CD40 és TLR9 stimulus hatása az antigénprezentációra

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Készítette: Kaszab Eszter, biológus hallgató,7.évf.

Témavezető: Dr. Prechl József, tudományos főmunkatárs

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

1 Bevezető ... 3
1.1 A CD40 ... 3
1.2 A Toll-szerű receptor 9 (TLR9) ... 4
2 Célkitűzés ... 5
3 Anyag és módszer ... 5
3.1 FGK előállítása és enzimatikus monobiotinilálása ... 5
3.2 Az alkalmazott oligonukleotid ... 6
3.3 Ovalbumin peptid ... 6
3.4 A SA-komplexek előállítása ... 7
3.5 Az egér lépsejtek izolálása és kezelése ... 7
3.6 Áramlási citofluorimetria ... 8
3.7 Statisztikai analízis ... 8
4 Eredmények ... 9
4.1 Az egyláncú ellenanyag fragmentum biokémiai jellemzése ... 9
4.2 DO11.10 egértörzs lépének összetétele ... 10
4.3 In vitro aktivációs teszt eredményei ... 11
4.3.1 B-sejtekre kifejtett hatások ... 11
4.3.2 T-sejtekre kifejtett hatások ... 11
5 Eredmények kiértékelése ... 14
5.1 Az egyláncú ellenanyag fragmentum biokémiai jellemzése ... 14
5.2 DO11.10 egértörzs lépének sejtösszetétele ... 14
5.3 In vivo aktivációs teszt eredményei ... 14
5.3.1 B-sejtekre kifejtett hatások ... 14
5.3.2 T-sejtekre kifejtett hatások ... 15
6 További tervek ... 16
7 A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke ... 16
Köszönetnyilvánítás ... 17
Irodalomjegyzék ... 18

1 Bevezető

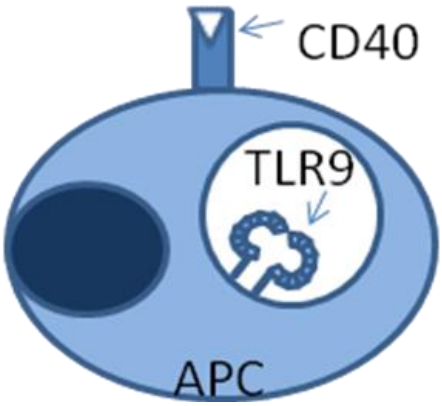
A korszerű, újgenerációs oltóanyagok a kórokozóknak csak egyes komponenseit tartalmazzák - így csökkenthető a nemkívánatos mellékhatások gyakorisága, ugyanakkor szintén csökken az oltóanyag immunogenitása. Az immunogenitás fokozásának egyik módja az antigének szöveti eloszlásának és sejtszintű hatásainak szabályozása molekuláris biológiai vagy biokémiai beavatkozásokkal. Az egyláncú ellenanyag fragmentumok (scFv) és szintetikus receptor ligandumok ennek a módszernek a tökéletes példái, amelyek a hozzájuk kapcsolt antigént specifikusan képesek irányítani a célsejtekhez. Ez a képesség lehetővé teszi, hogy egy vakcina esetén például kisebb antigén-dózis alkalmazása is elegendő legyen, továbbá az antigén bemutatása hatékonyabbá válhat. Az általunk kiválasztott antigént - biotin-streptavidin kapcsolaton keresztül - könnyen és gyorsan konjugálhatjuk az egyláncú ellenanyag fragmentumhoz vagy a célreceptor ligandumához. A streptavidin (SA) akár négy biotin megkötésére is képes, ezáltal több biotinilált antigén, illetve scFv, vagy más, adjuváns hatású molekulák, mint például CpG oligonukleotidok (CpG) is hozzá kapcsolhatók. Az így létrehozott komplex az antigén irányítása és az immunválasz modulálása révén hasznos lehet mind a fertőző, mind a tumoros és allergiás megbetegedések immunterápiás lehetőségeinek modellezésére.

1.1 A CD40

A CD40 (1. ábra) az egyik legfontosabb kostimuláló receptor az antigénprezentáló sejteken (APC), a Tumor Nekrózis Faktor Receptor szuperfamília tagja, elsősorban B-limfociták felszínén megjelenő glikoprotein, de megtalálható makrofágokon, FDC-n, monocitákon, fibroblasztokon, tímuszepitélsejteken, endotélsejteken [1-5]. Természetes liganduma a CD40L (CD154, gp39), a TNF molekulacsalád tagja, amely antigénspecifikus aktiválódás után jelenik meg $CD4^+$ T-sejteken, (illetve a $CD8^+$ sejtek egy részén) [1, 2, 5]. Keresztkötésük fontos reguláló szerepet tölt be az antigénprezentáló sejtek aktiválódása, illetve a B-sejtek proliferációja, érése során, sőt, megállapították, hogy a B-sejtek CD40-en keresztüli aktiválódása fontos apoptózis elleni védelmi mechanizmussal szolgál a sejt számára [5, 6]. Ezen felül fontos szabályozó elem a T-sejt függő humorális immunválasz lépéseinek lezajlásában, szükséges a germinális centrumok kialakulásához, izotípusváltáshoz, affinitáséréshez [4, 5]. Ez a CD40 és liganduma kapcsolat makrofágok és DC-k érését is indukálja, illetve megnöveli az általuk termelt gyulladáskeltő citokinek mennyiségét, ezáltal előidézi a Th sejtek polarizációját a Th1 irányba [2, 4].

