

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Nem-polimorf MHC molekulák alkalmazása daganatterápiában

Szőke-Kovács Rita

Témavezető: Dr. Gogolák Péter, Dr. Mariolina Salio



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2026

Nem-polimorf MHC molekulák alkalmazása daganatterápiában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Szőke-Kovács Rita, Biologia MSc

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Gogolák Péter, PhD
Dr. Mariolina Salio, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Szőőr Árpád, PhD
Dr. Molnár-Érsek Barbara, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Szabó Gábor, MTA doktora
tagok:	Dr. Kalló Gergő, PhD
	Dr. Jakus Zoltán, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2026. november 2., 13 óra

1. BEVEZETÉS

1.1 T-sejt közvetített immunválasz

Az immunrendszert jellegzetességei alapján veleszületett és az adaptív részekre tagoljuk. A veleszületett immunitás gyors, nem specifikus válaszokat biztosít fizikai barriereken, immunsejteken és gyulladásos mediátorokon keresztül. Az adaptív immunitás jellegzetessége az antigén specifikus immunválasz, T- és B-limfocitákon keresztül, amely immunológiai memóriát eredményez. A T-limfociták kulcsszerepet játszanak az egészség megőrzésében és a betegségekben azáltal, hogy felismerik a peptid-fő hisztokompatibilitási komplex (pMHC) molekulákat a fertőzött és rosszindulatú sejteken található T-sejt receptorokon (TCR) keresztül. A fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulák a populációban jelenlevő nagyszámú allél következtében nagymértékben polimorfak és különféle peptid antigéneket mutatnak be. A TCR nagy mértékű diverzitása az öt felépítő láncok variábilis doménjét kódoló exonok génszegmensekből történő véletlenszerű összeállítódása és a létrejött láncok kombinálódása során valósul meg a T sejtek tímuszbeli fejlődése során. A timociták pozitív és negatív szelekción mennek keresztül a tímuszban, CD4+ vagy CD8+ sejtekké differenciálódva. Általánosságban a CD4+ T-sejtek segítik, szabályozzák az immunválaszokat, míg a CD8+ T-sejtek elpusztítják a fertőzött vagy rákos sejteket. A naiv T-sejtek a véráram és a nyirokszervek között keringenek. A nyirokszervekben a pMHC komplexek aktiválják őket, ami klonális expansziójukhoz majd effektor és memória T-sejtekké történő differenciálódásukhoz vezet.

1.2 T-sejt populációk által felismert nem konvencionális MHC molekulák

Az MHC rendszer 1940-es években történő felfedezése óta, az MHC molekulákat tekintjük a T-sejt aktivitás fő szabályozóiként. Idővel, a terület kibővült a nem konvencionális $\alpha\beta$ és $\gamma\delta$ T-limfociták felfedezésével, amelyek képesek felismerni a nem polimorf antigénprezentáló molekulákat. A CD1 és az MR1 antigénprezentáló molekulákat kódoló gének az MHC lókuszon kívül helyezkednek el, míg a HLA-E, HFE, vagy az egér H2-M3 és H2-Q9 génjei azon belül találhatóak. Ezek a nem konvencionális antigénprezentáló molekulák a hagyományos peptid antigénekkal ellentétben, metabolitokat vagy lipideket kötnek meg (a HLA-E kivételével, ami egy szűk szignál peptid garnitúra prezentációjára hivatott), melyeket nem konvencionális T-sejtek ismernek fel. Ezek a nem konvencionális T-sejtek memória jellegű sejtekként széles körben elterjedtek a perifériás szövetekben és keringésben, és gyors reakcióra képesek. Mivel nem polimorf MHC-szerű molekulákat ismernek fel, ezeknek a T sejteknek a

működését nem korlátozzák a donorok és recipiensek MHC molekulái közötti allélikus eltérések. A hagyományos T-sejtekkel ellentétben az, antigénspecifikus, nem konvencionális T-sejtek elsősorban nem-limfoid szervekben találhatók, és kisebb TCR-diverzitással rendelkeznek. A T-sejtbiológia és immunterápia területén végzett kutatások főként az MHC I. és II. osztályú molekulák által bemutatott peptid antigénekre összpontosítanak, viszont ezek a monomorf antigénprezentáló molekulák ígéretes univerzális immunterápiás stratégiát kínálnak.

1.3 Cluster of differentiation 1 (CD1) molekula család

A Cluster of Differentiation 1 (CD1) család olyan antigénprezentáló molekulák csoportja, amelyek szerkezeti hasonlóságokat mutatnak az MHC I. osztályú fehérjékkel. Azonban a peptideket prezentáló MHC molekulákkal ellentétben a CD1 fehérjék lipid jellegű molekulákat kötőnek és azokat prezentálják a T-sejteknek. Ezek a molekulák először porcos halakban jelentek meg, és együtt fejlődtek az MHC fehérjékkel, B-sejt receptorokkal és a T-sejt receptorokkal. Emlőszövetekben, a CD1 család öt izoformát tartalmaz (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d és CD1e), melyek az 1. kromoszómán kódoltak. Szerkezetileg, a CD1 molekulák egy nehézláncból és egy nem kovalensen kapcsolódó $\beta 2$ -mikroglobulinból ($\beta 2m$) állnak. A nehézláncnak három extracelluláris doménje van ($\alpha 1$, $\alpha 2$ és $\alpha 3$), amelyek közül az $\alpha 1$ és $\alpha 2$ domének alkotják a lipidkötő zsebet. A CD1 1. csoportú izoformái (CD1a, CD1b és CD1c) az adaptív T-sejteket aktiválják, míg a 2. csoportban lévő CD1d a T-sejtek azon alcsoportjait aktiválja, amelyek veleszületett-szerű funkciókat mutatnak. A CD1e nem található meg a sejtfelszínen, hanem a CD1b lipid kötésében tölt be szerepet. Az MHC Ia osztályú molekulákkal ellentétben, melyek szinte minden magas sejtben megtalálhatóak, a CD1 molekulák főként antigént prezentáló sejteken (APC) és dupla-pozitív (CD4+CD8+) timocitákon vannak jelen. A CD1a, CD1b és CD1c expresszióját olyan hatások indukálhatják, mint a GM-CSF vagy az IL-1 β . Magas szintű CD1a expresszió jellemző a bőrben található dermális dendritikus sejteken és a Langerhans-sejteken. CD1b elsősorban a nyirokcsomókba vándorló dendritikus sejteken és mieloid eredetű dendritikus sejteken expresszálódik. A CD1 család szélesebb expressziós mintázatát mutató CD1c, a monocita eredetű dendritikus sejteken (moDC-ken), Langerhans-sejteken és B-sejteken expresszálódik. A CD1d széles körben expresszálódik számos szövet- és sejttípusban, beleértve a monocitákat, dendritikus sejteket (DC-eket), B-sejteket, timocitákat, veleszületett limfoid sejteket (ILC-eket), bélhámsejteket (IEC-eket), hepatocitákat és keratinocitákat. Néhány, a CD1a promotor régiójában megfigyelt kisebb polimorfizmusokról szóló tanulmánytól eltekintve más CD1 polimorfizmust nem írtak le. Mivel az emberekben nincsenek

genetikai variációk (a CD1a-n kívül, amelynek két különböző allélja van, amelyek két aminosavban különböznek), ezek a molekulák nem polimorfok. A CD1 molekulákkal szembeni T-sejt válasz ezért nem korlátozott a donor genetikai hátterére. Ezenkívül, mivel a lipidek mutációs aránya alacsonyabb a peptid-HLA-hoz képest, a CD1-hoz kötött lipidantigének célzása alacsonyabb kockázatot jelent terápiának ellenálló (rezisztens) ráksejtek kialakulására.

1.3.1 CD1 recycling és antigénprezentáció

A CD1 izoformák az endoplazmatikus retikulumban (ER) termelődnek, és a Golgi-készüléken keresztül haladva kerülnek a sejtmembránra. A sejtfelszín elérése után, internalizációs és újrahasznosítási folyamaton mennek keresztül a különböző endoszomális kompartmentumokban. A CD1a molekulák képesek az extracelluláris lipidek megkötésére a sejtfelszínen. A CD1b, CD1c és CD1d molekulák kevésbé hatékonyak a lipidek felszíni betöltésében, és lipidcsere céljából az endoszomális rendszerben hasznosulnak újra. A CD1 molekulák a plazmamembrán citoplazmatikus oldalán elhelyezkedő Adaptor Protein (AP) komplexekhez kötődnek. Az AP-k, az CD1 izoforma-specifikus motívumokat felismerve a citoplazmatikus doménen, lehetővé teszik a CD1 izoformák szétválogatását és az endoszomális hálózat különböző részeibe irányítását. A CD1a citoszolikus doménje nem rendelkezik újrahasznosító motívummal, így ezek a molekulák főként a felszínen maradnak, és csak a korai endoszomákban mennek keresztül ARF-6-függő felszíni újrahasznosításon. A CD1b mélyen behatol a késői endoszomákba és lizoszomákba mind az AP-2, mind az AP-3 közreműködésével. A CD1c az AP-2 segítségével újrahasznosul a korai és késői endoszomális kompartmentek között. A CD1d AP-2 és AP-3 segítségével a késői endoszomákba és lizoszomákba jut.

1.3.2 Az antigén szelektivitás szabályozása a CD1 szerkezete által

A CD1 izoformák antigénkötő zsebei egyedi szerkezeti jellemzőket mutatnak. A zsebmélység, térfogat és csatorna kialakításbeli különbségek lehetővé teszik, az izoformák eltérő lipidek megkötésére való specializációját, mely tükrözi az izoformák sejten belüli transzport mintázatát és endoszomális mintavételi helyét. A CD1a rendelkezik a legkisebb antigénkötő zsebbel (1350 Å), amely két fő kamrát, az A' és F' zsebeket foglalja magában. Az A' zsebet a tetőt alkotó láncok közötti elektrosztatikus kölcsönhatások alakítják, míg a bázisán található Valin28 korlátozza a befogadható alkílláncok hosszát. Ezért a CD1a a rövidebb vagy elágazás nélküli szénhidrogénláncú lipidek kötésére alkalmasabb. A CD1a-nak nincs endoszomális célzó motívuma, ami kiemeli az antigének sejtfelszínen történő megkötésében betöltött szerepét. A CD1b

rendelkezik a legnagyobb kötőzsebbel (2200 Å), amely négy összekapcsolódó részből (A', F', C' és T') áll. Ez a szerkezet lehetővé teszi nagy lipidek (akár C80–C86 glükóz mikolátok) befogadását az ATF szupercsatornában, ahol az alkiláncok átszövik a C' portált. A kristályszerkezetek kimutatták, hogy a CD1b két lipidet képes megkötni a kötőzsebben, ahol a kisebb molekulák segítik a nagyobb lipidek prezentációját. Endoszomális lokalizációja segíti a hosszú szénláncú lipidek betöltését, amelyeknek alacsony pH-ra van szükségük az optimális kötődéshez. A CD1c, 1780 Å³ zsebtérfogattal és egy folyamatos A'/F' zsebrendszerrel rendelkezik, amelyet egy egyedi D járulékos portál köt össze. Ez a szerkezet lehetővé teszi, hogy elágazó mikoketideket, például mannozil-foszfomikoketidet prezentáljon, ahol az alkil láncok az A' zsebben kifelé terjednek. A CD1c képes továbbá lipopeptidek befogadására is. Szerkezeti vizsgálatok azt mutatják, hogy képes kettős lipid prezentációra: a mikoketid váz az A' zsebben rögzül, míg a rövidebb szénhidrogének (C12) az F' zsebben helyezkednek el. A CD1d (1 400 Å) csak A' és F' zsebeket tartalmaz. Először α-galaktoszilceramiddal komplexben kristályosították. Az alkil lánc elhelyezkedését a nehézlánc (Asp80, Asp153, Thr156) aminosavai és a váz poláros oldalláncai közötti konzervált poláris kölcsönhatások határozzák meg, ezért az acil lánc az F' zsebben helyezkedik el, függetlenül annak hosszától. Az F' zseb ideálisan képes befogadni 16-18 szénatom hosszúságú alkil láncokat, mint például a szfingozin, de kissé hosszabb láncokat is képes horgonyozni

Az αGalCer-analógok rövidebb alkil láncokkal mindkét zsebben (A' és F') spacer lipidek együttes prezentációját igénylik, így biztosítva az optimális lipidkötést.

1.3.3 A CD1c-kötött lipid-antigén repertoár

Habár a CD1 molekulák által prezentált lipidek ismerete kulcsfontosságú a daganat specifikus lipidek azonosításához, csak néhány tanulmány irányult ezek vizsgálatára. Jelenleg az egyetlen, daganathoz köthető, CD1c-restriktált lipid antigén a metil-lizofoszfatidsav (mLPA), amelyet leukémiás sejtekben azonosítottak, de egészséges monocitákban és B-sejtekben nem fordul elő. Bár a CD1c-mLPA ígéretes terápiás célpont lehet leukémia esetén, az mLPA előfordulásának gyakorisága, mind a tumorokon belül, mind a betegek között továbbra is megválaszolatlan kérdés. Ez rámutat a CD1c-hoz kötött lipidom átfogóbb profilozásának szükségességére, amelynek ismerete segíthet a daganatsejteket az egészséges sejtek megkülönböztetésében, és feltételezhetően új lipid célpontokat tárhat fel. A terület előrehaladását hátráltatja, hogy a CD1c lipid repertoárjával kapcsolatos eredmények eltérést mutatnak. Korábbi tanulmányok, kisebb számban, saját-lipideket azonosítottak, - például glikoszfingolipideket, szulfatidokat és

gangliozidokat (GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b) találtak -, amelyeket a CD1a, CD1b és CD1c prezentál a T-sejteknek. Azonban Huang és munkatársai(1) legújabb kutatásai során oldható CD1 molekulák által kötött széles saját-lipid-spektrumot tártak fel, beleértve foszfo- és glikolipideket is. Ezek a különbségek rávilágítanak a jelenlegi módszerek kihívásaira a CD1 komplexek izolálásában és lipid tartalmuk elemzésében. A továbblépéshez és klinikailag releváns felfedezésekhez sztandardizált, nagy pontosságú technikák kifejlesztésére van szükség.

