

Doktori értekezés tézisei

CpG és egyéb oligonukleotidok immunmoduláló hatása

Herbáth Melinda

Témavezető: **Prechl József, M.D., Ph.D.**



Biológia Doktori Iskola

Immunológia Program

A Doktori Iskola és a Ph.D. Program vezetője: **Prof. Erdei Anna, D.Sc.**

ELTE TTK Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest

2015

Bevezetés

A különböző vakcinációs módszerek napjainkban gyors fejlődésen mennek keresztül, mert világossá vált, hogy nemcsak a fertőző betegségek elleni küzdelemben alkalmazhatóak hatékonyan, hanem számos egyéb esetben, például tumoros és allergiás megbetegedésekben is. Az immunizáció során fontos, hogy olyan izotípus profil alakuljon ki, amely védelmet nyújt az adott betegséggel szemben. Ez megfelelő vakcinációs stratégiával befolyásolható. A kiváltott sejtes vagy ellenanyagválasz befolyásolásához hatékony eszköz lehet az antigén bizonyos immunreceptorokhoz történő irányítása, vagy az immunrendszer saját szabályozási mechanizmusainak kihasználása. Az antigénnel együtt beadott immunreceptor-ligandumok például aktiváló, vagy épp gátló jeleket közvetíthetnek az adott antigénnel kapcsolatban. Érdekes példa erre a mintázatfelismerő receptorok ligandumainak, például a CpG oligodeoxinukleotidoknak (CpG ODN) adjuvánsként történő felhasználása.

A nukleinsavakról kimutatták, hogy a természetes immunválasz rendkívül hatékony aktivátorai, amely nemcsak a kórokozók elleni gyors válaszreakciót biztosítja, hanem formálja a lassabban kialakuló adaptív immunitást is. A CpG oligonukleotidokat, amelyek a bakteriális DNS immunstimuláló hatásáért felelősek, metilátlan CG nukleotidpárok és az ezeket határoló jellegzetes szekvenciák alkotják. A CpG ODN-eket a Toll-like receptor 9 (TLR9) ismeri fel. A DNS váza (foszfodiészter vagy foszforotioát gerinc), a CG párok száma és az őket határoló nukleobázisok mind befolyásolják a CpG ODN által kiváltott biológiai hatásokat. Kimutatták, hogy a DNS gerincének foszforotioát-módosítása nemcsak nukleáz rezisztenssé teszi az ODN-t, hanem más fontos változásokat is okoz, például hatékonyabbá teszi az ODN sejtek általi felvételét és megnöveli annak biológiai hozzáférhetőségét is. A foszforotioát vázú CpG ODN-ek, erős aktiváló hatásuk és stabilitásuk miatt, általánosan használt eszközeivé váltak a TLR9 és az általa kiváltott immunológiai hatások vizsgálatának. A jelen munka célja a CpG és egyéb szintetikus ODN-ek immunválaszt befolyásoló hatásainak vizsgálata volt.

Célkitűzések

Fő célunk az volt, hogy megismerjük a szintetikus oligonukleotidok különböző típusainak az immunválaszt befolyásoló hatásait. Ezen ODN-ek TLR9 általi APC aktiváló hatása már ismert, azonban nemrég ismertté vált, hogy más sejttípusokban, más útvonalakon is hathatnak. Mivel a CpG ODN-eket már adjuvánsként is alkalmazzák egyes betegségekben, elengedhetetlen, hogy a lehetséges hatásmechanizmusaik teljes spektrumát minél hamarabb megismerjük.

Vizsgáltuk a CpG ODN-ek hatását az antigén felvételére, a kiváltott immunválaszra, valamint azt is, hogyan befolyásolja a CpG és más ODN-ek általi T-sejt kostimuláció a kiváltott B-sejtválaszt. Új módszereket dolgoztunk ki azért, hogy az általunk vizsgált mintákból minél komplexebb biológiai információkat nyerjünk.

