

## **XXXII. OTDK Biológia Szekció**

# **Az anti-koleszterin ellenanyagok (pato)fiziológiás szerepének nyomában**

Írta: Szenes Éva,

Biológia szak, V. évfolyam, ELTE TTK Immunológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Papp-Balogh Andrea

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2014

# Tartalomjegyzék

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK .....</b>                                                                              | <b>3</b>  |
| <b>ÖSSZEFOGLALÓ.....</b>                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>SUMMARY .....</b>                                                                                       | <b>6</b>  |
| <b>BEVEZETŐ ÉS CÉLKITŰZÉSEK .....</b>                                                                      | <b>7</b>  |
| <b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>                                                                          | <b>9</b>  |
| 1.   ÁRAMLÁSI CITOFLUORIMETRIA .....                                                                       | 9         |
| 2.   KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA.....                                                                           | 10        |
| 3.   MICROARRAY .....                                                                                      | 11        |
| 4.   AZ EGEREK OLTÁSA AC8 ELLENANYAGGAL.....                                                               | 11        |
| 5.   KOLESZTERIN ESSZÉ .....                                                                               | 11        |
| 6.   ENZIM-KAPCSOLT IMMUNSZORBENS ESSZÉ (ELISA).....                                                       | 12        |
| <b>EREDMÉNYEK.....</b>                                                                                     | <b>13</b> |
| 1.   AZ AC8 ELLENANYAG INTERNALIZÁCIÓS KINETIKÁJA ÉS INTRACELLULÁRIS LOKALIZÁCIÓJA<br>IMMUNSEJTEKBEN ..... | 13        |
| 2.   AZ AC1, AC8 ÉS AC9 ELLENANYAGOK KÖTÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA ANTIGÉN MICROARRAY MÓDSZERREL<br>.....         | 17        |
| 3.   AZ AC8 ELLENANYAG HATÁSA <i>IN VIVO</i> A SZÉRUM KOLESZTERIN SZINTJÉRE .....                          | 18        |
| <b>DISZKUSSZIÓ.....</b>                                                                                    | <b>21</b> |

## Rövidítésjegyzék

|                |                                                                                              |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| A488, A647     | Alexa Fluor488, Alexa Fluor647                                                               |
| ACHA           | anti-koleszterin ellenanyag (Anti-Cholesterol Antibody)                                      |
| ACK            | ammónium-klorid kálium lízis puffer (Ammonium Chloride Potassium Lysing Buffer)              |
| BSA            | borjú szérum albumin (Bovine Serum Albumin)                                                  |
| CD             | Cluster of Differentiation                                                                   |
| ChAG           | csirke-anti-kecske (Chicken-Anti-Goat)                                                       |
| CLSM           | konfokális lézer szkennig mikroszkópia (Confocal Laser Scanning Microscopy)                  |
| CTX            | koleratoxin (Choleratoxin)                                                                   |
| DMEM           | Dulbecco Modified Eagle Medium                                                               |
| DMPC           | 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfokolin                                                    |
| DMPG           | 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfoglicerin                                                 |
| DPPE           | dipalmitil-L- $\alpha$ -foszfatidiletanolamin                                                |
| EEA1           | korai endoszóma antigén-1 (Early Endosome Antigen 1)                                         |
| ELISA          | enzim-kapcsolt immunszorbens esszé (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)                       |
| FACS           | fluoreszcencia aktivált sejt elválasztás (Fluorescence-activated Cell Sorting)               |
| Fc             | az ellenanyag konstans régiója                                                               |
| FcR            | Fc-receptor                                                                                  |
| FCS            | magzati borjú szérum (Foetal Calf Serum)                                                     |
| GAM            | kecske-anti-egér (Goat-Anti-Mouse)                                                           |
| HIV-1          | Humán Immundeficiencia Vírus-1                                                               |
| HTS            | nagy áteresztőképességű vizsgálat (High Throughput Screening)                                |
| i.v.           | intravénás                                                                                   |
| LAMP-1         | lizoszóma asszociált membrán ptein 1 (Lysosome-associated Membrane Protein 1)                |
| LDL, VLDL, HDL | alacsony/nagyon alacsony/magas denzitású lipoprotein (Low/Very Low/High Density Lipoprotein) |
| MAR            | egér-anti-patkány (Mouse-Anti-Rat)                                                           |
| MeOH           | $\beta$ -merkaptóetanol                                                                      |
| PAGE           | poliakrilamid gélelektroforézis (Polyacrilamide Gel Electrophoresis)                         |
| PBS            | foszfát pufferelt sóoldat (Phosphate Buffered Saline)                                        |
| PE             | fikoeritrin (Phycoerythrin)                                                                  |
| PerCP          | peridinin-klorofill (Peridinin Chlorophyll)                                                  |
| PFA            | paraformaldehid                                                                              |
| RFU            | relatív fluoreszcencia egység (Relative Fluorescence Unit)                                   |
| RMF            | relatív átlag fluoreszcencia (Relative Mean Fluorescence)                                    |

|      |                                                                 |
|------|-----------------------------------------------------------------|
| ROI  | „Region of Interest”                                            |
| RPMI | Roswell Park Memorial Medium                                    |
| scFv | egyláncú variábilis fragmentum (Single Chain Variable Fragment) |
| SDS  | nátrium-dodecil-szulfát (Sodium Dodecyl Sulphate)               |
| TMB  | 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin                                   |
| TX   | Triton X-100                                                    |
| VH   | nehéz lánc variábilis régiója                                   |
| VL   | könnyű lánc variábilis régiója                                  |

## Összefoglaló

A koleszterin fiziológiás, valamint egyes kóros folyamatokban is fontos szerepet tölt be a szervezetben. Univerzális membránalkotó szerepe és kis mérete ellenére azonban egészséges egyéneken is kimutathatóak koleszterin-ellenes ellenanyagok (ACHA). Ezek funkciójáról még keveset tudunk. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a monoklonális koleszterin-specifikus IgG3 izotípusú egér ellenanyagok képesek humán és egér eredetű intakt sejtek membránjához és lipoproteinekhez kötődni. Fontos kérdés, hogy a kötődést követően mi történik az ellenanyaggal, hiszen ez meghatározó lehet esetleges sejtműködést szabályozó funkciója szempontjából. Ezért először egér immunsejteken vizsgáltuk az ACHA internalizációs kinetikáját, valamint sejten belüli útvonalát áramlási citometria és konfokális mikroszkópia segítségével. Eredményeink szerint a sejtek (főként a makrofágok) felveszik az ellenanyagot, amely ezután a korai-, majd a késői endoszómákba kerül. Az ACHA lizoszómális lokalizációját eddig nem sikerült detektálnunk, mely arra utalhat, hogy proteaszómán keresztül kerül lebontásra. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az ACHA klónjaink milyen (kereszt)reaktivitással bírnak különböző lipid természetű antigénnel szemben. Ezt a kérdést antigén microarray segítségével vizsgáltuk. Új antigének bevonása mellett megerősítést nyertek korábbi ELISA módszerrel kapott eredményeink, miszerint ellenanyagaink eltérő affinitással kötődnek különböző  $3\beta$ -hidroxil szteroidokhoz, míg más vizsgált lipidekhez nem kötődnek. Vizsgáltuk továbbá az ACHA szérum koleszterin-szintre gyakorolt hatását is, *in vivo* egérmodellben. Kezdeti eredményeink szerint az ACHA képes csökkenteni az LDL/VLDL-, és kis mértékben az HDL-koleszterin szintet. Az ellenanyag pontos *in vivo* szerepének feltárására további állatmodell kísérleteket tervezünk elvégezni a közeljövőben.

## Summary

Cholesterol has important physiological role in the body, but it also may be included in several pathological processes (e.g. atherosclerosis, Alzheimer's disease). Despite of the small size and universal occurrence of cholesterol in cell membranes, natural autoantibodies against cholesterol (ACHAs – anti-cholesterol antibodies) are present in the serum of healthy individuals with yet unknown functions. Furthermore, significant and bidirectional changes in serum level of ACHAs have already been reported in various disorders (e.g. cardiovascular and autoimmune diseases, tumors, chronic infections). Our research group has previously shown that monoclonal cholesterol-specific IgG3 mouse antibodies, developed by our workgroup, are able to bind to the surface of human and mouse cells, and lipoproteins. The events after binding might be important in the possible regulatory functions of ACHA. Therefore, firstly we examined the internalization kinetics and intracellular trafficking of the antibody in mouse immune cell lines by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. According to our results, cells (mainly macrophages) internalized ACHA, which was trafficked to early then to late endosomes, but not to lysosomes. The lack of lysosomal presence might refer to its proteasomal degradation. Moreover, we inquired about the (cross-) reactivity of the ACHA clones to various lipid antigens by antigen microarray. ACHA clones bound to various 3 $\beta$ -hydroxyl sterols with different affinity, but not to other types of lipids, confirming our previous ELISA results by using new antigens as well. Lastly, we studied the *in vivo* effects of ACHA on serum cholesterol level, in mice. Our first results show that intravenous addition of ACHA decreased VLDL/LDL cholesterol level and influenced HDL cholesterol level as well. However, further investigations are needed to reveal the exact role of ACHA in this phenomenon.

