

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az autoimmunitást befolyásoló tényezők vizsgálata egér
modellekben: a T sejt aktiváció és -apoptózis, a lép és a
természetes autoantitestek szerepe**

Dr. Boldizsár Ferenc



Pécsi Tudományegyetem
Klinikai Központ
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

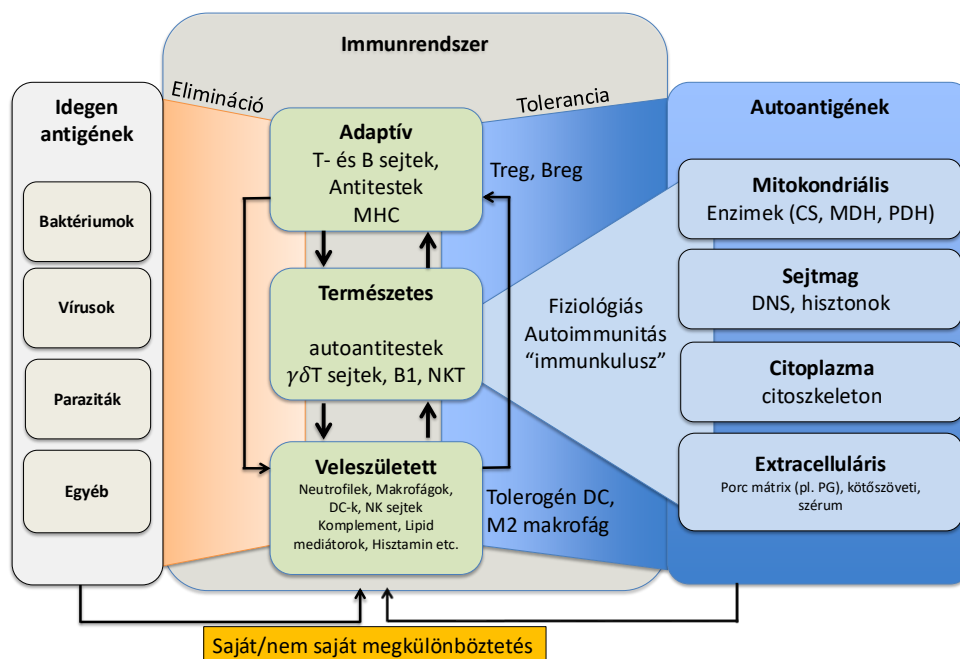
2025

I. BEVEZETÉS

I.1. Tolerancia és autoimmunitás

Az immunrendszer az idegi- és endokrin szabályozó hálózatok mellett a szervezet harmadik nagy homeosztatisz szabályozó rendszere. Fő feladata a szervezet integritásának megőrzése, a belső álladóság fenntartása: ehhez képes felismerni és megkülönböztetni, hogy mi a saját és mi nem, és ennek megfelelő immunválaszt alakít ki (I.1. ábra). A potenciálisan veszélyes nem saját- vagy megváltozott saját antigének (pl. tumor sejtek) elpusztításra kerülnek, míg a normál saját antigéneket tolerálja az immunrendszer.

Ezt a feladatot három funkcionálisan elkülöníthető alrendszer: a veleszületett-, a természetes- és az adaptív immunválasz harmonikus együttműködése látja el (I.1. ábra). A hálózat részei szoros kapcsolatban állnak egymással, és dinamikusan változnak az aktuális antigén stimulációknak megfelelően. A hálózatszerű működés legfontosabb következménye, hogy bárhol következzen is be változás, a hálózat többi része azonnal módosul és egy új egyensúlyi helyzet ("steady state") jön létre.



I. ábra Az immunrendszer élettani funkciói. Normál szabályozás esetén az immunrendszer különböző részei hálózatosan együttműködve képesek elkülöníteni a saját- és nem saját struktúrákat és erre megfelelő immunválaszt adnak. Az idegen antigének eliminációra kerülnek, míg az autoantigéneket a tolerancia mechanizmusok védik. Az autoantigéneken belül kiemelt fontosságúak a szervezetnek azok a biokémiai építőelemei, amelyek létfontosságúak és evolúciósan konzerváltak (világos kékkel jeleztük). Ezeket az antigéneket a természetes autoantitest hálózat ismeri fel ("immunológiai homunkulusz" vagy "immunkulusz"). CS: citrát-szintáz, MDH: malát-dehidrogenáz, PDH: piruvát-dehidrogenáz, PG: proteoglikán, DC: dendritikus sejt

A három alrendszer alapvetően eltérő felismerési mechanizmusokat használ. A veleszületett immunrendszer mintázat felismerő receptorai PAMP (főképp mikrobiális eredetű) és DAMP jeleket érzékelnek, ami gyulladáshoz vezet. Az adaptív immunrendszerben a limfoid sejtek receptoraikkal igen precíz epitóp-specifikus felismerésre képesek, ami antitest termeléshez és T sejt aktivációhoz vezet. A természetes immunrendszer felismerési mechanizmusa pedig a két másik közötti átmenet: limfocita receptorok (B1- és $\gamma\delta$ T sejtek) "mintázatfelismerés-szerű" funkciókkal (I.1. ábra).

A fentiekből következően, az immunrendszer rendelkezik saját felismeréssel, azaz "autoimmunitás"-al, ami a normál immunhomeosztázis része. Ez az ún. "**fiziológiás autoimmunitás**", az aktív tolerancia fenntartásában játszik szerepet, amihez szintén az immunrendszer mindhárom funkcionális része hozzájárul (I.1. ábra). A sejt oldalán a Treg- és Breg populációkkal és a tolerogén dendritikus sejtek valamint az M2 makrofágok játszanak fontos

szerepet, míg a molekuláris oldalról a szupresszív citokinek (pl. IL-10 és TGF β) kulcsfontosságúak, együttműködésben a természetes (auto)antitest hálózattal. A fiziológias autoantitestek olyan evolúciósan megőrzött antigénekkal (DNS, hisztonok, mitokondriális enzimek, citoskeletális elemek, extracelluláris mátrix komponensek) reagálnak, amelyek a szervezet eszenciális biokémiai építőelemei, amit összefoglalóan "immunológiai homunkulusz"-nak vagy röviden "immunkulusz"-nak neveznek (I.1. ábra).

Természetesen a fenti működésekben olyan hibák is kialakulhatnak, amik már kóros folyamatokként, betegségeként manifesztálódnak. Az eliminációs oldal hiányosságai immundeficienciákhoz, míg a tolerancia mechanizmusok problémái autoimmun betegségekhez vezetnek.

Az autoimmun betegségek (amit a fentiekől való elkülönítésre "**patológiás autoimmunitás**"-nak nevezünk) a populáció 7-8%-át érintik és rendkívüli sokféleséget mutatnak. Jelen munkámnak nem célja ezeknek a részletes ismertetése, itt csak a fő alapmechanizmusokkal foglalkozom. Habár nem beszélhetünk egységes patomechanizmusról az autoimmun betegségek esetében, de az biztosnak tűnik, hogy multifaktóriális betegségekről van szó, azaz genetikai, hormonális, életmódbeli és környezeti tényezők állnak a háttérben. A genetikai predispozíció olyan gén variánsok együttes meglétét jelenti, amik elősegítik az autoimmunitás kialakulását. Ezt természetesen jelentősen módosíthatják az életmódi tényezők: a táplálkozás, dohányzás, elhízás, fizikai aktivitás, pszichés stressz etc. Végül kiemelkedően fontos szerepe van a fertőzéseknek: számos esetben egy fertőzést követően indul el a patológiás autoimmun folyamat, ami létrejöhet egy molekuláris hasonlóság ("mimikri"), de akár egy "bystander" aktiváció révén is. Régóta ismert az is, hogy a nők körében jóval gyakoribbak az autoimmun betegségek, aminek háttérben valószínűleg hormonális tényezők állnak.

Kiemelendő, hogy a legtöbb autoimmun betegségben viszonylag hosszú látencia előzi meg a klinikai tünetek megjelenését, miközben az immunszabályozás zavara kialakulhat és megszilárdulhat, és a kóros és visszafordíthatatlan szövetkárosító mechanizmusok is aktiválódhatnak. Részben ez is lehet az oka, hogy a legtöbb betegségben sajnos még mindig nem rendelkezünk gyógyító jellegű kezeléssel, csak a betegség előrehaladását lehet lassítani és a betegek jobb életminőségének a fenntartása a fő cél.

I.2. Reumatoid artritisz

A reumatoid artritisz (RA) egy szisztémás autoimmun betegség, ami körülbelül a lakosság 1%-át érinti. Jellemzője, a perifériás kis ízületek progresszív gyulladása (szinóvitisz, szinóviális hiperplázia és pannusz képződés a jellegzetes patológiai eltérések), ami az ízületi porcot súlyosan károsítja és végül deformitásokhoz és ankilózishoz vezet. Immunológiai szempontból a RA-t a veleszületett- (makrofágok, neutrofilek, gyulladást előidéző citokinek, komplement faktorok etc.) és adaptív (T- és B limfociták, Th1/2/17 citokinek, autoantitestek etc.) immunmechanizmusok alakítják, és az immunológiai események sorában a tolerancia elvesztése a károsodott immunológiai szabályozás miatt különös jelentőséggel bír. A RA poligénes betegség, aminek a kialakulásához genetikai faktorok speciális "együttállása" szükséges, amik kialakítják a betegségre való "fogékonyságot" és befolyásolják a betegség súlyosságát, ám ezeket természetesen módosíthatják különböző környezeti tényezők, például a dohányzás (ami elősegíti a saját fehérjék citrullinációját), az orális és bél mikrobiom összetétele és az obezitás. Ugyanakkor az is jól ismert, hogy a RA leggyakrabban a 4.-5. évtizedben kezdődik, azaz, az életkor előrehaladtával bekövetkező változások, például az immunrendszerben ("immunöregedés"- "immunosenescence"), szintén fontosak lehetnek (erről bővebben a IV.2. fejezet bevezető részében). A RA komplex állatmodelljei kritikusak a kórfolyamat jobb megértésében, illetve új kezelések kifejlesztésében (részletesebben lásd a következő alfejezetben). A kiterjedt kutatás ellenére, a betegséget beindító és/vagy kiváltó tényezők nem ismertek, ezért egyelőre oki kezelés sem elérhető.

A RA patogenezise szempontjából lényeges a citrullináció szerepe. Ennek a biokémiai folyamatnak az eredményeképp a fehérjékben található arginin aminosavak a peptidil-arginin-deimináz (PAD) enzim hatására citrullinná módosulhatnak. Ezt az átalakulást a fiziológias öregedés kapcsán is leírták, de gyulladást előidéző körülmények között fokozódik a PAD aktivitás és így a citrullináció is. Számos kötőszöveti fehérje, köztük porc extracelluláris mátrix komponensek is (például a PG aggregátum is), gazdag argininben, amik citrullinálódhatnak. Ezek a módosult peptid

szekvenciák már idegen antigénként ("neoepitóp") kerülhetnek felismerésre az adaptív immunrendszer sejtjei számára, ami beindíthatja a kóros autoimmun reakciót. Fontos kiemelni, hogy a gyulladásos folyamat beindulása tovább fokozza a citrullinációt ezzel egy kóros pozitív feedback kört kialakítva. Ezért a szervezetben fennálló krónikus gyulladások például krónikus periodontitisz a szájüregben (itt kiemelkedő bizonyos patogénekkal való összefüggés is például a Porphyromonas gingivalis maga is nagy mennyiségben termel PAD-t) vagy a dohányzás által indukált krónikus légúti gyulladás predisponálnak a fokozott citrullinációra, ami fokozza az RA rizikóját.

A patológiás ACPA autoantitesteket, amik citrullinált saját antigénekkal reagálnak, már évekkal a klinikai tünetek kialakulása előtt mérni lehet a betegek szérumban. Ebben a szubklinikai fázisban a saját antigénekkal szembeni tolerancia mechanizmusok károsodnak, így autoreaktív T- és B sejtek képződhetnek, valamint autoantitestek, amik szinóviális antigénekkal reagálnak. Az ACPA pozitív betegek többsége RF (reuma faktor) pozitív is, ami általában szignifikánsan rosszabb prognózist jelent súlyosabb porc és csont destrukcióval, illetve a remisszió kisebb esélyével. A porcszövet extracelluláris mátrix komponensei közül két molekula (a II. típusú kollagén és a proteoglikán aggregán) szintén cél antigénjei az autoimmun reakciónak RA-ben, amit az igazol, hogy a RA betegek szérumban autoantitestjei és T sejtjei felismerik az epitópjaikat. Kiemelendő továbbá, hogy mindkét mátrix makromolekulával artrítiszt lehet indukálni genetikailag "fogékony" egerekben: kollagén indukált artrítisz (CIA) illetve proteoglikán aggregán indukált artrítisz (PGIA)(lásd lenn az I.3. és I.4. fejezetekben).

I.3. A RA modelljei

Számos olyan modell ismert, ami a RA-hez hasonló jellemzőkkel rendelkezik és így alkalmas a betegség kialakulásának, immunológiai hátterének tanulmányozására valamint a lehetséges új kezelési lehetőségek kipróbálására és optimalizálására. A modell rendszereket hagyományosan feloszthatjuk "spontán-" és "indukált" formákra. A fő különbség, hogy az "indukált" formákban az egereket vagy porc antigénekkal (pl. kollagén, aggregán, verzikán) kell immunizálni vagy valamilyen adjuvánst (pl. komplett Freund, bizonyos bakteriális komponensek) adnak be és ennek hatására alakul ki artrítisz. A "spontán" modellekben ezzel szemben az egerek egy bizonyos életkor elérése után "maguktól" lesznek artrítiszesek, ami sok szempontból jobban megfelelhet a humán RA-nek, hiszen az is "spontán" alakul ki. Azonban fontos megjegyeznünk, hogy a "spontán"-nak nevezett modellek többsége olyan genetikailag célzottan módosított egerekben alakul ki (pl. IL-1R antagonistá génkült, HLA-DR4- vagy humán PG aggregán specifikus TcR transzgenikus) ami emiatt nem tekinthető valóban spontánnak. Természetesen vannak olyan modellek is (pl. MRL/lpr, SKG), bár ritkák, amelyekben nem szándékos, hanem véletlen genetikai mutáció vezet RA-hez hasonló fenotípushoz, ez utóbbiak azok, amik tulajdonképpen "spontán"-nak nevezhetőek. A fenti okokból helyesebb lehet, ha a modelleket úgy osztjuk fel, hogy megkülönböztetünk **I. genetikai**: spontán mutáció (I/a), vagy mesterségesen/célzottan módosított (transzgen vagy génült) (I/b) valamint **II. nem genetikai** (az egerekbe be kell juttatnunk valamilyen artrítiszt kiváltó anyagot): **szisztémásan (II/a)** - ezen belül meg kell különböztetnünk azt a csoportot, amikor az egér saját immunreakciója vezet artrítiszhez ("aktív") illetve amikor egy másik artrítisz állatból kinyert szérumban/aktivált sejtek beadásával transzferáljuk az artrítiszt ("passzív"), ez utóbbi esetben természetesen a recipiens saját immunrendszere korlátozottabban vesz részt -, vagy **lokálisan az ízületbe (II/b)**.

További lényeges szempont a beltenyésztett egértörzsek eltérő genetikai háttere: bizonyos modelleket egy- vagy csak néhány egértörzsből válthatunk ki (pl. PGIA/GIA - BALB/c, CIA - DBA/1). Ezek a komplex genetikai háttér különbségek tükrözhetik egyes emberi populációk közti genetikai eltéréseket is a betegségre való fogékonyságban (MHC- és nem MHC gének szerepe), ám ezeknek a feltérképezése komplexitásuknál fogva igen bonyolult.

Mivel az értekezésem jelentős részében a proteoglikán-aggregán indukált artrítisz (PGIA) illetve az ebből továbbfejlesztett rekombináns humán aggregán G1 domén (rhG1) indukált artrítisz (GIA) modellekből származó eredményeket mutatok be, ezért csak ezt a modellt mutatom be részletesebben.

I.4. A proteoglikán aggregán- és a rekombináns aggregán G1 domén (rhG1) indukált artritisz (PGIA ill. GIA) modell

A PG aggregán indukált artritisz (PGIA) modellben az egerek ismételt intraperitoneális (i.p.) oltása humán porc PG aggregán kivonattal progresszív poliartritiszhez vezet, ami számos tulajdonságban hasonlít a RA-hez (autoantitestek termelődése, T sejtek aktivációja, citokin termelés, hasonló hisztopatológiai és radiológiai eltérések. Hasonlóan artritiszt lehet kiváltani, ha az aggregán molekula rekombináns G1 doménjével történő immunizálással. A rhG1 indukált artritisz (GIA) azonos hisztopatológiai- és klinikai képet mutat, mint az "elődje", a PGIA, és ugyanúgy megfigyelhető a T- és B sejtek aktív részvétele és gyulladással citokinek termelődése.

A GIA kiváltásához az egereket i.p. immunizáljuk rhG1 antigén és DDA adjuváns keverékével. Az oltást 3 hetente ismétljük, és az egerek összesen 3 oltást kapnak. Az artritisz első klinikai jelei rendszerint a 2. oltást követően a 10-14. napon mutatkoznak az állatok 20-30%-ában. Majd a 3. oltás után 7-10 nappal már az egerek többségének begyulladnak a végtagjai. A GIA kialakulását 3 stádiumra oszthatjuk a fentiek alapján: 1. tünetmentes preklinikai fázis az 1. oltás után (0-28. nap), majd a 2. korai/enyhe artritisz a 2. oltást követően (30-48. nap) és végül a 3. súlyos artritisz a 3. oltás után alakul ki (50. naptól).

I.5. Az IL-17

Az IL-17 felfedezése komoly kihívást jelentett a T helper sejtek korábbi bipoláris osztályozásának. Mivel az IL-17-t nem lehetett sem Th1- sem Th2 citokinként besorolni, ezért a termelő sejteket egy külön CD4⁺ alcsoportként Th17 sejtekként azonosították. Röviden az IL-17 család 6 tagból (IL-17 A-F) és öt receptorból (IL-17RA-RE) áll említsük. Az IL-17A a leggyakoribb ezek közül és amikor egyszerűsítve "IL-17"-t említenek, akkor az legtöbbször erre vonatkozik.