Célkitűzéseink tehát a következők voltak:

1. Az ODN-antigén komplexek APC-k és T-sejtek általi felvételének vizsgálata.
2. Az együttesen beadott szabad és antigénhez konjugált CpG adjuváns hatásának vizsgálata egérben.
3. Az aktiváló, kontroll és gátló ODN-ek hatásának összehasonlítása az antigén felvételére, a sejtaktivációra és a B-sejtek ellenanyagtermelő sejtje (ASC) történő differenciációjára.
4. Annak vizsgálata, hogy szükség van-e specifikus B-sejt - T-sejt interakcióra ahhoz, hogy a nem-CpG ODN-ek hatással legyenek a B-sejtek izotípus váltására és T-sejt függő ellenanyag-termelésére.
5. Új multiplex módszerek kifejlesztése, amelyek a humorális immunválasz hatékonyabb vizsgálatát teszik lehetővé.

Alkalmazott módszerek

- Egér lép, nyirokcsomó és csontvelői sejtek izolálása, tenyésztése és *in vitro* aktivációja, csontvelői eredetű dendritikus sejtek (BMDC) differenciáltatása
- Áramlási citofluorimetria és sejtválogatás (sejtaktiváció és proliferáció mérése, streptavidin (SA)-ODN komplexek sejtek általi felvételének meghatározása)
- Sejtszeparálás mágneses gyöngyök segítségével (MACS)
- Quantitative real-time PCR (TLR9 expresszió mérése)
- Egerek szubkután immunizálása
- ELISA (Immunoglobulin (Ig) szekréció mérése)
- Reverse Protein Microarray (Ig szekréció mérése)
- ELISPOT (Ig-termelő B-sejtek számának meghatározása)
- Fluoreszcens ELISPOT nitrocellulózzal fedett lemezekon (eltérő Ig-termelő B-sejtek egyidejű detektálása)

Eredmények és megbeszélésük / I.

A CpG oligonukleotidok sejtekhez történő kötődésének és aktiváló hatásának meghatározása *in vitro*.

- Bemutattuk, hogy jégen történő inkubáció során a SA-CpG komplexek kötődnek az elpusztult sejtekhez, az élőkhöz azonban nem. Ez arra utal, hogy az élő sejtek a felszínükön nem expresszálnak jelentős mennyiségű ODN receptort, különben megkötötték volna a SA-CpG komplexeket. A gyenge vagy hiányzó anti-SA jelek ugyanezt támasztják alá.
- Az antigén CpG-hez történő konjugációja elősegíti annak sejtekhez történő kötődését és felvételét mind antigén-prezentáló sejtek (B-sejtek és BMDC-k), mind T-sejtek által, 24 órás inkubációt követően.
- A CpG biotinizálása és SA-hoz történő konjugációja nem rontja a szabad CpG által kiváltott APC aktivációt.

Eredmények és megbeszélésük / II.

Az antigénhez konjugált és szabad ODN-ek kompetálnak, és ez hátrányosan befolyásolja immunogenitásukat.

- A szabad és antigénhez konjugált CpG között versengés lép fel a BMDC-k és T-sejtek általi felvételért, azonban a B-sejtek esetében nem, vagy csak gyenge kompetíció tapasztalható. Azt a tényt, hogy a B-sejtekben nehezebb kompetíciót kiváltani, magyarázhatja az erre a sejttípusra jellemző magas TLR9 expresszió, amely mind a nyugvó, mind az aktivált sejtekben megfigyelhető.
- Bár a szabad kontroll (CTRL) ODN nem aktiválja az APC-eket, kompetíciós profilja megegyezik a CpG ODN-ével. Az inhibitor (INH) ODN szintén verseng a SA-CpG komplexekkel, de kevésbé hatékonyan, mint a szabad CTRL vagy CpG ODN-ek. Lehetséges, hogy ezért a különbségért az INH ODN eltérő szerkezete a felelős.
- Szemben a CTRL és INH ODN-ekhez történő kapcsolással, a modell antigén (SA) CpG-hez történő konjugációja megnöveli az antigén-specifikus ellenanyagok mennyiségét. Az általunk használt koncentrációban az antigénhez konjugált CpG-nek volt kimutatható immunválaszt fokozó hatása, míg a szabad CpG-nek nem.