1.3.4 CD1-lipid komplexeket felismerő T sejt receptorok

A T-sejtek két eltérő módon lépnek kapcsolatba a CD1-lipid komplexekkel TCR-jeiken keresztül. Az első módszert „fejcsoport-diszkriminációs modellnek” nevezik, amelyben a TCR-ek egyszerre ismerik fel a CD1 molekulát és a prezentált lipid poláros fejcsoportját, hasonlóan ahhoz, ahogy az $\alpha\beta$ TCR-ek a peptid-MHC komplexeket azonosítják. A második megközelítés az „kölcsonhatás hiányának modellje”, amely során a TCR-ek úgy kötődnek a CD1-hez, hogy közben nem lépnek közvetlen kapcsolatba a lipid antigén fejcsoportjával. Kimutatták, hogy a CD1a-specifikus T-sejtek gyakran ezt a második stratégiát alkalmazzák: TCR-jeik kizárólag magához a CD1a-hoz kötődnek, az A' tető domén felett, anélkül, hogy a lipiddel bármilyen kölcsönhatásba lépnének. Bizonyos lipidek, mint például a szulfatid és a szfingomielin, megszakíthatják ezeket a kölcsönhatásokat azáltal, hogy konformációs változásokat idéznek elő az A' zsebben, így hatékonyan megakadályozzák a TCR kapcsolódását. Az emberi vérben az autoreaktív $\alpha\beta$ T-sejtek jelentős populációja (a memória T-sejtek kb. 0,02-0,4%-a) a CD1a molekulát ismeri fel. Ezek a sejtek szerepet játszanak a bőr fiziológiás homeosztázisának és immunegyensúlyának fenntartásában azáltal, hogy IL-22-t termelnek, ami serkenti a keratinocitákat antimikrobiális peptidek kibocsátására.

A CD1b fontos szerepet játszik a mikobakteriális lipid antigének prezentálásában. CD1b tetramerek segítségével azonosítottak olyan specifikus T-sejt populációkat, amelyek ezeket a mikrobiális lipideket CD1b-restríktált módon ismerik fel. Bár léteznek autoreaktív, CD1b-specifikus T-sejtek is, ezek ritkábbak, mint a CD1a-reaktív társaik. Hasonlóképpen, a CD1c is részt vesz autoreaktív T-sejt válaszok kiváltásában, jelentős populációk találhatók mind felnőtt, mind köldökzsinórvérben. Roy és munkatársai(2) több CD1c-reaktív T-sejt klónt azonosítottak, amelyek különféle mikobakteriális glikolipideket képesek felismerni. Érdekes módon néhány ilyen CD1c-reaktív TCR polispecifitást mutat, vagyis többféle saját-lipid antigént prezentáló CD1c molekulával is képesek kötődni, ami arra utal, hogy a CD1c fehérje felszínével lépnek kapcsolatba, nem pedig magukkal a lipid antigénnel. Ezt világosan bemutatták Wun és munkatársai 2018-ban(3), akik

igazolták, hogy a 3C8 $\alpha\beta$ TCR közvetlenül a CD1c-hez kötődik, anélkül, hogy a lipid fejcsoportokat érintené, ami jelentős eltérést jelent a hagyományos antigénfelismerési modellektől.

A CD1d rendszer különösen jól ismert, ahol az invariáns NKT (iNKT) sejtek a klasszikus példái a CD1d-restríktált populációnak. Újabb eredmények további T-sejt alcsoportokat tárnak fel, például $\gamma\delta$ T-sejteket, amelyek szintén reagálnak CD1d-lipid komplexekre. Például jelentős számú keringő $\gamma\delta$ T-sejt ismeri fel a CD1d-szulfatid komplexeket, ami tovább bővíti a CD1 által korlátozott immunválaszok körét.

1.4 CD1-restríktált T-sejtek előfordulása betegségekben

Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak a CD1-restríktált, autoreaktív T-sejtek fontos szerepére különböző betegségekben. Ezek a T-sejtek képesek felismerni a CD1 molekulák által prezentált szelflipideket. De Lalla(4) és munkatársai kutatásai meglepően magas arányban mutattak ki keringő, CD1-autoreaktív T-sejteket (10:1-től 300:1-ig terjedően), ami arra utal, hogy ezek a sejtek jelentős részét képezik az emberi immunrendszernek. A CD1-autoreaktív T-sejteket több autoimmun betegséggel is összefüggésbe hozták. Pajzsmirigy betegségekben, mint a Graves-kór és a Hashimoto-thyreoiditis, ezek a sejtek CD1-expresszáló B-sejtekkel és dendritikus sejtekkel együtt infiltrálják az érintett szöveteket, gyulladást és szövetkárosodást okozva. A CD1a- és CD1c-restríktált T-sejtek citotoxikus hatást mutatnak a CD1a- és CD1c-pozitív pajzsmirigy-sejtekkel szemben. Az endokrin autoimmunitáson túl a CD1a-reaktív T-sejtek részt vesznek a pikkelysömörben és allergiás bőrbetegségekben megfigyelhető bőrgyulladásban, míg a CD1c-restríktált válaszokat összefüggésbe hozták a szisztémás lupus erythematosus (SLE) kialakulásával, mivel segítik az autoreaktív B-sejteket káros IgG antitestek termelésében. A CD1 rendszer emellett létfontosságú a fertőzések elleni védekezésben és a daganatok elleni küzdelemben is. A CD1c-mediált válaszok segítenek a Mycobacterium tuberculosis elleni védekezésben, és a CD1-restríktált T-sejtek szerepet játszanak a daganat immunellenőrzésében. Lepore és munkatársai(5) leukémia-reaktív T-sejt klónokat fedeztek fel, amelyek felismerik a CD1c által prezentált metil-lizofoszfatidsavat (mLPA), egy tumor aszociált antigénnek tekinthető saját-lipidet, amely leukémiás sejtekben található meg, de hiányzik az egészséges monocitákból és B-sejtekből. Ezek a felfedezések ösztönözték azon adoptív T-sejt terápiák fejlesztését, amelyek célja a CD1c-mLPA komplexek célzott támadása akut myeloid leukémia kezelésére. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a lipid anyagcsere változásai hozzájárulnak az autoimmun betegségek előrehaladásához. Olyan állapotok, mint a szisztémás lupus erythematosus (SLE), pikkelysömör, cukorbetegség és rheumatoid arthritis gyakran társulnak diszlipidémiával. Ezekben az esetekben a CD1-restríktált T-sejtek

súlyosbíthatják vagy éppen csökkenthetik a gyulladást, amikor megváltozott saját-lipidekkel találkoznak. Például pikkelysömörben a kóros lipid szintek káros válaszokat válthatnak ki a CD1-restríktált T-sejtekből, míg rheumatoid arthritisben ezek a sejtek az ízületi gyulladás kialakulásában is szerepet játszhatnak. Mindez arra utal, hogy a lipidanyagcserét célzó vagy a CD1-restríktált T-sejtek aktivitását módosító terápiák új utakat nyithatnak a lipidekhez kötött autoimmun betegségek kezelésében. Ennek ellenére még mindig jelentős hiányosságok vannak abban, hogy pontosan megértsük, hogyan befolyásolják a saját-lipidre specifikus T-sejtek a betegség lefolyását, különösen a lipidanyagcsere-zavarok esetén. További kutatások szükségesek annak meghatározásához, hogy ezek a sejtek főként elősegítik-e a gyulladást, vagy szabályozó szerepük is van. Egyes CD1c-restríktált T-sejtek azon képessége, miszerint mind saját-, mind mikrobiális lipideket is felismernek, érdekes kérdéseket vet fel ezek immunegyensúly fenntartásában és az autoimmun válaszok kiváltásában betöltött szerepéről. Ezen bonyolult kölcsönhatások megértése, lehetőséget nyit olyan célzott immunterápiák fejlesztésére, amelyek képesek modulálni a CD1-restríktált T-sejt válaszokat különféle betegségekben.

1.5 Oldható T-sejt receptorok terápiás alkalmazása

A TCR-ok a szervezet természetes receptorai a peptid-HLA (pHLA) komplexek és a CD1 molekulák számára. Két transzmembrán láncból, egy α - és egy β -láncból (esetleg γ és δ láncból) állnak, amelyek mindegyike tartalmaz konstans (C) és variábilis (V) doméneket. Szerkezeti vizsgálatok kimutatták, hogy a TCR α - és β -láncainak variábilis doménjei közvetlenül kölcsönhatásba lépnek a pHLA komplexek α -héliceivel, valamint a peptid antigénnel. A TCR specificitásáért három komplementaritást meghatározó régió (CDR) —CDR1, CDR2 és CDR3— a felelős. Míg a CDR1 és CDR2 a csírvonal V génszegmentenseiből származik, a CDR3 hipervariabilitása a V(D)J kapcsolódásnál bekövetkező nukleotid hozzáadásokból vagy törlésekből ered. Általában a CDR3 hurok érintkezik a peptid felszínével, míg a CDR1 és CDR2 a HLA hélixekkel lép kapcsolatba. A TCR-ok ígeretes molekulák terápiás alkalmazásokban, akár sejtes terápiaként, akár oldható, bispecifikus hatásmechanizmusú molekulaként. Azonban a természetes TCR-ok terápiás célú alkalmazása számos kihívással jár: az oldható molekulák gyenge stabilitásával, a pHLA komplexekhez való alacsony affinitással, alacsony expressziós hozammal, hibás hajtogatással és protein aggregációval. Az Immunocore Ltd. innovatív fehérjemérnöki megoldásokat alkalmazott, például extra intermolekuláris diszulfidkötés bevezetését a TCR konstans domének között a stabilitás növelése érdekében, valamint fág display-alapú affinitásérlelést a kötőerő fokozására, így hozva létre olyan oldható TCR-alapú terápiákat, amelyek kifejezetten a pHLA komplexeket célozzák. Ennek kiváló

példája az Immunocore ImmTAC (Immune-mobilizing monoclonal TCRs Against Cancer) platformja. Az ImmTAC molekulák egy célzó karral rendelkeznek, amely egy monovalens, affinitásnövelt TCR, amely pikomoláris tartományú kötődési affinitással bír, valamint egy effektor doménnel, amely egy monovalens anti-CD3 egy láncú Fc antitest fragmentum, az UCHT1 monoklonális antitestből származtatva. A célzó kar a tumorsejteken található pHLA komplexekhez kötődik, hatékonyan megjelölve azokat az immunválasz számára. Az effektor domén toborozza és aktiválja a T-sejteket, függetlenül azok saját TCR specificitásától, lehetővé téve a daganatsejtek célzott elpusztítását még akkor is, ha a célzott pHLA sejtfelszíni expressziója alacsony. Ez az innovatív stratégia vezetett az első FDA által jóváhagyott ImmTAC terápiához 2022-ben az uveális melanoma kezelésére, ami bizonyítja a mérnökiileg módosított TCR-terápiák ígéretes jövőjét.

1.6 A HLA-molekulákat célzó terápiák limitációja

A HLA-molekulák értékes terápiás célpontok, mivel intracelluláris peptideket prezentálnak a sejtfelszínen, így betekintést nyújtanak a sejtek egészségi állapotába és olyan betegségekbe, mint a fertőzések vagy a daganatok. A TCR-ek képesek felismerni a pHLA komplexeket, és erős immunválaszt kiváltani a rendellenes sejtekkel szemben. Ez vezetett a TCR-alapú terápiák kifejlesztéséhez, amelyek a T-sejteket a beteg szövetek elpusztítására irányítják. Azonban ezek a kezelések csak azoknál a betegeknél alkalmazhatók, akik expresszálják az emberi populációban leggyakoribb HLA-A*02:01 allélt.

A CD1c ígéretes alternatívát kínál monomorf jellege és korlátozott expressziója miatt. A CD1c elsősorban a timocitákon, B-sejteken és monocitákból származó antigén-prezentáló sejteken található meg, így különösen alkalmas a leukémiák célzott kezelésére, kevésbé érintve az egészséges szöveteket. Kutatások kimutatták, hogy a CD1c-restriktált T-sejtek képesek felismerni és megtámadni a leukémiás sejteket. Mivel a CD1c nem található meg a hematopoetikus őssejteken, a CD1c-pozitív daganatsejteket célzó terápiák lehetővé tennék, hogy az egészséges prekurzorok a csontvelőben pótolják az eltávolított vérsejt-populációkat. Ezek a tulajdonságok ideális jelöltté teszik a CD1c-t a TCR-alapú bispecifikus T-sejt aktivátorok új generációjának kifejlesztésére, lehetőséget adva a HLA-korlátozások leküzdésére és a nem célzott hatások minimalizálására precíziós immunterápiában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori dolgozat elsődleges célja a CD1c-t célzó bispecifikus T sejt aktivátorok kifejlesztése hematológiai rosszindulatú betegségek kezelésére. A vizsgálatok magában foglalják a CD1 lipidom jellemzését, valamint a CD1c molekulák T-sejt receptorok általi molekuláris felismerésének részletesebb leírását.

1. A CD1 komplexek lipid antigén repertoárjának jellemzése

Célkitűzés: A CD1 izoformákhoz kapcsolódó lipidek azonosítása és mennyiségi meghatározása daganatsejtekben.

Módszer: Oldható CD1 molekulák előállítása Expi293F sejtekben, CD1c-expresszálo daganatsejt-vonalak létrehozása, valamint a CD1-hez kötött lipidom tömegspektrometriás analízise.

2. A CD1c molekuláris felismerésének megértése

Célkitűzés: CD1c molekulák T-sejt receptorok általi molekuláris felismerésének vizsgálata.

Módszer: Oldható CD1c molekulák előállítása specifikus lipidekkel, CD1c-lipid specifikus TCR-ek izolálása, valamint a TCR-CD1c kölcsönhatások biofizikai tulajdonságainak vizsgálata kristályszerkezetek segítségével.

3. Nagy affinitású, CD1c-lipid specifikus TCR-ok kifejlesztése

Célkitűzés: A CD1c-lipid specifikus TCR-ek affinitásának növelése terápiás célokra.

Módszer: Véletlenszerű és szerkezetalapú fág könyvtárak alkalmazása a CD1c-specifikus TCR-ek mutációjára és affinitásuk növelésére, valamint lipid specificitásuk vizsgálata tömegspektrometriával és krisztallográfiával.

