

A ZAP-70 KINÁZ HIÁNYÁNAK VIZSGÁLATA *IN VIVO* T-SEJT  
AKTIVÁCIÓBAN, DIFFERENCIÁCIÓBAN ÉS AUTOIMMUN  
ARTHRITIS KIALAKULÁSÁBAN

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI



**Kugyelka Réka**

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet  
Klinikai Központ  
Pécsi Tudományegyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola  
Témavezető: Dr. Boldizsár Ferenc, egyetemi docens  
Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár  
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar

Pécs  
2019

# 1. Bevezetés

## 1.1 A ZAP-70 molekula jellemzése

A zéta-lánc-asszociált 70 kDa fehérjét (ZAP-70) először Chan és munkatársai írták le T-sejt receptoron keresztül stimulált Jurkat sejtekben. Fiziológiás körülmények között T-sejtek és NK-sejtek expresszálják, azonban krónikus limfoid leukémiában (CLL) és B-sejtes akut limfoblasztos leukémiában (B-ALL) B-sejtek egy alcsoportjában is leírták. Újabb eredmények szerint a ZAP-70 normál körülmények között is expresszálódik éretlen és érett B-sejtekben egyaránt.

A ZAP-70 a Syk (lép tirozin kináz) protein kináz fehérjecsald tagja, két Src homológia 2 (SH2) doménből és egy C-terminális kináz doménből épül fel. Az SH2 tandemet az interdomén A választja el egymástól, míg a kináz domén és a C-terminális SH2 domén között az interdomén B található. Az SH2 domén egy konzervált, szekvencia-specifikus foszfortirozin-kötő domén különféle jelátviteli molekulákban, a ZAP-70 esetében a CD3  $\zeta$ -láncán található foszforilált ITAM-okhoz (immunoreceptor tirozin alapú aktivációs motívum) való kapcsolódást biztosítja.

A ZAP-70 nélkülözhetetlen mind a T-sejtekéréséhez, mind az aktivációjukhoz. Hiányában a timocitákérés a tímuszban megáll a kettős pozitív ( $CD4^+CD8^+$ ) stádiumban, melynek eredményeképp nincsenek érett T-sejtek a másodlagos nyirokszervekben. A molekula expressziójának hiányában, vagy funkcióvesztésének következtében emberben a súlyos kombinált immundeficiencia (SCID) egy formája alakul ki.

## 1.2 A T-sejtek fejlődése

A T-sejtekérés és szelekciója a tímuszban lejátszódó dinamikus folyamat. A T-sejtekérés a csontvelőben kezdődik meg, a csontvelői hematopoetikus őssejtekből (HSC) származnak a később tímuszt kolonizáló sejtek.

A pro-T-sejt fázisban a timociták legfőbb fenotípusos markerei a c-kit, a CD44, illetve a CD25. A korai tímusz progenitor (ETP) sejtek ( $c\text{-kit}^{\text{hi}} CD44^+CD25^-$ ) DN2a ( $c\text{-kit}^{\text{hi}} CD44^+ CD25^+$ ), majd DN2b ( $c\text{-kit}^{\text{lo}} CD44^+ CD25^+$ ) fejlődési stádiumot érnek el. A timociták ekkor  $CD4^-$  és  $CD8^-$  kettős negatívak (DN), fejlődésük a T-sejt receptortól független. A DN timociták a kortexbe vándorolnak, ahol a kortikális tímusz epithél sejtekből (cTEC) származó szignálok elősegítik a timociták proliferációját és megerősítik a T-sejt irányú elköteleződést, de ezzel párhuzamosan a timociták is hozzájárulnak a tímusz epithél prekursorok érett cTEC-té történő differenciációjához. A T-sejt receptor (TcR) gének átrendeződése a DN3 ( $CD4^-CD8^-CD25^+CD44^-$ ) stádiumban zajlik le. Ilyenkor játszódik le a  $\beta$ -szelekció: ha a TcR $\beta$  gén átrendeződése sikeres, a TcR  $\beta$  fehérje a sejt felszínén expresszálódik, majd a pre-TcR  $\alpha$ -láncal összekapcsolódva pre-TcR komplexet alkot. Az  $\alpha\beta$  és  $\gamma\delta$  T-sejt irányú elköteleződés közti választás ekkor játszódik le. Az  $\alpha\beta$  TcR-t expresszáló timociták felszínén megjelenik a CD4 és a CD8 koreceptor, az így kialakult  $CD4^+ CD8^+$  kettős pozitív (DP) timociták elkezdnek a tímusz centrális része, a medulla felé haladni.