## Bevezető és célkitűzések

A koleszterin nélkülözhetetlen szerepet tölt be az emlős sejtekben, ugyanis részt vesz az úgynevezett membrán nano/mikrodomének (lipid raftok, kaveolák) stabilizálásában. A lipid raftok jelentőségét számos folyamatban leírták. A jelátvitel megindulásakor sok esetben megváltozik a raftok mérete és összetétele, a raftok összeolvadnak, a jelátvitel szempontjából fontos molekulák a membrán nano/mikrodoménbe gyűlnek, míg más molekulák kiszorulnak onnan. Ezáltal kialakul az úgynevezett szignáloszóma (Pike 2003). Számos raft-asszociált membrán protein patogének behatolási célpontja lehet, mint például a T-sejteken és monocitákon megtalálható CD4 a HIV-1 vírus számára (Fantini, Garvey et al. 2004). Ezen kívül több patológias folyamatban is összefüggést találtak a lipid anyagcsere megváltozása és az adott betegség kialakulása között (pl. atherosclerosis, Alzheimer-kór, diabetes, számos vírusos vagy bakteriális fertőzés) (Simons and Ehehalt 2002).

Az utóbbi években egyre nagyobb érdeklődés övezi az egészséges egyéneknél is megtalálható, saját antigénekre specifikus úgynevezett természetes ellenanyagokat. Érdekes módon koleszterin-ellenes antitestek (ACHA) kimutathatóak egészséges emlősök szérumból (pl. nyúl, egér, ember) (Alving, Swartz et al. 1996; Dijkstra, Swartz et al. 1996; Horváth and Bíró 2003). Az ACHA szérumból szintjének megváltozását számos patológias folyamatban leírták, pl. atherosclerosis (Horváth, Füst et al. 2001), Hepatitis C fertőzés (Biro 2003), nem-kissejtes tüdőrák (Egri and Orosz 2006) és SLE esetén (Nagy, Horváth et al. 2001). A koleszterin-ellenes ellenanyagok fiziológias funkciója máig nem tisztázott. Szerepük többek között a koleszterin anyagcsere és ezáltal a sejtek lipid raft koleszterin mennyiségének szabályozásában is feltételezhető.

Kutatócsoportunk régóta vizsgálja az anti-koleszterin antitesteket (ACHA) a laboratóriumunkban előállított monoklonális egér ellenanyagok segítségével. Az már korábbi kutatásokból is kiderült, hogy ezen monoklonális AC1, AC8 (IgG3 izotípus) és AC9 (IgM izotípus) egér ellenanyagok képesek kötődni a koleszterinhez és néhány szerkezetileg hasonló 3 $\beta$ -hidroxil szteroidhoz, valamint LDL és HDL lipoproteinekhez (utóbbiak esetén a külső foszfolipid rétegben elhelyezkedő szabad koleszterinhez kötődve). Ezen kívül az AC1 és AC8 ellenanyagok képesek kötődni intakt sejtek felszínéhez is, mely a sejtek limitált papainos emésztését követően fokozódik (Biro, Cervenak et al. 2007). Ez azt mutatja, hogy a kisméretű koleszterin epitóp hozzáférhetősége a sejtmembránban kritikus az ACHA-k kötődése szempontjából. Kutatócsoportunk azt is kimutatta, hogy az AC8 a sejtfelszínhez kötődve *in*

*vitro* képes befolyásolni bizonyos lipid raft-kapcsolt immunfolyamatokat, például megnöveli a hivatásos antigén prezentáló sejtek fagocitotikus és antigén prezentáló képességét (Izsepi, Balogh et al. 2012), illetve gátolja a HIV-1 vírus fertőző képességét (Beck, Balogh et al. 2010). Az eredmények szerint ezen hatásokat az AC8 a lipid raftok keresztkötésével, ezáltal a raft-asszociált fehérjék és lipidek interakciós mintázatának megváltoztatásával éri el.

A dolgozatomban ismertetett kutatás távolabbi célja az ACHA fiziológiai funkciójának feltárása. Célkitűzéseink a következők voltak:

- Először azt szeretnénk volna tisztázni, hogy mi történik az ellenanyaggal különböző immunsejtekhez (egér T- és B-limfociták, makrofágok) való kötődést követően – a sejtek felveszik-e az ellenanyagot, és vajon milyen sejtalkotába/kompartmentbe kerül a felvétel után. Ezen vizsgálatokat áramlási citofluorimetria és konfokális mikroszkópia segítségével végeztük.
- Nagy áteresztőképességű antigén micorarray módszer optimalizálását követően vizsgáltuk ACHA klónjaink kötődését a koleszterin különböző „formáihoz”.
- Az ACHA *in vivo* hatásának feltárására egereket oltottunk AC8 ellenanyaggal (intravénásan) és koleszterin-esszé segítségével vizsgáltuk, történik-e változás a szérum VLDL/LDL és HDL koleszterin-szintjében.

# Anyagok és módszerek

## 1. Áramlási citofluorimetria

Az IP12-7 Th- (ELTE, Immunológiai Tanszék), 2PK3 B- (ATCC) és P388D1 monocita-makrofág (ATCC) egér sejt vonalakat DMEM (Sigma) +  $\beta$ -merkaptoetanol (MeOH) + 5% FCS (Sigma) tartalmú médiumban tartottuk fenn. Az AC8 ellenanyag internalizációs kinetikáját áramlási citometria segítségével vizsgáltuk. A sejteket DMEM + MeOH + 5% FCS tartalmú médiumban 10  $\mu$ g/ml AC8 ellenanyag (ELTE, Immunológiai Tanszék) jelenlétében inkubáltuk 24-72 órán keresztül, 37°C-os termosztátban. A sejteket kivételkor és az egyes jelölési lépések között AC8-mosó pufferben mostuk (PBS + 0,1% esszenciálisan zsírsav- és globulin-mentes BSA + 0,05% azid). A sejtek centrifugálása 1200 rpm-en, 4°C-os hőmérsékleten, 7 percig történt. A sejtfelületen jelölendő mintákhoz kecske-anti-egér-IgG3-AlexaFluor488 (GAM-IgG3-A488, Life Technologies) másodlagos ellenanyagot adtunk. Az intracelluláris jelöléshez először fixáltuk a sejteket 4% PFA-PBS oldatban 20 percig, szobahőmérsékleten, majd permeabilizáltuk 0,1% Triton X-100 (Sigma) tartalmú PBS-ben 5 percig, és csak ezután adtuk hozzájuk másodlagos GAM-IgG3-A488 ellenanyagot. A sejteket végül AC8-mosó pufferben vettük fel. Az ACHA Fc-receptorhoz (FcR) való kötődésének kizárása érdekében megvizsgáltuk az egér CD32/16 FcR-re specifikus 2.4G2 ellenanyag kötődését az AC8-cal kezelt és nem kezelt sejteken. Ebben az esetben a másodlagos ellenanyagként egér-anti-patkány-IgG2b-Alexa Fluor647-et használtunk (MAR7/5 klón, ELTE, Immunológiai Tanszék).

Az egér lépet cervikális diszlokációt követően izoláltuk az állatokból. Az eltávolított lépeket hideg GKN-ben mechanikailag roncsoltuk, mostuk, majd hipotóniás ACK-val 1 percig lizáltuk a vörösvérsejteket. Ezután a szuszpenzióhoz FCS-t adtunk, majd GKN-nel történő mosások után RPMI (Sigma) + MeOH médiumban tettük ki a sejteket sejtenyésző lemezre. A kezeletlen sejteken kívül alkalmaztunk AC8 vagy egér IgG3 (mIgG3, Sigma), kezelést, 10  $\mu$ g/ml végkoncentrációban. Ez esetben FcR blokkoló (K9.361 klón, National Institute of Health) ellenanyagot is hozzáadtunk a sejtsuszpenzióhoz. A sejteket 1-18 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. A sejtfelületi jelölés és intracelluláris jelölés a korábbiakban leírtak szerint történt, ám ez esetben a jelölések megkezdése előtt minden mintát 20  $\mu$ l 100  $\mu$ g/ml koncentrációjú K9.361 FcR blokkoló ellenanyaggal kezeltük, 5 percig. A sejtpopulációk elkülönítésére a B-sejt marker anti-B220-PerCP/Cy5.5 (eBioscience) és a T-sejt marker anti-CD3-PE (Biolegend) ellenanyagokat használtunk.

