

B3432

**A LIMFOCITA FUNKCIÓKBAN SZEREPET JÁTSZÓ
SEJTFELSZÍNI MARKEREK VIZSGÁLATA, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A
TÖRZSFEJLŐDÉS SORÁN ÁLLANDÓSULT STRUKTÚRÁKRA**

PhD értekezés

1996.

Dr Kurucz Éva

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében



A PhD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

1. BEVEZETÉS

Az immunrendszer a törzsfejlődés során a saját és a testidegen anyagok megkülönböztetésére differenciálódott. A magasabbrendű gerincesek, az emlősök és a madarak limfocitái, az immunrendszer antigénspecifikus sejtjei, antigénstimuláció hatására aktiválódnak, végrehajtó sejtekké fejlődnek és így vesznek részt az immunválaszban, a kórokozók és az idegen antigént hordozó sejtek elpusztításában. A celluláris immunválaszt biztosító, tímusz eredetű T limfociták antigénspecifikus receptorai (TCR) az antigént bemutató sejtek felületén megjelenő, a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekuláival kapcsolódott immunogén peptideket ismerik fel, az antigén kötését és az ezt követő jelátviteli folyamatot, legalább nyolc fehérjeláncuk egymással összerendezett működése révén valósítják meg. Míg a T sejt receptor variabilitást mutató α és β láncainak funkciója az antigén specifikus kötése, a CD3 komplex és a ζ család láncai a jelátvitelben vesznek részt.

A T sejt aktiváció folyamatának megismeréséhez nagymértékben hozzájárulnak a sejtfelszíni receptorokkal kapcsolódó monoklonális ellenanyagok. Az ellenanyagok a receptorokhoz kötődve általában a természetes ligand kötését követő biokémiai folyamatokat váltanak ki. A CD3 molekulával kapcsolódó monoklonális ellenanyagok a CD3 komplex ϵ lánc extracelluláris részét ismerik fel, kötődésük az antigénkötődés által elindított folyamatokhoz hasonló eseményeket vált ki. Az érett T sejtek esetében a TCR antigénkötése, vagy a CD3 specifikus monoklonális ellenanyag kapcsolódása eredményezhet sejtdifferenciálódást és proliferációt, de hosszantartó válaszképtelenséget,

anergiát is, attól függően, hogy a szükséges másodlagos, (ko-stimulációs) jelek rendelkezésre állnak-e.

Egy ilyen másodlagos jelet szolgáltat a Leukocita Közös Antigén (CD45), a transzmembrán tirozinfoszfátázok molekulacsaládjába tartozó enzim, mely tirozinfoszfátáz aktivitása révén szabályozza a T sejt aktiváció korai fázisában szerepet játszó tirozin kinázokat, a p56^{lck}-t és a p59^{lyn}-t. A molekulának legalább négyféle izoformája ismert, melyek létrejötte az extracelluláris régió elsődleges szerkezetének variálódásából adódik, amit a prekursor mRNS "alternatív splicing"-ja okoz. A különböző molekulatömegű izoformák exonspecifikus epitópot felismerő monoklonális ellenanyagokkal jellemezhetők, segítségével a CD45 molekula sejtfelszíni régiójának T sejt aktiválásban betöltött szerepe vizsgálható.

Számos, az immunválaszban résztvevő sejtfelszíni molekula, így a T sejt antigén receptor, a Leukocita Közös Antigén az emberi leukociták mellett az emlősök immunsejtjein is általánosan előforduló molekulák. Ezen funkcionális markerek fehérje szintű konzerváltságának vizsgálata a különböző fajokban homológ molekulák szerkezetének és funkciójának összehasonlítására ad lehetőséget, a konzervált régiók nukleotid szintű vizsgálata az immunválasz evolúciójának megismeréséhez járulhat hozzá.

2.CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A Leukocita Közös Antigén sejtfelszíni régió szerepének vizsgálata a T sejt aktiválási folyamatban.

