

B3486

Keresztes Gábor

***Az állatfajok széles körében immunsejtek kimutatására felhasználható,
rögzített szövetek vizsgálatára is alkalmas immunreagensek előállítása
és jellemzése***

Ph.D. értekezés tézisei

1997.

Készült az MTA SZBK Genetikai Intézetében



1. Bevezetés

A többsejtű élőlények integritását számtalan környezeti tényező veszélyezteti. Az immunrendszer fő feladata ezek közül kiküszöbölni azokat, amelyek a szervezet erőforrásait saját túlélésük és szaporodásuk érdekében használják fel, és amelyek ezáltal a szervezet számára veszélyt, stresszt vagy pusztulást jelentenek. A gerinces állatokban az immunfunkciók többségét a fehérvérsejtek látják el, amelyek a vér és a nyirok útján az egész szervezetben képesek a veszélyes struktúrák felkutatására és felismerésére, majd helyben vagy a zömmel fehérvérsejtekből álló immunszervekben egymással együttműködve hatékony immunválasz kialakítására.

Sokáig az immunválaszban fontos szerepet játszó sejteket csak alaktani sajátásaik alapján tudták elkülöníteni egymástól. A monoklonális ellenanyagok előállításának kidolgozása később lehetővé tette a fehérvérsejtek felszínén található fehérjék széleskörű szerológiai jellemzését. Ezen fehérjéket markerként használva mód nyílt a fő fehérvérsejt-fejlődési vonalak azonosítására és a fejlődési vonalakon belül a különböző fejlődési szakaszok és aktivációs állapotok megkülönböztetésére. A különböző fehérvérsejt-antigének ellen rendelkezésre álló ellenanyagok immuncitokémiai és immunhisztokémiai alkalmazásával lehetővé vált az immunsejtek kóros eloszlásainak nyomon követése, így a szerológiai markereket felismerő ellenanyagok megjelenése a humán patológiai diagnosztikát is forradalmasította.

Az emberi fehérvérsejt-antigének megismerésével párhuzamosan az állatokban is megindult az immunrendszer molekuláris szintű jellemzése. Az állatfajok nagy száma és az ehhez viszonyítva rendelkezésre álló erőforrások szűkössége miatt az egyes állatfajok immunrendszerével kapcsolatos alak- és oktani ismereteink korlátozottak. Kevés az állatok immunsejtjeit felismerő reagens, ezért az immundiagnosztikai módszerek szemben a humán gyakorlattal az állatorvosi patológiában még nem terjedhettek el széles körben.

2. Célkitűzések

Munkám célja olyan immunreagensek előállítása és/vagy jellemzése volt, amelyek nemcsak megbízható módon felismerik az immunsejteket a különböző állatfajokban, hanem az állatorvosi alkalmazás szempontjából kiemelkedő fontosságú két egymástól független követelménynek is megfelelnek.

1, Képesek az általuk felismert epitóp(ok)hoz kapcsolódni a rögzített szövetekben is lehetővé téve az ilyen ellenanyagok visszatekintő és rutin vizsgálatokban történő alkalmazását.

2, A törzsféjlesztés során olyan állandósult struktúrákhoz kötődnek, ami az alkalmazhatóságukat nem korlátozza egy fajra vagy egy közeli rokon fajokból álló szűk csoportra.

Kísérleteim során több különböző megközelítéssel előállított ellenanyag-preparátum közül kíséreltünk meg ennek a kettős követelményrendszernek eleget tevő immunreagenseket találni.

3. Eredmények

3.1. Fehérvérsejtek membránantigénjeinek extracelluláris epitópjait felismerő monoklonális ellenanyagok

A "Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens" keretében olyan monoklonális ellenanyagokat vizsgáltunk, amelyeket különböző kérődző állatfajokból származó fehérvérsejt-szuszpenziókkal immunizált egér B-limfocita-klónjainak immortalizálásával előállított hibridómaklonok termeltek, és amelyek szarvasmarha fehérvérsejt-felszíni antigének extracelluláris epitópjait ismerték fel.