A P388 sejteken elvégzett rövidtávú FACS-méréshez a lépsejtekhez használt protokollt alkalmaztuk azzal a különbséggel, hogy az FcR-ok gátlására 2.4G2 ellenanyagot használtunk.

A mérést FACSCalibur (BD Biosciences) készülékkel végeztük CellQuest Pro szoftver (BD Biosciences) segítségével, mintánként 10.000 sejt lemérésével. Az adatok kiértékelése FCS Express 3 szoftver (De Novo Software) segítségével történt.

## **2. Konfokális mikroszkópia**

A konfokális lézer pásztázó mikroszkópos (CLSM) mérésekhez 8-kamrás boroszilikát aljú sejttenyésző lemezeket használtunk (Ibidi), melyeket BD CellTak Adhesive (BD Biosciences) oldattal kezeltünk, a gyártó által ajánlott protokollt követve. A sejteket RPMI + MeOH médiumban tettük ki a kamrákba. Az ellenanyaggal való inkubáció során 10 µg/ml AC8 került a sejtszuszpenzióba, az FcR-on keresztül való kötődés elkerülése érdekében emellett 10 µg/ml koncentrációban 2.4G2 ellenanyagot is hozzáadtunk a sejtekhez. Az inkubáció 37°C-on történt, 1-24 órán keresztül. A LysoTracker Red DND-99 (Life Technologies) vitális festéket az inkubáció utolsó órájában adtuk hozzá a sejtekhez, 75 nM végkoncentrációban. A sejtek kivételekor és a jelölési lépések között a kamrákat óvatosan mostuk AC8-mosó pufferrel. A fixáláshoz 20 perc 4% PFA-PBS kezelést alkalmaztunk, míg a permeabilizálás 5 perc 0,1% TX-PBS vagy (a LysoTrackerrel jelölt minták esetén) 20 perc 0,2% saponin-AC8-mosó kezeléssel történt. A saponinnal permeabilizált sejtek esetén a további lépések is saponin tartalmú oldatban történtek. Az elsődleges ellenanyagokkal (anti-EEA1, Santa Cruz Biotechnology, anti-LAMP-1, Miltenyi Biotec vagy anti-CD63-biotin, Bioss Antibodies) való jelölés szobahőmérsékleten történt, 1 órán keresztül. A másodlagos GAM-IgG3-A488 és csirke-anti-kecske-Alexa Fluor647 (ChAG-A647, Life Technologies) ellenanyagokkal és a streptavidin-Alexa Fluor647 (SA-A647, Life Technologies) reagenssel 30 percig inkubáltuk a sejteket. A másodlagos ellenanyagok mellett sejtmagfestékeket is alkalmaztunk: 0,5 µg/ml propidium-jodidot (PI, Sigma) vagy 1 µM Draq5 festéket (Biotium). A mérés Olympus IX81 inverz mikroszkópon, Fluoview 500 konfokális lézer pásztázó rendszer segítségével (Olympus Europe), 60x olajimmerziós objektívvel (numerikus apertúra: 1,25) történt.

A kolokalizációs analízis ImageJ program Red Green Correlator Plugin használatával történt. Az érdeklődésre számot tartó területek (ROI, Region of Interest) kijelölésekor az AC8 ellenanyaggal megjelölt területeket vettük figyelembe. A kapott Pearson korrelációs

koefficienseket (Manders, Stap et al. 1992) GraphPad Prism 5 program segítségével ábráztuk.

### **3. Microarray**

A három koleszterin-ellenes ellenanyag klón (AC1, AC8, AC9) kötődését antigén microarray analízis segítségével vizsgáltuk. Az antigének (koleszterin,  $7\alpha$ -,  $7\beta$ -koleszterin, ergoszterin, koprosztán, koleszterin-oleát, 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfokolin/PMPC, 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfoglicerol/DMPG, dipalmitoil-L- $\alpha$ -foszfatidiletanolamin/DPPE, LDL, HDL) nyomtatása Odyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad) készülék segítségével történt a nitrocellulózzal bevont, 16 vagy 2 alchip-es tárgylemezek felszínére (Sartorius). A chip-ek mosása (háromszor PBS-sel) után blokkoltuk a szabad helyeket 30 perc 0,1% kazein-PBS-sel történő inkubációval. Ezután egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a mintákat 5 vagy 25  $\mu\text{g/ml}$  anti-koleszterin antitesttel. Kontrollként anti-LDL és anti-HDL ellenanyagokat használtunk (2F6 és 4D8/G6 egér IgG1 és IgG2a klónok, Diagnosticum Zrt. ajándéka). PBS-sel való mosási lépések után a mintákat 30 percig inkubáltuk GAM-IgG+M-A488 másodlagos ellenanyag (Life Technologies) 4  $\mu\text{g/ml}$ -es oldatával. Végül PBS-sel történő mosások után a microarray lemezeket szárítottuk és Axon GenePix 4300A készülék segítségével mértük le. A kiértékeléshez GenePix Pro 6 szoftvert (Molecular Devices) használtunk.

### **4. Az egerek oltása AC8 ellenanyaggal**

Az oltásokhoz csoportonként 4-4 db, 4 hónapos Balb/c egeret használtunk, és 75  $\mu\text{g}$  ellenanyagot oltottunk intravénásan (a farokvénába), hetente egyszer, 3 héten keresztül. A kontroll állatokat PBS-sel oltottuk. Az oltások befejeztével a 25. napon az állatokat elvéreztettük és a szérumukat a kísérletekig -80°C-on tároltuk.

### **5. Koleszterin esszé**

Az oltott egerek szérumából való VLDL/LDL és HDL koleszterin-szint meghatározására HDL precipitációs puffert (Abcam) és Amplex Red Cholesterol Assay Kit-et használtunk (Life Technologies), a gyártók utasításait követve.

Az oltott és oltatlan állatok szérum koleszterin szintjének statisztikai összehasonlítására párosítatlan t-próbát használtunk (GraphPad Prism 5 program).