A végső cél, hogy ezt a tudást bispecifikus, olyan TCR-alapú reagensek kifejlesztésére fordítsuk, amelyek képesek megkülönböztetni az egészséges és a daganatsejteket a daganatspecifikus CD1c-lipid antigének célzásával. A doktori munka átfogó célja CD1c-t célzó bispecifikus aktivátorok kifejlesztése hematológiai rosszindulatú betegségek ellen.

3. NYANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Oldható CD1 molekulák molekuláris klónozása és expressziója

A humán CD1a, b, c és d $\alpha 1$ – $\alpha 3$ doménjeit N-terminálisan $\beta 2$ -mikroglobulinhoz fuzionáltuk glicin-serin linker segítségével. Az egyláncos konstrukció szintetizált C-terminális AviTag™-ot és 6xHis tag-ot tartalmazott (GeneArt, Invitrogen), majd olyan pCDNA3.1 vektorba klónoztunk, amelyről ko-expresszálódik a BirA enzim is a biotinilációhoz. Az Expi293F sejteket 1 $\mu\text{g/ml}$ plazmiddal transzfektáltuk, és az endogén lipideket tartalmazó CD1c molekulákat, „CD1c-endo” monomereket öt napon keresztül expresszáltuk. A fehérjéket affinitás- és méretkizárásos kromatográfiával (géliszűréssel) tisztítottuk. A lipid-betöltési vizsgálatokhoz a CD1c-t és CD1d-t GnTI-hiányos Expi293FGnTI- sejtekben expresszáltuk, glikán-hiányos CD1 molekulákat előállítva. A kristályosítási konstrukcióból a C-terminális His tag-et a tisztítás után TEV proteáz segítségével távolítottuk el. Az expresszió során kifunenzint adtunk hozzá, hogy a glikoziláció mannóz magas típusokra korlátozódjon. A maradék glikánokat pedig PNGaseF segítségével távolítottuk el.

3.2 A CD1 lipidom lipid tömegspektrometriás vizsgálata

Az oldható CD1 monomereket Expi293F sejtekben expresszáltuk a lipid-ligandum kölcsönhatások tanulmányozására. A lipid háttér meghatározására, kontrollként HLA-A2 molekulákat használtunk, amelyek szerkezetileg hasonlóak, de peptideket kötnek. A lipidomikai analízist a Lipotype GmbH (Drezda, Németország) végezte tömegspektrometriás módszerrel. A lipideket kétlépcsős kloroform/metanol extrakcióval vontuk ki, a kivonás előtt belső standardokat adtunk a mintákhoz. A mintákat pozitív és negatív ion üzemmódban is elemeztük. A lipidek azonosítása LipidXplorer szoftverrel történt, a mennyiségi meghatározást pedig lipid osztály-specifikus belső standardokhoz normalizáltuk. Az adatelemzést házon belüli R-alapú pipeline-nal (R 4.3.2 verzió) végeztük.

3.3 In vitro ligandumcsere és validációs módszerek

A CD1 molekulák lipid betöltéséhez az 50-szeres moláris feleslegben lévő lipidet nitrogén alatt üveg fiolákban szárítottuk, majd ligandumcsere pufferben (0,5% CHAPS, 50 nM nátrium-citrát, pH 6,0) oldottuk újra, és 37°C-on 45 percig szonikáltuk. Ezután CD1c-endo vagy CD1d-endo monomereket adtunk hozzá, és a keveréket egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. A mintákat Vivaspin 500 oszlopokkal koncentráltuk, majd Zebra Desalting spin oszlopokkal tisztítottuk. Az optimális csere pH 6,0-nál történt. A ligandum

betöltését izoelektromos fókuszálás (IEF) géllal (pH 3–7) ellenőriztük. A CD1 fehérjét 1:1 arányban kevertük a betöltő pufferrel, majd növekvő feszültségen (100 V, 250 V, 500 V) futtattuk, 12%-os triklórecetsavval fixáltuk, és Coomassie-val festettük. Az izoelektromos pont eltolódása sikeres lipid betöltésre utalt.

A csere megerősítésére natív tömegspektrometriát alkalmaztunk. Öt mikrogramm fehérjét töltöttünk méretkizárásos kromatográfiás (SEC) oszlopra; a 4–14 ml közötti frakciókat elemeztük. A nyers adatgörbék dekonvolúcióját PMI-Byos szoftverrel végeztük, majd Chromeleon-nal dolgoztuk fel. A fragmentációs adatok alapján azonosítottuk a lipideket. Fluoreszcens CD1c és CD1d tetramereket állítottunk elő, a biotinilált monomereket PE- vagy APC-konjugált streptavidinnel inkubálva, 25%-os moláris monomer többlettel. A CD1 dextramereket APC-jelölt SA-Dextramer vázakkal készítettük, szintén monomertúlsúllyal. Ezeket a lipid-betöltött tetramereket és dextramereket CD1d-restríktált T-sejtek festésére használtuk, ezzel validálva a ligandumcsere protokollt.

3.4 TCR szelekció Fág display módszerrel

A CD1c-specifikus TCR-ek izolálásához fágdisplay technológiát alkalmaztunk. Ez a módszer véletlenszerű TCR α - és β -lánc könyvtárakat hoz létre, amelyek bakteriofág felszínen jelennek meg, majd ezeket 100 nM biotinilált CD1c-endo molekulával, streptavidin bevonatú mágneses gyöngyökön szelektáljuk. A fág virionokat előzetesen 3% tejport tartalmazó PBS-ben blokkoltuk a nem specifikus kötődés csökkentése érdekében, majd a gyöngyökkel inkubáltuk. Mosás után a kötött fágokat tripszinnel eluáltuk, majd korai log-fázisban lévő TGI E. coli-t fertőztünk meg velük. A fertőzött sejteket YTEag táptalajra oltottuk, és 30°C-on 16 órán át inkubáltuk. Titrációs lemezeket használtunk a könyvtár méretének becslésére, míg nagy négyzet alakú lemezekon maximalizáltuk a klónok diverzitását. Ezt a szelekciós folyamatot háromszor ismételtük meg, minden kör után szekvenálással és titer meghatározással. A TCR specificitásának és keresztreaktivitásának vizsgálatához MAGPIX assay-t alkalmaztunk. A TCR-eket HLA-peptid és CD1-lipid komplex panelek elleni reaktivitásukra teszteltük, részletesen értékelve szelektivitásukat. Ez a megközelítés lehetővé tette, nagy specificitású, CD1c-lipid antigénekre reagáló TCR-ok azonosítását.

3.5 TCR és ImmTAC konstrukciók tervezése és expressziója

A TCR láncokat a pLAS0729 és pLAS0730 vektorokba klónoztuk. A TCR konstrukciók tartalmazzák az α - és β -láncok variábilis és konstans doménjeit, a láncokat pedig egy diszulfidhíd stabilizálja. A funkcionális kísérletekhez a TCR konstrukciókat

ImmTAC formátumba alakítottuk át, ahol a TCR β -lánc egy anti-CD3 scFv-vel van fuzionálva a pLAS536 vektor segítségével (az ImmTAC molekulák teljes mérete 75 kDa). A TCR láncokat a BL21(DE3)Rosetta pLysS E. coli törzsben expresszáltuk. Az előkultúrákat három órán át 250 ml-es Erlenmeyer-lombikokban növesztettük, amíg az OD600 $\approx$ 0,5 értéket el nem érték. Ezután 250 ml Auto Induction Mediumot oltottunk be. A kultúrát 37°C-on, 220 rpm-en 2 órán át inkubáltuk, majd éjszakára 30°C-ra helyeztük. A TCR és ImmTAC α - és β -láncok diszulfidkötéseket tartalmaznak. A bakteriális sejtek citoszolja redukáló környezet, amely megakadályozza a diszulfidkötések kialakulását, ezért az expresszált fehérje zárványtestekként (IB-ként) aggregálódik az expresszió során. Az IB-ket 4000 rpm-en, 30 percig tartó centrifugálással választottuk el. Az IB-ket mostuk, majd újrászuszpendáltuk szuszpenziós pufferben. Az IB-k minőségét és tisztaságát SDS-PAGE gélen ellenőriztük.

3.6 TCR és ImmTAC újraahajtás és tisztítási eljárás

Az α és β zárványtesteket denaturáló pufferben denaturáltuk, hogy a polipeptidek az aggregátumokból feloldódjanak és szétváljanak egymástól, 1,5:1 (α : β) moláris arányban, mely korlátozza a β homodimerek képződését. Az ImmTAC α és β láncokat ekvimoláris arányban (α : β 1,0:1,0) kevertük. A β - β homodimer képződés sokkal kevésbé valószínű a fuzionált scFv miatt (az effektor domén szterikusan akadályozza a β - β homodimerek kialakulását). DTT-t adtunk a denaturáló pufferhez, hogy redukáljuk a cisztein oldalláncokat, és megakadályozzuk a nem natív diszulfidkötések kialakulását. A kicsomagolt α és β láncokat a refoldingot segítő pufferben kevertük össze. A fehérjék dialízis során hajtogatódnak vissza natív állapotukba. A TCR-eket két lépésben tisztítottuk – anioncserés kromatográfiával és méretkizárásos kromatográfiával. Az ImmTAC molekulák esetében az első anioncserés lépést követően további kationcserés kromatográfiára is szükség volt. A két tisztítási lépést, az ioncserét és a méretkizárásos kromatográfiát ÄKTA Pure rendszeren végezték.

3.7 SPR analízis

A tisztított TCR-ek kötődési analízisét BIAcore® T-200 és BIAcore® 8K (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.) készülékeken, CM5 szenzorcsippel (Cytiva, 29149604) és Series S CM5 szenzorcsippel (Cytiva, 29149603) végeztük. Streptavidin molekulákat (5000 válaszegység (RU)) kovalensen kötöttünk a chip felszínéhez, majd a maradék reaktív csoportokat 1 M etanol-amin-hidrokloriddal deaktiváltuk. Körülbelül 100–1000 RU CD1c-endo molekulát kötöttünk a CM5 szenzorcsipre 10 μ L/perc áramlási sebességgel. Egy

áramlási cellát üresen hagytunk, és negatív kontrollként használtunk.

Alacsony affinitású TCR-ek egyensúlyi affinitásmérése

A vad típusú, alacsony affinitású TCR-ok gyors kötődési kinetikát mutatnak, ezért a kinetikai mérések megbízhatatlanok. Ezért affinitásukat (K_D) egyensúlyi kötődési analízissel határoztuk meg a CD1c-endo molekulák 20–80%-os telítettségét lefedő koncentrációtartományban. A TCR-eket és ImmTAC-okat 100 μ M-ra koncentráltuk, majd nyolc, kétszeres hígítást injektáltunk 30 μ L/perc áramlási sebességgel, 25°C-on. A kötődési adatokat Biacore T-200 Evaluation, Biacore Insight (GE Healthcare) és GraphPad Prism szoftverekkel elemeztük. A K_D értékeket 1:1 kötődési modell ($A + B \leftrightarrow AB$) feltételezésével számoltuk. Az egyensúlyi válaszokat a fehérje koncentrációkhoz viszonyítva ábrázoltuk, és nemlineáris legkisebb négyzetes illesztést végeztünk a Langmuir kötődési egyenlettel: $AB = (B \times AB_{max}) / (K_D + B)$.

Közepes és magas affinitású TCR-ek és ImmTAC-ok single cycle kinetikai (SCK) analízise

A relatíve magas affinitású mutánsok kinetikai paramétereinek mérésére single cycle kinetikát alkalmaztunk. Ez több, növekvő koncentrációjú injektálásból áll az on-rate (k_{on} , k_a) mérésére, és egyetlen hosszú disszociációs idő alatt az off-rate (k_{off} , k_d) mérésére. Ez a módszer pontos kinetikai mérést tesz lehetővé közepes és magas affinitású TCR-ek és ImmTAC molekulák esetén. 100 RU CD1c-endo-t kötöttünk a chipre. 10 nM, 5 nM, 2,5 nM, 1,25 nM és 0,625 nM TCR hígításokat injektáltunk. Az eredményeket Biacore T-200 Evaluation szoftverrel elemeztük.

3.8 TCR láncok affinitásérlelése

A vad típusú S2 TCR CD1c-hez való affinitásának növelésére affinitásérlelési folyamatot hajtottunk végre fág display segítségével. Könyvtárakat hoztunk létre úgy, hogy véletlenszerű mutációkat vezettünk be a TCR α - vagy β -láncok komplementaritást meghatározó régióiba (CDR-ek). Minden CDR-re 3%-os randomizációs arányt alkalmaztunk, így a vad típusú szekvencia nagy arányban megmaradt, miközben minimális, de funkcionálisan releváns diverzitás jött létre. Két első generációs könyvtárat készítettünk – egyet-egyet mindkét lánchoz – NNN kodon sablonokkal randomizálva a CDR1, CDR2 és CDR3 régiókat, miközben a partnerláncot változatlanul hagytuk. A fág részecskéken megjelenő TCR-variánsokat 50 nM CD1c-endo ellen szelektáltuk, ami a vad típusú K_D alatti koncentráció, így a nagyobb affinitású kötők dúsultak. A szelekciót detergens mentes pufferekben végeztük a lipid integritás megőrzése érdekében, 2% BSA/PBS blokkolással. Három szelekciós kör után gátlásos fág ELISA-t alkalmaztunk a

klónok rangsorolására. Ebben a tesztben a fág kötődését az immobilizált CD1c-endo-hoz oldható CD1c-endo (100 nM) kompetálta, és a jel gátlása nagyobb affinitást jelzett. A legjobb klónokat szekvenálták, majd ImmTAC-ként expresszáltuk további funkcionális vizsgálatokhoz.