1.2 A Toll-szerű receptor 9 (TLR9)

A TLR9 (1.ábra) a mintázatfelismerő receptorok családjának a tagja, melyek ősi, egyes patogénekre jellemző mintázatokat ismernek fel, úgy mint egy- és duplaszálú RNS, a DNS metilálatlan CpG motívumai, peptidoglikánok, a Gram negatív baktériumok lipopoliszacharidja (LPS), lipoteikolsav, flagellin, bakteriális lipoproteinek [7]. A receptorok az endolizoszomális kompartmentben helyezkednek el. A TLR9 számos immunsejtben megtalálható, ide sorolhatók a B-sejtek, monociták, makrofágok, plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC), NK sejtek és újabb kutatások T-sejtekben is kimutatták [7]. A receptor olyan egyszálú DNS-szakaszokat ismer fel, amelyek metilálatlan CpG dinukleotidokat, és az azokat határoló jellegzetes szekvenciákat tartalmaznak. Ligandkötése többek között gyulladásos citokinek termelődését indukálja és elindítja a limfociták proliferációját [8, 9]. A CpG motívumok száma gerincesekben alacsony, többségük metilált, valamint a CG bázispárt határoló bázisok is eltérőek a patogénekétől. A CpG oligodeoxinukleotid (ODN) foszfodiészter (PO) kötéseinek foszforotioátra (PS) cserélése megvédi azt a nukleázoktól, így koncentrációja állandó marad a további alkalmazások során [10]. A TLR9 aktivációja az NFκB transzkripciós faktorok aktivációjához, kostimulátor molekulák expressziójának növekedéséhez, citokinek (pl. I-es típusú interferonok) termeléséhez vezet, végső soron pedig erőteljes Th1-típusú immunválaszt eredményez [9].



1. Ábra A TLR9 az endolizoszómás kompartmentben, a CD40 a sejt felszínén fejeződik ki

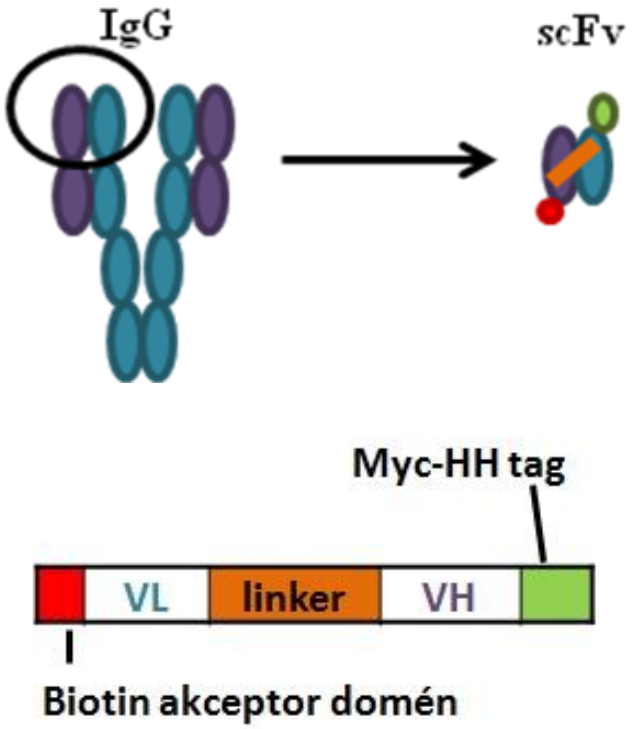
2 Célkitűzés

Célunk az antigénprezentáló sejteket célzottan aktiválni képes - biotin-streptavidin kapcsolaton alapuló - moduláris rendszer létrehozása, az így kialakított komplex CD40 és TLR9 receptorokhoz irányítása, valamint APC-re, T-sejtre kifejtett hatásainak vizsgálata volt.

3 Anyag és módszer

3.1 FGK előállítása és enzimatikus monobiotinilálása

Az általunk rekombinánsan előállított, 30,02 kDa molekulatömegű, enzimatikusan monobiotinilált FGK az N-terminusán tartalmazza a biotin akceptor domént, C-terminusán pedig a Myc és Hexa-His (HH) tag-eket. A könnyű- és nehézlánc eredetű variábilis doméneket egy flexibilis linker régió köti össze (2. ábra).



2. Ábra Az scFv felépítése

E. coli BL21 (RIL) kompetens sejteket transzformáltunk a munkacsoportunk által korábban létrehozott és izolált pET-3d-BSN-FGKscFv plazmiddal. A fehérje expressziót 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk. A zárványtestben felhalmozódó fehérje tisztítását Kurucz I. et al.

és Prechl et al. módszere alapján végeztük [11, 12]. A 6 M-os urea oldatban denaturált FGK-t a bakteriális fehérjétől affinitás kromatográfiával (Ni-NTA, Qiagen) választottuk el. SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), Coomassie Blue festéssel ellenőriztük az scFv preparátum tisztaságát. A helyspecifikus biotinilálást BirA (protein biotin ligáz) kittel (Avidity) végeztük. Ezt követően a biotinilált FGK oldatunkon puffercserét hajtottunk végre Sephadex G50 médium oszlop segítségével, a feleslegben lévő, szabad biotin eltávolítása érdekében. Ezek után funkcionális vizsgálatot hajtottunk végre áramlási citofluorimetria segítségével annak érdekében, hogy megállapíthassuk, hogy az FGK-preparátumunk megfelelően működik-e.