A DP timociták szigorú szelekciós lépéseken mennek keresztül. A pozitív szelekció során azok a DP timociták, amelyek  $\alpha\beta$  TcR-a felismeri a cTEC sejteken expresszált saját antigént bemutató fő hisztokompatibilitási komplexet (MHC), a TcR-n keresztül túlélési szignálokat kapnak és tovább differenciálódnak. A pozitív szelekció eredményeként SP timociták jönnek létre, az MHC I-t felismerő timociták a CD8 irányba, az MHC II-t felismerő timociták a CD4 irányba köteleződnek el. Azok a DP timociták, amelyek TcR-a nem ismeri fel a saját peptid-MHC komplexet, nem élnek túl a szelekciót, apoptózissal elpusztulnak. A medullában zajlik le az autoreaktív timociták negatív szelekciója, melyben a tímusz medulláris epithél sejtek (mTEC) játszanak fontos szerepet, az AIRE és Fzf2 transzkripciós faktorok hatására a mTEC sejtek a lehető legváltozatosabb szöveti (saját) antigéneket mutatják be az MHC-n keresztül a fejlődő timocitáknak. Az autoimmunitás elkerülése érdekében a saját antigéneket nagy affinitással felismerő timociták klonális delécióval eliminálódnak, azonban vannak olyan sejtpopulációk, amelyek az úgynevezett agonista szelekcióval annak ellenére túlélnek a negatív szelekciót, hogy felismernek saját antigéneket, ide tartoznak többek között a természetes regulatórikus T-sejtek (tTreg). Az érett, szelekciót túlélő timociták a vérkeringésbe jutnak, ahol a naiv CD4<sup>+</sup> T-sejtek a bemutatott antigénnel való találkozás után aktiválódnak, proliferálnak, majd meghatározott helper T-sejt (Th) alcsoporttá differenciálódnak.

### **1.3 A ZAP-70 molekula szerepe a T-sejtek fejlődésében**

A Syk fehérjecsaládba tartozó ZAP-70 és Syk protein tirozin kinázok kiemelkedően fontos szerepet töltenek be a T-sejtek fejlődésében. A két fehérje expressziója ellentétes módon változik a T-sejt differenciáció során, a Syk a korai, kettős negatív stádiumban expresszálódik, míg a ZAP-70 később, a DP timocitákban, a rövid, köztes stádiumban pedig a két fehérje expressziója átfed. A ZAP-70 expressziója a pozitív szelekció során upregulálódik. Az upregulációhoz a pozitív szelekció alatt a TcR-n keresztüli jelátvitel is hozzájárul, ezáltal egy pozitív visszacsatolási rendszer alakul ki. Timocitákon kimutatták, hogy a ZAP-70 rögzített expressziós szintje mellett, az upreguláció és pozitív visszacsatolás hiányában a CD8<sup>+</sup> SP sejtek DP sejtekből történő érése gátolt, majd később bizonyították, hogy a CD4<sup>+</sup> SP timociták fejlődését is megzavarta az elégtelen TcR-n keresztüli jelátvitel. Összességében elmondható, hogy a ZAP-70 mind a CD4<sup>+</sup>, mind a CD8<sup>+</sup> SP timociták érésében fontos szerepet játszik, feltételezhetően a pozitív szelekcióhoz nélkülözhetetlen TcR-ZAP-70 pozitív visszacsatolási rendszeren keresztül.