## **6. Enzim-kapcsolt Immunszorbens esszé (ELISA)**

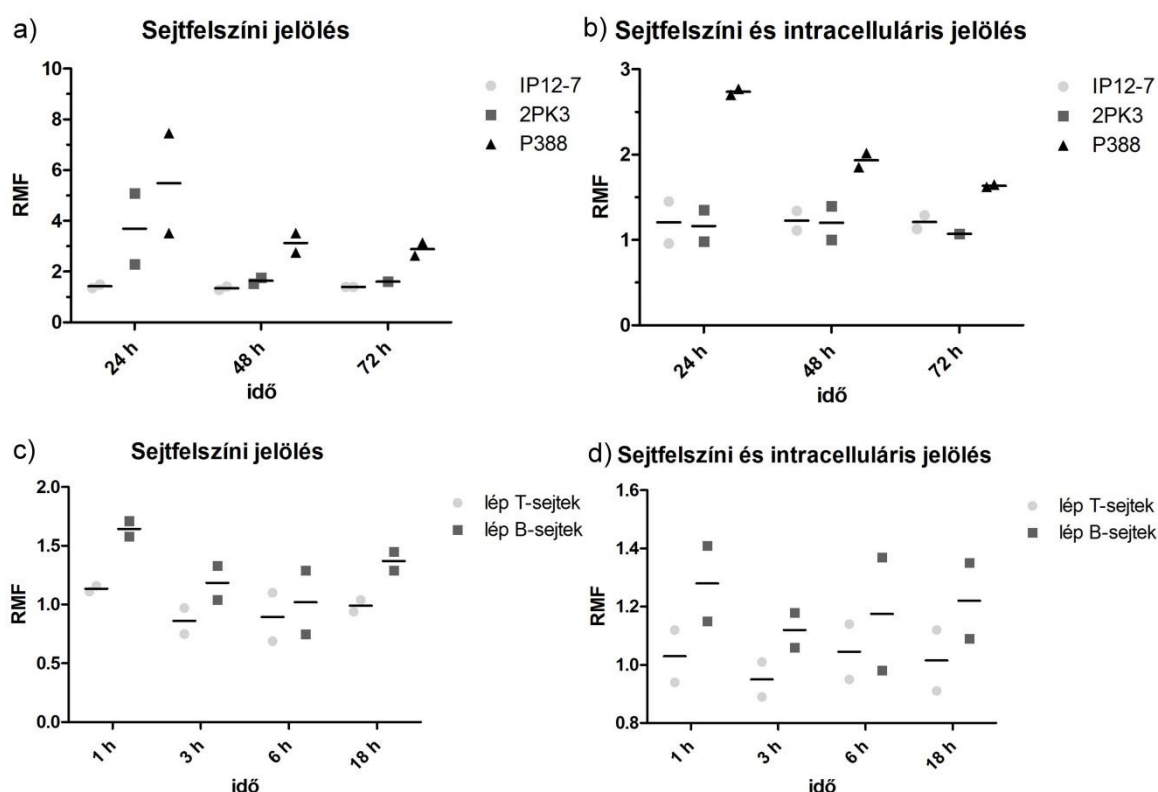
Az IgG izotípusú ACHA ellenanyag szintet az oltást követően ELISA módszer segítségével mértük le. Ehhez 96% etanolban oldott 50 µg/ml koleszterinnel fedtük a lemezeket. Ezután egy éjszakán át fedő nélkül inkubáltuk a lemezt 4°C-on, valamint további 0,5-1 órán át szobahőmérsékleten, amíg az alkohol el nem párolgott. A blokkolás 0,1% kazein-PBS-sel történt 1 órán át, szobahőmérsékleten. Az AC8 ellenanyaggal vagy PBS-sel oltott állatok szérumát 100-szoros hígításban vittük fel a lemezre, majd GAM-IgG-HRP (Southern Biotech) ellenanyaggal inkubáltuk a lemezeket. Az egyes lépések között a lemezt háromszor-ötször mostuk PBS-sel, a jelöléseknél 1 órás inkubációs időt alkalmaztunk. Az előhíváshoz TMB (Sigma) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) + TMB puffer mixet használtunk, és a színreakció megfelelő mértékű lezajlásáig rajtahagytuk a reagenst a mintákon. Ezután 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldattal állítottuk le a reakciót. A minták mérése Thermo MultiSkan Ex (Thermo Scientific) típusú készülékkel történt, 450 és 620 nm-en.

Az oltatlan és oltott állatok szérum IgG ACHA szintje közötti statisztikai analízist GraphPad Prism 5 program segítségével végeztük, párosítatlan t-próba alkalmazásával. Az IgG ACHA szint és VLDL/LDL szint közti korrelációs együtthatót szintén ezen program segítségével számoltuk ki.

# Eredmények

## 1. Az AC8 ellenanyag internalizációs kinetikája és intracelluláris lokalizációja immunsejtekben

Először megvizsgáltuk, hogy az intakt sejtekhez kötődő AC8 ellenanyag milyen internalizációs kinetikával jellemezhető. A vizsgált egér T-, B- és makrofág sejtvonalat tenyésztetben 24-72 óráig inkubáltuk az AC8 ellenanyaggal, annak érdekében, hogy elegendő időt hagyjunk a sejteknek a kötődött ellenanyag felvételére, sőt akár a lebontására is. Az inkubálás után fluoreszcens anti-egér IgG3-mal jelöltük a sejt felszínhez kötődött, vagy a sejt felszínhez kötődött és internalizálódott AC8-at együttesen (fixált, permeabilizált sejtek). A legerősebb kötődést a makrofág (P388D1) sejtvonalnál tapasztaltuk. Mind a sejt felszíni, mind a sejt felszíni + intracelluláris jel 24 óra elteltével volt a legmagasabb, majd fokozatosan lecsökkent. A B-sejtek (2PK3) felszínén is hasonló kinetikát tapasztaltunk, ám az intracelluláris jelölődés alacsony szinten maradt. A T-sejteken (IP12-7) mind a sejt felszíni, mind az intracelluláris jelölődés végig gyengének mutatkozott (1. ábra).

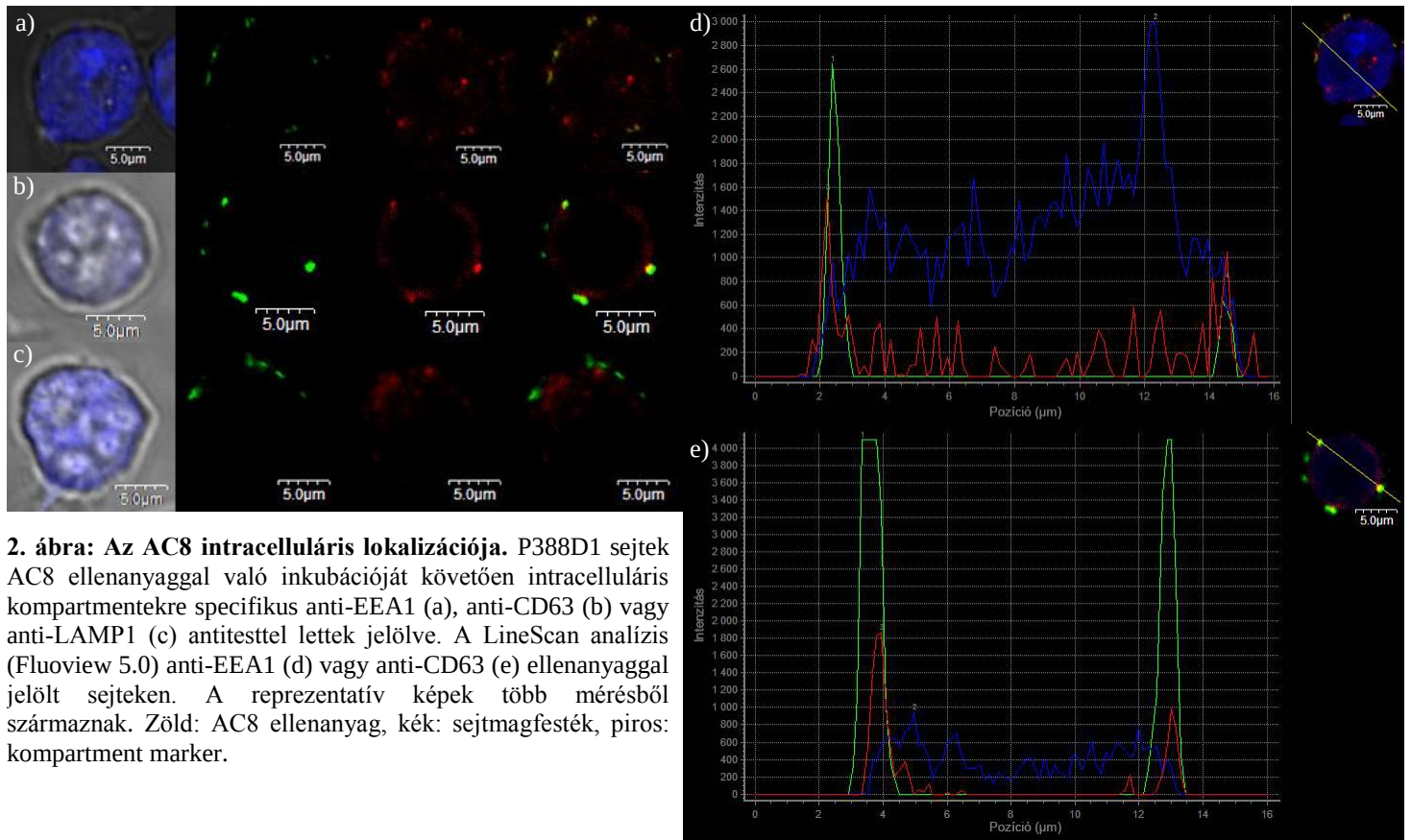


**1. ábra: Az AC8 internalizációs kinetikája egér immunsejteken.** Az AC8 sejt felszíni és sejt felszíni + intracelluláris jelenlétét különböző időpontokban vizsgáltuk IP12-7, 2PK3 és P388D1 sejtvonalakon (a, b), illetve egér lépsejteken (c, d). Az RMF (relatív átlag fluoreszcencia) értékek az első esetben (a, b) a másodlagos ellenanyag fluoreszcencia intenzitására lettek normalizálva, míg a második esetben (c, d) az izotípus kontrolléra. A három sejtvonalal és az egér lépsejtekkel való kísérleteket 2-2 alkalommal ismételtük meg, melyek eredménye a diagramokon egy-egy pontként van jelölve.