A fehérje koncentrációját NanoDrop készülékkel, a 280 nm-en mért optikai denzitás alapján határoztuk meg.

3.2 Az alkalmazott oligonukleotid

A kísérleteinkben 1668 CpG ODN (Sigma) biotinilált formáját használtuk (CpG). Az általunk használt B-típusú ODN váza foszforotioát alapú, poli-G motívumokat nem tartalmaz, ez a típusú CpG erőteljes B-sejt aktivációt vált ki. Ezen felül egyéb típusú CpG ODN szekvenciák is ismertek: az A-típus erős IFNα termelést vált ki a pDC-kben, a C-típus pedig az említett két típus hatását kombinálja [10].

1668 (CpG) ODN szekvencia: **5'-tccatgacgttcctgatgcT-3'-biotin. (**A kisbetűk az oligonukleotid vázának PS kötéseire, a nagybetűk a váz PO kötéseire utalnak.)

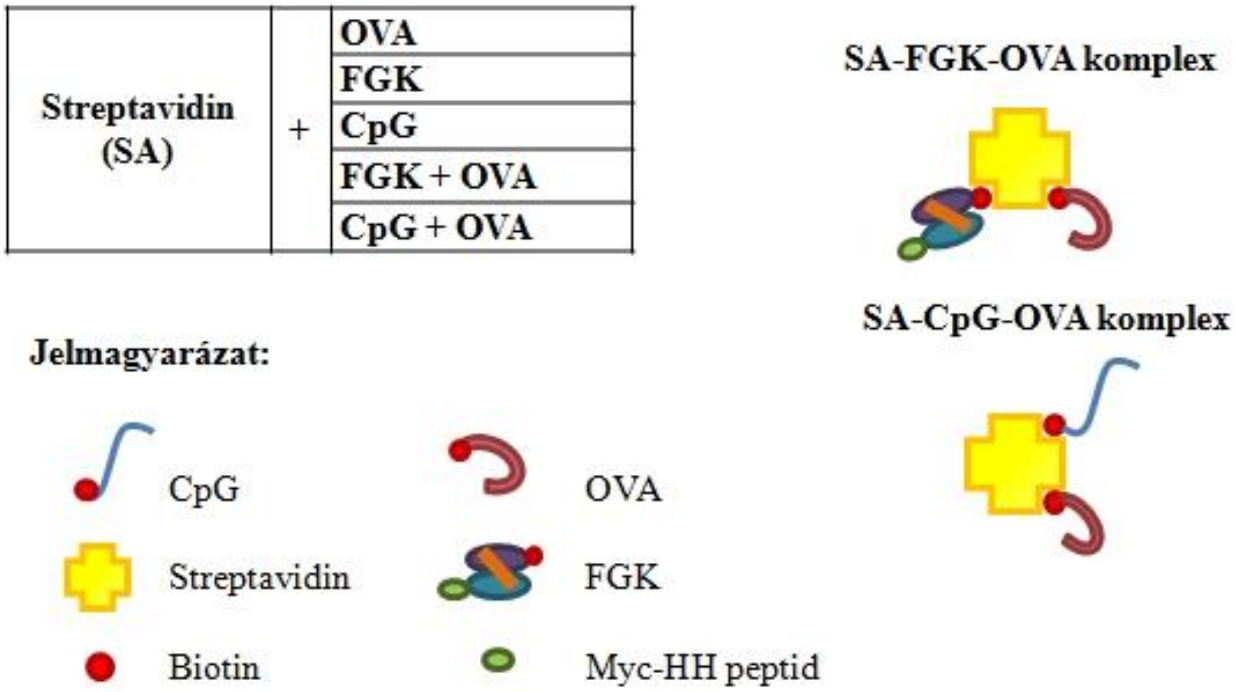
3.3 Ovalbumin peptid

Kísérleteinkhez szintetikusan előállított (Caslo Co.), az N-terminálison monobiotinilált ovalbumin peptidet ($OVA_{323-340}$) alkalmaztunk. Az általunk használt DO11.10 transzgenikus egértörzs TCR-e erre az MHCII I-A^d allotípusához kötődő OVA peptidre specifikus [13], ezáltal a peptid tökéletes modellantigén számunkra.

Az alkalmazott ovalbumin peptid (OVA) szekvenciája: **Biotin-KISQAVHAAHAEINEAGR**

3.4 A SA-komplexek előállítása

Komplexeink központi eleme a fluoreszcensen jelölt streptavidin (SA), kísérleteinkben Alexa488 fluorokrómmal jelölt változatát használtuk. Minden komponenst (SA, CpG, OVA, FGK) ekvimoláris arányban konjugáltunk (3. ábra). Harminc perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után a képződött komplexeket a kezelési koncentrációra hígítottuk.



3. Ábra A különböző SA-komplexek összetétele. Ahogy két komplex részletesebb ábrája mutatja, ekvimoláris mennyiségben konjugáltuk az alkotórészeket.