A háromszázöt vizsgált monoklonális ellenanyag közül harmincnyolc adott reprodukálható és az előzetes áramlási citofluorimetriai és a natív immunhisztokémiai kísérletekben kapott adatokkal összhangban lévő eredményt neutrális pufferelt formalinnal rögzített szarvasmarha nyirokszöveteken. A legtöbb esetben a jelölődés megléte és erőssége nagy mértékben függött az immunhisztokémiai festést megelőző különböző epitóp reaktiváló módszerektől. A rögzített szöveteken is felhasználható monoklonális ellenanyagok segítségével lehetővé vált a B- és T- limfociták, a monociták, a makrofágok, a granulociták, a vörösvértestek és a vaszkuláris endothel sejtek, illetve ezen sejtípusok jól körülírható alcsoportjának azonosítása szarvasmarhában.

A háromszázöt szarvasmarha fehérvérsejt-felszíni antigént felismerő ellenanyaggal különböző emlősfajokból származó fehérvérsejteket jelöltünk meg, hogy az állatfajok széles körében fehérvérsejt-antigéneket felismerő

ellenanyagokat azonosítsunk. A keresztreakciót adó ellenanyagok aránya jól tükrözte a vizsgált fajok szarvasmarhához viszonyított rokonsági helyzetét, hiszen a közelebbi rokonsági fokhoz az epitópok nagyobb mértékű szerológiai keresztreakciós gyakorisága társult. Tíz olyan ellenanyagot találtunk, amelyek valamennyi vizsgált emlősfajban fehérvérsejteket ismertek fel. E tíz ellenanyag esetében a különböző állatfajokban észlelt reaktivitás azonos sejtpopulációkra és nagy valószínűséggel azonos – de legalábbis hasonló – molekulásúlyú antigénekre korlátozódott, ami a keresztreakció specificitására és ezáltal a felismert antigén nagy fokú állandósultságára utalt.

Várakozásainknak megfelelően a háromszázöt reagens között csak két monoklonális ellenanyag (DH16, VPM36) ismert fel olyan epitópot, amelyik a rögzítés során nem módosul visszafordíthatatlanul és a fajok szélesebb körében is állandósult.

3.2. Fehérvérsejtek membránantigénjeinek intracelluláris epitópjait felismerő

affinitás-tisztított szérumok

3.2.1. A CD3 ϵ fehérjét felismerő immunreagens

A CD3 láncok a T sejt receptor láncokhoz kapcsolódó invariábilis fehérjék, amelyek a variábilis láncok antigénkötésének jelét közvetítik a sejt felé. A CD3 transzmembrán fehérjét a T limfoid fejlődési vonalba tartozó sejtek és a természetes ölösejtek fejezi ki. Az emberi CD3 ϵ lánc 177.-190. aminosavainak megfelelő aminosav-sorrendű peptidet felismerő, Mason és tsi. által előállított p.aCD3 ϵ (177-190) affinitás-tisztított szérum alkalmasnak bizonyult a T limfociták (és a természetes ölösejtek) kimutatására natív és

archivált szövetekben. Ezt a reagenst a kóros szöveteket beszűrő limfoid sejtek eredetének meghatározására az emberi immunohisztopatológiában széles körben használják.

A legutóbbi időkben a CD3 ϵ fehérje aminosavsorrendjét több emlősfajban meghatározták. A különböző fajkból származó fehérjeszekvenciák összehasonlításakor kiderült, hogy a fehérje citoplazmatikus része erősen állandósult szakaszokat is tartalmaz. A p.aCD3 ϵ (177-190) szérum által felismert emberi CD3 ϵ fehérjerész is magas fokú állandósultságot mutatott. A szérum az emberi CD3 ϵ fehérjéhez hasonló molekulasúlyú fehérjéket ismert fel több madár- és emlősfaj immunszerv-lizátumaiban, és valamennyi vizsgált madár- és emlősfajban limfoid sejteket jelölt a nyirokszervek T-sejtes területein mind natív, mind archivált szövettani metszeteken. E kísérletek egyértelműen arra utaltak, hogy a CD3 ϵ lánc a madár- és emlősfajokban állandósult.

A p.aCD3 ϵ (177-190) szérummal állati kórképekből származó szövettani metszeteket immunfestettünk, hogy feltérképezzük a szérum felhasználási területeit az állatorvosi patológiában. A legtöbb esetben a CD3 ϵ + sejteket még tíz éves szövettani mintákban is láthatóvá tudtuk tenni. Ez a reagens tehát megbízható eszköz lehet az egészséges és kóros limfoid szövetek és limfoid beszűrődések jellemzéséhez a kutató munkában és a napi állatorvosi gyakorlatban egyaránt.