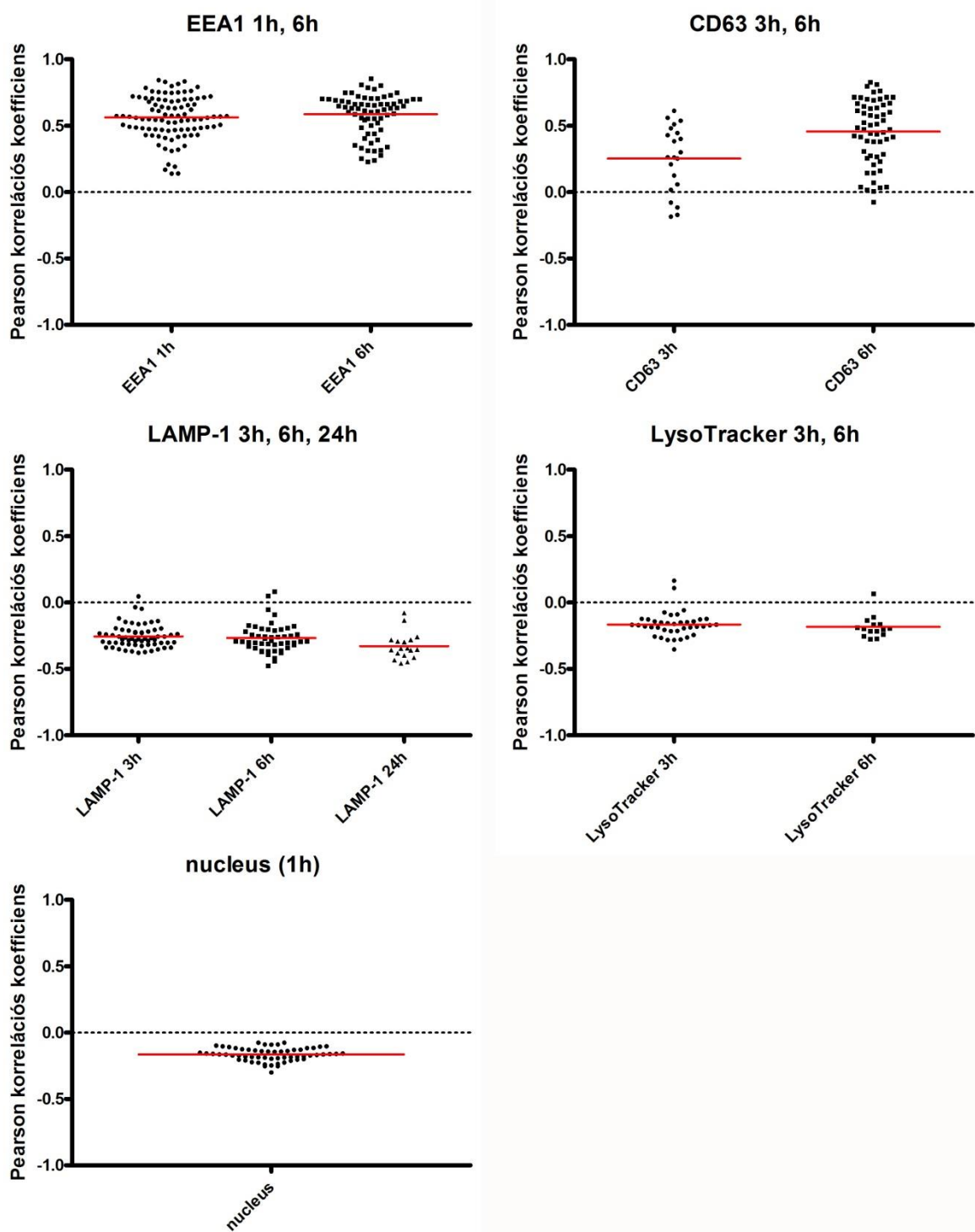
Az ellenanyag Fc-receptorokhoz (FcR) való kötődésének kizárására a 2PK3 és P388D1 sejteken vizsgáltuk, hogy az AC8 kezelés hatására mennyivel csökken le az anti-CD32/16 ellenanyag (2.4G2) kötődése az FcR-okhoz. Eredményeink azt mutatták, hogy nem következett be jelentős változás az ACHA kezelés hatására (nem bemutatott adat), mely alátámasztja, hogy az IgG3 izotípusú ellenanyagok alacsony affinitással kötődnek az Fc $\gamma$ R-okhoz. Ettől függetlenül, az Fc-részen keresztül történő kötődés kizárása érdekében kísérleteinkben az inkubáció és jelölés alatt a továbbiakban mindig használtunk FcR-blokkoló ellenanyagot (K9.361 vagy 2.4G2).

Primer T- és B-sejteken is vizsgáltuk az AC8 kötődését és internalizációját, FCS-mentes médiumban, mivel az FCS-ben lévő lipoproteinek is csökkenthetik az AC8 hozzáférhetőségét. Az FCS hiánya, valamint az előző kísérletekben tapasztalt 24 órai maximum miatt rövidebb időkinetikát választottunk. A lépsejtekkel való kísérlet esetében is hasonló kötődési kinetikát tapasztaltunk, mint a sejtvonalaknál. Mivel meglehetősen gyenge jeleket kaptunk, feltehető, hogy fiziológias körülmények között a koleszterin-ellenes ellenanyag nem, vagy alig kapcsolódik ezekhez a sejtekhez (*1. ábra*). Hasonlóan rövid inkubációs idő mellett P388D1 sejtnél is hasonló internalizációs kinetikát tapasztaltunk (nem bemutatott adat).

Annak igazolására, hogy az ellenanyag valóban bekerül a sejtekbe, és ha igen, milyen módon, illetve a sejten belül milyen utat jár be, a P388D1 egér monocita/makrofág sejteket inkubáltunk az ACHA-val 37°C-on, termosztátban, majd a fixált és permeabilizált sejtekben különböző intracelluláris kompartmenteket jelöltünk és konfokális mikroszkópon vizsgáltuk az AC8 és a markerek kolokalizációját. Mivel az áramlási citometria módszerrel végzett kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy már 3-6 óra alatt csökkenés következett be az intracelluláris jel mértékében, azt feltételeztük, hogy az ellenanyag néhány órán belül bekerül a sejtbe. Az AC8 intracelluláris útvonalának első állomásaként a korai endoszóma markerrel (korai endoszóma antigén-1, EEA-1), majd a CD63 antigénnel (késői endoszóma, multivezikuláris test és lizoszóma marker) való együttes megjelenését vizsgáltuk meg. Végül kíváncsiak voltunk, hogy az ellenanyag lizoszómális lebontásra kerül-e (lizoszóma asszociált membrán protein-1, LAMP-1 specifikus ellenanyaggal való kolokalizáció).



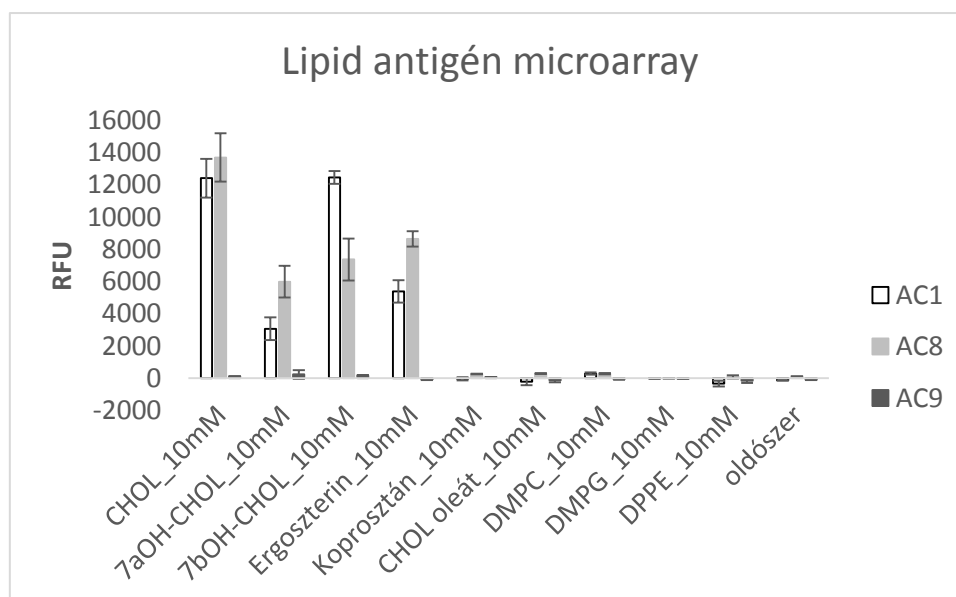
Eredményeink szerint az AC8 ellenanyag már 1 óra után kolokalizációt mutat az EEA-1 antigénnel (Pearson korrelációs koefficiens: 0,56), mely 6 óra után is jelentős mértékű marad (Pearson korrelációs koefficiens: 0,58) (2., 3. ábra). Ez arra utalhat, hogy a sejtek folyamatosan veszik fel a médiumból a jelen lévő ellenanyagot. A CD63 esetében a kolokalizáció foka alacsonyabb, ám mértéke az idő előre haladtával növekszik (Pearson korrelációs koefficiens 3 óra: 0,25, 6 óra: 0,45) (2., 3. ábra). A lizoszómával való kolokalizációt nem sikerült kimutatnunk sem LAMP-1 ellenes ellenanyagot használva (Pearson korrelációs koefficiens 3 óra: -0,26, 6 óra: -0,27, 24 óra: -0,33) (2., 3. ábra) sem LysoTracker vitális festék segítségével (Pearson korrelációs koefficiens 3 óra: -0,17, 6 óra: -0,18) (3. ábra). Az AC8 a sejtmaggal (mint negatív kontroll) sem mutatott kolokalizációt (Pearson korrelációs koefficiens: -0,16) (3. ábra).



