidek TCEM-jei nagyobb valószínűséggel keletkeznek a timoproteaszómális hasítás eredményeképp, mint a nem-immunogének TCEM-jei. Az immunoproteaszóma hasítási pontszám nem mutatott ilyen különbséget a két csoport között.

Ezek az immunogenitást befolyásoló hatások egy többváltozós logisztikus modellben is megmaradtak, ami azt mutatja, hogy ezek a hatások nem zavarják meg egymást és függetlenek egymástól. Ráadásul ezeknek a jellemzőknek a hatása additívnek bizonyult: a ritka, kis

expressziójú és kis timoproteaszóma vágási pontszámú TCEM-ek kevésbé voltak immunogének, mint ha csak a TCEM-nek egy vagy két jellemzőjét vettünk volna figyelembe.

A TCEM-ek gyakorisága, expressziója és a timoproteaszóma hasítási valószínűségük meghatározza a specifikus naiv CD8+ T sejtek előfordulását a repertoárban

A korábbi megállapítások megerősítésére a hipotézis 3 következményét közvetlenül igazoltuk egészséges egyének T sejt repertoárjának elemzésével. A hipotézis alapján kisebb valószínűséggel vártunk olyan naiv T sejteket a repertoárban, amelyek specifikusak a humán proteomban ritka TCEM-ekre, azokra a TCEM-ekre, melyek nem expresszálódnak a cTEC-ben, valamint amelyek nem jelennek meg a cTEC felszínén. A közelmúltban közzétett adatok felhasználásával bizonyítottuk ezen T sejtek hiányát egészséges egyének repertoárjában. A ritka TCEM-ekre specifikus naiv CD8+ T sejtek kevésbé voltak jelen az egészséges egyének repertoárjában. Hasonlóan kisebb valószínűséggel figyeltünk meg specifikus T sejteket a cTEC-ben kevéssé vagy magasan expresszáló TCEM-ekkel szemben. Továbbá a kis timoproteaszóma vágási pontszámú TCEM-ekkel szemben is kevesebb specifikus T sejt volt megfigyelhető a repertoárban, míg az immunoproteaszóma vágási pontszám nem mutatta ezt a kapcsolatot. Összességében ezek az T sejt repertoárban kapott megfigyelések megerősítették az in vitro T sejt aktivációs adatokon kapott eredményeinket.

A humán fehérjétől túlzottan különböző peptidek csökkent immunogenitást mutatnak

A hipotézisünk egy elég provokatív kapcsolatot feltételez: a várakozásokkal szemben a túlzottan különböző peptideket nem fogja felismerni az immunrendszer, mert a saját peptidek irányítják a T sejtek szelekcióját. Másképpen fogalmazva a túlzottan különböző peptidek TCEM-jeit kisebb valószínűséggel találjuk meg a humán proteomban, és ezért a pozitívan szelektált specifikus T sejtek potenciálisan hiányoznak a repertoárból. Várakozásainknak megfelelően a nagyon ritka TCEM-eket tartalmazó peptidek kisebb hasonlóságot mutattak a humán fehérjékkel, mint a többi peptid. Megmutattuk, hogy a két in vitro adatszettben megtalálható túlzottan különböző peptidek, csakúgy, mint a nagyon hasonló, kisebb valószínűséggel voltak immunogének. Ezeket az eredményeket az is alátámasztja, hogy kevesebb egyén repertoárjában találtunk a túlzottan különböző peptidekre specifikus naiv CD8+ T sejteket.

A keresztreaktivitás nem képes kompenzálni a saját peptidek által irányított T sejt pozitív szelekció mellékhatását

Eredményeink azt sugallják, hogy a pozitív szelekció mechanizmusa egy hiányos T sejt repertoárt eredményez. Azt találtuk, hogy a T sejt repertoár sejtjei kis valószínűséggel lesznek specifikusak olyan TCEM-ekre, melyek felismerését negatívan befolyásolja a saját peptidek által irányított pozitív szelekció (vagyis a TCEM ritka a humán fehérjékben, alacsony az expressziója a cTEC-ben és alacsony a timoproteaszóma vágási pontszáma), és ezt a hiányosságot a T sejtek keresztreaktivitása sem képes kompenzálni.

A T sejtek pozitív szelekciója és a fertőzésekre való hajlam

A kórokozók peptidszekvenciáinak adaptív felismerése alapvető fontosságú egy hatékony immunválasz elindításában. A bemutatott eredmények azt sugallják, hogy sok peptid valószínűleg azért nem immunogén, mert a specifikus T sejtek hiányoznak a CD8+ T sejt repertoárból. 50 ismert kórokozó proteomjában meghatároztuk azokat a TCEM-eket, amelyek vagy nagyon ritkák a humán fehérjékben, vagy nagyon alacsony az expressziójuk a cTEC-ben, vagy kis valószínűséggel keletkeznek a timoproteaszóma hasítás után (nevezzük őket np-TCEM-eknek). Az np-TCEM-ek aránya 58% - 71% között változott a különböző fajokban.