Egy nanomoláris affinitású, jó hozamú és specificitású TCR-t választottunk kiindulási alapnak a második generációs könyvtárakhoz. Ezekben a könyvtárakban nagyobb mutációs terhelést alkalmaztunk, egyszerre egy CDR-t célozva (öt egymást követő aminosav), miközben a többi öt CDR változatlan maradt. Összesen hat könyvtárat hoztunk létre. Emellett szerkezetalapú könyvtárakat is terveztünk a CD1c-TCR kristályszerkezet alapján, hogy fokozzuk a CD1c nehézlánccal való kölcsönhatásokat. A második generációs TCR szelekciót csökkenő CD1c-endo koncentrációkkal (100 pM, 10 pM, 1 pM) végeztük, hogy tovább dúsítsuk a nagy affinitású variánsokat. Ismét gátlásos ELISA-t alkalmaztunk a jelöltek rangsorolására. A legjobban teljesítő TCR-eket emlős expressziós vektorokba klónoztuk ImmTAC formátumban, és oldható fehérjeként expresszáltuk további validálás céljából.

3.9 Röntgenkristallográfia TCR–CD1c komplexekkel

A CD1c–TCR komplexek kristallográfiás előkészítéséhez oldható CD1c monomereket expresszáltunk Expi293FGnTI⁻ sejtekben az egységes glikoziláció érdekében, majd PNGaseF-fel deglykoziláltuk és Superdex 75 méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk. A TCR-eket (S2c^{WT} és S2c^{a5b6}) E. coli-ban expresszáltuk, visszahajtottuk, majd anioncserés és méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk. A CD1c-endo-t és a TCR-eket 1:1,1 moláris arányban kevertük, Superdex 200 oszlopon tisztítottuk, majd ~10 mg/ml-re koncentráltuk. Röntgendiffrakciós adatokat a Diamond Light Source (UK) I03 és I04 sugárvonalain gyűjtöttük. A szerkezeteket molekuláris helyettesítéssel határoztuk meg: a 3OV6, 4P4K és 5FK9 PDB behelyettesítéseket használtuk az S2c^{WT}–CD1c-hez, míg az S2c^{WT}–CD1c komplexet modellként az S2c^{a5b6}–CD1c-hez. A szerkezeteket PyMOL-ban ábráztuk, és a Protein Data Bankban (PDB) helyeztük el (hozzáférési kódok: 9QWJ és 9QWK).

3.10 ImmTAC–CD1c komplexek lipidomikai analízise

A vad típusú és nagy affinitású ImmTAC-ok által kötött lipid ligandumok azonosításához oldható CD1c monomereket expresszáltunk Expi293F sejtekben, míg az ImmTAC-okat (S2c^{WT} és S2c^{a5b6}) CHO sejtekben expresszáltuk. Tisztítás után az ImmTAC-okat CD1c-endo-val 1:1 moláris arányban kevertük, majd Superdex200 10/300 Increase oszlopon választottuk szét. A kötött és nem kötött

frakciókat lipidomikai analízisre küldtük a Lipotype GmbH-nál (Drezda, Németország). A lipideket kétlépcsős kloroform/metanol extrakcióval vonták ki, a kivonás előtt belső standardokat adtak hozzá. A mintákat pozitív és negatív ion módban, egyetlen mérés során elemezték. A lipidek azonosítása LipidXplorer szoftverrel történt, a mennyiségi meghatározást lipid osztály-specifikus belső standardokhoz normalizáltuk. Az adatok végső elemzését házon belüli R workflow-val (R 4.3.2 verzió) végezték.

3.11 Antitest-alapú, CD1c-specifikus T-sejt aktivátorok előállítása

13, házon belül azonosított, különböző eredetű (láma, csirke és humán) anti-CD1c antitest klónt bispecifikus T-sejt aktivátorra (BiTE) alakítottunk át. A BiTE molekulák két egy láncú variábilis fragmentum (scFv) fúziós fehérjéi, amelyeket rugalmas (GS) linker köt össze. A variábilis könnyű (VL) és nehéz (VH) láncokat kétféle orientációban fuzionáltuk. Az egyik scFv a T-sejtekhez kötődik a CD3 receptoron keresztül (UCHT1), a másik a sejtfelszíni CD1c molekulához. A BiTE molekulákat CHO sejtekben expresszáltuk, majd protein L affinitás-kromatográfiával tisztítottuk.

3.12 CD1c-expresszáló sejtvonalak és effektor sejtvonalak előállítása

A CD1c konstrukciókat pSF Lenti vektorba klónoztuk, majd lentivírus virionokat állítotunk elő HEK 293T sejtek tranziens kotranszfekciójával, harmadik generációs rendszerben, csomagoló és envelope plazmidokkal. A transzfekciót PEI közvetítette. A THP1(CTHAB2mKO), K562 és MOLT4(B2mKO) sejteket egyláncú CD1c-vel transzdukáltuk koncentrált lentivirussal és protamin-szulfáttal, spinfekcióval. A transzdukció hatékonyságát áramlási citometriával értékeltük. CD1c-restriktált effektor sejtvonalak előállításához NFAT.Luc.Jurkat.TCRKO és JRT3 Jurkat sejteket transzdukáltunk TCR α és β láncokkal ugyanezzel a módszerrel.

3.13 T-sejt átirányítási assay anti-CD1c/anti-CD3 bispecifikus reagensekkel

Jurkat.NFAT.Luc effektor sejteket (25 000) 12 500 célsejttel együtt inkubáltunk Jurkat Assay Mediumban 384 lyukú lemezen, kb. 22 órán át. Bispecifikus aktivátorok (BiTE vagy ImmTAC) hígítási sorozatának ($1-1 \times 10^{-6}$ nM) jelenlétében. Másnap BioGlo reagenst adtunk minden lyukhoz. Aktiváció esetén a Jurkat sejtek tüzlégyc luciferázt expresszálnak NFAT kontroll alatt. A lumineszcenciát 574 nm-en mértük Clariostar leolvasóval. Az adatokat Microsoft Excel és GraphPad Prism szoftverrel elemeztük.

3.14 T-sejt aktiváció vizsgálata

50 000 célsejtet és 50 000 effektor sejtet (Jurkat.NFAT.Luc) együtt inkubálunk lapos

fenekű 96 lyukú lemezen, termosztátban, egy éjszakán át (~16 óra) Jurkat Assay Mediumban. Kontroll lyukakhoz 10 µg/ml anti-CD1c blokkoló antitestet (L161) adtunk. Másnap a sejteket először LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain-nel festettük, majd Human TruStain FcX™ (Fc receptor blokkoló oldat) alkalmazásával blokkoltuk, végül CD69 és CD25 aktivációs markerekre festettük. Az áramlási citometriát BD LSRFortessa™ Cell Analyzer készüléken végeztük. Az adatokat Flowjo V10 szoftverrel elemeztük.

3.15 T-sejt klónozás

Perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) és CD2⁺ sejteket izoláltuk egészséges belső donoroktól az Immunocore Ltd.-nél, Health Technology Assessment (HTA) által jóváhagyott eljárás szerint. A PBMC-ket Lymphoprep gradiens centrifugálással választottuk szét, a CD2⁺ sejteket Miltenyi CD2 MicroBeads segítségével tisztítottuk. CD1c- és CD1d-restriktált gangliozyd-specifikus T-sejt klónok expandálásához a CD2⁺ sejteket CFSE-vel jelöltük. Besugárzással inaktivált THP1.DKO, THP1-CD1c és THP1-CD1d sejteket (66 Gy) lipid ligandumokkal (GD3, GM3, Neu5GM3) töltöttük fel 25 µg/ml koncentrációban, majd 3 órán át 37°C-on inkubáltuk. A CD1d-expresszáló sejteket anti-HLA-A, B, C és HLA-DR specifikus L243.2 antitestekkel blokkoltuk. A jelölt T-sejteket 3 napig együtt tenyésztettük a célsejtekkel. A tenyésztés során naponta 500 IU IL-2 tartalmú sejt kultúra médiummot adtunk hozzá, és a sejt kultúrákat túlnövés (konfluencia) esetén szétszítottuk. A proliferáló sejteket Sony szorter-citométerrel CFSE hígulás alapján azonosítottuk, és szeparáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 CD1 molekulák expressziója emlős sejtvonalakban

A funkcionális, oldható CD1 komplexek előállításához az ExpiCHO és Expi293F emlős sejtvonalakat használtuk, melyek alkalmasak a komplex fehérjék helyes hajtogatására és glikozilálására. A sejteket egy kettős expressziós pcDNA3.1 vektorral transzfektáltuk, amely egy láncból álló CD1 variánsokat (CD1a, b, c, d) és a BirA biotin ligáz kódolta. A BirA C-terminális KDEL szekvenciája biztosította a fehérje retencióját az endoplazmatikus retikulumban, lehetővé téve a szekretált CD1 monomerek in vivo biotinilálását. Az expressziós analízis szerint az optimális termelés az Expi293F sejtek transzfekcióját követő ötödik napján volt elérhető. A CD1 monomereket affinitás- és méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk. A szerkezeti integritást felszíni plazmon rezonancia (SPR) vizsgálattal igazoltuk ILT2 kötés segítségével, amely a CD1 és a β2-

mikroglobulin megfelelő hajtogatását igényli. A funkcionalitásukat SPR-rel, CD1c-specifikus TCR-eken keresztül végeztük. SDS-PAGE és izoelektromos fókuszálás analízis során több CD1c sávot figyeltünk meg, ami a négy N-kötött glikozilációs helyen történő glikozilációra utal. A nem glikozilált variánsok mutagenezissel történő előállítására tett kísérletek instabil, alacsony hozamú fehérjéket eredményeztek, ami megerősíti a glikoziláció szerepét a CD1 stabilitásában. Ezért minden további vizsgálatban teljesen glikozilált CD1-et alkalmaztunk, szerkezeti analízishez pedig enzimatis deglikozilálást végeztünk. Az optimalizált protokoll megbízhatóan biztosította a biotinilált, megfelelően hajtogatott CD1 monomerek előállítását, amelyek alkalmasak a CD1-mediált lipid antigén prezentáció szerkezeti és funkcionális vizsgálatára.

4.2 Lipid-ligand csere módszer fejlesztése

A TCR lipidekkel szembeni reaktivitás vizsgálatának lehetővé tétele érdekében egy megbízható lipidcsere protokollt dolgoztunk ki. A CD1c monomereket emlős sejtekben állítottuk elő, amelyek endogén lipideket tartalmaznak. Ezek cseréje nehéz, mivel a lipidek rosszul oldódnak, és a CD1-lipid komplexek stabilak. CHAPS detergenssel, pH 6,0-os pufferben kezeltük a fehérjét a CD1c kötőseb részleges kinyitásához, miközben a szerkezeti integritást megőriztük. A lipideket szonikálással oldottunk fel, és 50-szeres moláris többletben kevertük a CD1c-vel, majd 37°C egy éjszakán át inkubáltuk. A lipidcsere sikerességét IEF, natív tömegspektrometria, TCR kötődési vizsgálatok, tetramer festés segítségével, a szerkezeti integritást ILT2 kötődés segítségével igazoltuk.

4.3 A lipidcsere átfogó validálása

4.3.1 Izoelektromos pont eltolódás vizsgálata

Az izoelektromos fókuszálás (IEF) bizonyítékot szolgáltatott a sikeres lipidcserére, ahol CD1c-endo és CD1d-endo több sávként jelent meg a heterogén glikoziláció és lipid tartalom miatt. A töltéssel rendelkező lipidek betöltésekor vándorlási eltolódásokat figyeltünk meg a gélen: a negatív töltésű gangliozidok (GD2, GD3, GM3, Gb4) savas irányba tolták el az izoelektromos pontot, míg a semleges lipidek (PC, KRN7000) megtartották az eredeti pI értéket. Bár ez a módszer csak szemi-kvantitatív, megerősítette a lipid betöltést, és támpontot adott a további vizsgálatokhoz.

4.3.2 Natív tömegspektrometria

A natív MS lehetővé tette az intakt CD1-lipid komplexek közvetlen elemzését lipid extrakció nélkül. A CD1c és CD1d monomereket Expi293FGnT⁻ sejtekben

expresszáltuk a glikozilációs komplexitás csökkentése érdekében. A natív ESI-MS kimutatta, hogy a CD1c-endo (55,3–56,4 kDa) és CD1d-endo (58,8–59,9 kDa) tömege meghaladja az elméleti értéket (~48 kDa), ami az endogén lipidek jelenlétét igazolja. A csere utáni tömegeltolódások sikeres lipidbetöltést jeleztek, de a spektrum komplexitása – a maradék lipidek és glikozilációs variánsok miatt – korlátozta a pontos mennyiségi meghatározást.

4.3.3 TCR kötődés validálása

A lipid-polispecifikus NM4 klónnal végzett TCR kötődési vizsgálatok funkcionális megerősítést adtak. Az SPR kimutatta, hogy a CHAPS kezelés önmagában nem specifikus, „ragadós” CD1c viselkedést eredményezett, míg a GD1a betöltése a nagy fejcsoport miatt gátolta a kötődést. A homogén glikoziláció javította a kötődési konzisztenciát, ugyanakkor az időben elhúzódó csere után csökkent a fehérje stabilitása, ami az eltervezett glikozilációk és a szerkezeti integritás közötti egyensúly fontosságára utal.

4.3.4 Funkcionális tetramer festés

A funkcionális validációt CD1d-KRN7000 tetramerekkel végeztük és in vitro hajtogatott CD1d- α GalCer komplexek pozitív kontrollként szolgáltak. Az NKT sejtek specifikus festése igazolta a sikeres lipidbetöltést, míg a CD1d-endo tetramerek nem mutattak kötődést. Ez a megközelítés mind a betöltési hatékonyságot, mind a biológiai funkciót igazolta.

A fent leírt módszerek együttesen lehetővé tették a lipidcsere hatékonyságának értékelését, különös hangsúlyt fektetve a glikoziláció, a stabilitás és az antigénprezentáció közötti összefüggésekre, melyek kulcsfontosságú tényezők a CD1-lipid komplexeket célzó terápiák fejlesztésében.