**3. ábra: Az AC8 ellenanyag intracelluláris markerekkel mutatott kolokalizációja.** A Pearson korrelációs koefficiens 0 feletti értéke mérsékelt (CD63), 0,5 feletti értéke pedig erős kolokalizációra (EEA1) utal. A negatív értékek a kolokalizáció hiányát mutatják (LAMP-1, LysoTracker, sejtmag). A kolokalizációs értékek 1-3 mérésből,  $n > 40$  ROI adatból kerültek kiszámításra.

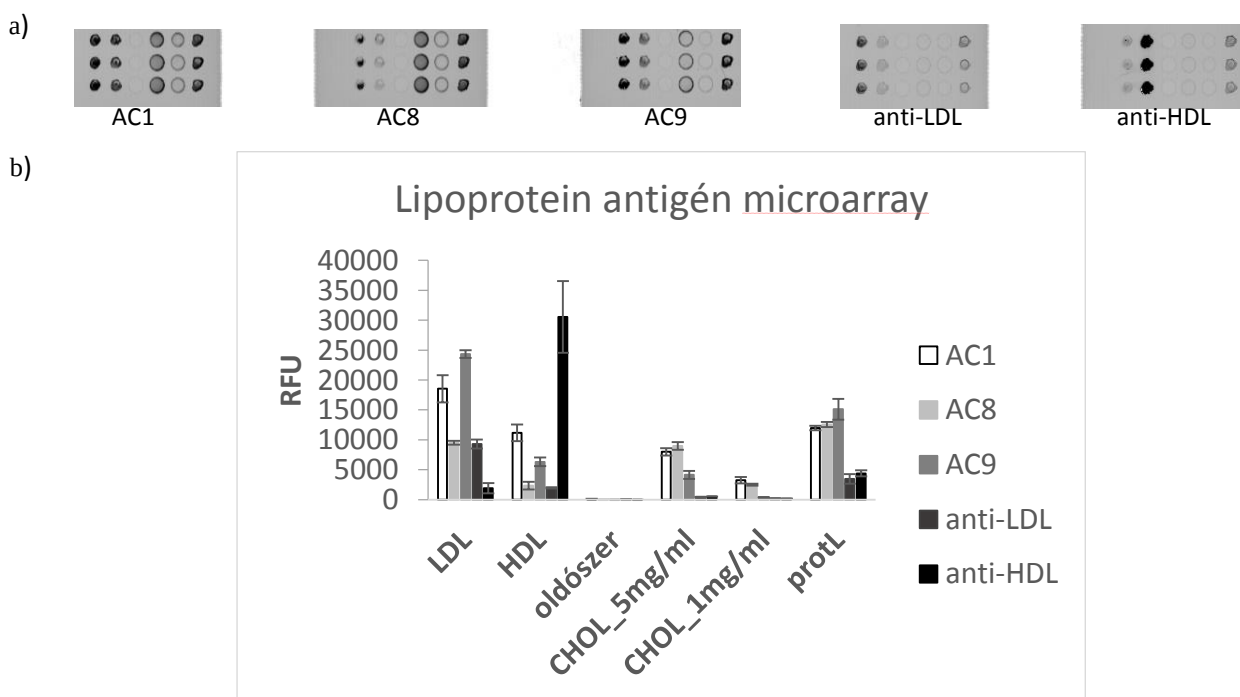
## 2. Az AC1, AC8 és AC9 ellenanyagok kötődésének vizsgálata antigén microarray módszerrel

Azt már korábban kimutattuk ELISA módszerrel, hogy az ACHA klónok képesek kristályosított és lipoproteinekben található koleszterinhez is kötődni (Biro, Cervenak et al. 2007). Jelen vizsgálatunkban antigén microarray módszert használtunk a koleszterin detektálás HTS irányba történő fejlesztése céljából. Eredményeink szerint, az IgG3 izotípusú antitestek (AC1 és AC8) erősebben kötődnek a koleszterinhez és egyéb 3 $\beta$ -OH csoportot tartalmazó szteroidokhoz, valamint a 7 $\alpha$ -OH-, a 7 $\beta$ -OH-koleszterinhez és az ergoszterinhez (5. és 6. ábra), mint az IgM izotípusú AC9 ellenanyag. Az AC9 gyengébb kötődési sajátságát jól mutatja az is, hogy ha az IgG3 izotípusú ellenanyagokkal azonos koncentrációban, de nem ekvimoláris mennyiségben alkalmazzuk (5  $\mu$ g/ml), akkor kötődése a koleszterinhez nem detektálható (5. ábra). Ezzel szemben (pentamer felépítését figyelembe véve) ekvimoláris mennyiségben (25  $\mu$ g/ml) már megfigyelhető az AC9 kötődése is a koleszterinhez, bár a jel erőssége még így is elmarad az AC1 és AC8 ellenanyagokétól (6. ábra). Egyéb vizsgált lipidekhez ellenanyagaink nem kötődtek (koprosztán, koleszterin-oleát, foszfatidil-kolin, -glicerín és -etanolamin származékok) (5. ábra).



**5. ábra:** Az AC1, AC8 és AC9 ellenanyagok különböző lipidekhez való kötődésének vizsgálata antigén microarray módszer segítségével. A chip felszínére kinyomtatott butanol-víz elegyben (ButOH-H<sub>2</sub>O) oldott lipidek előhívása 5  $\mu$ g/ml koncentrációjú AC1, AC8 vagy AC9 ellenanyaggal történt. A vizsgált lipidek a következők voltak: koleszterin (CHOL), 7 $\alpha$ -OH- és 7 $\beta$ -OH-koleszterin (7aOH-chol és 7bOH-chol), ergoszterin (Ergo), koprosztán (Copro), koleszterin-oleát (Chol-ole), 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfokolin (DMPC), 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfoglicerín (DMPG) és 1,2-bisz-difenilfoszfino-etán (DPPE). A kötődést anti-egér IgG+M fluoreszcens ellenanyaggal detektáltuk. A relatív fluoreszcencia egység (RFU) a három párhuzamos átlagából került kiszámításra. A feltüntetett adatok két mérés eredményét tükrözik.

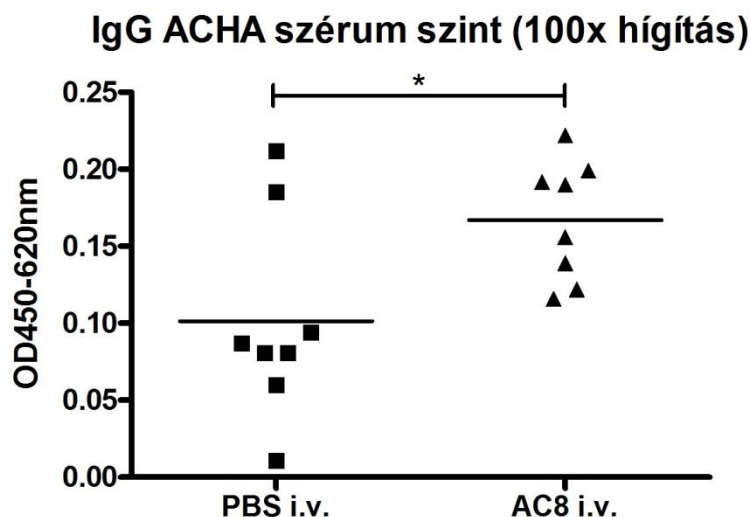
Az ACHA klónok lipoproteinekhez való kötődése teljesen más mintázatot mutatott (6. ábra). Az LDL-hez való kötődés erősségének sorrendje AC9>AC1>AC8, míg a HDL estében AC1>AC9>AC8. Az anti-LDL és anti-HDL ellenanyagok a vártak megfelelően az LDL-hez illetve a HDL-hez kötődtek, a koleszterinhez pedig nem (6. ábra).