3.5 Az egér lépsejtek izolálása és kezelése

A kísérleteinket az általunk használt OVA peptidre specifikus transzgenikus TCR-rel rendelkező DO11.10 egértörzs lépsejt szuszpenzióján végeztük. A sejteket hideg GKN-ben megmostuk, lecentrifugáltuk (8 perc, 1200 rpm, 4 ^{0}C), majd a felülúszó leöntése után ACK pufferrel lizáltuk a vörösvértesteket. A sejtszuszpenziót ezután 50 µM-os β-merkaptoetanollal és 10 % FCS-sel kiegészített RPMI 1640 médiumban (GIBCO) mostuk, majd 70 µm-es sejtszűrőn átszűrtük. Az életképes sejteket megszámoltuk, tripánkék festékkel elkülönítve tőlük a halott sejteket. A sejtszuszpenziót 96 lyukú mikrotiter lemezre mértük (lyukanként 10^6 db életképes sejttel számolva), majd a SA-komplexekkel 25 nM végkoncentrációban kezeltük. A sejteket CO_2 termosztátban, 37 ^{o}C-on egy napig inkubáltuk.

3.6 Áramlási citofluorimetria

A komplexek kötődésének, sejtaktiváció ellenőrzésére, illetve a különböző sejtpopulációk elkülönítésére áramlási citofluorimétert használtunk. A jelöléshez a sejteket FACS pufferben (1% FCS és 0,05% Na-azid tartalmú PBS) megmostuk, majd fluoreszcensen jelölt ellenanyagokkal jégen, 20 percig inkubáltuk. A T-sejteket anti-egér CD4-PE (BD Biosciences) ellenanyaggal jelöltük. A transzgenikus T-sejteket anti-egér DO11.10-PercCP-Cy5.5 (BioLegend) ellenanyaggal azonosítottuk. Az anti-egér CD69-A647-et (BioLegend) használtuk a sejtaktiváció mérésére. A jelölés után a mintákat egyszer megmostuk, majd 300 µl FACS pufferben felvéve FACS Calibur (Beckton Dickinson) készüléken lemértük. Az adatok kiértékelését FlowJo és FCSExpress programokkal végeztük.

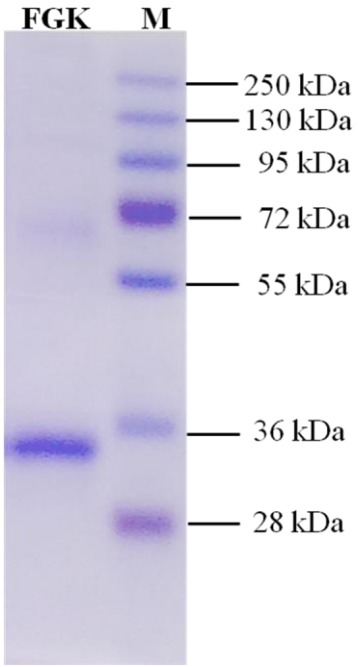
3.7 Statisztikai analízis

Az elvégzett kísérletek eredményeit egy permutációs teszttel (5000x50 alkalommal végzett véletlenszerű mintavételezés eloszlásvizsgálata) elemeztük, mely segítségével megállapítottuk, hogy a megfigyelt hatások szignifikánsnak tekinthetők-e vagy sem. Amennyiben a p érték 0,05-nál kisebb volt, az eredményt szignifikánsnak tekintettük.

4 Eredmények

4.1 Az egyláncú ellenanyag fragmentum biokémiai jellemzése

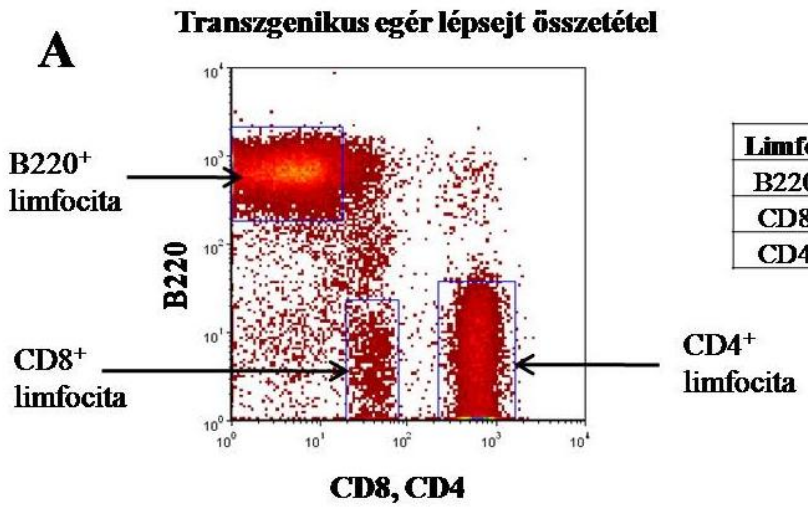
Az gélkép vándorlási sebessége alapján az FGK molekulatömege 32-34 kDa. Ez az előzőleg kiszámolt értéket közelítőleg tükrözi (4. ábra). A biotinilálódott FGK hatékonyan kötődik a CD40-hez, ezt a 6. ábra tökéletesen szemlélteti.



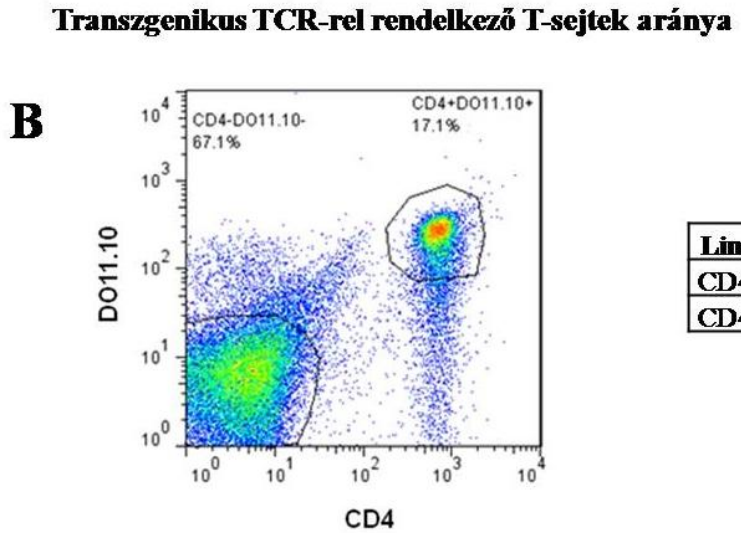
4. Ábra SDS-PAGE eredmény, 15 %-os gélen. Az FGK molekulatömege 34 kDa
Marker: Fermentas #SM1811.