- Olyan vakcina-összetételt választva, amelyben a CpG mennyiség fele antigénhez konjugált, a fele pedig szabad formában található azt mutattuk ki, hogy a szabad CpG rontja az antigénhez konjugált CpG adjuváns hatását. A jelenség oka a DC-k alacsony mértékű TLR9 expressziója lehet (melyet *in vitro* kísérleteinkben kimutattunk). A fenti eredmény alátámasztja, mennyire fontos a megfelelő vakcina-összetétel megtalálása.

Eredmények és megbeszélésük / III.

A nem-CpG oligonukleotidok pozitívan hatnak a korai és késői sejtaktivációra, az ASC-vé történő differenciációra, valamint a T-sejtfüggő ellenanyagtermelésre ha a T- és B-sejtek között specifikus kapcsolat áll fenn.

- A nem-CpG oligonukleotidok serkentik a korai aktivációs marker (CD69) expresszióját mind a B-, mind a T-sejtekben, amennyiben történik antigén prezentáció.
- Az MHCII expresszió nem, de a B- és T-sejt proliferáció tükrözte a CD69-mérés eredményét.
- Kifejlesztettünk egy microarray lemezekon kivitelezhető, fluoreszcens ELISPOT módszert, hogy multiplex méréseket végezve egyidejűleg azonosítsunk és számolhassunk eltérő B-sejt populációkat. Ehhez a módszerhez érzékenysége miatt rövidebb inkubációs idők szükségesek mint a hagyományos ELISPOT esetében. Ezen módszer felhasználásával határoztuk meg az antigén prezentációt és ODN-kostimulációt követően az eltérő izotípusú ASC-k számát.
- Kimutattuk, hogy a nem-CpG ODN-ek modulálják az ASC-vé történő differenciációt, ezáltal elősegítik az ellenanyagtermelést és az izotípus váltást az antigén-specifikus B- és T-sejtek interakciója során.
- Vad típusú és TCR transzgenikus egerek összehasonlításával igazoltuk, hogy szükség van az antigén-specifikus T-sejtek és a B-sejtek interakciójára ahhoz, hogy a nem-CpG ODN-ek modulálni legyenek képesek a T-sejtek által indukált ellenanyagtermelést.
- A különböző ODN-ek eltérő izotípus-mintázat kialakulását indukálják, ami arra utal, hogy a CpG és egyéb oligonukleotidok hatásmechanizmusa eltérő lehet (1. ábra). A T_H1 és T_H2 izotípusú ASC-k aránya szignifikánsan eltérőnek mutatkozott a SA-CpG valamint

a SA-INH komplexekkel történő immunizálás és a SA kezelés között, míg a SA-CTRL komplexxel történő immunizáció hatására nem alakult ki jelentős különbség az ASC-k arányát tekintve a SA-val kezelt csoporthoz képest.