Az először leírt Th17 sejtek mellett számos egyéb sejtípust azonosítottak, amelyek IL-17-et termelhetnek, így például neutrofilek és hízósejtek mellett a $\gamma\delta$ - és CD8⁺ T (ún. Tc17) sejtek, NK- és iNKT- valamint ILC3 sejtek. A célsejtek tekintetében is nagyon változatos képet látunk: neutrofilek, monocita/makrofágok, oszteoblasztok és oszteoklasztok, kondrociták, szinoviociták, fibroblasztok, keratinociták és endotél sejtek. Tekintettel a források és célpontok ilyen szerteágazó jellegére, nem meglepő, hogy számos kór állapotban is azonosították az IL-17 szerepét, például szisztémás autoimmun betegségeken (SLE, RA) és egyéb krónikus gyulladással betegségeken is (pszoriázis, IBD, periodontitisz).

I.5.1. A Th17 sejtek RA-ben

A Th17 sejtek nagy mennyiségben termelnek IL-17-t, emellett CCR6-t és ROR γ t transzkripciósfaktort expresszálnak. Emberben a Th17 elköteleződéshez főleg IL-1 β , IL-6, IL-21 és IL-23 szükséges, amelyek mind termelődnek a gyulladással környezetben található makrofágokban és dendritikus sejtekben. Korai, kezelt RA betegek vérében megemelkedett a CCR6⁺ Th17 sejtek aránya, és a korai RA-ban Th17 sejtek infiltrálták az ízületeket: kimutathatók voltak mind a szinóviális folyadékban, mind magában a szinóviában, továbbá a szinóviális folyadékban való jelenlétük általában magasabb betegség aktivitással társul. Az IL-17, a gyulladással citokinek termelésének elősegítésével valamint az oszteoklasztok differenciációjának elősegítésével jelentős, ha nem központi szerepet játszhat a RA patogenezisében. Az IL-17 szerepét számos RA modellben is kimutatták, például SKG, K/BxN és a CIA modellekben, ám a PGIA és GIA modellben még nem volt tisztázva a részvétele.

I.6. A lymphocyták aktivációjának- és apoptózisának fő jellemzői

Ahogy a fenti fejezetekben bemutattam, RA-ban, a modelljeiben és más autoimmun betegségeken is központi szerepet töltenek be a T- és B lymphocyták különböző csoportjai. Az antigén receptor molekulák (TcR vagy BcR) önmagukban nem képesek biokémiai jeltovábbításra, ezért ehhez kiegészítő molekulák szükségesek. A TcR esetében ez a CD3 komplex, míg a BcR-hez a CD79 kapcsolódik, amelyekben olyan ITAM szekvenciák vannak, amelyeknek a foszforilációja kulcsfontosságú az aktivációban. Első lépésben a CD45 membrán foszfatáz aktiválja a Src kináz családba tartozó molekulákat (Lck, Fyn, Lyn), amik foszforilálják a CD3 vagy CD79 ITAM szekvenciáit. Ezekhez a Syk kináz család tagjai kapcsolódnak: a T sejtek esetében a ZAP-70, míg a B sejtekben a Syk. A Syk kinázok aktivációja részben a Src kinázok által, részben pedig autofoszforiláció révén történik. Az aktivált Syk kinázok adapter-

(pl. LAT, SLP-76, SLP-65, Grb-2) és enzim aktivitással (PLC γ) rendelkező molekulákat foszforilálnak.

A PLC γ a plazma membránban található foszfatidil-inozitol biszfoszfát (PIP₂) molekulát inozitol triszfoszfátra (IP₃) és diacil-glicerolra (DAG) hasítja. Ezen a ponton a jelátviteli folyamat kettéágazik: az IP₃ az endoplazmás retikulum Ca²⁺ csatornáit aktiválja, ami átmeneti Ca²⁺ szint emelkedéshez vezet a citoplazmában, míg a DAG a PKC enzimet aktiválja. A megemelkedett Ca²⁺ szint a kalmodulinon keresztül a kalcineurint aktiválja, ami foszfatáz aktivitása révén defoszforilálja az NFAT transzkripciós faktort, ami így képes a sejtmagba transzlokálódni és géneket aktiválni. A PKC aktiválása az IKK degradációján keresztül az NF-KB aktivációjához vezet, ami szintén számos gén expresszióját befolyásolja. A fentiek mellett a Grb-2 a Sos GTP/GDP kicserélő faktoron keresztül aktiválja a Ras-t, ami a MAPK útvonalat (Raf, MEK, ERK) indítja be, ami végül szintén transzkripciós faktorok aktiválásához vezet (pl. AP-1). A transzkripciós faktorok citokinek, citokin receptorok és a sejt proliferációban szerepet játszó géneket szabályozzák.

A stimuláció erősségétől függően, a TcR jelátvitel okozhat T sejt aktivációt (proliferáció és differenciáció) vagy apoptózist, mindkettőben szabályozó szerepet játszanak a kostimulációs molekulák és citokin receptor jelátviteli útvonalak. A TcR jel által kiváltott apoptózis, vagy aktiváció indukált sejthalál ("activation-induced cell death"=AICD), az aktivált T sejtek elpusztítására szolgáló mechanizmus, ami megakadályozza az immunválasz "túlsordulását". Ezért az AICD-ben bekövetkező hibák fennmaradó T sejt aktivációt okozhatnak ami általában autoimmun betegségekben fordul elő. A T sejtek apoptózis rezisztenciáját mind RA betegekben mind pedig az artritisz állatmodelljeiben leírták, ami a folyamatos T sejt aktiváció mellett szintén hozzájárulhat az autoimmunitás kialakulásához. A T sejtek apoptózisában mind az extrinszik- (kaspáz 8 függő) mind pedig az intrinszik (kaspáz 9 függő) mechanizmusok részt vesznek. Ez utóbbinak a szabályozásában kiemelkedő szerepe van a Bcl-2 család fehérjéinek.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A. A PROTEOGLIKÁN AGGREGÁKÁN INDUKÁLT AUTOIMMUN ARTRITISZ MODELLBEN SZEREPET JÁTSZÓ IMMUNOLÓGIAI HAJLAMOSÍTÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA

1. Azonosítani szeretnénk volna olyan immunológiai tényezőket, ami a BALB/c egerekben az artritiszre való érzékenységet magyarázhatják. Ehhez vizsgáltuk a PGIA korai szakaszában zajló lokális- (peritoneális) illetve szisztémás (lép, nyirokcsomók) immunválaszt és összehasonlítottuk az eredményeket az artritiszre rezisztens, de azonos MHC-vel rendelkező DBA/2 egerek immunválaszával.
2. Az öregedés hatására bekövetkező immunológiai változások hogyan befolyásolják a PGIA kialakulását.

B. A T SEJT AKTIVÁCIÓ ÉS -APOPTÓZIS VÁLTOZÁSAI AUTOIMMUN ARTRITISZBEN

I. Vizsgálatok PG antigén specifikus T sejt receptor transzgenikus egerekben (ennek a megközelítésnek az előnye, hogy ismert a T sejt receptor specifitása és így antigén specifikus módon lehet aktiválni a T sejteket):

3. A PG antigén specifikus T sejt receptor transzgenikus egérben kialakuló spontán artritisz immunológiai hátterének felderítése, különös tekintettel a T sejtek aktivációjára és apoptózisára, valamint az IL-4 módosító szerepére.
4. A TcR jel erőssége hogyan befolyásolja az autoimmun artritist a T sejt aktiváció és apoptózis egyensúlyának a befolyásolásán keresztül PG antigén specifikus T sejt receptor transzgenikus egérben.

II. Vizsgálatok részlegesen- vagy teljesen ZAP-70 hiányos egerekben:

5. A ZAP-70 molekula szerepének vizsgálata GIA modellben. A ZAP-70 részleges hiánya milyen változásokat okoz az artritiszben, az immunválaszban, valamint a T sejtek aktivációjában és apoptózisában.
6. A ZAP-70 gén kiűtött egerek T sejt képzésének helyreállítása és funkcionális jellemzése.

C. A LÉP IMMUNOLÓGIAI SZEREPE AUTOIMMUN ARTRITISZBEN

7. Az Nkx2-3 transzkripciós faktor hiányában bekövetkező lép fejlődési zavar hatásának vizsgálata az autoimmun artritisz kialakulásában.
8. A lép sebészi eltávolításának hatásának vizsgálata az autoimmun artritisz kialakulásában és a szplenektómia időzítésének vizsgálata.

D. TERMÉSZETES- ÉS PATOLÓGIÁS AUTOANTITESTEK JELLEMZÉSE AUTOIMMUN MODELLEKBEN

9. A természetes- és patológias autoantitestek kor függő változásainak vizsgálata és korrelációja a B sejt alcsoportok megoszlásával New Zealand Black (NZB) spontán autoimmun modellben.
10. A lép szerepe a természetes- és patológias autoantitestek egyensúlyának szabályozásában egér autoimmun artritisz modellben.

E. AUTOIMMUN MIOKARDÍTISZ

11. A HLA-DQ8 transzgenikus egerekben kialakuló spontán autoimmun miokarditisz kialakulásában szerepet játszó tényezők- és lehetséges kezelési módok vizsgálata.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Felhasznált egértörzsek

1. BALB/c (Charles River Laboratories), 1-11 hónapos.
2. SCID BALB/c (Charles River Laboratories), 4-5 hónapos.
3. DBA/2 (NCI), 4-5 hónapos.
4. PG-specifikus TcR transzgenikus egér (BALB/c genetikai háttér) kétféle variánsa: "TgA" és "TgB", 4-12 hónapos.
5. IL-4^{-/-} PG-specifikus TcR transzgenikus egér (BALB/c genetikai háttér), 4-12 hónapos.
6. HLA-DQ8 humanizált transzgenikus egér (egér I-A^d hiányos, BALB/c genetikai háttér), 1-4 hónapos.
7. ZAP-70 hiányos egér (B6.129X1- Zap70tm1Weis/J) a Jackson Laboratories-tól. Az eredeti törzset visszakereszteltük BALB/c genetikai háttérre (ZAP-70 BALB/c), 1-5 hónapos.
8. Nkx2-3 knock-out egér (BALB/c genetikai háttér), 4-5 hónapos.
9. NZB (New Zealand Black) (Charles River Laboratories), 1-12 hónapos.

A transzgenikus ill. knock-out egértörzsek esetében a genotipizálást farok mintából izolált genomialis DNS mintából végeztük PCR reakcióval a megfelelő primer kombinációkkal (részletesebben ld. az egyes publikációkban).

III.2. Proteoglikán aggregán- ill. rekombináns humán aggregán G1 domén által indukált artritisz (PGIA/GIA) kiváltása és követése

4-5 hónapos nőtény egereket immunizálunk 100µg tisztított és deglikozilált humán porc proteoglikán aggregán- (röviden "PG") vagy 40µg tisztított rekombináns humán G1 domén (röviden "rhG1") antigén és DDA adjuváns keverékével intraperitoneálisan. Az immunizálást háromszor, három hetenként adjuk (lásd fenn I.2. ábra). Az autoimmun artritisz kialakulásának követése az egerek lábainak vizsgálatával történik. Röviden: heti háromszor mind a négy végtag pontozásra kerül (0: egészséges, nem gyulladt láb; 1: pirosság és enyhe duzzanat a lábujjakon és/vagy a láb közép tájon; 2: Pirosság és enyhe/közepes duzzanat a csukló vagy bokaízületben; 3. súlyos gyulladás az egész lábra kiterjedően; 4: ankylosis és ízületi deviáció kialakulása)(lásd fenn I.1. táblázat, I.3. ábra). A pontokat összegezve megkapjuk a kumulatív súlyossági pontszámot. Az incidenciát az artritiszes egerek számának és a kísérleti csoportban résztvevő összes egér számának százalékos arányaként fejezzük ki.

III.3. Szérum markerek meghatározása

A kísérleti állatoktól szérum begyűjtését követően a következő jellemzőket határozzuk meg rutinszerűen. A szérum citokinek (IL-1, IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, TNF α , IFN γ) szintjét sandwich ELISA módszerrel mérjük R&D Systems DuoSet rendszerével a gyártói utasításoknak megfelelően vagy a BD Cytokine Bead Array módszerével. A szérum specifikus antitest szintjeit indirekt ELISA módszerrel vizsgáljuk az immunizálásra használt humán PG aggregán vagy rhG1-el szemben, valamint az egér PG aggregánnal szemben, továbbá rheuma faktor (RF) és CCP ellen.

III.4. *In vitro* lép-, nyirokcsomó- és peritoneális sejt tenyészetek proliferációjának és citokin termelésének meghatározása

Az egerekből a kísérletek végén lépet illetve nyirokcsomókat izolálunk, majd ezeket mechanikusan homogenizálva egy sejt szuszpenziókat hozunk létre, peritoneális sejteket pedig a hasüreg hideg PBS-el történő kimosásával izolálunk. A sejtek proliferációjának mérésére 3×10^5 sejtet teszünk lyukanként 96-lyukú lemezekre 200µl médiumban triplikátumban, melyeket antigén jelenlétében ill. -hiányában tenyészünk 5 napig. A stimuláció végén vagy ³H-timidin beépülésen alapuló vagy kolorimetriás proliferációs tesztet (Promega CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) végzünk. A sejtek proliferációját stimulációs indexként (SI) fejezzük ki, ami az antigénnel stimulált sejtek jel intenzitásának és a nem stimulált sejtek jel intenzitásának a hányadosát jelenti.

Az *in vitro* sejt kultúrák citokin termelésének meghatározására 1.8×10^6 sejtet teszünk ki lyukanként 48-lyukú lemezre amelyeket a proliferációhoz hasonlóan antigén jelenlétében vagy anélkül tenyészünk 5 napig. A citokinek meghatározása hasonlóan történik, mint a szérum esetében (ld. fenn). Amennyiben a sejtek felülúszóit nem használjuk fel azonnal, a mérések elvégzéséig -80°C-on tároljuk.

III.5. Áramlási citometria

A különféle eger szövetek sejtes összetételének meghatározásához sokszínű áramlási citometriás technikát alkalmaztunk. A méréseket BD FACS Canto II vagy Beckmann Coulter Dx Flex citométereken mértük, melyek kék (488 nm), vörös (633 nm) és ibolya (405 nm) gerjesztő lézerrel rendelkeztek és 8- vagy 13 fluoreszcens paraméter detektálására képesek. A mérések analízise a "BD FACS Diva" ill. "Beckmann Coulter CytExpert" szoftverek segítségével történt. A következő fő sejtpopulációkat különítettük el: CD3⁺: össz T sejt ; CD3⁺CD4⁺: CD4⁺ T sejt; CD3⁺CD8⁺: CD8⁺ T sejt; CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺: regulatórikus T sejt (Treg); CD3⁺CD4⁺CD25⁺, aktivált CD4⁺ T sejt; B220⁺: össz B sejt; IgD^{high}IgM^{low}CD23⁺: follikuláris B sejt; IgD^{low}IgM^{high}CD23⁻: nem follikuláris B sejt (B1 és MZ B sejt); Ig⁺CD73⁺CD38⁺, memória B sejt; B220⁻CD138⁺, plazmasejt. Az intracelluláris jelölésekhez a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk.

III.6. Szöveti vizsgálatok

Szöveti vizsgálatokat végeztünk eger thymus-, lép-, nyirokcsomó-, szív- és láb metszeteken valamint omentum whole mount preparatumokon. Hagyományos paraffin beágyazott metszeteken hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk. A fagyasztott szövetekből készített metszeteken illetve az whole mount készítményen immunfluoreszcens ill. immunhisztokémiai festéseket végeztünk. A képeket Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal, az alysis vagy ZEN szoftver segítségével készítettük. A képek analízisét és szerkesztését Adobe Photoshop CS2 vagy ImageJ szoftverrel végeztük.

III.7. *In vivo* képkalkító vizsgálatok

Az egereket altatásban vizsgáltuk *in vivo* képkalkító vizsgálatokban. A csontok és az ízületek állapotának vizsgálatához mikroCT vizsgálatokat a PTE, ÁOK, Farmakológiai Intézetében "SkyScan 1176 *in-vivo* mikro-CT system" (Bruker, Kontich, Belgium) segítségével végeztünk. A végtagok gyulladásának képkalkító vizsgálatához PBS-ben oldott luminolt (20 mg/ml, Sigma Aldrich) oltottuk be intraperitoneálisan (150mg/ttkg). A neutrofil-eredetű mieloperoxidáz enzim oxidálja a luminolt, mely a folyamat eredményeként kék fényt bocsát ki ($\lambda_{max} = 425$ nm). A képeket 10 perccel a luminol beadása után készítettünk el az IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Egyesült Államok; 60 s acquisition, F/Stop = 1, Binning = 8) készülék segítségével a PTE, ÁOK, Farmakológiai Intézetében.

III.8. Intracelluláris Ca²⁺ mérés

A sejteket Fluo-3 kalcium indikátor festékkel töltjük fel, majd áramlási citometriával mérjük az fluoreszcenciát (Boldizsár et al., 2002). Az indikátor csak Ca²⁺ kötést követően fluoreszkál, így a fluoreszcencia intenzitás arányos a citoplazmatikus szabad Ca²⁺ szinttel (Boldizsár et al., 2002). A mérés során felvesszünk egy alap görbét, majd a T sejteket anti-CD3-, a B sejteket pedig vagy anti-IgM- vagy anti-IgG antitestekkel aktiváljuk és követjük a fluoreszcencia változását. A mérés különböző időpontjaiban kiszámolt átlagos fluoreszcencia értékeket az időtengelyen ábrázolva kapjuk meg a Ca²⁺ jel görbét (Boldizsár et al., 2002).

III.9. Western-blot

A tisztított T sejteket vagy A20-as antigén prezentáló sejtekkel vagy anti-CD3/anti-CD28 antitestekkel aktiváltuk különböző ideig, majd összegyűjtöttük és lizáltuk. A sejt lizátumokat a megszokott módon SDS mintapufferben készítettük elő, majd PAGE-t végeztünk 7,5%-os vagy 10%-os gélben. A szeparált fehérjéket nitocellulóz membránra transzferáltuk, majd különféle jelátviteli fehérjékre specifikus antitestekkel hívtuk elő. Másodlagos antitestként HRP-konjugált kecske anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG antitesteket használtunk. A blotokat kemilumineszcens reagenssel hívtuk elő és Fujifilm LAS 4000 blot imaging system vagy BioRad Chemidoc rendszer segítségével készítettük a képeket. A minták egyenlő mennyiségének ellenőrzésére a blotokat anti- β -aktin antitesttel is előhívtuk.