4.2 DO11.10 egértörzs lépének összetétele

A Transzgenikus TCR megjelenése változásokat idézhet elő a CD4, CD8 arány megoszlásában, illetve ellenőriztük a CD4-en belül található transzgenikus TCR-rel rendelkező limfociták számát is (5. ábra).



Limfocita populációk %-os megoszlása	
B220+ limfocita	60,18
CD8+ limfocita	3,79
CD4+ limfocita	26,21



Limfocita populációk %-os megoszlása	
CD4+DO11.10+ limfocita	17,1
CD4-DO11.10- limfocita	67,1

5. Ábra A limfocita populációk **(A)** és a transzgenikus TCR-rel rendelkező $CD4^+$ sejtek **(B)** százalékos megoszlása az általunk használt OVA peptidre specifikus TCR-rel rendelkező transzgenikus DO11.10 egértörzs lépében.

4.3 In vitro aktivációs teszt eredményei

A komplexek kötődését és az általuk kiváltott sejtaktivációt az 6. ,7. és 8. ábra szemlélteti.

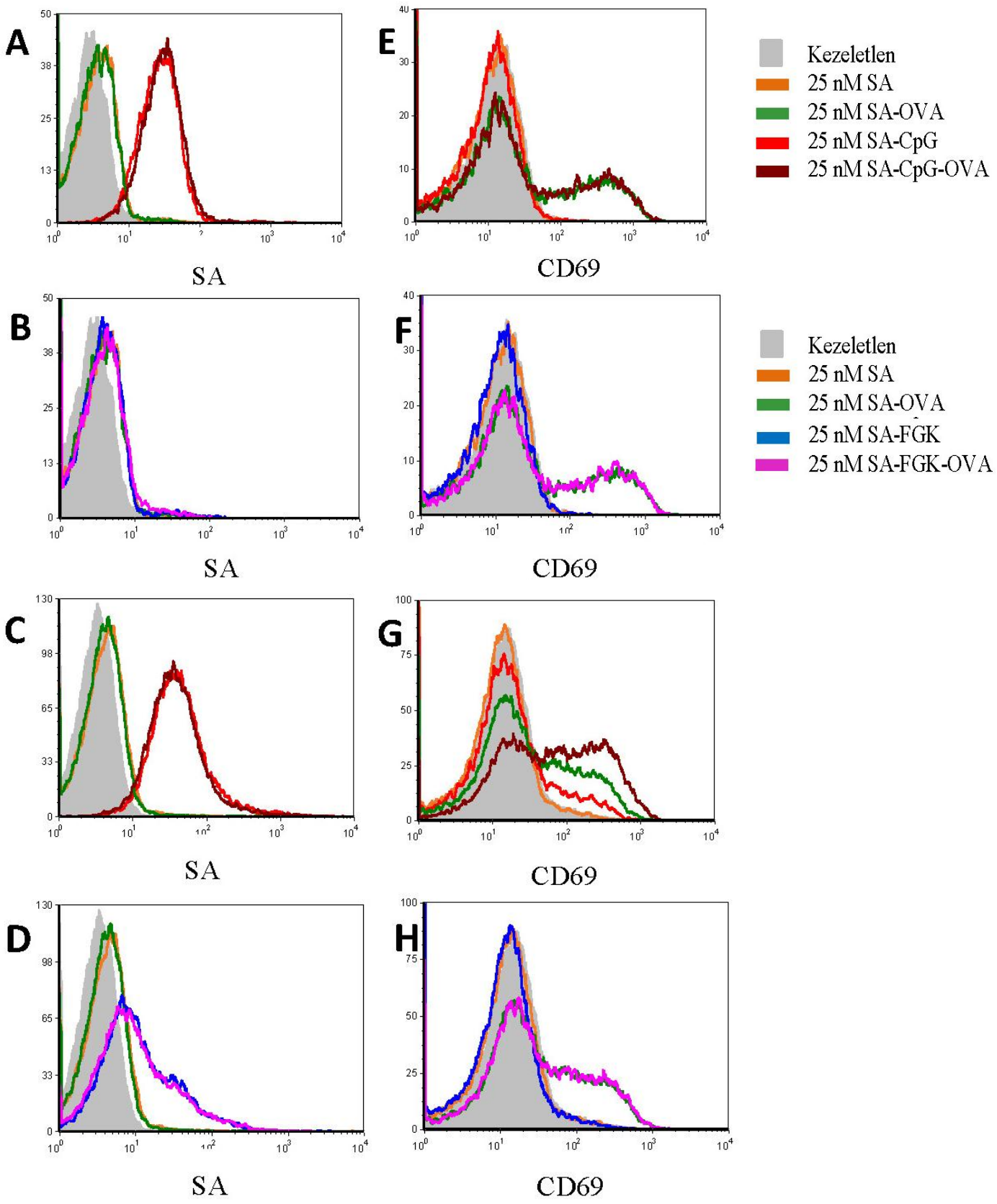
4.3.1 B-sejtekre kifejtett hatások

25 nM-os komplexeink hatását a B-sejtekre egy napos inkubáció után vizsgáltuk. Eredményeink szerint a SA jelentősen nem kötődött a B-sejtekhez, s azokat nem is aktiválta. A SA-OVA komplex kötődési mintázata megfelel a SA-nak, vagyis nem történt jelentős mértékű B-sejt kötődés, ám a TCR transzgenikus T-sejtek jelenlétében a B-sejtek aktiválódtak. A SA-FGK komplex kötődött a B-sejtekhez, CD69 expressziót ezzel szemben nem váltott ki, míg a SA-CpG komplex kötődése jelentős mértékű aktivációt eredményezett. B-sejthez történő asszociáció szempontjából a SA-CpG-OVA, illetve a SA-FGK-OVA hasonló eredményt mutatott, mint az OVA nélküli komplexek. Ha a SA-OVA komplexhez viszonyítottuk az aktiváció mértékét, akkor a SA-CpG-OVA jóval erősebb hatású volt, míg a SA-FGK-OVA nem mutatott különbséget.