2.2. A törzsféjlődés során állandósult fehérje szekvencák vizsgálata az immunválaszban alapvető szerepet játszó leukocita sejtfelszíni markereken.

2.2.1. A T sejt receptor-CD3 komplex filogenetikailag konzervált régiójának vizsgálata.

2.2.2. Az immunválaszban résztvevő, a törzsfejlődés során állandósult struktúrákat azonosító monoklonális ellenanyagok előállítása.

2.2.3. Az emlősök filogenetikailag konzervált leukocita sejtfelszíni markereinek vizsgálata.

2.3. Az állandósult sejtfelszíni markerek kapcsoltsági csoportokhoz rendelése.

2.4. A szarvasmarha immunrendszerét elemeire bontó, az állatorvosi diagnosztikában jól használható monoklonális ellenanyagpanel összeállítása.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

3.1. Kísérleteinkben a CD45 molekula különböző izoformáinak a T sejt aktivációban betöltött szerepét, nevezetesen a CD3 molekula ϵ láncán és a CD2 molekulán keresztül kiváltott T sejt aktiváció körülményeit vizsgáltuk. Az ϵ lánc extracelluláris régióján lévő epitópot felismerő monoklonális ellenanyaggal (OKT-3) az emberi T limfociták makrofágok jelenlétében aktiválhatók, proliferációra és interleukin-2 (IL-2) termelésére bírhatók. A tisztított T limfociták számára csak szilárd fázishoz, pl. a szövettenyésztő edény felületére kötött ellenanyag szolgáltat megfelelő aktivációs jelet. A CD45 molekula vizsgált izoformái, a CD45, CD45RA és CD45RO epitópok specifikus monoklonális ellenanyagokkal történő keresztkötése a T sejtek proliferációjának és IL-2 termelésének fokozódását (kostimuláció) eredményezte. Ez a hatás azonban csak akkor érvényesült, amikor mind a CD3, mind a CD45 ellenanyagok szilárd fázishoz, makrofágok jelenlétében azok Fc receptoraihoz, tisztított T sejtek esetén a szövettenyésztő edény polisztirol felületéhez voltak kötve. Ilyen körülmények között a leukociták

proliferációja lényegesen emelkedett a CD45 keresztkötetést nem tartalmazó kontrollhoz képest. A proliferáció fokozódása minden esetben együtt járt a T sejt osztódást serkentő citokin, az interleukin-2 (IL-2) termelődésének fokozódásával. Ebből arra következtethetünk, hogy mind a TCR/CD3 komplexen, mind a CD2 antigénen keresztül kiváltott T sejt aktiválódási folyamatot a CD45 izoformákon sejtbe jutó jelek pozitívan szabályozzák. Az a megfigyelésünk, hogy a CD45 antigén különböző izoformái csak keresztkötetett állapotban képesek a CD3 molekulán keresztül történő aktivációs utat befolyásolni, a molekula extracelluláris részének receptor funkciójára enged következtetni, végleges bizonyítékot azonban csak a természetes ligand megtalálása jelenthet.

3.2. Munkánk során T sejt receptor-CD3 komplex ϵ -láncának filogenetikai konzervatizmusát vizsgáltuk. Különböző emlős és madárfajokban az ϵ láncsal homológ molekulákat kerestünk szerológiai módszerekkel. Kísérleteinkben az emberi CD3 ϵ lánc intracelluláris régiójában a 156-168 aminosav szekvenciát felismerő ellenanyagot alkalmaztunk. Vizsgálataink szerint az ellenanyag szarvasmarha, bivaly és sertés nyirokcsomókban szintén T sejt zónákkal reagál, míg a B sejt follikulusokkal nem, kivéve néhány szétszórtan elhelyezkedő sejtet, melyek valószínűleg a B sejt zónában elhelyezkedő segítő T sejtek. Madárban, a házityúk lépéből származó szövettani metszeten, szintén a nem festődő follikulusok körüli extrafollikuláris régiók, a T sejt zónák, mutattak erős reakciót. A madárban történő B sejt fejlődés központi szervében (Bursa Fabricii), szinte kizárólag negatív sejteket találtunk. Biokémiai vizsgálataink is alátámasztották a szövettani eredményeinket. Az ellenanyag mellett, hogy a nyirokszervekben kizárólag T-sejt régiókkal reagált, a vizsgált fajokban közel azonos, (19-20 kDa) molekulatömegű fehérjét ismert fel. A madár és emlős nyirokszövetek immunhisztológiai és biokémiai vizsgálatának eredményeként arra a következtetésre jutottunk, hogy az emberi T sejt receptor molekula sejt felszíni