4.4 A CD1-hez kötött lipid repertoár

4.4.1 A CD1 izoformák lipid repertoárjának elemzése

A CD1 molekulák lipid-prezentációs repertoárjának vizsgálatát a molekulák expressziójának optimalizálásával kezdtük. Expi293F sejteket használva oldható CD1a-d izoformákat állítottunk elő, Huang és mtsai.(1) által validált módszerére alapozva, amelyet transzmembrán CD1 molekulák vizsgálatára fejlesztettek ki. A tömegspektrometriai analízis során HLA-A2 molekulát alkalmaztunk negatív kontrollként, mely segítségével a CD1-hez kötött lipideket el tudtuk különíteni a háttérzajtól. Átfogó optimalizálás után megállapítottuk, hogy 500 μ g CD1 fehérje biztosítja a legjobb érzékenységet a lipid detektálásához, miközben minimalizálja a mennyiségi torzításokat, de párhuzamosan 100

µg-os replikátumokat is elemeztünk az alacsonyabb abundanciájú komponensek kimutatására. Az analízist, házon belül fejlesztett, R-alapú bioinformatikai pipelineban végeztük. Az HLA-A2 kontrollokban 81 lipidet azonosítottunk, amelyek a detektált háttérjel kevesebb mint 6%-át tették ki, ezzel biztosítva eredményeink specificitását.

4.4.2 A CD1 izoformák megkötik a sejtben előforduló lipidek többségét

Vizsgálatunk legszembevetőbb eredménye a CD1 izoformák által mutatott rendkívül széles lipidmintavétel volt. Bár minden izoforma mutatott némi preferenciát, összességében mindegyik lefedte jelentős részét a sejt lipidomnak. A foszfolipidek és szfingolipidek minden variánsban domináns osztályként jelentek meg. A CD1a és CD1c mutatta a legnagyobb hasonlóságot a teljes sejt lipidprofilhoz, bár a CD1a eltolódást mutatott a közepes hosszúságú szénláncok (C34–C38) felé. Ezzel szemben a CD1b és CD1d markánsabb eltéréseket mutatott: a CD1b rövid láncú (C16–C20) lipideket, és bizonyos szfingolipideket dúsított, míg a CD1d különösen affinitást mutatott a C42 lipidek és gangliozidok iránt. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy bár a CD1 molekulák széles körben mintázzák a lipidkörnyezetet, egyedi szerkezeti sajátosságaik enyhe, de funkcionálisan jelentős mintavételi eltéréseket eredményeznek.

4.4.3 A CD1 izoformák közös és egyedi lipidprofiljai

Az 1040 azonosított lipidet tartalmazó teljes adathalmazunk főkomponens-analízise (PCA) jelentős átfedést mutatott az izoformák között: 293 lipid volt univerzálisan jelen minden CD1 variánsban. Ezek a közösen prezentált lipidek főként foszfolipidek (PC, PE) és szfingolipidek (Cer, SM) voltak, amelyek egyfajta „alap” CD1 lipidomot alkothatnak. Érdekes módon a CD1a és CD1d mutatta a legnagyobb átfedést (474 közös lipid), miközben minden izoforma megőrizte sajátos lipid szignatúráját. A CD1a különösen gazdag volt foszfatidil-szerin (PS) és foszfatidil-inozitol (PI) komponensekben (128 egyedi lipid), míg a CD1b a szulfatidokat és rövid láncú lizo-foszfolipideket dúsította (25 egyedi fajta). A CD1c különösen jelentős affinitást mutatott gangliozidok (GM2, GD1-3) és rövid láncú szfingomielinek (33 egyedi lipid) iránt, míg a CD1d kiemelkedő szelektivitást mutatott a koleszterin és GM3 iránt.

4.4.4 A CD1 izoformák által megkötött lipidek lánc hosszának jellemzői

A CD1 izoformák lipidmintavételi preferenciáinak szerkezeti alapja akkor vált világossá, amikor a lánc hossz-eloszlásokat az izoformák kötőzsebeinek kontextusában elemeztük. A CD1a a közepes hosszúságú lipideket (C34–C38) preferálta, ami összhangban van kisebb méretű zsebével, bár a nagy kardiolipinek (C60) kötésére való képessége váratlan rugalmasságra utal. A CD1b kettős preferenciát mutatott a nagyon rövid (C16–C20) és hosszú (C40–C42) láncok iránt, támogatva a „spacer-lipid”

megfigyeléseket, ahol a kis lipidek stabilizálják a zsebet a nagyobb antigének befogadásához. A CD1c mutatta a legszélesebb tartományt (C30–C46), ami szerkezeti plaszticitását tükrözi, és korábbi megfigyelésekkel egyezően bizonyítékot mutatott arra, hogy rövid lizo-lipidek (C14–C18) foglalják el az F' zsebet. A CD1d a rövidebb láncokat (C34–C36) preferálta, és 26-szoros dúsulást mutatott a GM3 esetében, ami specializált szerepet jelez a gangliozyd prezentációban. A fejcsoport nélküli lipidek, mint a ceramidok, minden izoformánál 2–9-szeres dúsulást mutattak, míg a fejcsoportos szfingolipidek – amelyek ismertén gátolják a CD1 restriktált autoreaktív T sejteket – változatosabb arányban jelentek meg. Ez a minta egy olyan szabályozó mechanizmusra utal, amelyben a CD1 molekulák mind aktiváló, mind gátló lipideket prezentálnak. Figyelemre méltó, hogy a foszfatidil-etanolaminok (PE) alulreprezentáltak voltak, míg az éterkötésű foszfatidil-kolinok (PC) dúsultak, ami a lipidbetöltés szerkezeti korlátaira utal, amelyek befolyásolhatják az immunfelismerést. Ezek az eredmények átfogó képet adnak arról, hogyan lépnek kölcsönhatásba a CD1 molekulák a sejtes lipidommal. Habár a mintavételi képességek átfednek, minden izoforma megőrzi sajátos lipid „ujjlenyomatát”, amelyet szerkezeti jellemzők és funkcionális szerepek alakítanak. Ezek az ismeretek fontosak a lipid antigénprezentáció megértéséhez, valamint a CD1-célzott immunterápiák tervezéséhez daganatos, autoimmun és fertőző betegségekben.

4.5 A CD1c-specifikus TCR-ek kötődési módja

4.5.1 CD1c-specifikus TCR-ek előállítás

Egy CD1c-specifikus TCR-t (S2c^{WT} TCR) izoláltunk házon belüli naiv TCR fágkönyvtárakból. Felületi plazmon rezonancia (SPR) vizsgálatokban meghatároztuk a TCR affinitását a CD1c-endo iránt, amelyben a tipikus TCR-pHLA affinitásoknak megfelelő, 16,7 μ M KD értéket mértünk. Az SPR kísérletek során az S2c^{WT} TCR a teoretikus R_{max} körülbelül 75%-os kötődését érte el (az észlelt R_{max} osztva a CD1c mennyisége alapján számított teoretikus R_{max}-szal), ami nagyrészt lipidfüggetlen kötődési módot jelez, összhangban a korábban leírt CD1c-reaktív TCR-ek adataival.

4.5.2 Affinitásnövelt, CD1c-restriktált TCR-ek

A HLA-peptid komplexekkel ellentétben a CD1-lipid komplexek kis mennyiségben fordulnak elő a sejtfelszínen. Ez megnehezíti a bispecifikus aktivátorok/engerek alkalmazását, amelyek általában magas affinitású kölcsönhatásokat igényelnek. Ennek megoldására affinitásnövelt S2c^{WT} TCR-variánsokat fejlesztettünk ki. Az első generációs könyvtárakban az α vagy β lánc három CDR régiójában 3%-os randomizációt alkalmaztunk. Három környi fágpanningot (szelekciót) végeztünk csökkenő CD1c-endo

koncentrációkkal a nagyobb affinitású kötők dúsítására, majd egy negyedik kör off-rate szelekció következett. Fág inhibíciós ELISA-val rangsoroltuk a klónokat, és a CD1c-S2-END-a2b1-U klónt ($K_D = 1,05$ nM, $t_{1/2} = 37$ perc) azonosítottuk legjobb jelöltként. Ez a klón szolgált sablonként a második generációs affinitásérleléshez. Hat „hard mutagenesis” és hat szerkezetalapú könyvtárat készítettünk, amelyek célzottan a CDR régiókat és azok CD1c helixekkel való kölcsönhatásait célozták. A panningot 100 pM, 10 pM és 1 pM CD1c-endo koncentrációkkal végeztük. Loop extension könyvtárak a CDR2 α rugalmasságát vizsgálták. Az elvégzett fág inhibíciós ELISA 0,5 nM CD1c mellett az S2^{a5b1} klónt 60%-os gátlással azonosította. Huszonnyolc lánckombinációt expresszáltunk ImmTAC formában, és SPR-rel vizsgáltuk keresztreaktivitásukat CD1a, b, d, valamint különböző HLA-peptid komplexekkel szemben. A keresztreaktív vagy csökkent felezési idejű klónokat kizártuk. Az optimális kombináció – S2-a5 (második generációs α CDR1 könyvtárból) és S2-b6 (első generációs outputból) – 100%-os kötődést mutatott CD1c-endo-hoz, és az affinitás 16,7 μ M-ról 15 pM-ra javult, 9,6 órás felezési idővel. Szerkezeti modellezés igazolta, hogy a mutációk a CDR hurkokban vagy a CD1c interfészen helyezkedtek el, támogatva a fokozott kötődést. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy affinitásérleléssel lehetséges nagy affinitású, lipid-agnosztikus CD1c specifikus TCR-ok előállítása, mely ígéretes alapot biztosít a CD1c célzására terápiás alkalmazásokban.

4.5.3 A CD1c lipidfüggetlen felismerésének szerkezeti alapjai

A CD1-lipid TCR általi felismerés mechanizmusának jobb megértése érdekében meghatároztuk az S2c^{WT}-CD1c-endo komplex kristályszerkezetét 2,04 Å, valamint az affinitásnövelt S2c^{a5b6}-CD1c komplexét 2,27 Å felbontással. Ezek a szerkezetek kulcsfontosságú információt nyújtottak a TCR dokkolási geometriájáról, kontaktusfelületeiről és a lipid befogadásáról. Az S2c^{WT}, S2c^{a5b6} és a korábban leírt 3C8 TCR-CD1c komplexek összehasonlítása konzervált diagonális dokkolási szöget ($\sim 43,3^\circ$) és központi elhelyezkedést mutatott a CD1c felett. Az S2c^{WT} és 3C8 hasonló dokkolási orientációt és átfedő CD1c aminosavakat érintett, míg az S2c^{a5b6} további kölcsönhatásokat alakított ki az 1-es helixszel, a 3C8 pedig inkább a 2-es helixszel lépett kapcsolatba. Mind az S2c^{WT}, mind a 3C8 érintette a CD1c Asp65, Glu80 és Glu157 aminosavait van der Waals és elektrosztatikus kölcsönhatások révén. Egyedi kontaktusok: S2c^{WT} esetén Arg71 és Leu162, 3C8 esetén Gln151, Glu153 és Ser169. A legtöbb TCR kontaktus a CD1c A'-tető felett, főként az 1-es helix mentén koncentrálódott, 1015 Å² eltemetett felülettel, mely megfelel a TCR-pHLA és TCR-CD1 interakciók tipikus tartományának. Az interfész elemzés eredményei alapján kiderült, hogy a TCR α -lánc a kontaktusok mintegy 63%-át adta. A CDR1 α és CDR2 α a CD1c helixek felett, a

CDR3 β az F' portál felett helyezkedett el. A β -lánc 35%-kal járult hozzá a kontaktusokhoz, főként a CDR2 β és CDR3 β révén, míg a CDR1 β nem létesített kontaktust. A szerkezetben nem volt egyértelmű elektron denzitás a lipid fejcsoportha, valószínűleg a CD1c-endo heterogén lipidösszetétele miatt, így lipidkontaktusokat az S2c^{WT} szerkezetben nem sikerült azonosítani. Főbb kölcsönhatások: S2c^{WT} esetén Tyr30 (CDR1 α), Gln95 és Tyr96 (CDR3 α), Glu52 (CDR2 β), valamint Arg97 és Arg100 (CDR3 β), amelyek a CD1c Asp65, Leu68, Arg79 és Glu80 aminosavaival léptek kapcsolatba. Ezek a csoportok analógok a pHLA felismerésben ismert „restriktációs triáddal”. Az S2c^{WT}, és a 3C8 több sóhid kialakításával (öt, illetve hat), stabilizálta a TCR–CD1c interfészt. A hasonló kontaktusfelület ellenére az S2c^{WT} és 3C8 eltérő kölcsönhatási hálózatokra támaszkodik. Az S2c^{WT} kötődési módja leginkább a CD1b-restriktált TCR-ekhez hasonlít, míg a CD1a- és CD1d-restriktált TCR-ek eltérő dokkolási szöveget mutatnak. Ezek az eredmények kiemelik a CD1c felismerés konzervált és eltérő jellemzőit, és szerkezeti alapot nyújtanak a CD1c-lipid komplexekhez emelt affinitással és specificitással kötődő TCR-ek tervezéséhez.

4.5.4 A hidrofób kölcsönhatások számának növekedése itányítja az S2c^{a5b6} affinitását

A bevezetett hét mutáció közül elsősorban három hidrofób aminosav (Y28 α , L30 α és M98 β) növelte az S2c^{a5b6} affinitását a CD1c iránt azáltal, hogy további van der Waals-kapcsolatokat alakított ki a Glu61, Glu157 és Tyr152 oldalláncokkal. A D94 α mutáció csökkentette az Asp65-tel való kölcsönhatást. A hidrofób kontaktusok számának növekedése (különösen az S30 β és M98 β révén) javította mind a CD1c affinitást, mind a lipid szelektivitást. Ezek az eredmények kiemelik, hogy célzott hidrofób mutációkkal fokozható a TCR kötődés és a CD1c-lipid komplexek felismerése.