III.10. Statisztikai módszerek

Az eredmények statisztikai analízisét a MS Excel vagy GraphPad Prism szoftverrel végeztük, különböző statisztikai tesztekkel (t-próba, Mann-Whitney teszt, ANOVA), ahol statisztikailag szignifikáns különbségnek a $p < 0.05$ értéket tekintettük. Az ábrázolt értékek minden esetben átlag \pm SEM ha másként nem jeleztük. A korrelációs analízisekben a Pearson korrelációs koeficienset használtuk.

IV. EREDMÉNYEK

IV.A. A PROTEOGLIKÁN AGGREGÁN INDUKÁLT AUTOIMMUN ARTRITISZ MODELLBEN SZEREPET JÁTSZÓ IMMUNOLÓGIAI HAJLAMOSÍTÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA

IV.1. A Th1/Th17 polarizáció- és immunválasz összehasonlító elemzése azonos MHC-t hordozó BALB/c- és DBA/2 egerekben az autoimmun artritisz különböző szakaszaiban

Mivel az intraperitoneális immunizálási mód a leghatékonyabb a PGIA kiváltásában, ezért a munkám első részében azokat az immunológiai eseményeket tanulmányoztuk, amelyek lokálisan a peritoneumban történnek és meghatározhatják a betegség kialakulását és előrehaladását. A peritoneális üreg egyedülálló mikrokörnyezet, amit egy szeróza hártya határol: ezt mezotél- és szubmezotéliális kötőszövet alkotja, nyirok- és vérerekkel, valamint nyirokszöveti struktúrákkal. Az omentumban található másodlagos nyirokszöveti formák "milky spot"-ok vagy FLAG-ek főképp dendritikus sejteket, makrofágokat és limfocitákat tartalmaznak. A peritoneális folyadékban, ami a hasüregi szervek mozgásaihoz biztosít megfelelő közeget, különféle immunsejtek is találhatóak: például makrofágok, limfociták és dendritikus sejtek. A B1 sejtek a peritoneumban egy fő sejtsoportot alkotnak, míg más nyirokszövetekben viszonylag ritkábban fordulnak elő. A B1 sejtek egyik fő funkciója az IgM termelés, de antigén prezentáló sejtneként is működhetnek. Két alcsoportjuk (B1a/b) különíthető el a CD5 expressziójuk alapján, amely marker egyébként jellemzően a T sejteken expresszálódik.

A PGIA a genetikailag érzékeny BALB/c egértörzsből váltható ki, a többi egértörzs rezisztens, például az azonos MHC-t expresszáló DBA/2 egerek is. Habár ezen két egértörzs között fennálló PGIA érzékenység béli különbség régóta ismert volt, és a PGIA kialakulásához vezető alapvető celluláris- és immunológiai mechanizmusok is leírásra kerültek, a legkritikusabb érzékenységi tényezők még nem voltak feltérképezve ezért összehasonlítottuk a két egértörzsből zajló korai immunválaszt, ami magyarázhatja az artritisz kialakulását a BALB/c egerekben és ennek hiányát a DBA/2 törzsből.

IV.1.1. A naív BALB/c- és DBA/2 egerek immunfenotípusának jellemzése

Mivel az egerek alapvető immunológiai tulajdonságai befolyásolják az antigénekre adott választ - ez esetben a PG-re, ami artritist vált ki - először jellemeztük a peritoneum sejtösszetételét, ahová az antigén ip. beadása történik, és a lépét, ami a későbbi szakaszban a szisztémás immunválasz kialakításban vesz részt naív BALB/c és DBA/2 egerekben a limfoid sejtekre fókuszálva. Az MHC-azonos, de PGIA rezisztens naív (nem immunizált), megegyező életkorú DBA/2 egerekben szignifikánsan kevesebb T sejtet, de hasonló számú B sejtet találtunk, mint a naív BALB/c egerekben mind a PLF mind pedig a lép esetében. A CD4⁺/CD8⁺ T sejtek aránya magasabb volt a DBA/2 egerekben, mint a BALB/c-ben. Szignifikánsan kevesebb CD62L^{high}CD4⁺ T- és Treg sejt volt a naív DBA/2 egerek lépében, mint a BALB/c-ben. A PLF-ben a B1/B2 sejtek aránya magasabb, de a CD5⁺/CD5⁻ B1 sejtek aránya alacsonyabb volt a DBA/2 egerekben mint a BALB/c-ben.

IV.1.2. A sejtösszetétel változásainak összehasonlítása a PLF-ben ip. immunizálás során BALB/c- és DBA/2 egerekben

A PGIA modelbben a peritoneális üreg az antigén bejutásának a helye, ahol az immunrendszer először találkozik a PG-vel és az adjuvánssal. Ezért vizsgáltuk a PLF sejtösszetételének változásait különböző időpontokban a PG+DDA immunizálás során, illetve csak DDA beadása mellett mind a BALB/c- mind a DBA/2 egerekben. A két egértörzs között a legfőbb különbség az volt, hogy a BALB/c egerekben az ip. immunizálás hatására egy jelentős T sejt arány növekedés volt tapasztalható, amiknek jelentős része aktivációs markereket is expresszált, ami a DBA/2 törzsből ez nem volt jellemző, ezzel szemben a B sejtek esetében nem láttunk jelentős különbséget. A DDA adjuváns önmagában nem okozott korai T sejt növekedést a BALB/c egerekben, viszont hasonlóan változott a B sejtek összetétele mint az antigén jelenlétében, DBA/2 egerekben viszont csak a B1 sejtekre volt hatással az adjuváns önmagában.

IV.1.3. PLF sejtek *in vitro* citokin termelése BALB/c egerekben

Mivel már az első ip. PG/DDA immunizálást követő 10. napon szignifikáns T sejt szám emelkedést tapasztaltunk a BALB/c egerek peritoneumában, továbbá a T sejtek száma és

aktivációja (CD25 és CD44 mérés alapján) dinamikus változást mutattak az immunizálás időszaka alatt, és mivel a citokinek az immunválasz fontos szabályozói PGIA-ban, ezért megvizsgáltuk a PLF sejt kultúrák citokin termelését. A BALB/c egerekből izolált PLF sejtek antigén stimuláció nélkül IL12/23 p40-t, IL-17-t és IFN γ -t termeltek, míg PG stimulációra nagy mennyiségű IFN γ , IL-17 és IL-6, valamint kisebb mennyiségű TNF α és IL-4 termeléssel reagáltak.

IV.1.4. Lép sejt kultúrák *in vitro* citokin termelése BALB/c egerekben

Az ip. oltást követően az antigént először a lokális sejtek dolgozzák fel, de később, a szisztémás immunválaszban a lép is fontos szerepet tölt be. A lépből izolált sejtek spontán módon viszonylag nagy mennyiségben termeltek IL-6, IL12/23 p40, IL-17 és IFN γ citokineket az immunizálás teljes ideje alatt. Az IL-17 és IFN γ termelés fokozódott már 10 nappal az első PG/DDA injekciót követően majd a második oltás után érték el a maximumot.

IV.1.5. Lép sejt kultúrák *in vitro* proliferációja és a szérum antitestek szintje BALB/c egerekben

A BALB/c lép sejtek szignifikáns proliferációt mutattak már 5 és 10 nappal az első PG/DDA injekció után, ami tovább fokozódott a második és harmadik PG oltásokat követően. A BALB/c egerek jelentős mennyiségű egér PG-specifikus IgG1 és IgG2a termelést mutattak a második- és harmadik oltást követően.

IV.1.6. A PG-specifikus immunválasz összehasonlítása BALB/c- és DBA/2 egerekben

Már a T sejtek számában a PLF-ben jelentkező szignifikáns különbség a két egértörzs között jelezte, hogy alapvető különbségek lehetnek a PG kiváltott immunválaszban. Azon túl, hogy felfedtük a két egértörzs sejtösszetételében található különbségeket jellemeztük a PG immunizálást követő citokin- és antitest termelés változásait is, ami a BALB/c egerekben hozzájárulhat a T- és B sejtek aktivációjához és az "artritogén fenotípus" kialakulásához. Azért, hogy kiderítsük, hogy ezek közül a tényezők közül melyek azok, amelyek "BALB/c-specifikusak" és felelősek lehetnek a PGIA iránti érzékenységet, szisztematikusan összehasonlítást végeztünk az artritisz-rezisztens DBA/2 egerekkel, hasonló számú egér felhasználásával és megegyező immunizálási protokollal alkalmazásával.

A DBA/2 egerek PLF sejtjei által *in vitro* termelt citokinek profilja alapvetően különbözött a BALB/c egerekben tapasztaltaktól: az immunizálási protokoll minden időpontjában az IL-6 volt a legdominánsabb citokin, miközben minimálisan vagy egyáltalán nem termelődött IL-4, IL-12/23 p40, IL-17 és IFN γ . A DBA/2 egerekből származó lép sejt kultúrák szignifikánsan kevesebb IL-17-et és IFN γ -t termeltek majdnem minden időpontban, mint a BALB/c egerekéi. A DBA/2 egerek lép sejt kultúrái ugyan erőteljesebb proliferációs választ mutattak a második és a harmadik oltás között, mint a BALB/c egerekéi, de a harmadik oltást követően a proliferációs aktivitás már csökkent. A szérumban mérhető anti-egér PG autoantitestek szintje pedig csak 10-30%-a volt a BALB/c-ben mért értékeknek az összes mérési időpontban.

IV.1.7. BALB/c PLF sejtekkel transferálható a PGIA SCID egerekbe

A BALB/c- és DBA/2 egerek PG-re adott immunválaszának összehasonlítása azt mutatta, hogy a legjelentősebb eltérés a peritoneális üregben található T sejtek számában és citokin termelésében volt. Mivel a PG immunizált BALB/c egerek peritoneális sejtjeinek az artritisz indukáló képességét még nem tesztelték korábban, a következő kísérletben PLF sejteket (amelyek nagyrészt T-, B2- és kisebb számban B1 sejteket tartalmaznak) használtunk a betegség átviteléhez.

A PGIA-t leghatékonyabban olyan PLF sejtekkel lehetett átvinni, amelyek már artritiszes BALB/c egerekből származtak. Kiemelendő, hogy sikerült artritiszt előidézni olyan PLF sejtekkel is, amelyeket 10 nappal a második PG immunizálás után izoláltunk, még nem artritiszes BALB/c donor egerekből. Azokban a recipiensekben, amik olyan BALB/c donoroktól kaptak PLF sejtet, amik csak egyszer lettek PG-vel immunizálva, nem alakult ki artritisz. Az áramlási citometriás analízis azt mutatta, hogy a recipiensek vizsgált szöveti kompartmentjeit hatékonyan repopulálták a donor PLF limfociták: főleg T-, B2- és B1 sejtek. Továbbá a T sejtek nagy része expresszált CD69 és CD25 aktivációs markereket.

IV.1.9. PGIA: a Th1/Th17 betegség határán

Eredetileg a PGIA-t teljesen Th1 típusú betegséggént fogták fel jelentős mennyiségű IFN γ termeléssel, viszont itt kimutattuk, hogy a PGIA immunizálási időszaka alatt, azaz még a

klinikai tünetek kialakulása előtt, az IL-17 egy prominens pro-inflammatórikus citokin, ami jelentős mennyiségben termelődik mind a peritoneális üregben, mind a lépben.

IV.2. Életkor függő faktorok vizsgálata reumatoid artrítisz egér modellben

Az immunfunkciók életkor függő csökkenése ("immunöregedés"- "immunosenescence") mind a veleszületett- mind az adaptív immunitásban megfigyelhető. Az életkor előrehaladtával fokozódik a fertőzések, a malignus- és az autoimmun betegségek előfordulása, ami a normál immunológiai felügyelet és az immunválasz regulációs zavarainak a következménye lehet. Az "öregedés" a RA egyik jól definiált rizikófaktora, és számos tanulmány foglalkozik az RA-ben megfigyelhető korai "immunöregedés" kérdésével. Habár az "immunöregedés" számos markerét azonosították emberben és egerekben is, még mindig nem teljes a kép, és ezért az sem egyértelmű, hogy az immunrendszer öregedése hogyan járulhat hozzá az autoimmun folyamatok kialakulásához. Ennek a pontosabb vizsgálatához ebben a tanulmányban BALB/c egerek 8 különböző korcsoportját immunizáltuk egymással párhuzamosan PG és DDA keverékével.

IV.2.1. A PGIA iránti fogékonyság fokozódik az életkorral

A 4-11 hónapos korú egerekben alakult ki a legsúlyosabb ízületi gyulladás (artrítisz súlyossági pontszám: 10.8-14.6), 85-100%-os incidenciával és korai kezdettel. A 2-3 hónapos egerekben alacsonyabb volt a betegség incidenciája (71-83%) és súlyossága is (artrítisz súlyossági pontszám: 5.8-9.6) és a kialakulás is lassabb volt. Az egy hónapos korcsoport lényegében ellenálló volt a PGIA-ra: az incidencia kevesebb mint 5% volt és a súlyossági pontszám csak 1.6 ± 0.3 volt.

IV.2.2. A PG-specifikus immunválasz életkor függő változásai

Ahhoz hogy meg tudjuk érteni a különféle korú egerekben talált különbségeket a PGIA klinikai képében, először a PG-indukált immunválasz (*in vitro* T sejt válasz, szérum citokin- és antitest szintek) életkor függő változásait vizsgáltuk meg. A PG-indukált *in vitro* T sejt IL-2 termelés és proliferáció életkor függő módon lineárisan és szignifikánsan csökkent. A PG-vel stimulált lépsejt kultúrák IL-4, IL-6, IL-17 és IFN γ termelése az idősebb egerekből (főleg 7 hónapos kortól) jelentősen elmaradt a fiatalabbakhoz képest. A PG-indukált IFN γ és TNF α termelés az 1-5 hónapos korcsoportokban magas volt, aztán csökkent. Az IFN γ :IL-4 arány, amit a Th1/Th2 egyensúly jellemzésére alkalmaztunk, szignifikánsan magasabb volt az egy hónaposnál idősebb egerekben. Habár találtunk szignifikáns eltéréseket, de nem sikerült egyértelmű összefüggést kimutatnunk a szérum citokinek és a klinikai paraméterek között. Ezzel ellentétben szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szérum antitestek szintje és a betegség súlyossága (artrítisz pontszám) között.

IV.2.3. A PLF-, lép- és vér sejtjes összetételének életkor függő változásai naív, nem immunizált egerekben

A következőkben jellemeztük azokat a sejtpopulációkat, amelyek részt vehetnek az immunválasz szabályozásában és így befolyásolhatják az artrítisz iránti fogékonyságot és annak súlyosságát: ezért megvizsgáltuk a T- és antigén prezentáló sejtek alcsoportjait (B sejtek, dendritikus sejtek és makrofágok) azokban a szöveti kompartmentekben, amik az immunizálás során antigén hatásnak vannak kitéve.

A vérben a T sejtek aránya jelentősen csökkent, ezen belül viszont az aktivált/memória : naív CD4⁺ sejtek aránya viszont nőtt az öregebb egerekben, ezzel szemben nem találtunk eltérést ezekben a sejtpopulációkban a PLF-ben és a lépben a különböző korcsoportok között. A CD28 expressziója a CD4⁺ T sejteken csökkent a PLF-ben az életkor előrehaladtával, de változatlan maradt a vérben és a lépben. A CD4⁺ T sejtek CD28 expressziója a PLF-ben volt a legmagasabb az 1- 3 hónapos egerekben. A Treg arány életkor függő módon csökkent a PLF-ben és a vérben, de nőtt a lépben.

Az APC-kben szintén változásokat tapasztaltunk: a konvencionális B sejtek aránya nőtt az első 5 hónap során, főképp a PLF-ben. A B1 sejtek minden vizsgált életkorban jelentős arányban voltak jelen a PLF-ben, de a lépben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk 1 és 3 hónapos kor között. A makrofágok és dendritikus sejtek aránya csökkent 1 és 5 hónapos kor között a PLF-ben, míg a lépben hasonló maradt.

IV.2.4. A Treg és aktivált T sejtek aránya PG immunizálás hatására életkor függő változást mutatott

Végül megvizsgáltuk, hogy a PG immunizálás hatására hogyan változik a Treg (CD25^{high}FoxP3⁺) ill. aktivált (CD25^{high}) CD4⁺ T sejtek aránya a különböző korú egerekben, illetve hogy ezek a változások megfelelnek-e az artritisz iránti fogékonyságban talált eltéréseknek.

A Treg/Takt arány csökkent a PLF-ben az immunizálási protokoll végére a kontrol, nem immunizált csoporthoz képest. Az egy hónapos korcsoportban a PLF-ben volt egy átmeneti Treg növekedés a második immunizálást követően a többi korcsoporthoz viszonyítva. A lépben, a Treg/Takt arány szignifikánsan alacsonyabb volt a 4-11 hónapos korcsoportban, mint a fiatalabb egerekben és további csökkenést mutatott az immunizálás alatt. A második immunizálást követően bár a Treg sejtek aránya is nőtt az öregedő egerek PLF-ben, de az aktiválódott (CD25^{high}CD4⁺) T sejtek aránya a PLF-ben és a lépben sokszorososa volt a 4-11 hónapos korcsoportban, mint az 1 hónapos egerekben. Ez a megfigyelés azt támasztja alá, hogy a Treg/Takt arány fokozatos csökkenése inkább a PG-specifikus aktivált T sejtek expanziójának köszönhető, mint a Treg sejtek kismértékű emelkedésének.

Mindezek alapján arra következtetünk, hogy az "immunöregedés" fiziológiás folyamata megváltoztatja az idősebb egyedek immunregulációs funkcióit. A fentiekben sikerült azonosítanunk néhány olyan tényezőt az életkor függő autoimmunitásra mutatott predispozícióban BALB/c egerekben, amelyek meghatározhatják az artritisz iránti fogékonyságot és a betegség súlyosságát. A T sejt APC kölcsönhatásokban, és a Treg sejtek csökkent képződésében tapasztalt komplex életkor függő változások vezethetnek a károsodott immunregulációhoz és autoimmun betegség (PGIA) kialakulásához, ami miatt ez az egér modell még inkább hasonlóságot mutat a humán RA-val.