kifejeződésében és a jelátvitelben jelentős szerepet játszó CD3 ϵ lánc az emberben, a szarvasmarhában, a bivalyban, a sertésben és a házityúokban nagyfokú konzervatizmust mutat. Szövettani vizsgálatainkat kiterjesztettük más, taxonómiai távol álló emlős, madár, hüllő és kételtű fajokra is. Kísérleteink során az irodalomban először azonosítottuk a madár CD3 ϵ molekulát. A madarak és emlősök szöveti mintáiban minden esetben igazoltuk az ϵ láncban lévő közös struktúrát, míg a hüllők és a kételtűek esetében nem kaptunk szöveti festődést.

3.3.. Az emlősök immunválaszában résztvevő, az evolúció során konzervált epitópokat kerestünk szerológiai módszerekkel szarvasmarha, bivaly, juh, teve, sertés és emberi limfocitákon 298 monoklonális ellenanyag felhasználásával. Ezek egy részét a laboratóriumunkban előállított, kérődző fajok leukocita antigénekkal kapcsolódó monoklonális ellenanyagok képezték. A különböző fajokból izolált perifériás vér mononukleáris sejteken az ellenanyagok által felismert struktúrák megoszlását FACS analízissel vizsgáltuk, a konzervatív epitópok biokémiai azonosítását Western-blot analízissel végeztük. Eredményeinkből egy olyan filogenetikai fát alkottunk, amely a vizsgált fajok immunsejtjein lévő sejtfelszíni markerei között fennálló szerológiai rokonságot mutatja be. A közel háromszáz ellenanyagból 13 ismert fel filogenetikailag erősen konzervált extracelluláris epitópot.. A homológ molekulákon lévő epitópokat felismerő monoklonális ellenanyagokat clusterekbe (Cluster of Differentiation, CD) soroltuk. Az általunk azonosított konzervált epitópok nagy része a sejt-sejt kölcsönhatásokban, CD29 (intergrin b1), CD44, CD81 (TAPA-1) MHC-I, MHC-II és a sejtadhéziós folyamatokban CD11a, CD41, CD62L résztvevő molekulákon található. A különböző fajokban azonosított, a törzsféjlődés során állandósult régiók vizsgálata elméleti és gyakorlati jelentőséggel bír. Egyrészt elősegíti a védekezési mechanizmusok közös elemeinek megismerését, másrészt az



állatorvosi gyakorlatban széleskörűen alkalmazható diagnosztikumok kifejlesztését teszi lehetővé.

3.4. Ellenanyagaink CD besorolását, azaz antigénspecifitásuk alapján történő azonosítását a "Third Workshop on Ruminant Leucocyte Antigens" nemzetközi fórum is megerősítette. Így lehetővé vált, hogy kromoszómákhoz, vagy már létező kapcsoltsági csoportokhoz térképezzük az azonosított leukocita antigéneket kódoló géneket, illetve a szarvasmarhában és a bivalyban egymással homológ kromoszómákat keressünk. Hörcsög fibroblaszt sejtvonal és bivaly leukociták fúziójának eredményeként létrejött hibridsejt vonalakban vizsgáltuk a bivaly leukocita antigének expresszióját. A kísérletekben 35 szomatikus sejt hibrid vonalat és bivaly, valamint szarvasmarha leukocitákat jellemeztünk negyven szarvasmarha és bivaly leukocitákkal reagáló ellenanyag felhasználásával. A hibridsejteken áramlási citometriás vizsgálattal meghatároztuk egy-egy sejt felszíni antigén jelenlétét vagy hiányát. Kapcsoltsági csoportokat hoztunk létre részben a leukocita antigének, részben pedig egyes leukocita antigének és egyéb bivaly eredetű kapcsoltsági csoportok és a leukocita antigének között. Hat kapcsoltsági csoportot találtunk, továbbá három marker csoportot már létező kapcsoltsági csoporthoz térképeztünk. A bivaly leukocitákon és a hibridsejteken végzett immunoblot analízis eredményeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy a hibridsejteken kapott szerológiai reakciók az antigének expressziójának, nem pedig véletlen keresztreakcióknak az eredménye.