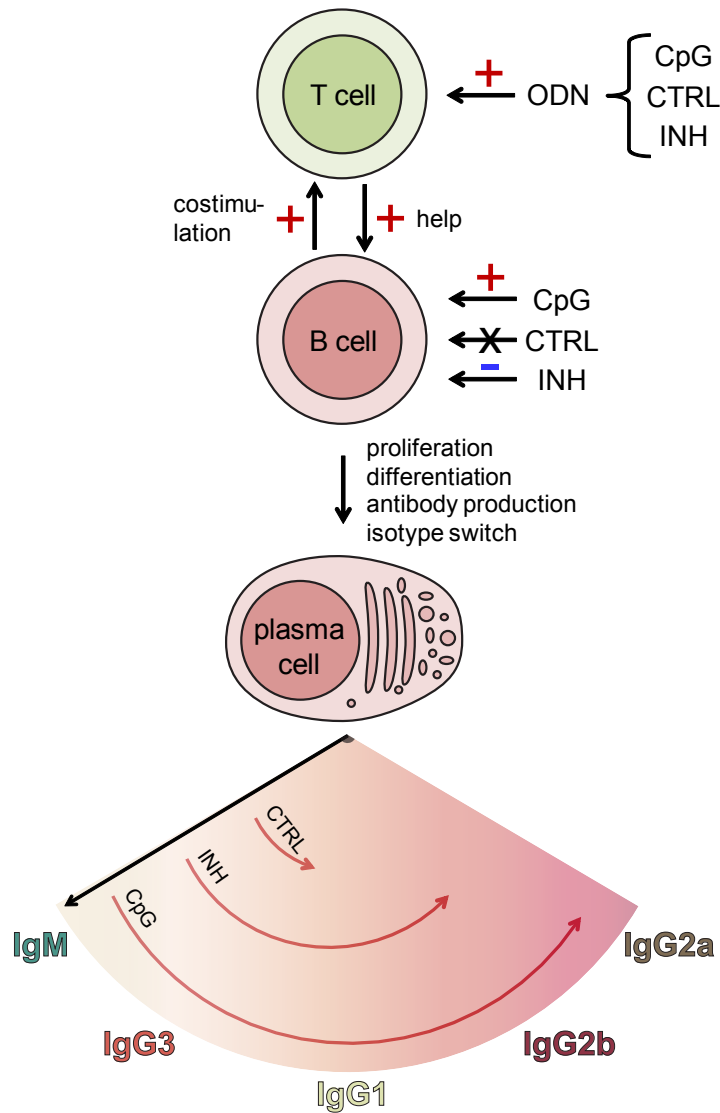


Figure 1: A különböző ODN-típusok T- és B-sejtekre gyakorolt eltérő hatásának bemutatása az antigén prezentáció során.

Az különböző típusú ODN-ek mind képesek kostimulálni a TCR-en keresztül aktivált T-sejteket, míg ugyanezek az ODN-ek a B-sejtekre eltérő módon, típusuknak megfelelően hatnak. A T-sejt - B-sejt interakció eredményét finomhangolhatja az adott típusú ODN-re a sejtek által adott eltérő válasz, valamint függhet az ezt követően kapott egyéb stimulusoktól is.

Összefoglalás

A természetes és szintetikus nukleinsavakról ismert, hogy immunválaszt befolyásoló hatással bírnak. Kimutatták róluk, hogy különböző útvonalakra valamint számos sejttípusra hatva befolyásolják az immunválaszt, amely az általuk okozott hatások összetett értelmezését teszi szükségessé. A CpG motívumot tartalmazó oligonukleotidokat széles körben vizsgálják, mert adjuvánsként, immunmoduláló szerként történő hasznosításuk lehetősége számos betegségben felmerült. Ilyenek például a fertőző betegségek, a rák és az allergiás megbetegedések is.

A CpG oligonukleotidokat szabad és antigénhez kötött formában is használják adjuvánsként. Az antigénhez kapcsolás azáltal fokozza a CpG által kiváltott adjuváns hatást, hogy biztosítja azt, hogy az antigént felvevő sejtbe jut be a veszély jelet indukáló oligonukleotid is. A jelen dolgozatban az antigénhez kapcsolt és szabad oligonukleotidok közötti versengés hatását vizsgáltuk, streptavidin modell antigén felhasználásával. Eredményeink alapján e két forma együttes adása kedvezőtlenül befolyásolja a CpG-hez kapcsolt antigén sejtek általi felvételét *in vitro*, vakcinációt követően pedig a kiváltott immunválaszt. Nemcsak aktiváló hatású, hanem kontroll és gátló funkcióval rendelkező oligonukleotidokat is vizsgáltunk, és ezek mindegyike mutatott versengést az antigénhez kapcsolt CpG oligonukleotiddal *in vitro*.

Bár a CpG oligonukleotidok hatásait már széleskörben kutatják, szükséges volna az egyéb, nem-CpG oligonukleotidok immunológiai hatásmechanizmusának a további vizsgálata is. Ezért a CpG és nem-CpG (azaz kontroll és gátló) oligonukleotidok hatásait az antigén-specifikus T-sejt - B-sejt interakciókkal összefüggésben is összehasonlítottuk. Azt találtuk, hogy a CpG motívumot nem tartalmazó oligonukleotidok jelentős immunmoduláló hatással bírnak a korai T-sejt és a késői B-sejt aktivációra. Specifikus T-sejt - B-sejt interakciót követően szinergizmust találtunk a különböző nem-CpG oligonukleotidok T-sejtekre gyakorolt hatása és a B-sejtekre kifejtett helper T-sejt aktivitás között, amelynek eredményeképp nemcsak az IgG termelés növekszik meg, hanem a kialakuló izotípus profil is megváltozik.