IV.B. A T SEJT AKTIVÁCIÓ ÉS -APOPTÓZIS VÁLTOZÁSAI AUTOIMMUN ARTRITISZBEN

IV.3. A károsodott aktiváció indukált sejthalál elősegíti a spontán artritisz kialakulását humán porc PG antigén specifikus T sejt receptor transzgenikus egérben

A PGIA-ban végzett epitóp térképezési vizsgálatok azonosítottak egy domináns artritogén epitópot az aggregán molekula G1 doménjében, amit 5/4E8-nak ((ATEGRVVRVNSAYQDK), a core peptid aláhúzva) nevezünk. Az 5/4E8 peptidre specifikus T sejt hibridóma felhasználásával TcR transzgenikus egeret készítették (az alábbiakban "PG-TcR-Tg" egér). A BALB/c egerekkel összehasonlítva, a PG-TcR-Tg egerekben súlyosabb artritisz alakult ki PG immunizálás hatására. Mivel a T sejt autoreaktivitás központi szerepet játszik a RA etiológiájában és patomechanizmusában, valamint a betegségnek megfelelő egér modellekben, ezért az (auto)antigén specifikus TcR jelátvitel különös érdeklődésre tart számot. Ezek miatt a PG-TcR-Tg BALB/c egér különösen alkalmas a T sejt aktiváció vizsgálatára saját peptidekkel éppúgy mint az autoreaktivitás és az artritisz kialakulásának tanulmányozására. Az IL-4 egy anti-inflammatorikus citokin, amely számos gén expresszióját szabályozza a STAT-6 aktivációján keresztül. Mind az IL-4 mind a STAT-6 hiánya BALB/c egerekben fokozta a PGIA súlyosságát. Az IL-4 AICD-ben betöltött szabályozó szerepét szintén kimutatták korábban. Következésképp, az autoepitóp specifikus (PG-TcR-Tg) CD4⁺ T sejtek az IL-4 hiányával kombinálva különösen az artritisz érzékeny BALB/c genetikai háttérben fokozott autoimmun válaszhoz vezethet.

IV.3.1. A PG-TcR-Tg egerekben spontán artritisz alakul ki idős korban

A homozigóta PG-TcR-Tg egerekben 5-6 hónapos koruktól kezdve gyulladás alakult ki az interphalangeális ízületekben. Az incidencia a kezdeti 10-20%-ról 6 hónapos korban fokozatosan nőtt ~40%-ig 12 hónapos korra. A gyulladás típusosan a disztális interphalangeális ízületekben kezdődött, először a hátsó, majd ~2 héttel később az első végtagokon. Ahogy az egerek öregedtek, további (proximális) interphalangeális ízületek gyulladtak be, amiket a metacarpophalangeális és metatarsophalangeális, majd a carpometacarpális és tarsometatarsalis ízületek követtek. Utoljára a gyulladás a proximális ízületekre (csukló, boka) is kiterjedt idősebb állatokban, főleg azokban, ahol a legkorábban kezdődött az artritisz.

IV.3.2. A spontán artritiszes PG-TcR-Tg egerek immunológiai jellemzése

A CD69^{high}- vagy CD25^{high}- (aktivált) vagy CD44^{high} (aktivált/memória) transzgenikus CD4⁺ T sejtek életkor függő expanziója, a CD62L^{high} (naív) populáció csökkenésével (4.6. táblázat) optimális miliót biztosíthat az autoimmunitás kialakulásához. Nem találtunk szignifikáns különbséget a lépsejteken a 5/4E8 epitóp peptid indukált proliferációban fiatal vagy öreg (artritiszes vagy még tünetmentes) egerek között. A legtöbb *in vitro* stimulált lépkultúrákból mért citokin esetében is hasonló volt a helyzet az IFN γ kivételével, ami szignifikánsan magasabb volt a 12 hónapos egerekben, mint a fiatalokban.

IV.3.3. A spontán artritisz incidenciája és az autoreaktív CD4⁺ T sejtek frekvenciája magasabb volt a PG-TcR-Tg/IL-4^{-/-} egerekben, mint a PG-TcR-Tg/IL-4^{+/+} egerekben

Mivel korábbi vizsgálatokban az IL-4 befolyásolta az artritisz súlyosságát, ezért kereszteztük a PG-TcR-Tg egereket IL-4 knock-out egerekkel (mindkettő BALB/c genetikai háttérben) hogy megvizsgáljuk vajon az IL-4-nek van-e szabályozó szerepe a spontán artritiszben. A PG-TcR-Tg/IL-4^{-/-} egerek ~10%-ban alakult ki az interphalangeális ízületek gyulladása 4 hónapos korban, ami fokozatosan emelkedett ~60%-ig a 12 hónapos egerekben. Ez a változás a betegség kezdetében és incidenciájában azt mutatja, hogy az IL-4-nek szabályozó szerepe van a spontán artritiszben, ezzel együtt a makroszkópos- és a hisztopatológiai elváltozások hasonlóak voltak.

IV.3.4. Az antigén specifikus AICD zavara elősegítheti a spontán artritisz kialakulását a PG-TcR-Tg BALB/c egerekben

Mivel a PG-TcR-Tg egerekben öregebb korokban spontán artritisz alakult ki és ezt az aktiválódott T sejtek felhalmozódása kísérte, ezért a következőkben vizsgáltuk az 5/4E8-epitóp-specifikus TcR jelátvitel indukálta apoptózist, valamint az IL-4 szabályozó szerepét a TcR jelátvitelben és apoptózisban a PG-TcR-Tg/IL-4^{-/-} egerek felhasználásával. A PG-TcR-Tg egerekből származó CD4⁺ T sejtek 60-70%-a AnnexinV pozitív volt 2 nap 5/4E8 peptid stimulációt követően az IL-4 jelenlététől függetlenül. A korai apoptotikus sejtek aránya még mindig 50% fölött volt a 3. napon a PG-TcR-Tg/IL-4^{+/+} egerek T sejtjei esetében, míg a PG-TcR-Tg/IL-4^{-/-} egerekből származó T sejtek esetében ez lecsökkent 30-40%-ra. Mindkét időpontban (de főleg a 3. napon) szignifikánsan több élő és kevesebb késői apoptotikus sejt volt az IL-4 hiányában. Végül megvizsgáltuk, hogy az apoptózisban kapott IL-4 függő különbségeket a TcR jelátvitel erőssége magyarázhatja-e. A ZAP-70 és ERK-1/2, amelyek központi szerepet töltenek be a TcR jelátvitelben, foszforilációja a lépből izolált CD4⁺ T sejteken 2 óránál érte el a csúcst az 5/4E8 peptid stimuláció során. Az IL-4 hiányában a ZAP-70 foszforilációja jelentősen alacsonyabb volt, míg az ERK-1/2 esetében csak kismértékű csökkenést mutatott.

Ezek alapján arra következtetünk, hogy a PG-TcR-Tg egerekben életkor függő módon kialakuló spontán artritisz hátterében a tartósan fennálló alacsony erősségű T sejt aktiváció áll amit a felszabaduló porc komponensek tarthatnak fenn és az AICD zavara egészíti ki. Megerősítettük az IL-4 szabályozó szerepét az antigén specifikus AICD-ben a TcR aktiváció két kulcsfontosságú résztvevőjén, a ZAP-70-en és az ERK-1/2-n keresztül.

IV.4. A T sejt receptor (TcR) jel erőssége befolyásolja az artritisz súlyosságát PG-specifikus TcR transzgenikus egérben

A fenti PG-TcR-Tg egerek (innentől "TcR-TgA" megjelöléssel) létrehozásakor, ugyanazzal a konstrukcióval létrehoztak egy második transzgen egértörzset is (innentől "TcR-TgB" megjelöléssel), aminek a pontosabb jellemzése még nem történt meg. Mivel a TgA és a TgB egerek ugyanarra az epitópra (5/4E8) specifikus TcR-t hordoznak, ezért azt gondoltuk, hogy a PG aggregán- vagy rhG1 immunizálás hatására hasonlóan fog az autoimmun artritisz kialakulni bennük. Ezzel ellentétben, a TcR-TgB törzsben jóval később kezdődő és enyhébb artritisz alakult ki, mint a TcR-TgA-ban, akár teljes PG aggregán kivonattal, akár rhG1-el immunizáltunk, ráadásul spontán artritisz sem alakult ki az idősebb állatokban úgy mint ahogy a TcR-TgA egerekben korábban megfigyeltük (lásd fenn IV.3. fejezet). A jelenlegi tanulmány célja az volt, hogy felderítsük mi állhat ezeknek a különbségeknek a hátterében.

IV.4.1. Az artrítisz kialakulásának időpontja és súlyossága különböző a két PG-specifikus TcR Tg egértörzsben

A két PG-TcR-Tg egértörzsben párhuzamosan indukáltunk GIA-t: a TcR-TgA törzs a várakozásainknak megfelelően reagált az rhG1 immunizálásra: az artrítisz már a második oltás után néhány nappal kezdett megjelenni, és 2 héttel a második oltást követően már elérte a maximális súlyosságot és a 100%-os incidenciát. A TcR-TgB egerek adatai viszont inkább a vad típusú kontrol BALB/c egerekhez hasonlítottak: későbbi kezdettel és alacsonyabb súlyossági pontszámmal, mint a TcR-TgA egerekben láttunk. Ez az eredmény azért volt meglepő, mivel mindkét törzsben a CD4⁺ T sejteknek közel azonos hányada (90-95%) hordozta a transzgenikus TcR-t. Ezzel párhuzamosan, a rhG1 specifikus antitestek szintje is alacsonyabb volt a TcR-TgB egerekben.

IV.4.2. A T sejtek aktivációs markereinek és kostimulációs molekuláinak összehasonlítása az immunizálás során a TcR-TgA és TcR-TgB egerekben

A CD4⁺ T sejteken kifejeződő aktivációs markerek (CD25 és CD44) százalékos aránya a lépben és a nyirokcsomókban az immunizálási időszak szinte minden időpontjában magasabb volt a TcR-TgA egerekben. A naív (nem immunizált) TcR-TgB egerekben 3-4-szer több ICOS^{high}CD4⁺ T sejtet találtunk, mint a TcR-TgA egerekben. Viszont amíg az immunizálás hatására a TcR-TgA egerekben az ICOS^{high}CD4⁺ T sejtek arányának folyamatos emelkedését tapasztaltuk, addig a TcR-TgB egerekben az ICOS^{high}CD4⁺ T sejtek aránya nagyon alacsony szintre süllyedt az első rhG1 immunizálást követően és ezen a szignifikánsan alacsonyabb szinten maradt a legtöbb vizsgált időpontban.

IV.4.3. Gyorsult *in vitro* apoptózis a TcR-TgB CD4⁺ T sejtekben

Az AICD csökkenése az artritogén T sejtekben lehet az egyik mechanizmus az artrítisz kialakulásában, továbbá az öregedő TcR-TgA egerekben, ahol a T sejt apoptózis csökkent, spontán artrítisz kialakulását is megfigyeltük (lásd a IV.3. fejezetben). Ezek alapján feltételeztük, hogy a két vonal között fennálló különbségek hátterében a T sejtek aktivációjának és apoptózisának eltérései állhatnak. A korai apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a TcR-TgB egerekből gyűjtött T sejtekben az egész immunizálási időszak alatt, míg a TcR-TgA egerekből származó T sejt kultúrákban minden időpontban szignifikánsan több élő sejtet detektáltunk.

IV.4.4. Magasabb TcR expresszió és TcR jel erősség a TcR-TgB egerek CD4⁺ T sejtjeiben, mint a TcR-TgA egerekben

Az AICD-t a TcR jel erőssége és a kostimulációs jelek együttesen befolyásolják. Habár a két törzs T sejt receptora ugyanarra az epitópra specifikus (ugyanaz a transzgen konstrukció), külön-külön hozták létre őket. Ebből kifolyólag lehetséges volt, hogy a két törzsben a TcR expresszió a CD4⁺ T sejteken különbözik. Ennek igazolására a TcR V β 4-, CD3- és CD4-expresszióját áramlási citometriás szaturációs kötési teszttel vizsgáltuk és azt találtuk, hogy a TcR-TgB egerek kétszer annyi TcR V β 4-t és CD3-t expresszáltak, mint a TcR-TgA egerek, viszont a CD4 expresszió szintje hasonló volt. Ezt qPCR vizsgálattal is megerősítettük.

A magasabb TcR expresszió, a későbbi kezdetű és enyhébb artrítisszel valamint az AICD-ben talált különbségek alapján a következőkben összehasonlítottuk a két törzsben a TcR által kiváltott jelátvitelt. Egy órás TcR specifikus peptid stimuláció hatására a ZAP-70- és a p38 foszforilációja szignifikánsan magasabb volt a TcR-TgB egerek CD4⁺ T sejtjeiben, mint a TcR-TgA-ban, míg az ERK-1/2 foszforiláció hasonló volt.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a TcR jel erőssége szabályozza az artrítisz iránti fogékonyságot a két PG-specifikus TcR transzgen egér vonalban. A jelátviteli molekulák eltérő foszforilációja magyarázatot adhat az artrítisz érzékenységben talált különbségekre. A két egértörzsben talált eltérő szintű TcR expresszió szignifikáns különbségekhez vezetett a TcR jel erősségében. A TcR-TgA egerekben az "erős" PG (5/4E8) specifikus TcR jel optimális szintű T sejt aktivációhoz vezetett, ami a vad típusú BALB/c egerekhez képest egy "szuper-artrítisz" fenotípust eredményezett. Ezzel ellentétben, a TcR-TgB egerekben, ahol "túlzottan erős" volt a TcR jel, valószínűleg a magasabb TcR expresszió miatt, már *in vivo* T sejt apoptózist okozott és ezért csökkent az artrítisz súlyossága. Azaz az artrítisz súlyosság és TcR jel erősség közötti összefüggés nem lineáris: a gyengébb jel (a TcR-TgA egerekben) optimálisabb az autoreaktív T sejtek aktivációjában.

IV.5. A ZAP-70 szabályozza az autoimmun artrítiszt a T sejt aktiváción és apoptózison keresztül

A ZAP-70 kináz a TcR jelátvitelben kulcsfontosságú szerepet tölt be, aminek a hiányában súlyos kombinált immundeficiencia alakul ki emberben és egérben egyaránt, mivel a T sejtek fejlődése a thymusban leáll a kettős pozitív ($CD4^+CD8^+$) stádiumban és így a perifériás nyirokszervekben nem találhatóak érett $\alpha\beta$ T sejtek egérben, míg emberben csak $CD4^+ \alpha\beta$ T sejteket figyeltek meg, amelyeknek a funkciója károsodott. Előzetesen, a ZAP-70 molekula autoimmunitásban betöltött szerepét már megmutatták egy jól jellemzett spontán egér artrítisz modellben, az SKG egerekben (lásd fenn a I.3. fejezetben). Jelen munkánkban az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk hogyan befolyásolja a T sejt aktivációt és apoptózist, ha csökkenés következik be a TcR jelpályában (a ZAP-70 részleges hiánya miatt) és ez hogyan befolyásolhatja az autoimmun artrítisz kialakulását.

IV.5.1. A ZAP-70 részleges hiánya csökkenti az autoimmun artrítisz súlyosságát

Azért, hogy megvizsgáljuk, hogy a ZAP-70 részleges hiánya hogyan befolyásolja az autoimmun artrítisz patogenezisét, ZAP-70^{+/-} heterozigóta egereket teszteltünk a GIA modellben. Ezekben a ZAP-70^{+/-} heterozigóta egerekben az immunhiányos állapot nem annyira nyilvánvaló, mint a ZAP-70^{-/-} homozigóta társaikban, mivel rendelkeznek érett $\alpha\beta$ T sejtekkel perifériás limfoid szöveteikben, habár szignifikánsan alacsonyabb számban és enyhén emelkedett B sejt számmal. A heterozigóta egerek ZAP-70 expressziója körülbelül fele a vad típusú társaiknak amit mind áramlási citometriás mind pedig Western-blot mérésekkel alátámasztottunk. A GIA indukció során a részlegesen ZAP-70 hiányos egerek súlyossági pontszámai nagyon hasonlóak voltak a kontrolokhoz a kísérlet korai szakaszában, később azonban, az 52. napot követően már szignifikánsan enyhébb volt az ízületi gyulladás a ZAP-70^{+/-} csoportban, amit *in vivo* biolumineszcens képalkotó vizsgálattal is meg tudtunk erősíteni.

IV.5.2. A G1 specifikus immunválasz összehasonlítása ZAP-70^{+/-} és kontrol egerekben

Az artritiszes ZAP-70^{+/-} egerekből izolált lépsejtek szignifikánsan alacsonyabb proliferációt mutattak és kevesebb IL-4, IL-6 és IFN γ citokineket termeltek az rhG1 stimulációra, mint az artritiszes BALB/c egerek lépsejtjei. A G1 specifikus antitest szint alacsonyabb volt a ZAP-70^{+/-} heterozigóta egerek szérumában, mint a kontrolokéban, az IL-6 viszont kismértékben emelkedett.