4.5.5 Lipid kötés és a CD1c F67 konformációs rugalmassága

A CD1c-endo által kötött heterogén lipidóm miatt az S2c^{WT}–CD1c szerkezetben nem volt megfigyelhető egyértelmű elektron denzitás a lipid fejcsoportha. Bár a szerkezeti modellezés a TCR-lipid kontaktusok lehetőségét sugallta, ezek közvetlenül nem voltak azonosíthatók. Érdekesség, hogy az aszimmetrikus egység két S2c^{WT}-CD1c komplexet tartalmazott, eltérő lipid denzitással, ami a lipidkötés variabilitására utal. A CD1c F67 oldallánca két különböző konformációt vett fel, befolyásolva a lipid befogadást; nagyobb lipid fejcsoportha valószínűleg az F67 kifelé néző konformációját igénylik. Az S2c^{WT} TCR ehhez alkalmazkodva módosította az oldalláncok konformációját az F' portál közelében (a Q95 α és Y48 β elfordult, hogy helyet adjon az F67-nek, miközben az R31 β , Q50 β és N30 β is elmozdult), támogatva a nagyobb lipidekkel való kölcsönhatást. A CD1c kötősebben két denzitás fragmentum korábban leírt „spacer” lipidekre emlékeztetett, amelyekhez a számítógépes modellezés során decán molekulák jól illeszkedtek. Az S2c^{a5b6}–CD1c

szerkezetben négy komplexet figyeltünk meg, mindegyikben konzisztens lipid denzitás nyúlt ki az F' portálból. A CD1c F67 kifelé néző konformációt vett fel, és a TCR β oldalláncai (Y48 β , R31 β , Q50 β) ugyanazt az alternatív konformációt mutatták, mint az S2c^{WT}-ben. Az affinitásnövelő S30 β és M98 β mutációk további teret hoztak létre, és körülölelték a lipid denzitást, ami nagyobb lipid fejcsoportok preferenciájára utal. Ezeket a megfigyeléseket a komplexből kinyert lipidek tömegspektrometriás vizsgálata is alátámasztotta. Ezek a szerkezeti eredmények rávilágítanak arra, hogyan alkalmazkodnak a TCR-ek a CD1c-lipid diverzitáshoz. Míg az S2c^{WT} és 3C8 hasonló kötődési jellemzőkkel rendelkezik, az S2c^{a5b6} szemlélteti, a hidrofób kölcsönhatásokat célzott mutációk szerepét az affinitás növelésében és a lipid szelektivitás modulációjában. Ezek az eredmények segítik a CD1c-restríktált TCR felismerésének megértését, és iránymutatást adnak a jövőbeli terápiás stratégiákhoz.

4.5.6 TCR-affinitás tisztítási (TCR-tap) kísérletek a CD1c-restríktált TCR specificitás vizsgálatára

Annak meghatározására, hogy az affinitásérlelés megváltoztatta-e az S2c^{WT} TCR lipidfelismerési profilját, lipid tömegspektrometriát végeztünk a CD1c-hoz kötött ligandokon, amelyeket mind a vad típusú, mind az affinitásnövelt TCR-ekkel együtt tisztítottunk. Oldható CD1c monomereket expresszáltunk Expi293F sejtekben, endogén lipidekkel (CD1c-endo). Ahogy Huang és mtsai. (2023)(1) igazolták, a szekretált CD1 fehérjék megbízható modellek a transzmembrán CD1 molekulák lipidomikai vizsgálatához. Ez a formátum lehetővé teszi a detergensmentes tisztítást is, megőrizve a natív lipid tartalmat. A vad típusú (S2c^{WT}) és affinitásnövelt (S2c^{a5b6}) TCR-eket ExpiCHO sejtekben, ImmTAC formátumban expresszáltuk és tisztítottuk. Mindkét TCR-t 1:1 moláris arányban kevertük CD1c-endo-val, majd a keletkezett komplexeket méretkizárásos kromatográfiával választottuk el a szabad CD1c-től. Az ImmTAC–CD1c komplexeket és a szabad frakciókat lipidomikai analízisnek vetettük alá. A nem specifikus háttér lipidóm kizárására HLA-A2 mintákat is elemeztünk. Emellett a csak TCR-t tartalmazó minták lipid tartalmát háttérként kivontuk. Összesen 813 lipidet azonosítottunk, amelyek közül 101 a HLA-A2 kontrollokban is jelen volt. Ezek 184 pmol lipidet tettek ki, köztük négy GM1/GM3 fajtát, amelyek a szabad TCR tartalmú mintákban nem voltak jelen, ami specifikus dúsulásra utal. A szabad TCR tartalmú frakcióból származó lipidek a teljes lipidom mindössze 2–4%-át adták, melyek közül a legnagyobb mennyiségű lipid (GD2 42:1;2) nem volt kimutatható az ImmTAC–CD1c komplexekben, igazolva a minimális háttérzajt. A háttér zaj kivonása után a

háttérinterferencia $\sim 0,4\%$ -ra becsülhető. Az $S2c^{WT}$ és $S2c^{a5b6}$ komplexek 402 lipid fajtát osztottak meg, beleértve számos lipid osztályt: ceramidokat, glikoszfinolipideket (GM1, GM2, GM3), foszfolipideket (PC, PE, PI, PS) és lizo-lipideket. Az összlipid profilok nagyon hasonlóak voltak, ami arra utal, hogy az affinitásérlelés elsősorban a CD1c nehézlánccal való kölcsönhatásokat fokozta, nem pedig a lipid specificitást változtatta meg. Ugyanakkor finom különbségek is megjelentek: a nagy affinitású $S2c^{a5b6}$ komplex enyhe eltolódást mutatott a hosszabb láncú lipidek felé, és hiányoztak belőle a PI és PS fajok, amelyek negatív töltésű fejcsoporttal rendelkeznek. Ez arra utal, hogy a lipid fejcsoport kémiai tulajdonságai (nem pedig az acil lánc hossza) befolyásolhatják a TCR kötődést. Több nagy lipid (TAG 54:1;0, TAG 54:2;0, TAG 56:2;0 és GM2 42:2;2) kizárólag az $S2c^{a5b6}$ komplexben volt kimutatható, ami a nagyobb ligandok fokozott befogadására utal. Rövid láncú lizo-lipidek (C16–C28) mindkét komplexben jelen voltak, melyek valószínűleg „spacer” lipidekként stabilizálják a CD1c kötőzsebet, elősegítve a nagyobb antigének prezentációját az F' zsebben. Összefoglalva, a lipidomikai profilozás azt mutatta, hogy az $S2c^{WT}$ TCR affinitásérlelése nem változtatta meg drasztikusan a lipid specificitást, de finoman módosította a lipidpreferenciákat, különösen a nagyobb, semleges fejcsoportú lipidek irányába. Ezek az eredmények támogatják azt a modellt, amely szerint a fokozott CD1c kötődés elsősorban a CD1c nehézlánccal való jobb kölcsönhatás révén valósul meg, miközben a széles lipidfelismerés megmarad.

4.6 T-sejt-aktiváció kiváltása CD1c-pozitív sejtek ellen TCR-CD3 bispecifikus molekula alkalmazásával

A nagy affinitású, CD1c-specifikus $S2c^{a5b6}$ TCR-t ImmTAC formátumba alakítottuk át, úgy, hogy β -láncát egy anti-CD3 scFv-hez fuzionáltuk ($KD = 10$ nM, felezési idő = 2 perc). Az ImmTAC hatékonyságának meghatározásához T-sejteket irányítottunk CD1c-pozitív és -negatív sejt vonalak ellen. A hatékonyság mérésére ImmTAC hígítási sorozatot (10^{-1} – 10^{-6} nM) alkalmaztuk. Az endogén CD1 és MHC expresszió elkerülésére a THP1 sejtekben a $\beta 2m$ és CIITA géneket CRISPR/Cas9 segítségével kiütöttük (THP1-DKO). Ezeket a sejteket ezután single-chain CD1c– $\beta 2m$ vagy CD1b– $\beta 2m$ konstrukciókkal transzdukáltuk, így jöttek létre a THP1-CD1c és THP1-CD1b sejt vonalak. További sejt vonalakat (C1R, K562) is transzdukáltunk CD1c– $\beta 2m$ vagy CD1d– $\beta 2m$ konstrukciókkal. A CD1c expressziót áramlási citometriával, L161 antitesttel igazoltuk. Magas CD1c expressziót figyeltünk meg a THP1-CD1c, K562-CD1c és C1R-CD1c sejt vonalakon, míg a szülői és DKO sejtek nem mutattak expressziót. A CD1c szintet hematológiai daganatsejt vonalakon (CCRFSB, NALM6, HPB-ALL, SKW3, OCIM1) is megerősítettük. A T-sejt aktivációt a CD25 expresszió növekedésével mértük.

Az S2c^{a5b6} ImmTAC erőteljesen aktiválta a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejteket CD1c⁺ célsejtek ellen, és ezt az aktivációt részben az L161 antitest blokkolta. Hematológiai sejtvonalak paneljén tesztelve az ImmTAC erős választ váltott ki a CCRFSB, NALM6, HPB-ALL és SKW3 sejtvonalakon, de nem az OCIM1-en. A CD1c-függőséget L161-mediált blokkolással igazoltuk. Az off-tumor hatások vizsgálatához az ImmTAC-okat két donorból származó primer monocitákon és B-sejteken is teszteltük. Reakciót figyeltünk meg a B-sejteken, kisebb mértékben a monocitákon is, melyeket az L161 blokkolta. Ezek az eredmények alátámasztják a CD1c-célzott ImmTAC-ok terápiás lehetőségeit hematológiai malignitásokban, ugyanakkor rámutatnak arra, hogy további fejlesztés szükséges az egészséges immunsejteken jelentkező on-target, off-tumor hatások minimalizálásához.

4.7 T-sejt-átirányítás CD1c-specifikus T-sejt-aktivátorokkal

A CD1c és CD3 bispecifikus T-sejt-aktivátorok (BiTE-k) CD1c iránti affinitását felületi plazmon rezonancia (SPR) segítségével vizsgáltuk, amely alacsony nanomoláris és magas pikomoláris tartomány közötti affinitásokat mutatott. A humán antitest-alapú BiTE-k mutatták a legerősebb kötődést, a legmagasabb CD1c-endo megkötési aránnyal. Minden BiTE esetében enyhe keresztreaktivitás volt megfigyelhető a CD1b-endo-val. A funkcionális hatékonyság értékelésére a BiTE-ket T-sejt-átirányítási tesztben vizsgáltuk, CD1c-specifikus ImmTAC-okkal összehasonlítva. Jurkat.NFAT.Luc sejteket ko-kultiváltunk éjszakán át CD1c⁺ vagy CD1b⁺ THP1 sejtekkel, BiTE vagy ImmTAC hígítási sorozat ($1-1 \times 10^{-6}$ nM) jelenlétében. A T-sejt aktivációt az NFAT indukálta luciferáz expresszióval mértük. Mindkét formátum CD1c-függő aktivációt mutatott, CD1c⁻ THP1.DKO sejtek esetén nem volt válasz. A BiTE-k erősebb Jurkat aktivációt váltottak ki, mint az affinitásérett ImmTAC (S2c^{a5b6}), míg a vad típusú ImmTAC volt a leggyengébb. Alacsony szintű keresztreaktivitás volt megfigyelhető CD1b-re. Minden vizsgálati körülményben háttérjel (~500 RLU) jelentkezett, valószínűleg a Jurkat sejtek CD1 expressziója miatt. Ezek az eredmények kiemelik a CD1c-specifikus BiTE-k lehetséges felhasználását, mint erős és specifikus immunterápiás szerek. Erős kötődésük, minimális off-target aktivációjuk és a T-sejt-átirányításban mutatott hatásuk miatt további fejlesztést és in vivo validációt indokolnak.

4.8 Antigénprezentáció CD1 molekulák segítségével

4.8.1 mLPA, egy új CD1c prezentált antigén

A metil-lizofoszfátidsav-észter (mLPA) lipid antigént, amelyet Lepore és

munkatársai(5) azonosítottak akut myeloid leukémiás (AML) mintákból, CD1c-restríktált T-sejtek ismerik fel. Bár kimutatták TCR-specifitását és leukémiellenes potenciálját, az mLPA eredete és CD1c-re történő betöltődésének mechanizmusa eddig feltáratlan maradt. Az mLPA egy módosított foszfolipid, amely éterkötésű alkil láncot és metilezett foszfátcsoportot tartalmaz – ezek a peroxisomális lipidszintézishez köthető jellemzők. Az antigén jobb megértése érdekében célt volt feltárni azt a sejtes útvonalat, amely felelős az mLPA CD1c-re történő betöltéséért.

4.8.2 A CD1c lipidbetöltési útvonalainak modellezése

Annak vizsgálatára, hogy hol töltődik be az mLPA lipid antigén a CD1c molekulákba, leukémiás sejtvonalakat hoztunk létre, amelyek különböző reciklizációs tulajdonságú CD1c-variánsokat expresszálnak. A vad típusú CD1c (scCD1c-WT) az ER-ben saját lipidekkel asszociálódva szerelődik össze, majd a sejtmembránra kerül, ahonnan AP2-mediált szortírozással endoszomális kompartmenteken keresztül reciklizálódik. Jackman és munkatársai(6) CD1d-re vonatkozó eredményei alapján létrehoztunk egy csonka, citoplazmatikus farok nélküli CD1c-variánst (scCD1c-TD), amely nem képes intracelluláris reciklizációra. Emellett egy GPI-horgonyzott CD1c-variánst (scCD1c-GPI) is terveztünk, amelyhez decay-accelerating factor (DAF, CD55) szekvenciát használtunk, így a CD1c korai és szortírozó endoszómákba irányul. A THP1 és K562 sejteket ezekkel a CD1c konstrukciókkal transzdukáltuk, majd azonos felszíni expresszió alapján szelektáltuk. A GPI-horgonyzást PI-PLC hasítással igazoltuk. mLPA-specifikus TCR-t expresszáló Jurkat sejtek (DN4.99, DN4.2, PZ-CD8) felismerték a CD1c-t THP1 és K562 sejteken, és kétszeres mértékű aktivációt mutattak a CD1c-GPI variánsok esetén. Ezt a választ anti-CD1c antitest blokkolta, igazolva a specifitást. Az intracelluláris forgalom szerepének vizsgálatára a lizoszomális acidifikációt Bafilomycin A1-gyel (BafA1) gátoltuk. A CD1c sejtfelszíni szintje THP1 sejtekben stabil maradt, K562 sejtekben viszont nőtt, valószínűleg az endoszomális szortírozás és a Na⁺/K⁺-ATPáz szabályozás különbségei miatt. BafA1 kezelés minden CD1c formátum esetén csökkentette a Jurkat aktivációt, bár a CD1c-GPI sejteknél enyhe aktiváció megmaradt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az mLPA betöltése a szekréciós útvonalon vagy korai endoszómákban történhet, nem pedig a lizoszómákban. A BafA1 peroxisomális génexpresszióra és lipidanyagcserére gyakorolt hatása szintén befolyásolhatja az antigén elérhetőségét. Összességében a vizsgálat rávilágít a CD1c reciklizáció jelentőségére a lipid antigénprezentációban, és arra utal, hogy az mLPA betöltése a klasszikus lizoszomális kompartmenteken kívül történhet.