Eredményeink alátámasztják azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint a CpG-vel kapcsolt antigének felvétele receptorfüggő módon megy végbe, továbbá rámutatnak a T-sejtekben kifejeződő TLR9-nek illetve más nukleinsav receptoroknak az adaptív immunválasz kialakulásában játszott fontos szerepére. Mindent egybevetve, megfigyeléseink hozzájárulhatnak az oligonukleotid-tartalmú vakcinák összetételének optimális kialakításához, mivel bemutattuk, hogy az antigénhez konjugált és szabad CpG együttes alkalmazása előnytelen a kivál-

tott immunválasz szempontjából, valamint hogy a nem-CpG oligonukleotidok, amelyek B-sejt aktiváló hatással nem, vagy kisebb mértékben rendelkeznek, T-sejt kostimuláló hatásuk révén ígéretes adjuvánsok lehetnek azokban az esetekben, amikor egy a CpG-re jellemző markáns és részben antigén-független immunválasz kialakítása előnytelen lenne.

Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények

1. Melinda Herbáth, Krisztián Papp, Anna Erdei, József Prechl: "Non-CpG oligonucleotides exert adjuvant effects by enhancing cognate B cell - T cell interactions, leading to B cell Activation, Differentiation and Isotype Switching" Journal of Immunology Research (Article ID 340468, available online at <http://downloads.hindawi.com/journals/jir/aa/340468.pdf>)
2. Melinda Herbáth, Krisztián Papp, Andrea Balogh, János Matkó, József Prechl: "Exploiting fluorescence for multiplex immunoassays on protein microarrays" Methods and Applications in Fluorescence 2 032001. doi:10.1088/2050-6120/2/3/032001
3. Melinda Herbáth, Zsuzsanna Szekeres, Dorottya Kövesdi, Krisztián Papp, Anna Erdei, József Prechl: "Coadministration of antigen-conjugated and free CpG: Effects of in vitro and in vivo interactions in a murine model." Immunology Letters 2014 Feb 22. pii: S0165-2478(14)00029-7. doi: 10.1016/j.imlet.2014.02.007.
4. Zsuzsanna Szekeres, Melinda Herbáth, József Prechl: "Immune response modulation by targeted complexes based on streptavidin" Biochemistry Research Updates, Chapter 2 (pp. 49-85) Editor: Simon J. Baginski ISBN 978-1-61209-700-8

Egyéb közlemények

1. Zsuzsanna Szekeres, Melinda Herbáth, Zoltán Szittner, Krisztián Papp, Anna Erdei, József Prechl: "Modulation of the humoral immune response by targeting CD40 and Fc γ RII/III; delivery of soluble but not particulate antigen to CD40 enhances antibody responses with a T_H1 bias" Molecular Immunology 2011. 49(1-2):155-62.

2. Zsuzsanna Szekeres, Melinda Herbáth, Adrienn Angyal, Zoltán Szittner, Viktor Virág, Péter Balogh, Anna Erdei, József Prechl: "Modulation of immune response by combined targeting of complement receptors and low-affinity Fcγ receptors" *Immunology Letters* 2010. 130(1-2):66-73.

Publikált absztraktok

1. Herbáth Melinda, Papp Krisztián, Prechl József: "Antigénspecificitás és izotípus egyidejű meghatározása reverse fluoroSPOT array segítségével" *Immunológiai Szemle, IV. évfolyam 3. szám, 17. oldal, 2012.*
2. Zsuzsanna Szekeres, Melinda Herbáth, Zoltán Szittner, Péter Balogh, Anna Erdei, József Prechl: "Modulation of immune response by combined targeting of complement receptors and low affinity Fcγ receptors" *European Journal of Immunology, Vol. 39 Issue S1 (2009)*
3. Szekeres Zsuzsanna, Herbáth Melinda, Szittner Zoltán, Prechl József, Erdei Anna: "Az immunválasz befolyásolása a komplementreceptorok és a kis affinitású Fc-receptorok együttes célzásával" *Magyar Immunológia, 2008;7(3)*