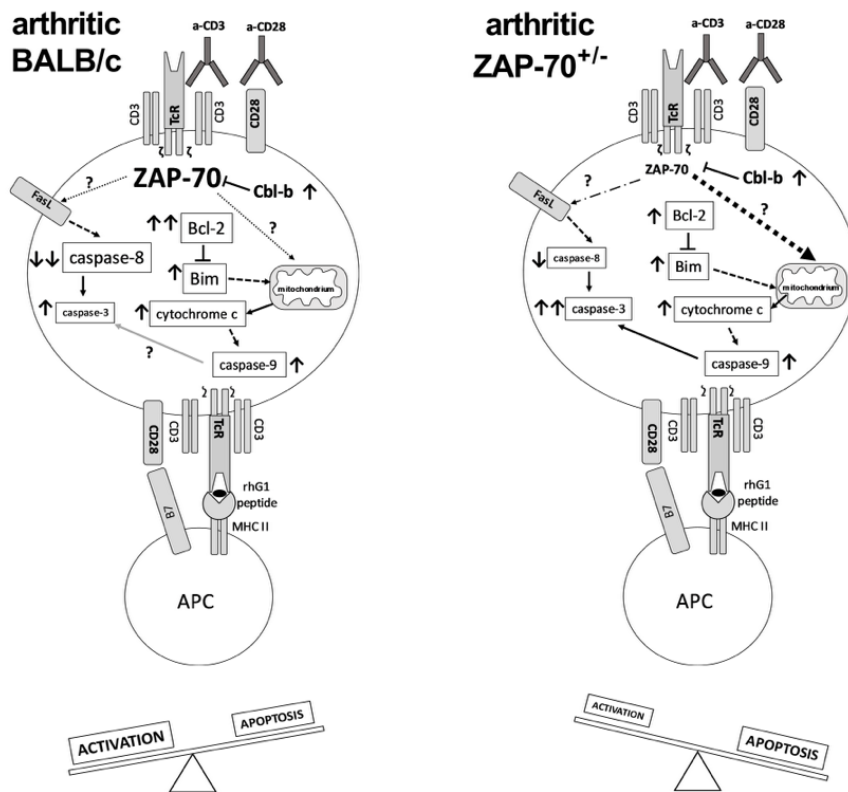
IV.5.3. Megváltozott Th1/Th17 polarizáció a részlegesen ZAP-70 hiányos egerekben

Az artritiszes egerekben szignifikánsan több Th1- és Th17 sejt volt, mint az egészségesekben, de a BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek között nem találtunk jelentős különbséget.

IV.5.4. A ZAP-70^{+/-} egerekben megváltozott az T sejt aktiváció és apoptózis

Mivel a ZAP-70 fontos szerepet tölt be a T sejtek aktivációjában, végül azt akartuk megvizsgálni, hogy a klinikai képből látott különbségek hátterében állhatott-e a ZAP-70 részleges hiánya miatt a T sejtekben megváltozó aktiváció/apoptózis. Az *in vitro* anti-CD3/anti-CD28 stimulációt követően hasonló tirozin foszforilációs mintázat alakult ki az egészséges BALB/c- vagy ZAP-70^{+/-} egerekből izolált T sejtekben. Az artritiszes BALB/c- vagy ZAP-70^{+/-} egerekből izolált T sejtekben azonban fokozott tirozin foszforilációt találtunk mint az egészségesekben. Kiemelendő, hogy az artritiszes ZAP-70^{+/-} egerekből izolált T sejtekben alacsonyabb mértékű volt a tirozin foszforiláció, mint az artritiszes BALB/c egerekében.

Mivel az aktiváció indukált sejthalál kritikus szerepet tölt be az immunválasz down-regulációjában, és a szabályozásában bekövetkező zavarokat feltételezik bizonyos autoimmun betegségek hátterében is, ezért a következőkben megvizsgáltuk az apoptózis kaskád molekuláris résztvevőit. Ezeknek az összefoglalását a 2. ábrán mutatom be. Erdeményeink alapján arra következtettünk, hogy a ZAP-70 megváltoztatja a T sejtek aktivációja és apoptózisa közti egyensúlyt (2. ábra). Az artritiszes BALB/c egerekben a T sejt aktiváció/apoptózis az aktiváció felé tolódott, ami súlyos artrítisz kialakulásához és a patogén T sejtek felhalmozódásához vezet. Ugyanakkor, a részlegesen ZAP-70 hiányos egerekben a T sejt aktiváció csökkent és az apoptotikus folyamatok sokkal kifejezettebbek, ami enyhébb ízületi gyulladáshoz vezet (2. ábra). Munkánk világosan bemutatja a ZAP-70 jelentőségét a TcR függő aktivációs- és apoptózis útvonalak szabályozásában autoimmun artrítiszben.



2. ábra A T sejt aktiváció és apoptózis változásainak feltételezett modellje a ZAP-70 részleges hiányában. Az artritiszes BALB/c egerek T sejtjeiben emelkedett Cbl-b, Bcl-2, Bim, citokróm C, kaszpáz-3 és -9 és csökkent kaszpáz-8 szintet találtunk, ami az aktiváció irányába tolta az egyensúlyt. Az artritiszes ZAP-70^{+/-} egerek T sejtjeiben a Cbl-b, Bcl-2, Bim, citokróm C, kaszpáz-3 és -9 szintje emelkedett stimulációt követően ami az egyensúlyt az apoptózis mitokondriális útja felé módosította. Az ábrán feltüntetett molekulák nevének mérete a Western-blot kísérletekben talált expressziós szinteknek felelnek meg, míg a nyilak a megfelelő nem stimulált mintákhoz képest bekövetkező változást jelzik. A pontozott- vagy szaggatott nyilak az extrinzik vagy receptor-független apoptózis útvonalak lehetséges összefüggéseit jelzik. [Kugyelka R, Prenek L, Olasz K, Kohl Z, Botz B, Glant TT, Berki T, Boldizsár F. ZAP-70 Regulates Autoimmune Arthritis via Alterations in T Cell Activation and Apoptosis. *Cells*. 2019 May 24;8(5):504. doi: 10.3390/cells8050504.]

IV.6. A T sejt hiány helyreállítása ZAP-70 knock-out egerekben thymocyták egyszerű intraperitoneális adoptív transzferével

Ahogy a fenti tanulmányban ismertettük, a ZAP-70^{+/-} egerek nem mutatnak jelentős immunhiányt, és a GIA is kiváltható volt bennük, habár kissé enyhébb formában, mint a vad típusú társaikban. Viszont a ZAP-70^{-/-} egerek T sejt immunhiánnyal rendelkeznek, ami miatt élettartamuk normál (nem SPF) körülmények között viszonylag rövid (7-10 hét). A ZAP-70 hiány által okozott T sejt defektus helyreállítására korábban számos kísérlet történt: hemopoetikus őssejtekkel intravénás vagy intratímikus bevitellel illetve különböző virális génbeviteli eljárásokkal. Mivel a timociták adoptív transzferével kapcsolatban viszonylag kevesebb irodalmi adat állt rendelkezésre, ezért az ip. timocita transzfer tesztelését tűztük ki célul.

IV.6.1. A T sejtek rekonstitúciója ZAP-70^{-/-} egerekben ip. timocita transzfer követően

A T sejt hiány korrekciójára a ZAP-70^{-/-} egerekben kipróbáltuk, hogy vad típusú egerekből származó timociták intraperitoneális (ip.) transzfer alkalmas módszer lehet-e a T sejtek helyreállítására. Ehhez 5-10 millió timocitát adtunk be a 3-4 hetes recipiens egerekbe a peritoneális üregbe majd vizsgáltuk a vér és a perifériás limfoid szövetek T sejt tartalmát. Mivel a ZAP-70^{-/-} egerekben lényegében nincs érett T sejt a perifériás szövetekben (lásd fenn IV.5. fejezet), ezért a T sejtek megjelenése biztosan jelzi az adoptív transzfer hatékonyságát. Először is vizsgáltuk a T sejtek arányát a vérben: már 10 nappal az ip. timocita transzfer követően T sejtek jelentek meg a vérben (~4%) és ez az arány stabilan 4-6% között maradt a nyomkövetésünk során (120 nap). 4 hónappal a transzfer után a recipiens egereket feláldoztuk és a nyirokcsomóikból és a lépből végzett szövettani vizsgálatokat megerősítették, hogy a periférián

valóban megjelentek a T sejtek, amit a helyreálló T sejt terület mutattak. Továbbá igazoltuk, hogy az ip. timocita transzfert követően a T sejtek több mint 80%-a $\alpha\beta$ TcR-t expresszált a vérben, a nyirokcsomókban és a lépben. Bizonyos esetekben az egereket 12 hónapig követtük és a transzfer stabilan fennált még ilyen hosszú időtartamon keresztül is, amit a jelentősen meghosszabodott túlélésük is bizonyított. A tímusz vizsgálata azt mutatta, hogy a transzferált egerekben $CD4^+$ és $CD8^+$ egyszeresen pozitív sejtek jelentek meg, ami a T sejt képzés helyreállítását jelezte.

IV.6.2. A T sejt helyreállítás korai kinetikája a perifériás limfoid szövetekben az ip. transzfert követően

A vérben a T sejtek aránya 5,5%-t ért el a 24. napra, majd kissé csökkent a 31. napon. A lépben egy hirtelen növekedést tapasztaltunk a 10. és 24. nap között, amit további növekedés követett a 31. napig. Azt gondoljuk, hogy ez egyrészt a T sejtek thymus felőli beáramlásának, másrészt pedig a T sejtek lokális expanziójának lehetett köszönhető. A nyirokcsomókban csak nagyon kis változást mértünk (4-5% között mozgott) a vizsgált időszakban, bár a kezdő időpontban itt volt a legmagasabb a T sejtek aránya valószínűleg a $\gamma\delta$ T sejtek jelenléte miatt. A 4. napon a vérben, a nyirokcsomókban és a lépben található T sejtek nagy része még $\gamma\delta$ T sejt volt, amiknek az aránya fokozatosan csökkent a 24. napig, ezzel párhuzamosan az $\alpha\beta$ T sejtek aránya pedig fokozatosan nőtt.

IV.6.3. A thymusban zajló korai változások az ip. timocita transzfert követően

Azért, hogy lássuk milyen változások zajlanak a tímuszban az első 4 hétben az ip. timocita transzfert követően, megvizsgáltuk a timocita alcsoportokat a 0., 4., 10., 17., 24. és 31. napokon. Az ip. timocita transzfert követően, a $CD4^-CD8^-$ DN timociták aránya megemelkedett a 17. napra, míg a $CD4^+CD8^+$ DP sejtek aránya csökkent. Ezzel párhuzamosan a $CD4^+$ vagy $CD8^+$ SP sejtek aránya a 4. nap után nőni kezdett és a 17. napra érte el a csúcát, ami a T sejt fejlődés helyreállítását mutatta. Érdekes módon a timocita alcsoportok összetétele a 24. napra visszatért a kiindulási arányokhoz. A továbbiakban megvizsgáltuk a tímusz szövettani szerkezetét is. A ZAP-70^{-/-} egerek tímuszában nincs rendezett medulláris terület, ezzel szemben az ip. timocita transzfert követő 17. napon medulla "foltok" jelentek meg a tímuszban.

IV.6.4. A donor eredetű T sejtek kimutatása GFP transzgenikus timocita transzferével

Ahhoz, hogy bizonyítsuk, hogy a fent leírt T sejt populáció az ip. timocita transzfert kapott egerekben valóban kimérizmus kialakulásának volt köszönhető, a következő kísérletekben GFP transzgenikus egerekből származó donor timocitákat használtunk fel. Hét és 12 héttel a transzfert követően a vérben, nyirokcsomókban és a Peyer plakkokban megjelenő T sejtek 70-90%-a GFP pozitív volt, a lépben a PALS régióban láttunk GFP pozitivitást, míg a tímuszban erős GFP expressziót tudtunk kimutatni RT-PCR segítségével.

IV.6.5. A T sejtek helyreállítása funkcionális T sejtek képződését eredményezte

Habár a transzferált egerek szignifikánsan meghosszabodott élettartama már azt mutatta, hogy a T sejtek helyreállítása az immundeficiencia korrekciójához vezethetett, de közvetlenül is vizsgáltuk a T sejtek funkcióját. A transzferált egerekből származó T sejtek anti-CD3/CD28 stimuláció hatására hasonló aktivált tirozin-foszforilációs mintázatot és proliferációs képességet mutattak mint a vad típusú egerekből származó kontrol T sejtek, azaz a donor eredetű T sejtek funkciója normális volt.

IV.6.6. A donor timociták a az omentumon található "milky spot"-on keresztül hagyják el a peritoneális üreget

Annak a tisztázására, hogy vajon milyen útvonalon hagyhatják el a donor timociták a peritoneumot CFSE jelölt donor timocitákat adtunk be ip. a recipiens egerekbe. Miután megvizsgáltuk a peritoneum különböző részeit és a környező elvezető nyirokcsomókat, azt találtuk, hogy a jelölt sejtek fő gyülekezési helye az omentum volt és az innen izolált limfociták többsége $CD4^-CD8^-$ DN fenotípusú volt. Az omentumból készített whole mount készítményben az látszott, hogy a CFSE⁺ sejtek aggregátumokban helyezkedtek el fibronectin pozitív területeken, amiket "milky spot"-okként azonosítottunk.

A recipiens peritoneumába befecskendezett timociták egy kevert sejtsoportot alkottak, amiben mind éretlen (DN és DP) mind pedig érett SP sejtek voltak. Azt feltételezzük, hogy az a kevert sejtpopuláció komplex módon repopulálta a recipiens limfoid szövetét: az

érett SP sejtek valószínűleg képesek voltak belépni a perifériás limfoid szervekbe/szövetekbe, ahol történhet egy homeosztatisz expanzió, ami viszonylag gyorsan helyreállíthatja az immunológiai funkciókat és elősegítheti a túlélést. Ezzel szemben az éretlen sejtek valószínűleg rendelkeznek a képességgel, hogy repopulálják a primer limfoid szerveket és ezáltal egy hosszú távú (hónapokig fennmaradó) stabil T sejt képzést hozzanak létre.

IV.C. A LÉP IMMUNOLÓGIAI SZEREPE AUTOIMMUN ARTRITISZBEN

A lép a legnagyobb másodlagos nyirokszerv, ami jelentős szerepet játszik mind a veleszületett-, mind pedig az adaptív immunválaszban, emellett kritikus a szerepe a B sejtek érésében is, beleértve a B1-, B2- és marginális zóna B (MZB) sejteket, és egyedülálló módon, minden perifériás B sejt alpopuláció (B1a/b, B2, marginális zóna (MZ) B sejt) megtalálható benne. A lép szerepe jól ismert a vörösvérsejtek lebontásában és a vérből származó patogénekkal - főleg a tokkal rendelkező baktériumok - szembeni immunválaszban. Nem sokat tudunk azonban a lép pontos funkciójáról RA-ban, bár olyan egér modellekből, mint a GIA és a CIA sejtethetjük a lehetséges részvételét: megnövekedett a mérete és több aktiválódott sejtet találunk benne mind GIA mind CIA egerekben.

IV.7. Enyhébb autoimmun artritisz és csökkent B sejt receptor függő Ca^{2+} beáramlás Nkx2-3 knock-out egerekben

A Nirenberg-Kim (NK) 2 homeobox 3 (Nkx2-3) homeodomén transzkripció faktor elengedhetetlen szerepet tölt be a lép, a Peyer-plakkok és a vékonybél valamint az bél limfoid szöveteinek fejlődésében. Az Nkx2-3 fontos szerepet tölt be a lép szerkezetének a kialakulásában és funkciójában, mivel szabályozza a B sejt éréshez- és a T sejt függő (TD) immunválaszhoz szükséges megfelelő mikrokörnyezetet. Hiánya rendezetlen csiraközpont (GC) képződéshez vezet, ami abnormalis másodlagos B sejt érést és csökkent antitest termelést okoz minimális affinitás érésel. Az Nkx2-3 hiányos (Nkx2-3^{-/-}) egerek vagy teljesen aszpleniásak vagy szignifikánsan csökkent a lépük mérete és hiányzik a marginális zóna. Jelen munkánk célja az volt, hogy felderítsük az Nkx2-3 hiány hatását GIA-ban, és tanulmányozzuk az Nkx2-3 hiányának hatását a B sejtek jelátvitelében és aktivációjában.

IV.7.1. Az rhG1-indukált artritisz súlyossága és incidenciája csökkent az Nkx2-3 knock-out egerekben

Mivel az Nkx2-3 knock-out egerekben súlyos lép fejlődési defektus figyelhető meg, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a GIA kiváltható-e bennük. Az Nkx2-3^{-/-} egerekben is kialakult az artritisz, de alacsonyabb súlyossággal és incidenciával, mint a BALB/c kontrolokban, továbbá az Nkx2-3^{-/-} egerek lábán szignifikánsan csökkent duzzanatot mértünk.

IV.7.2. Mikro CT vizsgálatok megerősítették a csökkent porc- és csont destrukciót az Nkx2-3 knock-out egerekben

Az RA nemcsak az ízületi porcot károsítja, hanem típusos elváltozások a csont vesztés, oszteofita kialakulás és, főleg a betegség késői stádiumaiban, ankilózis kialakulása. Ezeknek a megvizsgálására mikro-CT vizsgálatot végeztünk az artritiszes Nkx2-3^{-/-} és BALB/c egerekben. A BALB/c kontrol egerekben jelentős volt az oszteofita képződés és a csontfelszínnek szabálytalanokká váltak főleg a tarzális és metatarzális területeken. Ehhez képest az Nkx2-3^{-/-} egerekben jóval kisebb volt a csont károsodás és csökkent a periartikuláris gyulladós oszteoporózis mértéke is.

IV.7.3. A G1 specifikus immunválasz összehasonlítása Nkx2-3^{-/-} és BALB/c egerekben

Az Nkx2-3^{-/-} egerekben talált enyhébb- és alacsonyabb incidenciájú artritisz alapján a következőkben megvizsgáltuk az rhG1 antigénnel szembeni immunválaszt, hogy mennyiben feleltethető meg a klinikai képnek. Az *in vitro* vizsgálatokban kettéosztottuk az Nkx2-3^{-/-} egereket artritiszes és nem artritiszes csoportokra, azért hogy láthassuk az immunológiai paraméterekben fennálló esetleges különbségeket. Szignifikánsan csökkent proliferációs aktivitást mértünk *in vitro* lép sejt kultúrákban mind az artritiszes-, mind a nem artritiszes Nkx2-3^{-/-} csoportban az artritiszes BALB/c-hez viszonyítva. Az Nkx2-3^{-/-} egerek lép sejtjei szignifikánsan kevesebb IL-4-t, IL-6-t és IFN γ -t és szintén kevesebb (de nem szignifikánsan) IL-17-t termeltek, mint a BALB/c lép sejtek.