3.2.2. A CD43 fehérjét felismerő immunreagensek

A CD43 egy erősen O-glikozilált transzmembrán fehérje, amely megtalálható a vörösvértestek és az érett B-sejtek kivételével valamennyi hematopoetikus sejten. Bár a fehérje pontos feladata nem ismert, feltételezhető, hogy a sejt jeltovábbító és adhéziós folyamataiban játszik szerepet. A rendelkezésre álló emberi, egér és patkány fehérje aminosav-sorrendek összehasonlításakor kiderült, hogy a fehérje citoplazmatikus régiója állandósult szakaszokat is tartalmaz.

Az általunk előállított affinitás-tisztított p.aCD43(352-372) szérum egy ilyen állandósultnak talált szakasz (az emberi CD43 fehérje 352.-372. aminosavai) alapján szintetizált oligopeptidet (CD43(352-372)) ismer fel. Amíg a szérum a permeabilizált CD43- P3HR1 sejteket nem jelölte és a sejtvonal lizátumában nem ismert fel fehérjét, addig azonos kísérleti körülmények között a reagens segítségével CD43+ Jurkat sejteken erős, és a CD43(352-372) peptiddel dóziszfüggően gátolható membránfestődést kaptunk, valamint a sejtvonal lizátumában a CD43 molekulásúlyával megegyező 135 kD molekulásúlyú fehérjét mutattunk ki. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a p.aCD43(352-372) szérum felismeri a natív és denaturált CD43 fehérje 352.-372. aminosavainak megfelelő szakaszát. Sajnos a p.aCD43(352-372) szérum títtere olyan alacsony volt, hogy az a további munkát nem tette lehetővé.

A p.aCD43(352-372) ellenanyaggal szerzett kedvezőtlen tapasztalatok miatt úgy döntöttünk, hogy a CD43 fehérje citoplazmatikus részét GST fúziós fehérje formájában molekuláris biológiai módszerekkel állítjuk elő, és a

túltermelt fehérjével történő immunizálással előállított szérum affinitás-tisztított frakcióját vizsgáljuk tovább (p.aCD43cp). Immunoprecipitációs és Western blot kísérletekben bizonyítottuk, hogy a p.aCD43cp szérum a CD43 molekulasúlyával megegyező molekulasúlyú fehérjét ismer fel CD43+ sejtvonalak lizátumaiban. Az affinitás-tisztított szérum a permeabilizált CD43+ sejtek membránját jelölte, míg a CD43- sejteket nem. Kettős jelöléses kísérletekben bizonyítottuk, hogy a p.aCD43cp szérum a vér fehérvérsejtjei közül a T-limfocitákat, a monocitákat és a granulocitákat ismeri fel. A nyirokszövetekben a szérum ugyanezeket a sejtípusokat jelölte. Ezzel bizonyítottuk, hogy a reagens alkalmas a humán CD43 fehérje natív és denaturált formájának kimutatására.

Megvizsgáltuk, hogy a CD43 citoplazmatikus régiójának állandósult szakaszai kimutathatók-e a különböző gerinces állatfajokban szerológiai módszerekkel. Western blot kísérletben a szérum felismerte az ember és egér CD43 fehérjét, de más vizsgált fajokat nem. Indirekt immunfluoreszcenciás és immunhisztokémiai kísérletekben viszont a reagens a vizsgált emlősfajok túlnyomó többségében a T-limfocitákat és a mieloid sejteket jelölte. A p.aCD43cp szérum a CD43 fehérje azonosítását és részleges jellemzését több olyan fajban is lehetővé tette, amelyben a fehérjét eddig nem írták le. A biokémiai és immunhisztokémiai kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a CD43 fehérje felépítése és kifejeződési mintázata több emlősfajban állandósult.

A legtöbb esetben a p.aCD43cp reagens segítségével a CD43+ sejteket még több éves, állati kóreseteket képviselő szövettani mintákból is

könnyen láthatóvá tudtuk tenni, annak ellenére, hogy a szövetek rögzítésekor és beágyazásakor alkalmazott körülmények sokszor kedvezőtlenek voltak. Tapasztalataink szerint a p.aCD43cp szérum alkalmas lehet a különböző beszűrődések hematopoetikus eredetének igazolására és más reagensekkel együtt a hematopoetikus eredetű beszűrődések jellemzésére az állatorvosi kutató munkában és a napi gyakorlatban egyaránt.