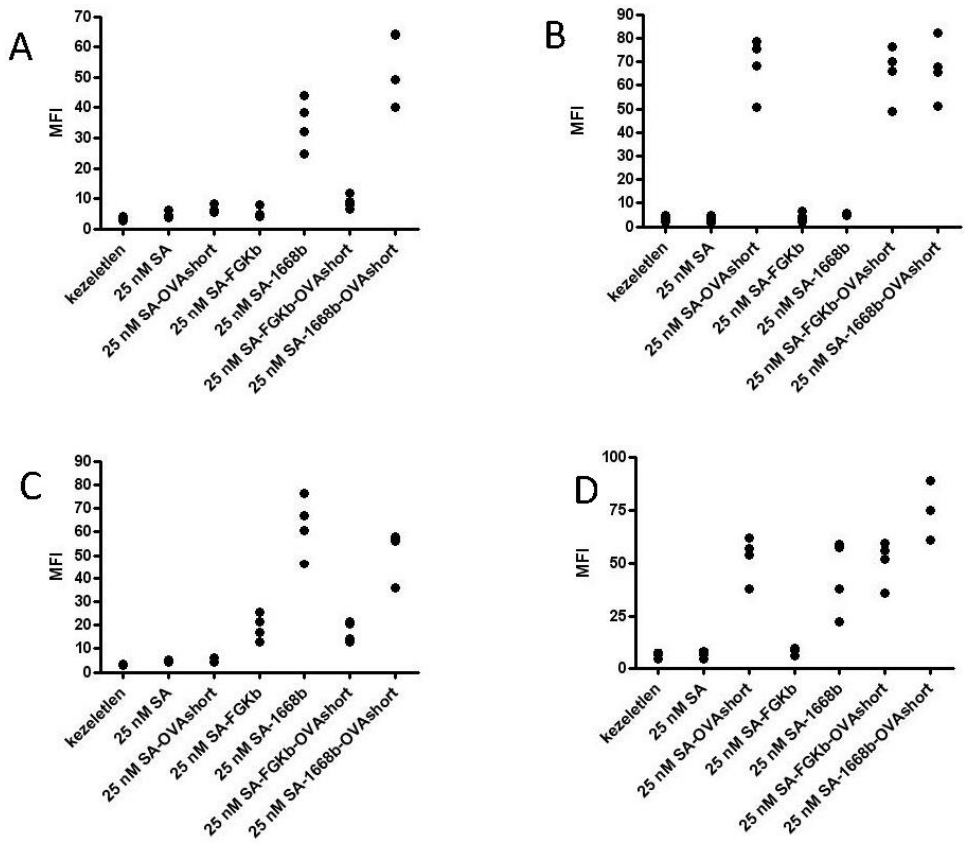
4.3.2 T-sejtekre kifejtett hatások

Szintén egynapos inkubáció után vizsgáltuk a 25 nM-os komplexeink T-sejtekre kifejtett hatását. Eredményeink alapján a SA-OVA komplex nem kötődött jelentősen a T-sejtekhez, ehhez hasonló eredményt tapasztaltunk a SA-FGK esetén is, s ezt az értéket a SA-FGK-OVA komplex sem növelte. Ha megnézzük a SA-CpG komplexet, ott T-sejtekhez történő asszociációt tapasztaltunk, sőt, ez a kötődés SA-CPG-OVA hatására még jobban erősödött.

Az aktiváció ezzel szemben más eredményeket mutatott. A SA-OVA komplex alkalmazásánál megnövekedett CD69 expressziót tapasztaltunk, míg a SA-FGK, illetve a SA-CpG komplex nem váltott ki jelentős mértékű aktivációt. Mindazonáltal, sem SA-CpG-OVA, sem a SA-FGK-OVA komplex kezelés során nem tapasztaltunk növekedést az aktiváció mértékében a SA-OVA komplexhez képest.



6. Ábra A SA-komplexek kötődése a T-sejtekhez (**A, B**) és a B-sejtekhez (**C, D**). A SA-komplexek aktiváló hatása a T-sejtekre (**E, F**) és B-sejtekre (**G, H**). Az **A, C, E, G** ábrákon CpG-t, a **B, D, F, H** ábrákon FGK-t tartalmazó komplexeket láthatunk. Az ábrán látható eredmények egy reprezentatív mérést képviselnek a négy, azonos beállításokkal végzett kísérletből.