A szérumban az anti-rhG1- és anti-CCP IgG1 szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a nem artritiszes Nkx2-3^{-/-}, mint az artritiszes BALB/c kontrol egerekben. Az artritiszes Nkx2-3^{-/-} egerekben hasonló volt az anti-rhG1- és anti-CCP IgG1 antitestek szintje, mint a BALB/c kontrolokban. Továbbá az anti-CCP IgG2a szintek alacsonyabbak voltak (bár nem szignifikáns mértékben) az Nkx2-3^{-/-} egerekben - függetlenül attól, hogy artritiszesek voltak vagy nem - mint a BALB/c kontrolokban. Ahogy vártuk, a nem artritiszes Nkx2-3^{-/-} egerekben alacsonyabb volt az anti-rhG1- és anti-CCP IgG1 szint mint az artritiszes Nkx2-3^{-/-} szérumokban, viszont nem volt különbség az anti-CCP IgG2a szintjeiben. Nem szignifikánsan, de emelkedett IL-1 β , IL-4, IL-6 és TNF α és csökkent IL-17 és IFN γ szinteket mértünk az artritiszes Nkx2-3^{-/-} egerekben az artritiszes BALB/c kontrolokhoz képest. Szintén nem szignifikánsan, de magasabb volt az IL-1 β , IL-4 és IL-6 citokinek szérumban szintje az artritiszes Nkx2-3^{-/-} egerekben a nem artritiszes Nkx2-3^{-/-} egerekhez viszonyítva.

IV.7.4. A B- és T sejtek Ca²⁺ jelátvitelének összehasonlítása Nkx2-3^{-/-} és BALB/c egerekben

Mivel az Nkx-2-3 mutáció főként a B limfociták fejlődését és recirkulációját befolyásolja, azt feltételeztük, hogy a B sejtek aktivációja károsodhatott, ami csökkent artritisz súlyosságot eredményezett. Azért, hogy megvizsgáljuk a B sejtek aktivációját, az inguinális- és mezenterialis nyirokcsomókból izolált limfocitákban mértünk intracelluláris Ca²⁺ jelet. Az Nkx2-3^{-/-} egerek inguinális nyirokcsomó B sejtjeiben szignifikánsan csökkent az anti-IgM- vagy anti-IgG stimuláció hatására kialakuló Ca²⁺ jel a BALB/c kontrolhoz képest. Hasonlóan, a mezenterialis nyirokcsomó B sejtekben is csökkent Ca²⁺ jelet mértünk a BALB/c kontrolhoz képest az Nkx2-3^{-/-} egerekben, bár ez a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket. Végül, az Nkx2-3^{-/-} egereknek mind az inguinális-, mind pedig a mezenterialis nyirokcsomó T sejtjei hasonló Ca²⁺ jelet mutattak, mint a BALB/c kontroloké, ami azt mutatta, hogy az Nkx2-3 mutáció csak a B sejtekben specifikusan okozott aktivációs zavart.

Következtetésül, az Nkx2-3^{-/-} egerekben talált komplex immunválaszbeli változások, amiket a súlyosan károsodott lép szerkezet és -funkció okoz, magyarázhatja az enyhébb artritisz kialakulását. A sejtek szintjén pedig a B sejtek gyengébb aktivációja, legalábbis részben, felelős lehet az immunválasz megváltozásáért.

IV.8. A lép eltávolítása megváltoztatja az immunválaszt, de nem akadályozza meg az ízületi gyulladást egér RA modellben

Mivel az Nkx2-3 hiányos egerekben sohasem teljes a lép hiánya, ezért a továbbiakban azt kívántuk megvizsgálni, hogy vajon a lép teljes sebészi eltávolítása (szplenektómia) hogyan befolyásolja az autoimmun artritisz kialakulását.

IV.8.1. Az autoimmun artritisz hasonlóan alakult a szplenektomizált csoportban mint a kontrolokban

Az immunizálás hatására a lépeltávolított- és lép megtartott (kontrol) csoportokban is hasonló kinetikával alakult ki az autoimmun artritisz, a kísérlet végén hasonló súlyossági pontszámot figyeltünk meg mindkét kísérleti csoportban és az incidencia is 90% körül volt mindkét csoportban. Nem találtunk szignifikáns eltérést a szplenektomizált - és a kontrol metszetek szövettani képe között sem: minden esetben intenzív gyulladás jelei látszottak a boka- valamint a láb kis ízületei körül.

IV.8.2. A szérumban citokinek és autoantitestek szintjének változásai a szplenektomizált egerekben

A szérumban szignifikánsan magasabb IL-1 β szintet találtunk a kontrol egerekben a szplenektomizáltakéhoz képest. Kissé magasabb volt a gyulladással IL-6 és TNF α szintje a kontrol csoportban, továbbá a Th1 és Th17 citokinek (IFN γ , IL-23 és IL-17) szintje szintén magasabb volt a kontrol egerek szérumban, míg az IL-4 szint a szplenektomizált egerekben volt kissé magasabb. Az artritiszben szerepet játszó szérumban antitestek (anti-rhG1 IgG1 és -IgM, anti-CCP IgG1 és -IgG2a, és RF IgM és -IgG) közül, az rhG1 IgM kivételével mind a szplenektomizált egerekben volt magasabb.

IV.8.3. Az artritiszes szplenektomizált egerekben megváltozott a B sejtek összetétele és nőtt az aktivált T helper sejtek aránya

A lépeltávolítás hatására a follikuláris- és nem follikuláris B sejtek aránya eltolódott az utóbbiak (főleg B1- és marginális zóna B sejtekből áll) irányába. A memória B- és a plazmasejtek aránya szignifikánsan csökkent a szplenektomizált egerekben. Az artritiszes egerekben a nem follikuláris B sejtek irányába történő eltolódás még kifejezettebb volt, a memória B sejtek és a plazma sejtek arányának növekedésével együtt a lépeltávolítástól függetlenül.

A szplenektómia szignifikánsan növelte a keringő T sejtek százalékos arányát, de nem változtatta meg a $CD4^+/CD8^+$ T sejtek arányát. A kontrol artritiszes egerekben a teljes T sejt szám növekedett, de a szplenektomizált egerekben nem. Az artritiszes egerekben nőtt a $CD4^+$ T sejtek aránya, míg a $CD8^+$ T sejtek aránya szignifikánsan csökkent, amit nem befolyásolt a lépeltávolítás. Kiemelendő, hogy az aktivált $CD4^+$ T sejtek aránya nőtt az artritiszes egerekben, ami szignifikánsan nagyobb volt a szplenektomizált csoportban.

IV.8.4. A lép jelentősége a GIA modellben

Eredményeink azt mutatták, hogy a lép eltávolítása nem befolyásolta a GIA klinikai képét szignifikánsan, habár egyértelmű különbségek látszottak mind a szérum paraméterekben, mind pedig a keringő limfocita alcsoportok tekintetében. A lép immunfluoreszcens vizsgálata azt mutatta, hogy jelentősen nagyobb follikulusok voltak az artritiszes egerek lépében, mint az egészségesekben, továbbá több és nagyobb centrum germinativumot is detektáltunk, ami aktív immunválaszra utalt. Az rhG1 specifikus immunválasz vizsgálatához az artritiszes egerek lépéből sejkultúrát készítettünk és vizsgáltuk a sejtek *in vitro* proliferációját és citokin termelését rhG1 antigén stimuláció hatására. A lépsejtek jól látható proliferációs választ mutattak az *in vitro* rhG1 stimuláció hatására és jelentős mértékű IL-4, IL-6, IL-17, $IFN\gamma$ és $TNF\alpha$ termelést mértünk.

IV.8.5. Az rhG1 specifikus immunválasz eltolódik a nyirokcsomók felé a szplenektomizált egerekben

Habár a lép érintett az artritisz indukcióban, a szplenektomizált egerekben mégis kialakult az autoimmun artritisz hasonló kinetikával és incidenciával mint a kontrol egerekben. Azt feltételeztük, hogy a lép hiányát az immunrendszer kompenzálta és más perifériás limfoid szerv(ek) "átvehették", legalább részben, a lép funkcióját az autoimmun válaszban. Ezért megvizsgáltuk, hogy mi lehet a szerepe az inguinális- és mezenterialis nyirokcsomóknak GIA-ban. A szplenektomizált artritiszes egerekben jelentősen megnagyobbodtak az inguinális nyirokcsomók a kontrolokhoz képest, továbbá a szplenektomizált artritiszes egerek inguinális nyirokcsomóiban észrevehetően nagyobbak voltak a follikulusok és több CG volt, mint az artritiszes- vagy egészséges kontrolokban vagy az egészséges szplenektomizált egerekben. Ez a nagy számú és -méretű follikulus a szplenektomizált artritiszes egerekben egy folyamatban levő immunválaszra utalt. A mezenterialis nyirokcsomókban nem voltak annyira egyértelmű különbségek a lépeltávolított- és kontrol csoportok között, mint az inguinális nyirokcsomókban, de az artritiszes egerekben talált CG szám növekedés mégis arra utalt, hogy a mezenterialis nyirokcsomók is aktiválódhattak GIA-ban.

A mezenterialis nyirokcsomó sejteket *in vitro* rhG1 antigénnel stimulálva a proliferációban nem találtunk szignifikáns különbséget a lépeltávolított vagy kontrol egerek nyirokcsomó mintáiban. Ezzel szemben a lépeltávolított artritiszes egerek mezenterialis nyirokcsomó sejt kultúrái jelentősen több IL-4-t, IL-6-t és $IFN\gamma$ -t és szignifikánsan több IL-17-t és $TNF\alpha$ -t termeltek mint a kontrol csoportéi.

Összegezve: az inguinális- és mezenterialis nyirokcsomók morfológiai és funkcionális adatai megerősítették, hogy az rhG1-el szembeni immunválasz a szplenektomizált egerekben a lép felől eltolódott más perifériás limfoid szervek felé mint a mezenterialis- és inguinális nyirokcsomók.

IV.8.6. A nyirokcsomó sejtek Ca^{2+} jelének összehasonlítása lépeltávolított és kontrol egerekben

Korábban az Nkx2-3 hiányos egerekben azt találtuk, hogy a B sejtek Ca^{2+} jelátvitelére szignifikánsan megváltozott. A jelen tanulmányunkban kíváncsiak voltunk, vajon a sebészi lépeltávolítás befolyásolja-e az inguinális- vagy mezenterialis nyirokcsomóból izolált T- és B sejtek Ca^{2+} jelátvitelét. Emelkedett Ca^{2+} jelet mértünk a szplenektomizált egerek inguinális

nyirokcsomó B sejtjeiben a kontrolokhoz képest anti-IgM aktiváció után, viszont nem találtunk különbséget amikor anti-IgG-vel aktiváltuk a sejteket illetve a T sejtek esetében sem. Ezzel szemben a mezenteriális nyirokcsomókból izolált B- és T sejtek más aktivációs mintázatot mutattak: a szplenektomizált egerek B sejtjei mind anti-IgM- mind anti-IgG aktivációra csökkent Ca^{2+} jelet mutattak a kontrolokéhoz képest, továbbá, a szplenektomizált egerek mezenteriális nyirokcsomó T sejtjei is csökkent Ca^{2+} jelet mutattak, mint a kontrolok.

A lép hiánya nem akadályozta meg az autoimmun artritisz kialakulását a GIA modellben. Megerősítettük, hogy az inguinális- és mezenteriális nyirokcsomók játszottak szerepet az rhG1 specifikus immunválasz kialakulásában, fokozott T helper aktiváción és autoantitest termelésen keresztül. Az immunhálózat sejtjeinek komplex átrendeződése elegendő kompenzációt jelentett a lép hiányában az autoimmun artritisz kialakulásához.

IV.9. A lép sebészi eltávolítása egér autoimmun artritisz korai szakaszában késlelteti a gyulladást és az ízületi károsodást

A fenti tanulmányunkban (IV.8. fejezet), amiben a lépét az artritisz indukció előtt 4 héttel távolítottuk el, nem találtunk különbséget a GIA klinikai- és szövettani képében a kontrol csoporthoz képest, viszont eltéréseket találtunk a keringő limfocita alcsoportokban és a szérum paraméterekben. A következő kísérletünkben arra kerestünk választ, hogy amennyiben a lépét az artritisz indukció során távolítjuk el, ami megfelel a humán RA korai stádiumának, az hogyan befolyásolja a GIA kialakulását. Ehhez a BALB/c egerek lépét az rhG1 antigénnel történő immunizálás során különböző időpontokban távolítottuk el. Minden kísérleti csoport három ip. oltást kapott a 0., 28. és 56. napokon és az egereket három kísérleti csoportba osztottuk: az első csoportban a lép nem került eltávolításra a kísérlet végéig (kontrol csoport); a második csoportban a lépét az első oltást követően 7 nappal távolítottuk el (SPE1); míg a harmadik csoportban a lépét a második oltás után 7 nappal, azaz a 35. napon távolítottuk el (SPE2).

IV.9.1. A lép eltávolítása az autoimmun artritisz indukciója során késleltette az ízületi gyulladást

A második oltást követően, a kontrol csoportban szignifikánsan és progresszíven nőttek a súlyossági pontszámok, ami közepesen súlyos gyulladásnak felelt meg. Ezzel ellentétben az SPE2 csoportban, amiben a 35. napon végeztünk lépeltávolítást, a gyulladás klinikai tünetei csökkentek és a súlyossági pontszámuk szignifikánsan alacsonyabb maradt mint a kontrol csoport egészen a harmadik immunizálásig. Az SPE1 csoportban továbbra sem találtunk artritiszes egereket, azaz mind a súlyossági pontszámuk mind pedig az incidencia nulla maradt a második oltást követő két hétben. Habár a 45. naptól enyhe artritisz jelei mutatkoztak már az SPE1 csoportban is, de a súlyosság a kontrol csoporthoz képest szignifikánsan, az SPE2 csoporthoz képest pedig kis mértékben enyhébb volt a 38.-46. napok között, és az SPE1 csoportban az 56. napig (a 3. immunizálásig) az egerek 65%-a egyáltalán nem lett artritiszes. Az artritisz végső, irreverzibilis, legsúlyosabb formájának a kiváltásához az egereket harmadszor is beoltottuk az rhG1 antigénnel az 56. napon. A súlyossági pontszámokban és az incidenciában is drámai növekedést tapasztaltunk minden csoportban. Ezzel együtt a kontrol csoportban maradt a legmagasabb a súlyossági pontszám egészen a kísérlet végéig. Végül a végtag duzzanat is hasonlóvá vált minden csoportban. Míg a kontrol- és az SPE1 csoportokban az incidencia 90% volt a kísérlet végén, az SPE2 csoportban 70% maradt. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy bár a szplenektómia késleltette az artritisz kialakulását, azonban az ismételt immunizálás hatására kialakuló végső rosszabbodást már nem tudta kivédeni.

IV.9.2. Az autoimmun artritisz korai stádiumában végzett szplenektómia csont- és porc megőrzéshez vezetett

A boka mikro CT analízise az SPE1- és SPE2 csoportokban magasabb csont sűrűséget mutatott a kontrol artritiszes csoporthoz képest, továbbá a csont morfológiai eltérések sem voltak annyira súlyosak. Szövettanban szintén megerősítettük, hogy a szplenektomizált csoportokban enyhébb fokú volt a gyulladás, a pannusz képződés és a csont infiltráció. Az SPE1 csoportban a tibia és a talusz felszínén található porc felszíne szinte teljesen ép volt, míg az SPE2 csoportban porc erózió már megfigyelhető volt, bár nem olyan mértékben mint az artritiszes kontrol csoportban, ahol az ízületi porc felszín szinte teljesen eltűnt. Ezek az eredmények azt mutatták,

hogy a lép eltávolítása az artrítisz indukció korai szakaszában meggátolhatja a destruktív artrítisz kialakulását.

IV.9.3. A citokin- és autoantitest szintek csökkentek a szplenektomizált egerek szérumban

A szérumban Th1/Th17- (IFN γ , IL-17, IL-23) és a gyulladáscsökkentő (IL-1 β és IL-6) citokinek szintje a kontrol csoportban volt a legmagasabb. Szinte az összes vizsgált autoantitest (anti-mPG IgG1/IgM, RF IgG/IgM és anti CCP-IgG1) alacsonyabb volt a szplenektomizált csoportban, mint a kontrolokban. Összefoglalva: a szplenektómia az artrítisz indukció során csökkent autoantitest szinteket eredményezett a szérumban, ami megfelelt a csökkent csont- és porc elváltozásoknak.

IV.9.4. A lépeltávolítás megváltoztatta az *in vitro* citokin termelést és a T helper polarizációt GIA-ban

Csökkent, de nem szignifikáns mértékben, IL-17-, IFN γ - és TNF α szintet mértünk a szplenektomizált egerek mLN kultúráinak a felülúszójában a kontrolokhoz képest. Referenciaként megmértük a kontrol (lép megtartott) csoportban a lép sejtek *in vitro* kultúráinak felülúszójából is ugyanezeket a citokineket. A lép sejtek nagy mennyiségben termeltek IL-4-t, IFN γ -t, IL-6-t, IL-17-t és TNF α -t, ami összhangban van a korábban számos tanulmányunkban leírtakkal. Általánosságban, az rhG1 antigénnel történő stimuláció erőteljesebb citokin választ váltott ki a lép sejtek kultúráiban, mint a mLN sejtekében.

A Th1 sejtek aránya az SPE1 csoportban volt a legmagasabb, viszont az SPE2 csoportban ennél alacsonyabb arányt mértünk, ami közel volt a kontrolhoz. A Th2 sejtek esetében az SPE1 egerekben volt a legmagasabb az arány és az SPE2-ben a legalacsonyabb. Végül a Th17 sejtek aránya a kontrol egerek nyirokcsomóiban volt a legmagasabb, amit az SPE1 és az SPE2 követett. Ahogy vártuk, a kontrol egerek lépében főleg a Th1 és a Th17 sejtek voltak dominánsak. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a GIA korai szakaszában végzett lépeltávolítás valóban befolyásolta a T helper polarizációt, ami, legalábbis részben, hozzájárulhatott a fent leírt klinikai képhez és a szérumban paraméterekben talált különbségek kialakulásához.

IV.9.5. Változások a Treg sejtcsoportban autoimmun artrítisz kialakulása során szplenektomizált egerekben

A kontrol csoportban azt találtuk, hogy a Treg arány nem változott az első és második immunizálás hatására, de a harmadik oltást követően az arányuk szignifikánsan csökkent. Ezzel szemben, mindkét szplenektomizált csoportban a Treg arány a második immunizálást követően emelkedett, amit viszont szignifikáns csökkenés követett az utolsó oltás után, a kontrol csoporthoz hasonlóan.