4.9 Lipid-specifikus T-sejt klónok előállítás

A lipid-specifikus TCR-ek azonosításához T-sejt klónozási módszert alkalmaztunk, amellyel szelektíven lehetne expandálni a CD1-restríktált T-sejteket. A módszerek között szerepelt antigén-prezentáló sejt (APC) stimuláció, tetramer/dextramer-alapú szelekció, valamint aktivációs marker-alapú izolálás. A CD1d-restríktált, GD3- és α GalCer-specifikus klónokhoz mesterséges APC-eket (aAPC) használtunk, amelyeket CD1d-lipid komplexekkel töltöttünk meg, illetve autológ dendritikus sejteket (DC) alkalmaztunk. A PBMC-eket 200 ml donorvérből izoláltuk, a monocitákat CD14 specifikus mikrogyöngyök segítségével, a pan T-sejteket negatív szelekcióval tisztítottuk.

4.9.1 Lipid-specifikus T-sejt klónok stimulálása és expandálása mesterséges APC-kkel

A mesterséges antigén-prezentáló sejteket (aAPC) úgy állítottuk elő, hogy streptavidin mágneses gyöngyöket biotinilált CD1d-lipid komplexekkel és biotinilált anti-CD28 antitestekkel vontunk be. A pan T-sejteket 2:1 arányban ko-kultiváltuk aAPC-kkel IL-2, IL-7 és IL-15 jelenlétében 10 napon át. Az expandált sejteket CD1d-lipid dextramerekkel, valamint CD3, CD4, CD8 és CD16 elleni antitestekkel festettük.

4.9.2 Stimuláció monocita eredetű dendritikus sejtekkel (moDC)

A monocitákat GM-CSF és IL-4 jelenlétében differenciáltuk moDC-kké. Az 5. napon a moDC-eket éjszakán át GD3-mal vagy α GalCer-rel pulzáltuk. Ezután a pan T-sejteket moDC-kel ko-kultiváltuk (3:1 és 5:1 arányban) citokinnal kiegészített médiumban 10 napon át. A sejteket a fentiekhez hasonlóan festettük. A stimuláció előtt meghatároztuk a kiindulási CD1d-restríktált T-sejt gyakoriságokat. Életképességi festéssel élő sejteket kapuztunk, amely 4,9% CD3⁺CD16⁺ NKT sejtet, 15,8% CD8⁺ T-sejtet és 74,5% CD4⁺ T-sejtet mutatott. A dextramer festés minimális CD1d-endo és CD1d-GD3 reaktivitást mutatott, míg α GalCer-specifikus sejtek gyakoribbak voltak (1,7% CD4⁺, 0,12% CD8⁺, 0,79% NK). A stimuláció után egyik módszerrel sem nőtt a GD3-reaktív T-sejtek száma. Ugyanakkor az α GalCer-rel pulzált moDC-k hatszorosára növelték az α GalCer-reaktív CD4⁺ T-sejtek arányát (6,83%), míg az aAPC-k nem fejtettek ki ilyen hatást. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a moDC-k hatékonyabban expandálják a lipid-specifikus T-sejteket, valószínűleg fiziológiás antigén prezentációjuknak, kostimulációs képességüknek és immunológiai szinapszis-képző tulajdonságuknak köszönhetően.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 Bispecifikus molekulák fejlesztése lipiddel töltött CD1 komplexekkel

A jelen tanulmányban sikeresen expresszáltunk funkcionális, oldható, single-chain

CD1a, CD1b, CD1c és CD1d molekulákat emlős sejtekben. A CD1c monomereket ILT2- és TCR-kötődési vizsgálatokkal validáltuk, amelyek igazolták a helyes fehérjehajtogatást. Az SDS-PAGE és IEF géleken megfigyelt glikozilációs heterogenitás befolyásolta a stabilitást, mivel a glikozilációs helyek mutációja gyenge expresszióhoz vezetett. A CD1 molekulák természetüknél fogva sokféle endogén lipidet kötnek, ezért egy ligandcsere-protokollt dolgoztunk ki meghatározott lipidek betöltésére. A CD1c-t csökkentett glikozilációval expresszáltuk, és CHAPS detergenssel, pH 6,0 puffert alkalmazva részleges fehérje-kibontást értünk el, így lehetővé téve a lipidcserét. A csere hatékonyságát IEF, natív tömegspektrometria, tetramer festés és TCR-kötődési vizsgálatokkal értékeltük, melyek közül a CD1d- α GalCer tetramer festés bizonyult a leghatékonyabbnak, igazolva a sikeres lipidprezentációt, bár ez csak ismert antigén-specifikus T-sejtek esetén használható. Bár a protokoll részleges lipidcserét tett lehetővé, a betöltött molekulák mennyiségi meghatározása továbbra is kihívást jelent. További optimalizálás szükséges a reprodukálhatóság javításához, egy standardizált lipidbetöltési, illetve lipid antigén vizsgálati módszer kidolgozása céljából.

5.2 CD1-hez társított lipid repertoár

A vizsgálat során a CD1 izoformákból emlős sejtekben expresszált és elúcióval nyert lipid ligandumokat elemeztük, és kimutattuk, hogy a CD1 molekulák széles körben mintázzák a sejtes lipidomot. Bár jelentős átfedés van az izoformák között, mindegyiknek megvannak a sajátos preferenciái. A CD1a és CD1c olyan lipideket kötött, amelyek jól tükrözik a foszfolipidben gazdag sejtes háttérrel, míg a CD1b és CD1d inkább a szfingolipideket részesítette előnyben. Kiemelendő, hogy a CD1d fokozottan kötötte a koleszterint, ami összhangban van a PPAR- γ -t aktiváló szerepével, oxidált koleszterin prezentációja által. A CD1 izoformák szerkezeti különbségei befolyásolják a lipidkötési preferenciákat, különösen a lánc hossz tekintetében: a CD1a közepes méretű lipideket (C34–C38) köt, a CD1b rövid (C16–C20) és hosszú (C40–C42) láncokat is képes befogadni, a CD1c széles tartományban (C30–C46) köt, míg a CD1d inkább rövidebb lipideket preferál, de hosszú láncokat is képes megkötni. Ezek az eredmények alátámasztják a CD1 kötőzsebek kulcsszerepét a lipid szelektivitás kialakításában. A foszfatidilkolin (PC) minden izoformában bőségesen jelen volt, míg a PE és éter-PE alulprezentációja szelektív megkötésre utal. A gangliozidok, különösen a GD1, GD2, GD3 és GM2, jelentősen dúsultak a CD1c-ben, ami megerősíti azokat a megfigyeléseket, miszerint a gangliozidok a CD1c α -hélice körül kötődhetnek, és befolyásolhatják az antigénprezentációt. A GM3, amely ismerten gátolja az NKT-sejt aktivációt, fokozottan kötődött a CD1b, CD1c és CD1d izoformákhoz. A CD1c daganatokban való

vizsgálatához a CD1c –t fokozottan expresszáló sejtvonalakat fejlesztettünk ki, mivel természetes expressziója alacsony. A His-tag alapú affinitás-purifikáció sikertelen volt, míg a StrepTactinXT-alapú módszerek lehetővé tették ugyan az oldható CD1c izolálását rákos sejtvonalakból, de alacsony hozammal. Az Immunprecipitációs (IP) módszer hatékonyabbnak bizonyult, ahol az AB012 antitest volt a leghatékonyabb a CD1c protein sejt lizátumból történő kinyerésében. Ez a munka rávilágít a CD1c izolálásának technikai kihívásaira, valamint a tisztítási stratégiák optimalizálásának fontosságára. A jövőben, az IP hatékonyságának növelésével rákos sejtvonalakon lehetővé válhat a teljes lipidomikai profilozás és a daganathoz társított lipid antigének azonosítása.

5.3 Antigen prezentáció CD1c molekulák segítségével

Az mLPA, mint új CD1c-hez kötött lipid antigen azonosítása jelentős előrelépést jelentett a nemkonvencionális T-sejtek célzásában daganatos betegségekben. A jelen tanulmány vizsgálta az mLPA CD1c-re való betöltődését, és szerepét az immunaktivációban. Olyan leukémiás sejtvonalakat alkalmaztunk, amelyek különböző reciklizációs tulajdonságú CD1c-variánsokat expresszálnak: vad típusú (reciklizáló), citoplazmikus domén csonkolt (felszínen maradó) és GPI-horgonyzott (korai endoszómákban rekedt) formákat, amelyeket mLPA-specifikus TCR-t hordozó Jurkat sejtekkel ko-kultiváltunk. A Jurkat aktivációja a CD1c-GPI esetén volt a legmagasabb, ami arra utal, hogy az mLPA betöltése a korai endoszómákban vagy a szekréciós útvonalon történik. A CD1c blokkolása csökkentette az aktivációt, igazolva a CD1c-függőséget. A lizoszomális acidifikáció gátlása Bafilomycin A1-gyel minden sejtvonalban csökkentette a Jurkat aktivációt, ami a lizoszomális és peroxisomális útvonalak szerepét jelzi az mLPA feldolgozásában. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az mLPA betöltése az endocitikus útvonal korai szakaszában történik, és azt a sejten belüli lipidanyagcsere is befolyásolja. A jövőbeni kutatásoknak az mLPA szintézisének és intracelluláris forgalmazásának molekuláris mechanizmusait kell feltárniuk, ami új terápiás célpontokat fedhet fel leukémiában és más daganatokban.

5.4 CD1c célzása bispecifikus engagerekkel/aktivátorokkal

A tanulmány hangsúlyozza a CD1c bispecifikus engagerek felhasználásának terápiás lehetőségeit. Az általunk előállított, erre a célra potenciális lehetőségként tekintett S2c^{a5b6} TCR nagyrészt lipid-agnosztikus módon ismeri fel a CD1c-lipid komplexeket. Szerkezeti és biofizikai elemzések kimutatták, hogy a vad típusú S2c^{WT} TCR mérsékelt affinitással (KD = 16,7 μ M) kötődik a CD1c-endo-hoz, hasonlóan a klasszikus TCR-pHLA interakciókhoz. Kristályszerkezeti vizsgálatok szerint az S2c^{WT} lipidfüggetlen módon

dokkol, a CD1c α -héliceit és az A' tetőt célozva, ahol a TCR α -lánc a kölcsönhatás 63%-át adja. A kötődést kulcsfontosságú aminosavak, mint az Asp65, Leu68, Arg79 és Glu80 mediálják, míg a lipid fejcsoport denzitásának hiánya a nehézlánc-fókuszú interakciót támasztja alá. Fág display-alapú affinitásérleléssel a TCR affinitása 15 pM-re nőtt, felezési ideje 9,6 órára hosszabbodott, ami terápiás alkalmazás szempontjából kritikus fontosságú. A nagy affinitású S2c^{a5b6}–CD1c komplex szerkezeti elemzése egységes F67 konformációt mutatott, lehetővé téve nagyobb lipid fejcsoportok befogadását. Az affinitás érlelés során bevezetett mutációk növelték a flexibilitást, így szélesebb körű lipidfelismerést tettek lehetővé. Az ImmTAC–CD1c komplexek lipidomikai profilja jelentős átfedést mutatott a vad típusú és nagy affinitású variánsok között, igazolva, hogy az affinitásérlelés nem változtatta meg a lipid specificitást, hanem a CD1c-kölcsönhatást erősítette. A nagy affinitású komplexekben nagyobb lipidek (pl. TAG 54:1;0, GM2 42:2;2) dúsultak, míg a negatív töltésű lipidek alulreprezentáltak voltak. Mindkét komplexben jelen voltak spacer lipidek (C16–C18 lizo-lipidek), támogatva a szerkezeti stabilitást és az antigénprezentációt. A nagy affinitású TCR-t ImmTAC bispecifikus engager formátumba alakítottuk át anti-CD3 karral, amely képes volt T-sejteket CD1c⁺ célsejtekhez irányítani. Erőteljes aktivációt figyeltünk meg CD1c⁺ sejtvonalakon, ugyanakkor off-tumor reaktivitás is jelentkezett CD1c⁺ primer sejtek (pl. B-sejtek, monociták) esetén, ami korlátozza a lipid-agnosztikus célzás terápiás megvalósíthatóságát. Ezért a jövőbeni stratégiáknak tumor-specifikus lipid antigének azonosítására kell fókuszálniuk a szelektív célzás érdekében. Alternatív megközelítésként 13 anti-CD1c antitestet alakítottunk BiTE formátumba, és összehasonlításuként az ImmTAC-okkal. Mindkét formátum CD1c-függő T-sejt aktivációt váltott ki, viszont a BiTE-k nagyobb hatékonyságot de minimális keresztreaktivitást mutattak CD1b molekulára irányulva. Funkcionális tesztek nem mutattak jelentős off-target aktivációt, és bár egyik formátum sem bizonyult egyértelműen jobbnak, mindkettő ígéretes terápiás alkalmazásra. A nagy affinitású, CD1c-célzott bispecifikus molekulák fejlesztése sokoldalú immunterápiás lehetőség alapját jelenti. Ezek a molekulák képesek CD1c⁺ sejtek azonosítására specifikus lipid antigének nélkül is, és meghosszabbított kötési felezési idejük tartós immunválaszt tesz lehetővé. Ugyanakkor a specificitás és a biztonság továbbra is kulcsfontosságú, ezért további funkcionális vizsgálatok szükségesek a keresztreaktivitás és az off-target kockázatok felmérésére. Emellett T-sejt klónozási módszereket is alkalmaztunk lipid-specifikus TCR-ek felfedezésére. Míg a mesterséges APC-k (aAPC) nem tudták expandálni az antigén-specifikus populációkat, a monocitából származó dendritikus sejtek (moDC) hatékonyan expandálták az α GalCer-

reaktív CD4⁺ T-sejteket. Ez arra utal, hogy a moDC-k az aAPC-khez képest hatékonyabbak a lipid antigén prezentációban. Ugyanakkor egyik megközelítés sem eredményezett CD1d-GD3 vagy CD1d-endo reaktív T-sejtek expanszióját, ami az antigénfelismerés vagy a stimulációs protokollok korlátaira utal. A jövőbeni kutatásoknak finomítaniuk kell az antigénbetöltési és tenyésztési feltételeket, hogy elősegítsék a különböző lipid-reaktív T-sejtek expanszióját. Az aAPC- és moDC-stimulációra adott eltérő válaszok molekuláris alapjainak megértése tovább segíti a nemkonvencionális T-sejt klónozást és a terápiás fejlesztést.