4. Következtetések

A különböző megközelítéssel előállított reagensekkel szerzett tapasztalatok egyúttal lehetőséget adtak a különböző megközelítések előnyeinek és hátrányainak összehasonlítására az állatorvosi patológiai alkalmazhatóság szempontjából.

A fehérjekeverékekkel (pl. sejtszuspenzió) végzett immunizálás során az immunválasz csak véletlenszerűen irányul olyan epitópok ellen, amelyek egyrészt a rögzítés és beágyazás során nem szenvednek visszafordíthatatlan változást, másrészt az állatfajok szélesebb körében állandósultak. Az ilyen megközelítéssel előállított immunreagensek (pl. a szarvasmarha sejtfelszíni fehérvérsajt-antigénjeit felismerő monoklonális ellenanyagok) ezért csak ritkán felelnek meg a széleskörű állatorvosi rutin alkalmazás szempontjából fontos követelményeknek.

Az immunválaszt irányítottá tehetjük, ha az immunizálást tisztított fehérjékkel végezzük. Mivel a fehérvérsajt-fehérjék általában nem tisztíthatók homogenitásig a hagyományos biokémiai módszerekkel, a tiszta antigén-készítményt más módon kell előállítanunk. A megfelelő szekvencia-adatok

ismeretében peptideket szintetizálhatunk vagy a fehérjéket vagy azok egyes doménjeit baktériumban túltermeltethetjük. A peptidekkel és rekombináns fehérjékkel végzett immunizálással előállított sejtfelszíni fehérvérsajt-antigének sejten belüli epitópjait felismerő affinitás-tisztított szérumokkal kapott eredmények biztatóak. Az anti-peptid szérumok az állatorvosi rutin diagnosztikában jól alkalmazható reagensekké válhatnak, amennyiben az állandósultnak jósolt aminosavsorrend alapján szintetizált peptid egyrészt megfelelően immunogénnek bizonyul, másrészt a szérum által felismert epitópok nem szenvednek visszafordíthatatlan károsodást a rögzítés és beágyazás során (p.aCD3 ϵ (177-190)). Ha ezek a feltételek nem teljesülnek (p.aCD43(352-372)), akkor célszerűbb az immunizálást a molekuláris biológiai eszközökkel létrehozott fehérjével vagy fehérjedoménnel végezni, mert a teljes fehérje vagy fehérjedomén valamennyi olyan potenciális epitópot tartalmazza, amely ellen képződött ellenanyag a céljainknak megfelelő lehet. A p.aCD43cp szérummal szerzett tapasztalatok igazolták, hogy a rekombináns fehérjével történő immunizálással az állatorvosi rutindiagnosztikumokkal szemben támasztott követelményeket kielégítő immunreagenseket nyerhetünk.

5. Az értekezéshez felhasznált közlemények

Kurucz E., Glávits R., Krenács L., Krenács T., Ocsovszki I., **Keresztes G.**, Monostori E. and Andó I.: An antiserum reacts with an evolutionary conserved region in the ϵ subunit of the T-cell receptor-CD3 complex in phylogenetically distant species *Immunol.Letters* 38:177 (1993)

Keresztes G., Glávits R., Krenács L., Kurucz É. and Andó I.: An anti-CD3 ϵ serum detects T lymphocytes in paraffin-embedded pathological tissues in many animal species *Immunol.Letters* 50:167 (1996)

Keresztes G., Takács L., Vilmos P., Kurucz E. and Andó I.: Monoclonal antibodies detecting components of the bovine immune system in formaldehyde fixed paraffin-embedded tissue specimens *Vet.Immunol.Immunopathol.* 52:383 (1996)

Vilmos P., Kurucz E., Ocsovszki I., **Keresztes G.**, and Andó I.: Phylogenetically conserved epitopes of leukocyte antigens *Vet.Immunol.Immunopathol.* 52:415 (1996)

Keresztes G., Szlanka T., Vilmos P., Tóth G., Ocsovszki I. and Andó I.: An antiserum raised against the recombinant cytoplasmic tail of the human CD43 glycoprotein identifies CD43 in many mammalian species - kézirat készülében