Ezek alapján azt gondoljuk, hogy amennyiben a lépeltávolítás az első immunizálás követően 7 nappal történik (SPE1), akkor az az aktiválódó T- és B sejtek és a memória prekursor sejtek eltávolításával jelentősen késlelteti az artrítisz indukciót; ha azonban a lépeltávolítást a második oltást követően 7 nappal végezzük (SPE2), amikor az rhG1 által kiváltott immunválasz már kialakult, akkor az valószínűleg csökkentette a lépben található memória sejtek számát, de nem befolyásolta a korábban már differenciálódott és a perifériás szövetekbe vándorolt effektor- és memória sejteket (pl. a csontvelőben található hosszú élettartamú plazmasejteket vagy a nyirokcsomókban lévő memória sejteket). Összefoglalva, a lép eltávolítása az autoimmun artrítisz korai stádiumában hasznos lehet, mivel gátolja a csont- és porc destrukciót az ízületekben. Ez valószínűleg összefügg a keringő Treg sejtek arányának a növekedésével és a Th1/Th17 polarizáció csökkenésével, ami hozzájárulhat a szérumban autoantitestek alacsonyabb szintjéhez is.

IV.D. TERMÉSZETES- ÉS PATOLÓGIÁS AUTOANTITESTEK VIZSGÁLATA AUTOIMMUN MODELLEKBEN

Korábban azt gondolták, hogy az autoantitestek kizárólag az autoimmun betegségek markerei. Azonban az autoantitestekre vonatkozó tudásunk alapvetően megváltozott, amióta felismerték a természetes vagy fiziológiás autoantitesteket, amelyeket egészséges egyének szérumban, korábbi immunizálás nélkül is megtalálhatóak és nem okoznak szöveti károsodást. Ezek a fiziológiás autoantitestek genetikailag és evolúciósan konzervált antigéneket ismernek fel (pl. hőszokk fehérjék, sejtvezeték komponensek, sejtmag struktúrák, mitokondriális enzimek, szérumban komponensek etc.), ami alapján megszületett az "immunológiai homunkulusz" vagy "immunkulusz" elmélet, ami szerint ezen természetes autoantitestek hálózata fontos szerepet tölt

be az immunológiai szabályozásban. A természetes autoantitestekre vonatkozó tudásunk folyamatos gyarapodása ellenére még mindig nincs közvetlen bizonyíték arra, hogy az összetételük vagy mennyiségük megváltozása hozzájárulhat-e az autoimmun betegségek kialakulásához.

A B1 és marginális zóna (MZ) B sejtek termelik azokat az alacsony affinitású polireaktív, főleg IgM típusú antitesteket, amelyeket természetes antitesteknek (natAAT) nevezünk. Egerekben a B1 sejtek a pleura- és peritóneum üregben találhatóak és az IgM antitestek termelésének körülbelül 80%-ért felelősek. A B1 sejtek hosszú élettartamúak és önmegújító képességgel rendelkeznek és tovább csoportosíthatóak B1a- és B1b alcsoportokra a CD5 expressziójuk alapján. Stimuláció hatására a B1 sejtek képesek a peritóneumból a lépbe vagy nyirokcsomókba vándorolni ahol natAAT termelő sejtekké alakulnak. A natAAT-k számos immunológiai funkcióban vesznek részt, például apoptózis indukció, komplement aktiváció, FcR közvetített aktiváció, antigén opszonizáció és allograft rejekció.

A natAAT-ek egy jelentős része autoantigénekkal reagál, ezért ezeket természetes autoantitesteknek (natAAT) nevezzük. A natAAT-k kötődhetnek megváltozott saját antigénekhez és neo-antigénekhez előregedett, apoptotikus vagy nekrotikus sejtekből amiknek elősegíthetik a fagocitózist. Ezért a natAAT-k szerepet játszanak a szöveti homeosztázis fenntartásában és fontosak lehetnek az autoimmun betegségek kialakulásának meggátolásában. Több tanulmány is alátámasztotta, hogy olyan egerekben amelyekben a szérumban IgM szint alacsony, magasabb patológiás IgG AAT szinttel rendelkeznek.

IV.10. A természetes- és patológiás autoantitestek kor függő változásokat mutatnak a New Zealand Black (NZB) spontán autoimmun modellben

A spontán autoimmun NZB törzsben autoimmun hemolitikus anémia (AIHA) alakul ki 6 hónapos életkortól, majd később az egerek egy részében 12 hónapos kor után lép lymphoma is kialakul. Az AIHA egy ritka autoimmun betegség, amiben autoantitestek pusztítják a VVT-eket, ami anémiához vezet. Habár előfordulhatnak egyéni variációk, az NZB egerek a spontán AIHA tanulmányozásának hagyományos modelljei. Annak ellenére, hogy az NZB egér modellt már évtizedek óta ismerjük, a spontán AIHA és a később kialakuló limfóma kialakulásának pontos mechanizmusa nem teljesen ismert és a natAAT-k szerepe csak részben volt jellemzett. Jelen munkánkban leírtuk, hogy a Hsp60-, Hsp70- és a CS specifikus természetes antitestek szintje a szérumban életkor függő változásokat mutat NZB egerekben: először egy kifejezett növekedés volt a 6-9 hónapos korig, amit csökkenés követett az öregebb egerekben. Ezzel párhuzamosan, 6 hónapos kor körül megjelentek a patAAT-k (Coombs pozitívitás, ANA és anti-dsDNA), ami egybeesett a spontán AIHA kialakulásával. A B sejt populációk változásai megfeleltek az autoantitest szintek változásainak: a natAAT termelő B1 sejtek aránya csökkent az idősebb egerekben, míg a plazmasejtek és a memória B sejtek aránya fokozódott, amelyek a patAAT termeléséért lehetnek felelősek. Eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy a natAAT-ktől a patAAT-k felé történő eltolódás az egerek hat hónapos kora körül hozzájárulhat az NZB fenotípus kialakulásához. A natAAT-k szintje még relatíve magas szinten maradt ezután is, ami a lehetséges kompenzatorikus szerepükre utalhat, azonban nem tudták megakadályozni az autoimmun betegség kialakulását.

IV.11. A lép befolyásolja a természetes- és patológiás autoantitestek egyensúlyát egy egér autoimmun artritisz modellben

A lép nemcsak a natAAT termelésben szerepet játszó sejteket tartalmazza, hanem a legnagyobb másodlagos nyirokszerv, amiben aktiválódott- és memória folliculáris B2 sejtek is találhatóak, amik nagy affinitású monospecifikus antitesteket termelnek, beleértve a pathAAT-eket is. A lép fontos szerepet tölthet be a tolerancia és autoimmunitás közötti finom egyensúly fenntartásában, a kettős funkciójának köszönhetően: a gyulladásgátló hatású natAAT termelő MZ B- és B1 sejtek illetve a pathAAT-eket termelő B2 sejtek egyidejű jelenlétével.

Jelen tanulmányunkban vizsgálni kívántuk a lép szerepét a nat/patAAT-k egyensúlyának szabályozásában autoimmun artritiszben. Elemeztük a szérumban natAAT

szintjeit a porc PG aggregán-, a Hsp60-, a Hsp70- és a mitokondriális CS antigénekre egészséges kontrol- és artritiszes BALB/c egerekben. Továbbá vizsgáltuk azt is, hogy hogyan befolyásolja a sebészi lépeltávolítás a nat/patAAT termelését artritiszes egerekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a PG aggregán, Hsp60-, Hsp70- és CS antigénekre specifikus natAAT szintek életkor függő változásokat mutattak egészséges BALB/c egerekben. Az autoimmun artritisz indukciója nem változtatta meg jelentősen a mért natAAT-ek szintjét, a szplenektómia viszont egyértelműen csökkentette a natAAT-k szintjét. Érdekes módon, a patAAT-ek szintje pontosan ellentétes változást mutatott: a szplenektomizált egerekben volt magasabb a szintjük, mint a kontrol artritiszes egerekben. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a lépnek szerepe van a nat/patAAT-k egyensúlyának kialakításában autoimmun artritiszben.

IV.E. IMMUNOLÓGIAI MECHANIZMUS VIZSGÁLATA AUTOIMMUN MIOKARDÍTISZ MODELLBEN

IV.12. Az FTY-720 (Gilenya) kezelés megakadályozza a spontán autoimmun miokarditisz kialakulását

A miokarditisz a szívizom gyulladása, amit leggyakrabban virális- és nem virális fertőzések, gyógyszerek által kiváltott hyperszenzitív reakciók vagy autoimmun reakciók váltanak ki. A széles körű kutatások ellenére nem létezik definitív gyógymód a miokarditiszre, ezért az új modell rendszerek kutatása különösen fontos.

IV.12.1. A HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerekben végzetes szívelégtelenség alakul ki fiatal életkorban

A homozigóta HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerekben korai halálozást (2-3 hónapos korban) figyeltünk meg szívelégtelenség következtében, ami 4-5 hetes korban kezdődött. A betegség a testtömeg- és a fizikai aktivitás csökkenésével kezdődött, a végtagok és szemek sápadtak vagy cianotikusak voltak, amit fokozatosan ödéma képződés váltott fel. Végstádiumban a beteg egereken jelentős teljes test ödéma alakult ki (4.68 B ábra). Az állatok boncolása során nagy mennyiségű pleurális- és peritoneális folyadék gyülemet, extrémén kitágult szívet és duzzadt, sötét színű májat találtunk (4.68. C ábra), amik megfelelnek a DCM tüneteteinek. HE festett metszeteken egyértelműen látszott, hogy a szívizmot mono- és polimorfonukleáris sejtek infiltrálták főleg a szívizom perifériás része felől már 3-5 hetes még egészségesnek látszó HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerekben is, azaz a a DCM-t valóban miokarditisz okozta. Immunfluoreszcens analízissel a szívizom neutrofil granulocita infiltrációját igazoltuk mind felszínesen, mind pedig a mélyebb szövetekben, továbbá T sejteket és makrofágokat is találtunk.

IV.12.2. A DCM-t autoimmun miokarditisz okozta

Miután a vírusos miokarditisz lehetőségét kizártuk, teszteltük a HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerek szérumát keringő szívizom antigénekre specifikus autoantitestek irányába. A beteg egerek széruma reagált a szív miozinnal illetve felismert a szívizom lizátumban egy 30 és 40kDa nagyságú antigént, az irodalmi adatok alapján a 30 kDa-os fehérje megfelelhet a szív troponinnak (33 kDa). A beteg egerek széruma indirekt immunfluoreszcenciával (IF) a kardiomiociták membránjához közeli területein elhelyezkedő antigénekhez kötődtek, erős citoplazmatikus granuláris festődés mellett. Direkt IF-al pedig igazoltuk, hogy *in vivo* antitest depozitumok voltak a beteg HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerek szívében, nagyon hasonló mintázattal, mint az indirekt IF-ben.

IV.12.3. Betegség aszociált génexpressziós változások a DCM-s HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerek szívében

Egy DCM specifikus PCR array platformot segítségével 48 DCM-hez kapcsolódó gén expresszióját vizsgáltuk: 26 gén expresszáldott eltérő módon legalább a 4 vizsgált DCM mintából legalább 3-ban: 14 gén fokozott-, 12 gén pedig csökkent expressziót mutatott a miokarditiszes egerek szívében az egészséges kontrolkhoz viszonyítva. Ezek alapján két jelátviteli útvonal génjeit sikerült beazonosítani a HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerek beteg miokardiumában: az extracelluláris mátrix receptor interakció- és az inzulin-szerű növekedési faktor útvonalakat. A megváltozott expressziót mutató gének kiemelkedő szerepet játszanak olyan útvonalakban, amik a miokardiális fibrózist, hipoxiát és gyulladást szabályozzák.

IV.12.4. Az FTY720 kezelés megvédte a HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egereket az autoimmun miokarditisz kialakulásától

Preventív kezelési sémában a TNF α blokkolása Remicade-al, a kalcineurin gátlása ciklosporin A-val és az anti-CD44 kezeléseknek nem volt szignifikáns hatása a túlélésre a kontrol egerekhez képest. Ezzel szemben az FTY720, ami egy szfingozin-1-foszfát (S1P) receptor antagonist, megnövelte a túlélést 100%-ra, azonban a kezelés abbahagyását követően az egerekben szinte mindig kialakult a DCM. Amikor a betegség korai szakaszában lévő egereket kezeltünk FTY720-al kissé lassabban progrediált a betegség a kezelés kezdetekor és a túlélés is kissé meghosszabbodott, de az a hatás csak enyhe volt és nem szignifikáns.

Összefoglalva: a HLA-DQ8^{BALB/c}-Tg egerekben korai életkorban kialakuló spontán miokarditisz végzetes DCM-hez vezet. A kórfolyamat autoimmun jellegét a következő eredmények támasztották alá: gyulladásoos sejtes infiltráció (T sejtek, neutrofilek és makrofágok) a myocardiumban, a beteg egerek széruma miokardiális antigénekkkel reagált ami antitest lerakódáshoz vezetett a szívizomban. Továbbá FTY720 kezeléssel, ami megakadályozza a limfociták nyirokcsomókból való kilépését, sikeresen kivédhető volt a betegség kialakulása, ami jelentősen meghosszabította a kezelt állatok élettartamát.

V. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Különböző autoimmun egér modellek felhasználásával a következő megfigyeléseket tettük.

1. A PGIA kialakulásában meghatározó jelentősége van a lokális peritoneális T sejtes immunválasznak és a korai IL-17 termelődésnek. Ennek a háttérében a peritoneális rezidens B1 sejtek Th17 polarizáló hatását feltételezzük. A PGIA ezek alapján "kevert" Th1 és Th17 irányú betegség modell.
2. A PGIA modell az emberi RA-hez hasonlóan életkorral összefüggést mutat. Az élettkorral összefüggő változások ("immunöregedés") közül azonosítottuk a következőket: (i) a PG-specifikus T sejtes immunválasz csökkent, (ii) a citokinek termelődése összességében csökkent, és a Th1 irányba tolódott, (iii) az (auto)antitest termelődés csökkent, (iv) a T/B sejt arány csökkent, (v) eltolódást találtunk a memória T sejtek irányába, (vi) szignifikánsan csökkent a CD28⁺CD4⁺ sejtek aránya, (vii) zavart Treg indukciót találtunk, (viii) az aktiválódott T sejtek arányának sokszoros növekedésével, és (ix) megváltozott a myeloid/limfoid APC arány az utóbbiak javára az antigén beadásának a helyén (peritoneum).
3. PG-specifikus TcR transzgenikus egértörzsben spontán artrítiszt írtunk le. Az artrítisz 6 hónapos kortól alakul ki, és az IL-4 hiányában fokozódott az incidenciája. A kórfolyamat háttérében a T sejtek kóros aktivációja és csökkent apoptózisa állhat, amit az IL-4 szabályoz.
4. A TcR jel erőssége befolyásolja az autoimmun artrítisz kialakulását a T sejt aktiváció és apoptózis egyensúlyának szabályozásával, amit kétféle PG-specifikus TcR transzgenikus- valamint csökkent ZAP-70 expressziójú egértörzsben is meg tudunk erősíteni. Az optimális jel erősség korán kialakuló és súlyos artrítiszhez vezet, míg a "szub"- vagy "szupraoptimális" jel hatására az autoreaktív T sejtekben az apoptózis kerül túlsúlyba aminek lassabban kialakuló és enyhébb artrítisz az eredménye.
5. Az intraperitoneálisan beadott timociták tartósan repopulálták a ZAP-70 knock-out egerek nyirokszöveit és helyreállították a T sejtes immunhiányt.
6. Az Nkx2-3 gén kiütött egerekben enyhébb volt az autoimmun artrítisz, aminek a háttérében a lép szerkezeti zavarai miatt bekövetkező csökkent immunválasz és a B sejtek csökkent aktivációja állhat.
7. A lép sebészi eltávolítása az artrítisz indukció megkezdése előtt nincs hatással az artrítisz klinikai és hisztológiai képre. A szplenektomizált egerekben módosult az immunválasz és a lép hiányát az immunrendszer más elemei például a nyirokcsomók kompenzálni tudták.
8. Az artrítisz indukció során, az első vagy második immunizálás után - ami a preklinikai ill. korai RA-nak felelhet meg - végzett szplenektómia hatására az artrítisz később alakult ki, és enyhébb szöveti károsodással járt, azaz protektív hatású volt.
9. NZB egerekben kor függő emelkedést tapasztaltunk a természetes autoantitestek szintjében, míg a patológiás autoantitestek a 6. hónaptól indultak növekedésnek, amikor a spontán autoimmun betegség kialakul. Az autoantitestek egyensúlyában bekövetkező változások a nem folliculáris B

sejtek arányának fokozatos csökkenésével és a memória B- és plazmasejtek növekedésével hozható összefüggésbe.