3.5. A kérődzők leukocita antigénjeivel kapcsolódó monoklonális ellenanyagokból olyan ellenanyag panelt állítottunk elő, mely a különböző típusú immunsejtek, a B és T limfociták, monociták, makrofágok, granulociták, vörösvértestek és vaszkuláris endoteliás sejtek azonosítására alkalmas.

4. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSZEGZÉSE

4.1. Kimutattuk, hogy a Leukocita Közös Antigén izoformái pozitívan szabályozzák a T sejt aktivációt, a különböző izoformákat azonosító monoklonális ellenanyagok fokozzák a sejtek proliferációját és interleukin-2 termelését.

4.2. Az emberi, szarvasmarha, bivaly, sertés és házityúk limfoid szöveteinek vizsgálata során azt találtuk, hogy a T sejt receptor-CD3 komplex epsilon láncának egy régiója filogenetikailag konzervált.

4.3. Az immunválaszban résztvevő, a filogenezis során állandósult struktúrákat azonosító monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő.

4.4. Az egymással analóg leukocita alpopulációkat azonosító ellenanyagok segítségével olyan filogenetikai fát alkottunk, amelyen a leukocita antigének rokonsági foka jól összevethető a vizsgált fajok közötti filogenetikai távolsággal.

4.5. Vizibivaly leukocita sejtfelszíni markereket kapcsoltsági csoportokhoz rendeltük.

4.6. A szarvasmarha leukocita antigénekkal kapcsolódó monoklonális ellenanyagokból olyan ellenanyagpanel állítottunk elő, amely az állatorvosi gyakorlatban jól használható az immunrendszer sejtjeinek azonosítására.

7. A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. CD3-induced T-cell proliferation and interleukin-2 secretion is modulated by the CD45 antigen. T. Oravecz, É. Monostori, É. Kurucz, L. Takács, I. Andó. Scand. J. Immunol. 34, 531. (1991).

2. Novel heterogeneity of the leucocyte common antigen (CD45): disulfidebound heterodimers between CD45 and an 80 Da polypeptide. T. Oravecz,É. Monostori, O. Adrian, É. Kurucz, I. Andó. Immunology Letters, 40, 7. (1994).
3. An antiserum reacts with an evolutionary conserved region in the ϵ subunit of the T cell receptor-CD3 complex in phylogenetically distant species. É. Kurucz, R. Glavits, L. Krenács, T. Krenács, I. Ocsovszki, G. Keresztes, É. Monostori, I. Andó. Immunology Letters. 38, 167. (1993).
4. Phylogenetically conserved epitopes of leukocyte antigens. P.Vilmos, É. Kurucz,I. Ocsovszki, G. Keresztes, I. Andó. Vet. Immunol. Immunopathol. (in press,1996).
5. Assignment of genes for leukocyte surface molecules to river buffalo chromosomes. S.M. El Nahas, H.A. Ramadan, A.A. Abou-Mossallem, É. Kurucz, P. Vilmos, I. Andó. Vet. Immunol. Immunopathol. (in press, 1996).
6. Monoclonal antibodies detecting components of the bovine immune system in formaldehyde fixed paraffin-embedded tissue specimens. G. Keresztes, L. Takács, P. Vilmos, É. Kurucz, I. Andó. Vet. Immunol. Immunopathol. (in press, 1996).