**6. ábra:** AC1, AC8 és AC9 ellenanyagok koleszterinhez és lipoproteinekhez való kötődésének antigén microarray segítségével végzett vizsgálata. A chipre három párhuzamosban kinyomtatott pontok, balról jobbra haladva: LDL; HDL; oldószér; 5 mg/ml koleszterin; 1 mg/ml koleszterin, protein L. Az előhíváshoz használt AC1, AC8, anti-LDL és anti-HDL ellenanyagokat 5 µg/ml, az AC9 ellenanyagot 25 µg/ml koncentrációban használtuk (a). Az ellenanyagok kötődését anti-egér IgG+M fluoreszcens ellenanyaggal detektáltuk. A relatív fluoreszcencia egység (RFU) a három párhuzamos átlagából került kiszámításra (b). A feltüntetett adatok három független mérés eredményét tükrözik.

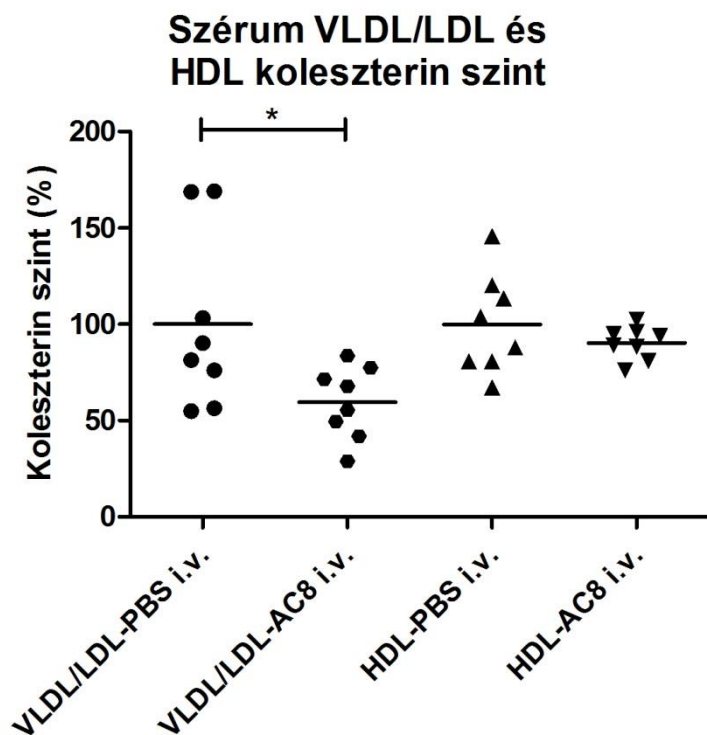
### 3. Az AC8 ellenanyag hatása *in vivo* a szérum koleszterin szintjére

Az ACHA klónok *in vitro* lipoproteinekhez való kötődése felveti a kérdés, hogy *in vivo* körülmények között is kötődnek-e LDL-hez és HDL-hez, és ezáltal befolyásolhatják a koleszterin anyagcserét. Ezért az AC8 klónnal (vagy PBS-sel) három héten keresztül oltottunk egereket és az állatokból vett szérum mintákat vizsgáltuk. Egyrészt, a szérum mintából ELISA módszer segítségével visszamértük az IgG izotípusú koleszterin-specifikus ellenanyagok szintjét. Az ACHA-val oltott állatokban szignifikánsan ( $P < 0.05$ ) növekedett az IgG ACHA, mely mutatja, hogy az oltási protokoll során az AC8 a szérumban a vizsgált időpontban még jelen van, és nem kerül kiürülésre, lebontásra (7. ábra).

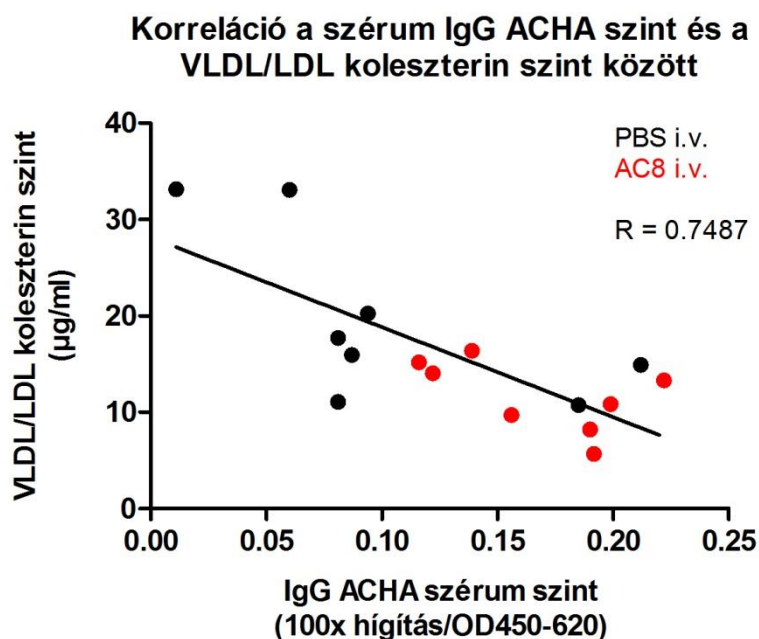


**7.  bra: IgG szérum ACHA szint AC8 ellenanyaggal való oltást követően.** Az egerek intravénás (i.v.) oltását követően az AC8-cal oltott állatok szérum ACHA szintje szignifikánsan megnövekedett ( $P = 0.0293$ ) a PBS-sel oltott állatokéhoz képest. Csoportonként 4-4 állat került oltásra, k t oltási sorozatból származó adatok láthatók.

Mindemellett a szérummintákból koleszterin ess e segítségével visszamértük a VLDL/LDL  s HDL koleszterin szinteket is. A kontroll állatokban a VLDL/LDL szérum koleszterin szint  $19.62 (\pm 8.91) \mu\text{g/ml}$ , a HDL szérum koleszterin szint  $116.9 (\pm 30.13) \mu\text{g/ml}$  volt. Ehhez képest az oltott állatokban a VLDL/LDL koleszterin szintje  $11.68 (\pm 3.69) \mu\text{g/ml}$ -re, a HDL koleszterin szintje  $105.5 (\pm 9.99) \mu\text{g/ml}$  koncentrációra csökkent. A szignifikáns ( $P < 0.05$ ) VLDL/LDL koleszterin szint csökkenés mellett kismértékű HDL koleszterin szint csökkenést is tapasztaltunk az AC8-cal oltott állatok esetében a kontrollhoz képest (8.  bra). Továbbá az IgG ACHA ellenanyag szintje és az alacsony denzitású lipoproteinek mennyisége között erős korreláció áll fenn ( $R = 0.7487$ ) (9.  bra). Ez az összefüggés azokban az oltatlan állatokban is fennáll, melyekben az átlagnál magasabb az IgG izotípusú koleszterin ellenes ellenanyagok szintje. Az ábrán összesítve látható az is, hogy az olt s hatására (piros pontok) az oltatlan állatokhoz (fekete pontok) képest megnövekedett az IgG ACHA szint és lecsökkent VLDL/LDL szint.



**8. ábra:** A szérum lipoprotein koleszterin szintje AC8 ellenanyaggal való oltást követően. Az egerek intravénás (i.v.) oltását követően az AC8-cal oltott állatok szérum VLDL/LDL koleszterin szintje szignifikánsan csökkent ( $P = 0.0449$ ) a PBS-sel oltott állatokéhoz képest. A VLDL/LDL 100% koleszterin szint  $19.62 \mu\text{g/ml}$  koncentrációnak, míg a HDL 100% koleszterin szint  $116.9 \mu\text{g/ml}$  koncentrációnak felel meg. Csoportonként 4-4 állat került oltásra, két oltási sorozatból származó adatok láthatóak.