6. ÚJ EREDMÉNYEK

1. Jellemeztük a CD1 kötött lipidomot tömegspektrometriai módszerrel, feltárva a CD1 izoformák széles lipidmintavételezését és az izoforma-specifikus lipid profilokat.
2. Izoláltunk egy CD1c-korlátozott TCR-t, fág-display könyvtárak segítségével.
3. Sikeresen növeltük egy CD1c-korlátozott TCR affinitását, fágdisplay-alapú érleléssel, pikomoláris szintre, megtartva a CD1c lipid-agnosztikus felismerését.
4. Publikáltuk két TCR–CD1c–lipid komplex kristályszerkezetét, amelyek jelenleg a második és harmadik ismert CD1c-specifikus TCR szerkezetet képviselik, értékes forrást nyújtva a CD1c-közvetített immunitás megértéséhez.
5. Krisztallográfiás és tömegspektrometriai vizsgálatokkal igazoltuk a nagy affinitású, CD1c-specifikus ImmTAC molekula szerkezeti rugalmasságát és lipid-agnosztikus kötődési módját, ezzel új betekintést nyújtva a TCR-ek CD1c-lipid felismerésének mechanizmusába.
6. Egy nagy affinitású, TCR-alapú bispecifikus molekula került kifejlesztése, amely szelektíven célozza a CD1c-t, anélkül hogy kereszt-reaktivitást mutatna más CD1 izoformákkal vagy HLA molekulákkal.
7. Bemutattuk, hogy a bispecifikus molekula hatékonyan célozza a CD1c-t, és specifikus aktivitást fejt ki CD1c⁺ sejtvonalak ellen.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Ez a PhD értekezés a CD1c-t célzó bispecifikus engerek fejlesztésére összpontosított hematológiai malignitások kezelésére. A kutatás két fő célkitűzés köré épült: (1) a CD1 molekulák által emlős- és ráksejtekben prezentált lipid antigén repertoár jellemzése, és (2) annak vizsgálata, hogy a T-sejt receptorok (TCR-ek) molekuláris szinten hogyan ismerik fel a CD1c-lipid komplexeket.

Az első célkitűzés megvalósításához CD1 izoformákat expresszáltunk emlős sejt expressziós rendszerekben az endogén lipidek megkötésére. A lipid tömegspektrometriai elemzés kimutatta, hogy a CD1 molekulák széles körben mintázzák a sejtes lipidomot, a CD1a és CD1c a foszfolipideket, míg a CD1b és CD1d a szfingolipideket preferálta. A CD1d erős asszociációt mutatott a koleszterinnel is. A lánchossz-elemzés izoforma-specifikus preferenciákat jelzett: a CD1a közepes méretű lipideket kötött, a CD1b széles tartományt fedett le, a CD1c széles specificitást mutatott, a CD1d pedig a rövidebb láncokat preferálta. Különösen figyelemre méltó, hogy a CD1c erős affinitást mutatott a gangliozidok iránt, ami immunmoduláló szerepre utal. A rák-specifikus lipid szignatúrák feltárására CD1c-expresszálo ráksejtvonalakat fejlesztettünk, és különböző dúsítási stratégiákat teszteltünk. Bár oldható CD1c-t sikeresen tisztítottunk THP1 rákos sejtekből, a mennyiségileg nem volt elegendő tömegspektrometriai elemzéshez. A tanulmány CD1c reciklizáció jelentőségét a lipid antigénprezentációban az mLPA (az egyetlen ismert, CD1c által prezentált rákhoz társított lipid antigén) prezentációján keresztül vizsgálta. Leukémiás sejtvonalakat használva, amelyek különböző CD1c reciklizációs tulajdonságokkal rendelkeztek, kimutattuk, hogy az mLPA valószínűleg korai endoszómákban vagy a szekréciós útvonalon töltődik be. A lizoszomális funkció gátlása tovább erősítette a lizoszomális és peroxisomális útvonalak szerepét az mLPA feldolgozásában.

A második célkitűzés a CD1c-lipid komplexek TCR általi felismerésének megértésére összpontosított. Oldható CD1c-lipid komplexeket használtunk TCR-ek izolálására fág display könyvtárakból. Ezeket a TCR-eket bispecifikus engagerekké alakítottuk át, amelyek képesek T-sejteket CD1c-expresszálo ráksejtekhez irányítani. Szerkezeti elemzés kimutatta, hogy a vad típusú TCR elsősorban a CD1c nehézláncával lépett kölcsönhatásba, nem pedig a lipid antigénnel. Az affinitásérlelés pikomoláris tartományba javította a kötődés affinitását, és 9,6 órára hosszabbította meg a felezési idejét, így a TCR alkalmassá válhat terápiás alkalmazásra. Szerkezeti és lipidomikai elemzések kimutatták, hogy a nagy affinitású TCR nagyobb lipid fejcsoportokat is képes befogadni, támogatva a szélesebb körű antigén felismerést. Ezzel párhuzamosan anti-CD1c antitest-alapú bispecifikus T-sejt engagereket (BiTE-eket) fejlesztettünk. Tizenhárom antitest klónt alakítottunk át és teszteltünk. Mind a

BiTE-k, mind az ImmTAC-ok (TCR-alapú bispecifikusok) hatékonyan aktiválták a T-sejteket CD1c-függő módon. Bár az affinitásérett ImmTAC erős aktivitást mutatott, on-target off-tumor reaktivitást is megfigyeltünk egészséges CD1c⁺ sejtekkel szemben, mint például B-sejtek és monociták, ami korlátozza klinikai alkalmazhatóságát lipid-agnosztikus formátumban. Lipid-specifikus TCR-ek azonosítására CD1c és CD1d molekulákat töltöttünk meg lipid antigénekkal egy detergens-alapú ligandcsere protokoll segítségével. Bár az α GalCer-reaktív T-sejtek jelentősen expandáltak monocitából származó dendritikus sejtek (moDC) alkalmazásával, nem figyeltünk meg expansziót CD1d-GD3 vagy CD1d-endo reaktív T-sejtek esetében. Ezek az eredmények kiemelik a moDC-k fölényét a mesterséges APC-kkel szemben, és az antigénbetöltési protokollok további optimalizálásának szükségességét.

Összefoglalva, ez az értekezés bemutatja a CD1c molekulák célzásának bispecifikus engagerekkel történő megvalósíthatóságát, és kiemeli a tumor-specifikus lipid antigének azonosításának fontosságát a terápiás specificitás és biztonság növelése érdekében.

8. KULCSSZAVAK LISTÁJA

T-sejt aktivátor, immunterápia, bispecifikus molekulák, CD1, saját lipid antigén, antigén prezentáció, lipidom, lipid tömegspektrometria, kristályszerkezet

9. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/518/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szőke-Kovács Rita
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szőke-Kovács, R.**, Khakoo, S., Rangel, V. L., Della Cristina, P., Pentier, J., Khanolkar, R., El-Ajouz, S., Simmons, R. A., Cole, D. K., Gogolák, P., Salio, M., Karuppiyah, V.: A CD1c lipid agnostic T cell receptor bispecific engager redirects T cells against CD1c+ cells.
Front. Immunol. 16, 1-14, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2025.1614610>
IF: 5.9 (2024)
2. **Szőke-Kovács, R.**, Khakoo, S., Gogolák, P., Salio, M.: Insights into the CD1 lipidome.
Front. Immunol. 15, 1-11, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2024.1462209>
IF: 5.9

További közlemények

3. Wet, B. d., Simmons, R. A., Suckling, R. J., **Szőke-Kovács, R.**, Mansour, S., Lepore, M., Cole, D. K., Jaworski, J., Chapman, A. L., Aleksic, M.: Characterization of Human CD8αβ Interaction With Classical and Unconventional MHC Molecules.
Eur. J. Immunol. 55 (1), 7, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.202451230>
IF: 3.7
4. Neamtu, A. A., **Szőke-Kovács, R.**, Mihok, E., Georgescu, C., Turcuş, V., Oláh, N. K., Frum, A., Tita, O., Neamtu, C., Szőke-Kovács, Z., Cziáky, Z., Máthé, E.: Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extracts Comparative Analysis Regarding Their Phytonutrient Profiles, Antioxidant Capacity along with the In Vivo Rescue Effects Tested on a *Drosophila melanogaster* High-Sugar Diet Model.
Antioxidants. 9, 1-33, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9111067>
IF: 6.312





5. Szőke-Kovács, Z., Móré, E. C., **Szőke-Kovács, R.**, Máthé, E., Frecska, E.: Selective Inhibition of the Serotonin Transporter in the Treatment of Depression: Sertraline, Fluoxetine and Citalopram.
Neuropsychopharmacol Hung. 22 (1), 1-14, 2020.
6. Szőke-Kovács, Z., Móré, E. C., **Szőke-Kovács, R.**, Máthé, E., Frecska, E.: Selective inhibition of the serotonin transporter in the treatment of depression: sertraline, fluoxetine and citalopram.
Neuropsychopharmacol. Hung. 22 (1), 4-15, 2020.
7. Máthé, E., Moş, L., Szőke-Kovács, Z., **Szőke-Kovács, R.**, Vigh, S., Pribac, C., Czapár, M., Oláh, C.: Plant extracts affect dose-dependently the hatching rate of *Drosophila melanogaster* but do not induce chromosome loss and/or aneuploidy.
Anal. Univ. Oradea Fac. Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară. 11B, 399-404, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,812

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,8**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.09.10.



10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez a disszertáció nem jöhetett volna létre sokak útmutatása, támogatása és bátorítása nélkül, akiknek mély hálával tartozom.

Szeretném őszinte köszönetemet kifejezni PhD témavezetőmnek, **Dr. Gogolak Péternek (Debreceni Egyetem)**, aki felbecsülhetetlen értékű útmutatással, türelemmel és hasznos tanácsokkal segítette munkámat ezen az úton. Szakmai tudása és folyamatos támogatása alapvető szerepet játszott a kutatásom formálásában.

Hatalmas hálával tartozom továbbá az Immunocore Ltd.-beli PhD témavezetőmnek, **Dr. Mariolina Saliónak** is. Mariolina a doktori képzésem felénél vette át a témavezetést, és mentorálása, tudományos és technikai szakértelme kulcsfontosságú volt kutatásom fejlődésében. Rendíthetetlen támogatása, bátorítása és belém vetett hite adott erőt és motivációt a kihívások leküzdéséhez. Nagyra értékelem útmutatását és kedvességét. Köszönetet szeretnék mondani az **Immunocore Ltd.**-nek is, hogy lehetővé tették számomra a kutatás elvégzését, biztosították a szükséges erőforrásokat és környezetet a munkámhoz.

Köszönet illeti az Immunológiai Kutatócsoport minden tagját a tartalmas szakmai beszélgetésekért, az együttműködésért és a barátságért. Támogatások és bátorítások sokkal gazdagabbá és élvezetesebbé tette ezt az utat. Külön köszönet Richard Sucklingnak a felbecsülhetetlen támogatásáért és a disszertációm kritikus átolvasásáért. Értékes visszajelzései és javaslatai nagyban hozzájárultak munkám színvonalához. Nagyon hálás vagyok az idejéért és bátorításáért a folyamat során.

Végül a legmélyebb hálámat szeretném kifejezni a **férjemnek és családomnak**, akik bátorítottak, hogy belevágjak a doktori képzésbe. Szeretetük, türelmük és támogatásuk volt a legnagyobb erőforrásom. Köszönöm, hogy mindig hittek bennem, és minden kihívásban mellettem álltak.

Ez a PhD út egyszerre volt kihívásokkal teli és felemelő, és hálás vagyok mindenkinek, aki részese volt. Külön szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Mariolina Saliónak és Dr. Gogolak Péternek a folyamatos támogatást.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Huang S, Shahine A, Cheng T-Y, Chen Y-L, Ng SW, Balaji GR, Farquhar R, Gras S, Hardman CS, Altman JD, et al. CD1 lipidomes reveal lipid-binding motifs and size-based antigen-display mechanisms. *Elsevier* (2023) 186:4583–4596. doi: 10.1016/j.cell.2023.08.022
2. Roy S, Ly D, Li N-S, Altman JD, Piccirilli JA, Moody DB, Adams EJ. Molecular basis of mycobacterial lipid antigen presentation by CD1c and its recognition by ab T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2014) 111:E4648–E4657.
3. Wun KS, Reijneveld JF, Cheng T-Y, Ladell K, Uldrich AP, Nours JL, Miners KL, McLaren JE, Grant EJ, Haigh OL, et al. T cell autoreactivity directed toward CD1c itself rather than toward carried self lipids. *Nature immunology* (2018) 19:397–406.
4. Lalla C de, Lepore M, Piccolo FM, Rinaldi A, Scelfo A, Garavaglia C, Mori L, Libero GD, Dellabona P, Casorati G. High-frequency and adaptive-like dynamics of human CD1 self-reactive T cells. *Eur J Immunol* (2011) 41:602–610. doi: 10.1002/eji.201041211
5. Lepore M, Lalla C de, Gundimeda SR, Gsellinger H, Consonni M, Garavaglia C, Sansano S, Piccolo F, Scelfo A, Häussinger D, et al. A novel self-lipid antigen targets human T cells against CD1c+ leukemias. *Journal of Experimental Medicine* (2014) 211:1363–1377.
6. Jackman RM, Stenger S, Lee A, Moody DB, Rogers RA, Niazi KR, Sugita M, Modlin RL, Peters PJ, Porcelli SA. The tyrosine-containing cytoplasmic tail of CD1b is essential for its efficient presentation of bacterial lipid antigens. *Immunity* (1998) 8:341–351.