7. Ábra Komplexek kötődése (**A,C**) és az általuk kiváltott aktiváció mértéke (**B,D**). Az **A** és **B** ábrán a T-sejtekre, míg a **C** és **D** ábrán a B-sejtekre kiváltott hatások láthatók. Az ábrán látható eredmények négy, azonos beállításokkal végzett kísérletből származnak.

B-sejtek

	A	B	C	D	E	F	G
A		nincs	*	nincs	*	*	*
B	*		*	nincs	*	*	*
C	*	nincs		*	nincs	nincs	*
D	*	*	*		*	*	*
E	*	*	*	*		nincs	*
F	*	*	*	nincs	*		*
G	*	*	*	*	nincs	*	

Aktiváció

Kötődés

T-sejtek

	A	B	C	D	E	F	G
A		nincs	*	nincs	*	*	*
B	*		*	nincs	*	*	*
C	*	nincs		*	*	nincs	nincs
D	*	nincs	nincs		nincs	*	*
E	*	*	*	*		*	*
F	*	*	nincs	*	*		nincs
G	*	*	*	*	*	*	

Aktiváció

Kötődés

Jelmagyarázat: A kezeletlen**, B** SA**, C** SA-OVA**, D** SA-FGK**, E** SA-CpG**, F** SA-FGK-OVA**, G** SA-CpG-OVA

8.Ábra A komplexek T- és B-sejtekhez kötődésében, s az általuk kiváltott aktivációban megfigyelt hatásainak statisztikai elemzése: *: szignifikáns eltérés ($p<0,05$); nincs: $p=>0,05$

5 Eredmények kiértékelése

5.1 Az egyláncú ellenanyag fragmentum biokémiai jellemzése

A gélkép alapján megállapíthatjuk, hogy az FGK preparátum tiszta és megfelelő molekulatömegű, a biotinilálás sikeres volt, tehát az előállítás menete megfelelő körülmények között zajlott, az FGK alkalmasnak tekinthető a CD40 molekulák megfelelő célzására.

5.2 DO11.10 egértörzs lépének sejtösszetétele

Áramlási citofluorimetriás mérés során, a használt fluoreszcens ellenanyagok segítségével sikeresen el tudtuk különíteni egymástól a különböző limfocita populációkat, melyek megoszlása elfogadhatónak tekinthető. A kapott eredmények tükrözik egy átlagos transzgenikus TCR-rel rendelkező egér eredményeit, tehát dominálnak a $CD4^+$ sejtek a $CD8^+$ sejtekhez képest, az idiotípusok megoszlása az elvárt értéket mutatja. Megállapíthatjuk, hogy a transzgenikus TCR kifejeződése megfelelő.

5.3 In vivo aktivációs teszt eredményei

5.3.1 B-sejtekre kifejtett hatások

Az FGK-val rendelkező komplexek alkalmasak a B-sejtek szelektív célzására a CD40 receptorokon keresztül, míg a CpG ODN erős, TLR9 általi sejtaktivációra képes.

Kijelenthetjük, hogy CpG-t tartalmazó komplexek minden esetben erősebb kötődést, illetve aktivációt váltottak ki az FGK-t tartalmazó komplexekhez képest. A várt eredmény, irodalmi adatok alapján, az FGK-s komplex esetében a tapasztaltnál nagyobb mértékű aktiváció lett volna. Számos oka lehet, ami miatt nem a kívánt hatást tapasztaltuk. Elsősorban az, hogy az általunk alkalmazott komplexek nem alkalmasak a célreceptor keresztkötésére, hiszen egy SA molekulához átlagosan egy FGK-t kapcsoltunk, így a komplex monovalens. Más kutatások felvetették, hogy valójában a kis affinitású Fc receptorok egyidejű stimulálása felelős a sejtaktiváció kiváltásáért a CD40 teljes ellenanyagokkal történő célzása esetén [14, 15]. Mivel a kísérleteinkben alkalmazott FGK nem rendelkezik Fc résszel, így nem képes a fenti hatást kiváltani. Befolyásoló tényezőként tekinthetjük még például a receptorok számának, a kontaktus idejének, a sejtszinapszisok számának a különbségét, melyek attól függően, hogy milyen komplexet alkalmazunk, más és más eredményre vezetnek.

OVA hatására a komplexek által kiváltott CD69 expresszió megnőtt a B-sejtek esetében is. Ezt arra vezethetjük vissza, hogy a sejtek valószínűleg felvették az OVA-t tartalmazó

komplexeket, MHC II-peptid komplexek révén aktiválták a T-sejteket, s ez az aktiváció hatással volt a B-sejtek aktiválódására egyaránt.

Az eredményeink alapján a TLR9-en, valamint az antigénprezentáció folyamatában résztvevő receptorokon keresztül érkező jelátviteli folyamatok szinergista hatást mutatnak az antigént bemutató B-sejteken.

5.3.2 T-sejtekre kifejtett hatások

T-sejtek esetén megállapíthattuk, hogy az OVA-t tartalmazó komplexek jelentős mértékű aktivációt váltottak ki, ezt az eredményt is vártuk, hiszen az általunk használt OVA-peptidre specifikus TCR-rel rendelkező DO11.10 egértörzs lépsejtszuszpenzióján végeztük kísérleteinket, tehát kijelenthetjük, hogy a peptid biotinilált formában, komplexben alkalmazva is megfelelően működik.