**9. ábra:** A szérum IgG ACHA szint és a VLDL/LDL koleszterin szint közötti korreláció. A diagramon piros színnel az oltott, míg fekete színnel a kontroll egyedek értékei láthatók. A két paraméter között erős korreláció figyelhető meg.

## Diszkusszió

A dolgozatomban vázolt koleszterin-ellenes ellenanyagok vizsgálatára irányuló kutatás számos kérdésre választ adhat. Eredményeink azt mutatják, hogy az ACHA bekerül a P388 monocita sejtekbe, és intracelluláris jelenléte akár 6 óra múlva is detektálható. Az is kiderült, hogy az ellenanyag kötődése a lépből izolált primer T- és B-sejtekhez jóval kisebb mértékű, mint a makrofágokhoz. Elképzelésünk szerint ennek egyik oka az, hogy az intenzíven osztódó hibridóma/limfóma sejteken a lipid raftok eloszlása, a koleszterin kitettsége eltér az „egészséges” sejtektől. Az egérből izolált lépsejtekhez érthető módon csak igen kis affinitással kötődik az ellenanyag, ellenkező esetben ugyanis kóros immunfolyamatok következnenek be. A jelenség másik lehetséges magyarázata az, hogy a lépben a makrofágok igen kis százalékban vannak jelen, a sejtvonalakon végzett kísérleteink azonban azt mutatják, hogy ACHA kötődése a monocita/makrofág sejtekhez erősebb, mint a T- és B-limfocitákhoz. Ennek bizonyításához az AC8 kötődését és internalizációját egér peritoneumból izolált makrofágok esetében is szeretnénk megvizsgálni.

Kérdéses egyrészt, hogy ez a kis affinitású kötődés hozzájárul-e az ACHA funkciójához, másrészt az, hogy pontosan milyen hatást vált ki az ellenanyag kötődése a sejteken. Vajon hatással van-e a lipid (és azon belül a koleszterin) anyagcserére, illetve részt vesz-e jelátviteli folyamatokban? Más lipidek (pl. szfingomielin, GM1 gangliosid) esetében már kimutatták, hogy keresztükötésük jelátviteli folyamatokat indukál a sejtekben (Dixon, Stewart et al. 1987; Kiyokawa, Baba et al. 2005).

Fontos megjegyezni, hogy az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a médiumban folyamatosan jelen van az ellenanyag, emiatt órák elteltével is lehetséges újabb antitestek felvétele a sejtek számára. (Ennek tesztelésére a jövőben szeretnénk a sejtek felülszójából visszamérni az AC8 ellenanyag szintjét.) Ez magyarázatot adhat az ellenanyag hosszan tartó intracelluláris jelenlétére, és arra, miért mutat kolokalizációt az AC8 6 óra elteltével is a korai endoszóma markerrel (EEA1).

A CD63 antigénnel való időfüggést mutató Pearson korrelációs koeficiens érték azt sugallja, hogy az ellenanyag 3-6 óra elteltével fokozatosan bekerül a késői endoszómába és a multivezikuláris testbe, bár ez az eredmény még megerősítésre szorul. Ezután azonban az eddigi adataink alapján úgy tűnik, hogy az ACHA nem kerül be a lizoszómába, hiszen sem a LAMP-1 ellenanyaggal, sem a LysoTrackerrel nem mutatott kolokalizációt. Ennek több oka lehet. Az egyik lehetséges magyarázat az, hogy az ellenanyag nem a lizoszómában, hanem más úton, például proteaszómán keresztül kerül lebontásra. Ezt az elméletet a jövőben

proteaszóma inhibitor (MG-132) segítségével szeretnénk ellenőrizni. A lizoszómával való kolokalizáció hiányát az is okozhatja, hogy az ellenanyag a sejten belül FcRn-hez kapcsolódik, ami megvédheti a lebontástól azokban a sejtekben, melyekben jelen van az FcRn. Ennek a lehetőségnek a körüljárását is tervezzük. Egyrészt szeretnénk megvizsgálni az AC8 FcRn-nel való kolokalizációját, eddig azonban nem sikerült megfelelő FcRn-ellenes ellenanyagot találnunk. Másfelől az AC8 ellenanyag koncentrációjának médiumból való visszamérése választ adhat erre a kérdésre is. Végül pedig, az eddig felsoroltakon kívül az AC8 lizoszómában való hiányának oka lehet az is, hogy az ellenanyag konformációja a savas környezetben megváltozik, így elveszíti a GAM-IgG3-A488 által felismerésre kerülő epitópját.

Az antigén-microarray technika segítségével végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a koleszterin-ellenes ellenanyagok eltérő affinitással kötődnek egyrészt a szerkezetileg egymáshoz hasonló  $3\beta$ -OH szteroidokhoz, másrészt különböző lipoproteinek membránjában lévő szabad koleszterinhez. A pozitív kontrollként használt anti-LDL és anti-HDL ellenanyagok nem mutattak kötődést a koleszterinhez, ami arra utal, hogy ezek az ellenanyagok a lipoproteinek fehérje komponenseire specifikusak. Ezen nagy áteresztőképességű módszer segítségével az ellenanyagaink további, akár nem lipid természetű antigénekkal szembeni keresztreaktivitása is könnyen vizsgálhatóvá válik a jövőben.

Az ACHA ellenanyagok kötődési képessége felveti annak lehetőségét, hogy az antitest szerepet játszhat *in vivo* körülmények között a koleszterin anyagcsere megváltozásában. Mint tudjuk, ennek komoly, akár patológiás következményei is lehetnek, hiszen az LDL/HDL arány megváltozása igazoltan atherosclerosis kialakulásához vezethet (Lemaire-Ewing, Lagrost et al. 2012). Mivel az ellenanyagok képesek az LDL-hez és a HDL-hez kapcsolódni, serkenthetik a lipoproteinek szérumból való felvételét. Ennek pontos mechanizmusa még nem ismert, ám egy lehetséges módja az lehet, hogy a komplexben lévő ellenanyag a Kupffer-sejteken lévő FcR-okhoz kötődik, ezáltal serkenti a lipoproteinek makrofágok általi bekebelezését (Alving, Swartz et al. 1996). Mivel a koleszterin esszé során főleg a VLDL/LDL lipoprotein csökkenését tapasztaltuk az AC8 ellenanyaggal oltott állatokban, érdekes kérdés, hogy ez a hatás káros vagy védő szereppel bír-e (Horvath, Fust et al. 2001). A HDL arányának megnövekedése ugyanis gátolja az érlelmeszesedés kialakulását, azonban az oxLDL monociták általi felvétele épp ellentétes irányú folyamatokat indukál (Zhao 2009). Mindazonáltal a szérum IgG ACHA szint és a VLDL/LDL szint között tapasztalt erős korreláció arra utal, hogy az ACHA-k (akár a szervezetben előforduló természetes

ellenanyagok, akár az oltással bejuttatott monoklonális AC8) a VLDL/LDL szint csökkentését, ezáltal a HDL szint arányának megnövekedését váltják ki, ami védő szereppel bírhat az atherosclerosis kialakulásával szemben. A későbbiekben tervezzük a különböző izotípusú és a koleszterin különböző formáihoz eltérő mértékben kötődő (ld. antigén microarray) ACHA klónok *in vivo* hatásának összevetését, az oltást követően az ellenanyagaink és a lipoproteinek szérumszintjének monitorozását, illetve az oltott állatokból a koleszterin-ellenes ellenanyagok sejtekhez (pl. leukocitákhoz) való kötődésének analízisét.

Az ACHA antitestekkel végzett további kísérleteken kívül terveink között szerepel a teljes ellenanyagból előállított monobiotinilálható egyláncú variábilis fragmentum (scFv) tesztelése is. Ehhez először fontos megvizsgálni, hogy az AC8 scFv is kötődik-e a koleszterin különböző „formáihoz”. Az scFv konstrukció igen hasznos eszköz lehet a kezünkben, hiszen segítségével kizárhatjuk az ellenanyag Fc-receptorokhoz való kötődését, és az Fc-részen keresztül kifejtett effektor hatásokat, abban az esetben, ahol erre szükség van. A fragmentum biotinilálása pedig lehetővé teszi az ellenanyag tetramerizálását avidin segítségével. Az ily módon előállított tetramerrel vizsgálható az ellenanyag lipid raft keresztkötő képességén alapuló hatása. Ezen kívül a konstrukció segítségünkre lehet az AC8 ellenanyag antigén-kötő zsebének feltérképezésében is, amivel közelebb kerülhetünk ennek az immunológiai szempontból érdekes antigén-antitest kötődésnek a molekuláris hátteréhez.