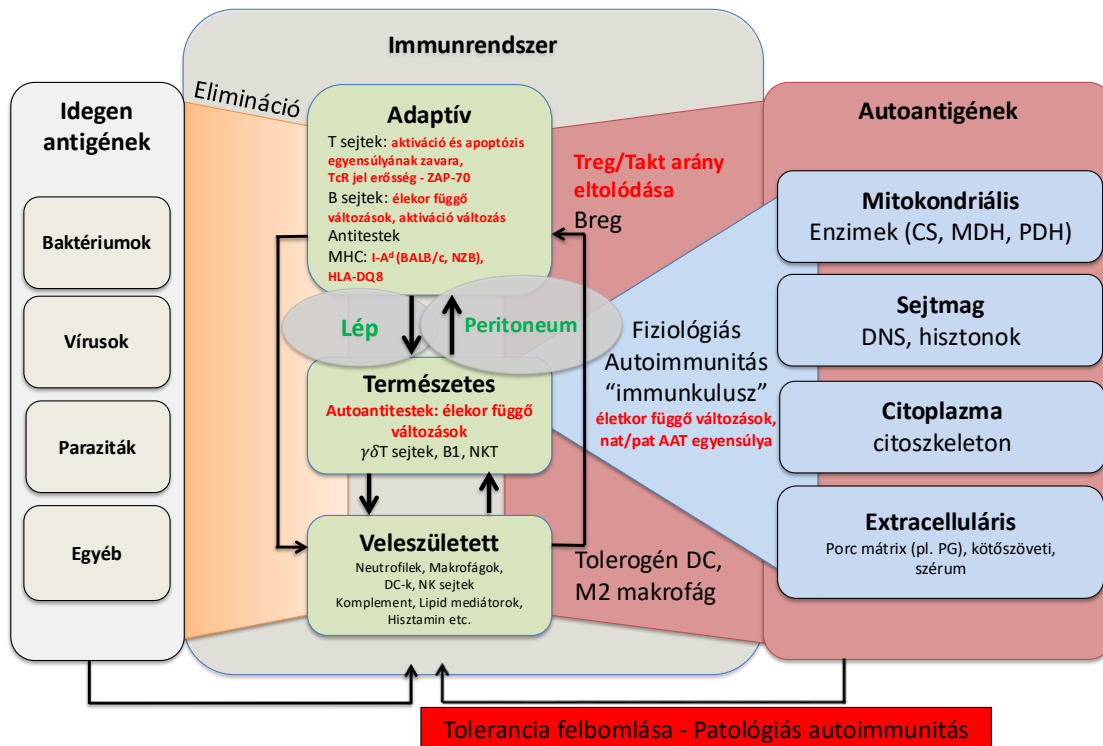
10. BALB/c egerekben kor függő csökkenést tapasztaltunk a PG-vel, és hősokk fehérjékkel reagáló természetes autoantitestek szintjében, de a természetes autoantitestek szintjét nem befolyásolta a GIA kialakulása. A lép sebészi eltávolítása viszont csökkentette a természetes autoantitestek- és növelte a patológiás autoantitestek szintjét autoimmun artritiszben.

11. Spontán kialakuló autoimmun miokarditist írtunk le HLA-DQ8 transzgenikus BALB/c egerekben, anti-kardiális miozin antitest termeléssel, gyulladással, sejtes infiltrációval a szívizomban, és szignifikáns génextpressziós változásokkal. A limfociták recirkulációját blokkoló FTY720 kezelés sikeresen megelőzte az autoimmun miokarditisz kialakulását.

VI. MEGBESZÉLÉS

Munkám során az autoimmunitást befolyásoló tényezőket térképeztem fel különböző autoimmun modellek felhasználásával. Itt most csak néhány olyan fő "motívumot" emelek ki, amiket így utólag a különböző projektekből közös szempontként lehet azonosítani (3. ábra).

Az egyik ilyen közös pont az öregedés hatásainak a felderítése az autoimmun folyamatok kialakulásában. Az immunrendszer öregedése ("immunszenescencia") miatt idősebb korban fokozódik az infekciókra való hajlam, az autoimmun- és daganatos betegségek előfordulása, ami mind az eliminációs- mind a tolerancia mechanizmusokban bekövetkező szabályozási zavaroknak köszönhető. Ebben a munkánk alapján mind az adaptív- mind pedig a természetes immunrendszer elemei érintettek. Az eredmények részletes felsorolását mellőzve, többféle egértörzsben (BALB/c és NZB) illetve betegség modellben (artritisz és AIHA) kimutattunk az immunrendszer öregedésével kapcsolatot (3. ábra).



3. ábra A kóros autoimmunitás kialakulásában szerepet játszó tényezők. A normál szabályozás felborulása esetén az immunrendszer különböző részei hálózatosan együttműködve képesek elkülöníteni a saját- és nem saját struktúrákat és erre megfelelő immunválaszt adnak (lásd I.1. ábra). Kísérleteink szerint az adaptív- és természetes immunrendszer elemeiben bekövetkező változások (pirossal emeltem ki) a tolerancia mechanizmusok felbomlásához és kóros autoimmun szövétkárosításhoz vezethetnek. A különböző autoimmun kórfolyamatokban ezek a tényezők más-más kombinációkban fordulnak elő. Az immunszenescencia hatásai rendkívül szerteágazóak mind az adaptív- mind a természetes immunrendszerben. A lép és a peritoneum fontos szabályozó szerepet tölthet be az autoimmunitás szabályozásában. CS: citrát-szintáz, MDH: malát-dehidrogenáz, PDH: piruvát-dehidrogenáz, PG: proteoglikán, DC: dendritikus sejt

Az immunszenescencia egyes esetekben "spontán" autoimmunitáshoz vezetett: a PG-spec. TcR Tg egerekben artritisz, míg az NZB egerekben AIHA alakul ki idősebb korban, másképp viszont,

ahogy a PGIA és GIA esetében láttuk, a leghatékonyabban az idős egerek immunizálása vezetett artrítiszhez. Azonban a specifikus modellekben mégis eltérő tényezőket találtunk a kórfolyamatok hátterében: míg a PG-spec. TcR Tg egerekben valószínűleg az aktiválódott autoreaktív T sejtek csökkent apoptózisa miatt alakul ki az artrítisz az életkor előrehaladásával, addig az NZB törzsben a nat/pat AAT egyensúly megváltozását látjuk az AIHA kialakulása során (3. ábra). A lép sejt összetételének vizsgálata során például különbséget találtunk a folliculáris (konvencionális) B sejtek arányának alakulásában az öregedés során: az NZB törzsben 6 hónapos kortól jelentősen csökkent (ami egybeesik az AIHA kezdetével), míg a BALB/c törzsben viszonylag állandó maradt (3. ábra).

Egy másik fontos megállapításunk, hogy a lép illetve a peritoneum összekötő kapocsként szolgálnak a természetes- és az adaptív immunrendszer között az autoimmun folyamatok kialakulása során (3. ábra). Itt egyrészt utalok a peritoneális üreg szerepére a (P)GIA kiváltása során az immunizálásra adott speciális immunválasz beindulásában, másrészt azokra az adoptív transzfer kísérletekre, ahol a peritoneumba beadott sejtek (aktivált- vagy prekursor T sejtek) hatékony homingját figyeltünk meg. A peritoneális terület és a lép között fennálló aktív sejt közlekedés már korábban leírásra került, azonban ennek a részvétele az autoimmunitás szabályozásában még nem volt ismert. Különösen érdekes továbbá a peritoneumban található szesszilis nyirokszöveti szerkezetek szerepe a lokális- és szisztémás immunitásban. Jelen vizsgálatainkban ugyan csak a milky spot-ok szerepe merült fel, mint lehetséges belépési pont a peritoneumba beadott sejtek számára, de az utóbbi évek kutatásai során leírásra került FLAG (foliate lymphoid aggregates) és FALC szöveti elemek részvétele az immunológiai szabályozó folyamatokban szintén érdekes lehet.

Végül kísérleteink arra is rámutatnak, hogy az állatmodellek használata az autoimmun betegségek vizsgálatában még mindig megkerülhetetlen. A jól jellemzett és beállított modellek segítségével olyan részletek is tanulmányozhatóak a betegségek kialakulása során amik elképzelhetetlenek humán vizsgálatokban. A humán kórfolyamatokkal fennálló transzlációs- és reverz transzlációs viszony vezethet el hosszabb távon specifikusabb kezelési formák fejlesztéséhez. Az állatmodellekben komplex módon, az immunrendszer teljes hálózata részvételével alakulnak ki az autoimmun kórfolyamatok, az emberhez hasonlóan, ami egyszerűbb kísérleti rendszerekben pl. sejt- vagy szövet kultúrákban nem vagy csak jelentősen korlátozottan vizsgálhatóak. A mesterséges intelligencia biológiai kutatásokban való széles körű elterjedésével ugyan feltételezhető, hogy bizonyos autoimmun betegségek vagy folyamatok *in silico* is komplexen modellezhetővé válnak, de még ebben az esetben sem valószínű, hogy a biológiai validálás állatkísérletekben elhagyható lenne. Az újabb kezelési lehetőségek tesztelésében szintén nem kihagyható lépés az emberi tesztelést megelőzően az állatmodellekben való kipróbálás.

VII.1. A dolgozat alapjául szolgáló publikációk (ÖSSZ IF: 56,418)

1. **Boldizsar, F.**, Tarjanyi, O., Nemeth, P., Mikecz, K., & Glant, T. T. (2009). Th1/Th17 polarization and acquisition of an arthritogenic phenotype in arthritis-susceptible BALB/c, but not in MHC-matched, arthritis-resistant DBA/2 mice. *International Immunology*, 21(5), 511–522. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp018> IF: 3,403
2. Tarjanyi, O., **Boldizsar, F.**, Nemeth, P., Mikecz, K., & Glant, T. T. (2009). Age-related changes in arthritis susceptibility and severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Immunity and Ageing*, 6. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-8> IF: -
3. **Boldizsar F**, Kis-Toth K, Tarjanyi O, Olasz K, Hegyi A, Mikecz K, Glant TT. Impaired activation-induced cell death promotes spontaneous arthritis in antigen (cartilage proteoglycan)-specific T cell receptor-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 2010 Oct;62(10):2984-94. doi: 10.1002/art.27614. IF: 8,435
4. Olasz K, **Boldizsar F**, Kis-Toth K, Tarjanyi O, Hegyi A, van Eden W, Rauch TA, Mikecz K, Glant TT. T cell receptor (TCR) signal strength controls arthritis severity in proteoglycan-specific TCR transgenic mice. *Clin Exp Immunol.* 2012 Feb;167(2):346-55. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04506.x. IF: 3,409

5. Hanyecz A, Olasz K, Tarjanyi O, Nemeth P, Mikecz K, Glant TT, **Boldizsar F**. Proteoglycan aggrecan conducting T cell activation and apoptosis in a murine model of rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:942148. doi: 10.1155/2014/942148. IF: 1,579
6. Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Prenek L, Berki T, Balogh P, **Boldizsar F**. Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knock-out mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes. *Clin Exp Immunol*. 2018 Jun;192(3):302-314. doi: 10.1111/cei.13114. IF: 3,711
7. Kugyelka, R., Prenek, L., Olasz, K., Kohl, Z., Botz, B., Glant, T. T., Berki, T., **Boldizsar, F**. ZAP-70 Regulates autoimmune arthritis via alterations in T cell activation and apoptosis. *Cells*, 8(5). (2019). <https://doi.org/10.3390/cells8050504> IF: 4,366
8. Khanfar E, Olasz K, Gábris F, Gajdócsi E, Botz B, Kiss T, Kugyelka R, Berki T, Balogh P, **Boldizsar F**. Ameliorated autoimmune arthritis and impaired B cell receptor-mediated Ca²⁺ influx in Nkx2-3 knock-out mice. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 26;21(17):6162. doi: 10.3390/ijms21176162. IF: 5,924
9. Khanfar, E., Olasz, K., Gajdócsi, E., Jia, X., Berki, T., Balogh, P., **Boldizsar, F**. Splenectomy modulates the immune response but does not prevent joint inflammation in a mouse model of RA. *Clinical and Experimental Immunology*, 2022, 209(2), 201–214. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac052> IF: 4,6
10. Khanfar E, Olasz K, Gál S, Gajdócsi E, Kajtár B, Kiss T, Balogh P, Berki T, **Boldizsar F**. Splenectomy at early stage of autoimmune arthritis delayed inflammatory response and reduced joint deterioration in mice. *Clin Exp Immunol*. 2024 May 16;216(3):240-251. doi: 10.1093/cei/uxae013. IF: 3,4
11. Khanfar E, Olasz K, Gál S, Balogh P, Berki T, **Boldizsar F**. The immunological role of the spleen in autoimmune arthritis: lessons from mice with genetic spleen disorganisation or splenectomy. *Immunológiai Szemle/Immunology Quarterly*. 2024. XVI. évfolyam, 2. szám, 4-12. IF:-
12. Gál S, Gajdócsi E, Khanfar E, Olasz K, Simon D, Balogh P, Berki T, Németh P, **Boldizsar F**. Natural and pathological autoantibodies show age-related changes in a spontaneous autoimmune mouse (NZB) model. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 6;24(12):9809. doi: 10.3390/ijms24129809. IF: 4,9
13. Olasz K, Gál S, Khanfar E, Balogh P, Németh P, Berki T, **Boldizsar F**. The spleen modulates the balance of natural and pathological autoantibodies in a mouse model of autoimmune arthritis. *Int J Mol Sci*. 2024 Oct 30;25(21):11683. doi: 10.3390/ijms252111683. IF: 4,9
14. **Boldizsar F**, Tarjanyi O, Olasz K, Hegyi A, Mikecz K, Glant TT, Rauch TA. FTY720 (Gilenya) treatment prevents spontaneous autoimmune myocarditis and dilated cardiomyopathy in transgenic HLA-DQ8-BALB/c mice. *Cardiovasc Pathol*. 2016 Sep-Oct;25(5):353-61. doi: 10.1016/j.carpath.2016.05.003. IF: 2,359
15. Kugyelka, R., Kohl, Z., Olasz, K., Mikecz, K., Rauch, T. A., Glant, T. T., **Boldizsar, F**. Enigma of IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis and in autoimmune animal models of arthritis. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6145810> IF: 3,232
16. Olasz K, **Boldizsar F**. Recombinant Human Proteoglycan Aggrecan-G1 Domain-induced Arthritis (GIA) Mouse Model. *Curr Protoc*. 2024 May;4(5):e1053. doi: 10.1002/cpz1.1053. IF: 2,2

VII.2. További publikációk a témában (ÖSSZ IF: 27,004)

17. Farkas B, **Boldizsar F**, Tarjanyi O, Laszlo A, Lin SM, Hutás G, Tryniszewska B, Mangold A, Nagyeri G, Rosenzweig HL, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. BALB/c mice genetically susceptible to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis show colony-dependent differences in disease penetrance. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R21. doi: 10.1186/ar2613. IF: 4,27
18. **Boldizsar F**, Mikecz K, Glant TT. Immunosenescence and its potential modulation: lessons from mouse models. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010 May;6(3):353-7. doi: 10.1586/eci.10.16. IF: 0,593
19. Glant TT, Radacs M, Nagyeri G, Olasz K, Laszlo A, **Boldizsar F**, Hegyi A, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1

- domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 May;63(5):1312-21. doi: 10.1002/art.30261. IF: 7,866
20. Glant TT, Adarichev VA, **Boldizsár F**, Besenyei T, Laszlo A, Mikecz K, Rauch TA. Disease-promoting and -protective genomic loci on mouse chromosomes 3 and 19 control the incidence and severity of autoimmune arthritis. *Genes Immun.* 2012 Jun;13(4):336-45. doi: 10.1038/gene.2012.2. IF: 3,675
21. Horváth Á, Borbély É, Bölcskei K, Szentés N, Kiss T, Belák M, Rauch T, Glant T, Zákány R, Juhász T, Karanyicz E, **Boldizsár F**, Helyes Z, Botz B. Regulatory role of capsaicin-sensitive peptidergic sensory nerves in the proteoglycan-induced autoimmune arthritis model of the mouse. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):335. doi: 10.1186/s12974-018-1364-5. IF: 5,7
22. Tarjányi, O.; Olasz, K.; Rátky, F.; Sétáló, G.; **Boldizsár, F.** Proteasome Inhibitors: Potential in Rheumatoid Arthritis Therapy? *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 2943. doi:10.3390/ijms26072943 IF: 4,9

A témában megjelent közlemények összesített impakt faktora: 83,422.

VII.4. Tudománymetriai adatok

Tudományos folyóiratcikkek száma: 49

Könyvfejezet: 1

Összesített impakt faktor: 162,883

Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: 74,578

Független hivatkozások: 828

Hirsch index: 17

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani mentoraimnak: **Prof. Dr. Berki Tímeának** és **Prof. Dr. Németh Péternek** akik megszerettették velem az immunológiát és az alapkutatót. Tőlük tanultam meg az alapvető immunológiai módszereket, valamint a PhD-m megszerzésében is fő támogatóim voltak. Végül, az Ő oktatói attitűdjük a mai napig hatással van a saját oktatási tevékenységemre. Szerencsés vagyok, hogy a mai napig egy intézetben dolgozhatunk Velük.

Hasonlóan hálás vagyok másik mentoromnak **Prof. Dr. Glant Tibornak** (†), akinek köszönhetően megismerkedhettem az autoimmun artritisz modellel. Az Ő végtelen energiája és kitartása mindig ösztönzően hatott ránk. Bár csak két évig dolgozhattunk az intézetében a Rush University-n Chicago-ban, de történeteit és mondásait a mai napig rendszeresen idézzük és az autoimmun modellel való munkát Ő szerettette meg velem. Hazatérésünk után is folyamatosan segítette minket az artritisz modell beállításában és közös projektjeink is sok éven át zajlottak még. Minden esetben önzetlenül segítette: sejtvonalakkal, transzgenikus egerekkel és más anyagokkal. Nyugdíjazása után, az intézetük megszűnésekor számos vegyszert és labor eszközt adományozott a pécsi laborunknak. Feleségének, **Prof. Dr. Mikecz Katalinnak** szintén hálával tartozom, Ő is nagy segítségünkre volt mind az amerikai évek, mind pedig hazatérésünk óta.

Olasz Katalint ki kell emelnem, mert vele a chicago-i évek óta folyamatos munkakapcsolatban vagyunk. Az, hogy Pécsen is meg tudtuk honosítani a PGIA és GIA modelleket nélküle nem lett volna lehetséges. Köszönöm, hogy mindig kitartott mellettem és remélem még hosszú évekig tudunk együtt dolgozni.

Köszönettel tartozom volt és jelenlegi PhD és TDK hallgatóimnak: **Dr. Bartis Domokosnak**, **Dr. Szabó Mariannak**(†), **Dr. Talabér Gergelynek**, **Dr. Hanyecz Anitának**, **Kugyelka Rékának**, **Dr. Kohl Zoltánnak**, **Esam Khanfarnak** és **Dr. Gál Szonjának**, akiknek a munkája nélkül nem juthattam volna el idáig.

Köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Balogh Péternek** a felbecsülhetetlen és rendkívül inspiráló kötetlen szakmai beszélgetésekért.

Továbbá köszönöm az **Immunológiai és Biotechnológiai Intézet** minden jelenlegi és korábbi dolgozójának is hogy mindenben segítettek a munkámat.

Leghálásabb mégis feleségemnek, **Dr. Tarjányi Oktáviának** vagyok, aki hosszú évek óta támogat a munkámban is, ráadásul abban a szerencsés helyzetben vagyunk, hogy szakmai kollaborációnk is igen gyümölcsöző.