Érdekes módon, ha a SA-CpG-OVA komplex aktiváló hatását viszonyítottuk a SA-OVA komplexhez, akkor azt tapasztaltuk, hogy a CpG-t tartalmazó komplex nem tudta növelni az aktiváció mértékét, holott a várt eredmény a növekedés lett volna. Elsősorban azért, mert az APC-k hatékonyabban aktiválódtak a CpG hatására, ezért úgy véltük, hogy az antigénprezentáció révén javulna a T-sejtekre kifejtett aktiváció mértéke. Ezen felül a legújabb irodalmi adatok alapján egyes oligonukleotidok kostimulálni képesek a TCR-en keresztül aktivált T-sejteket [6]. Az első opció, lehet azért nem teljesült, mert nem sikerült elég gyorsan vagy hatékonyan az antigénprezentáció útjára terelni a bejuttatott komplexeket. A komplexeinket szuboptimális dózisban alkalmaztuk, melyek elvileg alkalmasak lettek volna a sejtaktiváció-fokozódás, illetve -csökkenés mérésére egyaránt. Ez a lehetőség elképzelhető, hogy azért nem teljesült, mert a T-sejtekben a TLR9 expresszió mértéke alacsonyabb, így az alkalmazott dózis a B-sejteket képes volt még stimulálni, de ugyanez a hatás itt már nem jelenhetett meg.

Mivel a CD40 célzás hatására nem tapasztaltuk a B-sejtek aktiválódását, ezért az antigénprezentáció során nem tudott javulni a T-sejtekre kifejett aktiváció mértéke sem.

6 További tervek

A különböző komplexeink immunmoduláns hatását a későbbiek során szeretnénk ellenőrizni DC-ken, mint APC-ken, s az így kapott adatainkat összevetni az eddigi *in vitro* kísérleteink során tapasztaltakkal.

Az irodalmi adatok alapján [14, 15] bevonnánk a kis affinitású Fc receptorokat, annak kiderítésére, hogy komplexeink kis affinitású Fc receptorokkal történő egyidejű stimulálása felelős-e a sejtaktiváció kiváltásáért.

Oltási kísérlet tervezünk, mely során megvizsgálnánk az alkalmazott komplexek hatását *in vivo* körülmények közt, s ezáltal megfigyelhetnénk a modellantigénre a szervezet által adott immunválasz minőségét, mennyiségét, a CD40, illetve TLR9 receptor célzása esetén.

7 A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke

BirA - biotin ligáz; **BSN** – a BirA enzim által felismert biotinilálási szekvencia; **CpG** – monobiotinilált CpG ODN; **ODN** – oligodeoxinukleotid; **DC** – dendritikus sejt; **FCS** – (fetal calf serum) fötális borjúszérum; **IFN** - interferon; **IPTG** - izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid; **LB** médium – Luria-Bertrani médium; **PBS** - phosphate buffered saline; **SDS** - Na-dodecil-szulfát; **scFv** - (single-chain variable fragment) egyláncú ellenanyag fragmentum; **FGK** – az általunk alkalmazott monobiotinilált scFv; **OVA** – monobiotinilált ovalbumin peptid; **SA** – streptavidin; **APC**-antigénprezentáló sejt

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Erdei Annának, hogy az Immunológiai Tanszéken dolgozhatok.

Nagyon sok köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Prechl Józsefnek, az érdekes témáért, a rengeteg segítségért, szakmai tanácsért, amit tőle kaptam és kapok.

Köszönöm Herbáth Melindának a módszerek elsajátításában nyújtott segítségét, és türelmét.

Munkatársaimnak, barátaimnak és a tanszék minden dolgozójának köszönöm a tanácsokat, technikai segítséget, és nem utolsósorban a kellemes hangulatot, amiben a mindennapi munka zajlik.

Irodalomjegyzék

1. Foy, T.M., et al., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 591-617.
2. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 111-35.
3. Jain, S., S.B. Chodisetti, and J.N. Agrewala, *CD40 signaling synergizes with TLR-2 in the BCR independent activation of resting B cells.* PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20651.
4. Szekeres, Z., et al., *Modulation of the humoral immune response by targeting CD40 and FcgammaRII/III; delivery of soluble but not particulate antigen to CD40 enhances antibody responses with a Th1 bias.* Mol Immunol, 2011. **49**(1-2): p. 155-62.
5. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
6. Landrigan, A., M.T. Wong, and P.J. Utz, *CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides directly costimulate mouse and human CD4+ T cells through a TLR9- and MyD88-independent mechanism.* J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3033-43.
7. Kabelitz, D., *Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(1): p. 39-45.
8. Bauer, S., et al., *Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9.* Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 315-28.
9. Sutmuller, R.P., et al., *Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation.* Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 387-93.
10. Vollmer, J. and A.M. Krieg, *Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists.* Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(3): p. 195-204.
11. Kurucz, I., et al., *Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies.* Mol Immunol, 1995. **32**(17-18): p. 1443-52.
12. Prechl, J., et al., *Targeting of influenza epitopes to murine CR1/CR2 using single-chain antibodies.* Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 159-65.
13. Robertson, J.M., P.E. Jensen, and B.D. Evavold, *DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope.* J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4706-12.
14. Li, F. and J.V. Ravetch, *Inhibitory Fcgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies.* Science, 2011. **333**(6045): p. 1030-4.
15. White, A.L., et al., *Interaction with FcgammaRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody.* J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1754-63.