Az np-TCEM-ek magas aránya gátolhatja az immunfelismerést, különösen akkor, ha a kórokozónak csak néhány peptidje jelenik meg. Ez lehet azért, mert kicsi a proteomja, vagy mert az adott HLA allélnak kicsi a kötő repertoárja (azaz kevés különböző peptidet képes megkötni). Ezért a kórokozók proteomjában előforduló összes nonamer esetén prediktáltuk a leggyakoribb HLA allélokhoz való kötődést. Minden allél – kórokozó párra meghatároztuk az allél által bemutatott peptidekre kiszámolt np-TCEM-ek arányát, és azt kaptuk, hogy ez az arány extrém nagy különbségeket mutatott az allélok között, ha a kórokozó proteomja kicsi volt.

Az np-TCEM arálynak egy HLA-függő hatását vártuk a betegségek kockázatára. Ennek vizsgálatához HLA asszociációs metaanalízis adatokat gyűjtöttünk. Az allélcsoportokhoz tartozó pozitív és negatív asszociációkat kiválasztottuk, és kiszámoltuk minden egyes allél esetében a kórokozó proteomjára az np-TCEM arányt és átlagoltuk allélcsoportonként. Azok az allélcsoportok, amelyeket összefüggésbe hoztak fertőzéssel vagy sikertelen kezeléssel, túlnyomó részt np-TCEM-eket mutattak be, szemben a protektív allélcsoportokkal.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az adaptív immunfelismerést a T sejtek által megkötött peptid-HLA komplexek irányítják. A csecsemőmirigyben zajló T sejt pozitív szelekció egy alapvető lépés a válaszképes T sejt repertoár kialakulása során: csak azok a T sejtek élnek túl, amelyek képesek kötni a cTEC felszínén megjelenő saját peptid-HLA komplexeket.

Három bizonyítékot mutattam be, amely azt sugallja, hogy a saját peptidek által irányított T sejt pozitív szelekció egy hiányos T sejt repertoárt eredményez, amely hatással van a nem saját peptidek felismerésére. (1) A humán proteomban nagyon ritka (vagy nem jelen lévő) TCEM-eket, (2) a cTEC-ben elégtelen expressziójú TCEM-eket, és (3) a cTEC specifikus timoproteaszóma által kis valószínűséggel generált TCEM-eket tartalmazó peptidek kisebb valószínűséggel immunogének. Az ilyen motívumokat hordozó peptidek nagymértékben különböztek a humán fehérjéktől. Fontos hangsúlyozni, hogy a legfőbb eredményeket 2 független T sejt aktivációs adatszetten is megmutattuk, valamint közvetlenül igazoltuk a naiv T sejtek hiányát egészséges egyének T sejt repertoárjából.

Azt is megmutattam, hogy a T sejt keresztreaktivitás nem képes kompenzálni a leírt jelenséget.

Továbbá eredményeink azt is mutatják, hogy a T sejt pozitív szelekció bemutatott mellékhatása hatással van az intracelluláris kórokozók adaptív immunfelismerésére és különböző fertőző betegségek kockázatára.

Összegezve az eredményeinket, a T sejt pozitív szelekció bemutatott mellékhatása magyarázhatja a válaszképtelenséget számos nem saját peptidre, és lehetővé teszi az adaptív immunfelismerés jobb megértését.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a humán fehérjéktől egy bizonyos fokú különbözőség szükséges a saját-nem saját megkülönböztetés miatt, viszont a túlzottan különböző peptideket kisebb valószínűséggel fogja felismerni az immunrendszer a specifikus T sejtek hiánya miatt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte hálámat fejezem ki témavezetőmnek, Manczinger Máténak, a folytonos támogatásáért és ellenőrzésért a munkám során. Bevezetett az R programnyelv ismeretébe, és abba, hogyan kell az online adatbázisokban keresni és azokat kezelni. Az általa alapított Számítógépes Immunológiai Kutatócsoportban részt vehettem számos projektben (E. coli és IBD, HLA promizskuitás a TCGA és az immunterápiás kohorszokban, mutációs szignatúrák, SARS-CoV-2 evolúció stb.). Tanácsokat adott a folytatáshoz és motivált. Folyamatosan monitorozta a munkák haladását, ezért a kutatások nem rekedtek meg. Köszönöm a kéziratban és a tézisben nyújtott nagymértékű támogatását is.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Kemény Lajos intézetvezetőnek, aki lehetővé tette, hogy a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán végezhessem PhD tanulmányaimat.

Hálás vagyok a kollégáimnak, Balogh Gergő Mihálynak, Papp Benjamin Tamásnak, Asztalos Leónak és Fülöp Anna Táciának a segítségükért és támogatásukért, amit az elmúlt években nyújtottak. Tanácsokat adtak a programozásban, és segítettek a konferenciaelőadások tökéletesítésében. Hálás vagyok a segítségükért és a megjegyzéseikért, amellyel segítették a munkámat.

Köszönetet mondok Pál Csabának és Papp Balázsnak is, hogy lehetővé tették a részvételemet a csoportszemináriumokon, valamint a hasznos tanácsokért számos projektünkben.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Hegyi Péternek, hogy az első évem során a laborjában kutathattam, és a Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoportnak, különösen Szentesi Andreának a segítséget és a támogatást.

Külön köszönöm feleségemnek, Barbinak, hogy türelmes velem, folyamatosan támogat és bátorít, lányaimnak, Orsinak és Flóranak, valamint az egész családomnak a nagy szeretetet, amellyel körülvesznek.