### **1.4 ZAP-70 hiányos egértörzsek**

Az első ZAP-70 knockout egértörzset Negishi és munkatársai hozták létre. A SCID betegekkel ellentétben a homozigóta knockout (ZAP-70<sup>-/-</sup>) egerek másodlagos immunszerveiben nincsenek sem CD4<sup>+</sup>, sem CD8<sup>+</sup> T-sejtek, a tímuszukban is csupán DN és DP sejtek találhatóak. A lépben nem találhatóak  $\alpha\beta$  T-sejt receptort expresszáló T-sejtek, a B220<sup>+</sup> B-sejtek száma viszont emelkedett. Az ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek immunhiányosak, ezért szuszceptibilisek különböző infekciókra, konvencionális állatházi körülmények között saját tapasztalataink szerint csak 7-10 hétig tarthatóak életben. Weiss és

kollégái a protein kináz kódoló régió egy szegmensének deléciójával egy másik ZAP-70 knockout egértörzset is létrehoztak, melynek fenotípusa megegyezik az előzőekben ismertetett egérével.

## 1.5 TcR jelátvitel

A T-sejtek az antigén prezentáló sejtek által a megfelelő MHC-n bemutatott peptid antigént a T-sejt receptorokkal ismerik fel. A T-sejt receptoron keresztüli jelátvitel a TcR komplexen keresztül zajlik, amely TCR $\alpha$  és  $\beta$  láncokból, valamint a CD3 komplexből áll. Az antigén felismerése után a CD45 foszfatáz lehasítja az Lck tirozin kinázon található inhibitor foszfát-csoportot, majd az így aktivált Lck foszforilálja a TcR/CD3 komplex  $\zeta$ -láncának ITAM régióit. A ZAP-70 a foszforilált ITAM régiókhoz való dokkolás után aktiválódik, majd foszforilálja a membránhoz kötött LAT és SLP-76 molekulákat. Ehhez a komplexhez különböző adapter- és jelátviteli molekulák képesek kötődni, pl. PLC $\gamma$ 1, a PI3K p85 szabályozó alegysége, Grb2, Gads, Vav1, Itk, Nck, Shc és ADAP. A Vav1 a MAPK/JNK jelátviteli útvonalat, az Itk molekula pedig a PLC $\gamma$ 1-n keresztül a MAPK/ERK jelátviteli útvonalat aktiválja. A ZAP-70 a p38 $\alpha$ -n keresztül a LAT-tól és MAPK kinázoktól függetlenül járulhat hozzá a MAPK-aktivációhoz. Az említett útvonalak aktivációjának következtében komplex génexpressziós változások indulnak el az aktivált T-sejtekben, melyek sejtproliferációt és különböző citokinek termelését eredményezik. A kostimulációs molekulák közül a CD28 erősíti legnagyobb mértékben a T-sejtek aktivációjakor végbemenő jelátvitelt. A CD28 a T-sejtek antigén-felismerésekor az antigén prezentáló sejteken található CD80/86-hoz való kapcsolódás után járul hozzá a jelátviteli folyamatokhoz.

## 1.6 Rheumatoid arthritis

A rheumatoid arthritis (RA) krónikus, szimmetrikus, sokízületi gyulladással járó szisztémás autoimmun betegség, mely végül az ízületek pusztulásához vezet. A RA az európai és észak-amerikai populáció 0,5-1%-át érinti, ezzel az egyik leggyakoribb autoimmun betegség; nőknél magasabb a prevalenciája. Az ízületeken kívül más szervrendszereket érintő, ún. extraartikuláris tünetek is kialakulhatnak, például a tüdőben, a bőrben, a gyomor-bélrendszerben, a szemben, továbbá előfordulhat fokozott infékción hajlam, felgyorsult atherosclerosis és vasculitis is. A RA-ra jellemző az autoantitestek megjelenése, gyakori szerológiai eltérés a rheuma faktor (RF) és az antri-citrullinált protein antitestek (anti-CCP, ACPA) emelkedett mennyisége, melyek a diagnosztikában is kiemelkedő fontosságúak. A kialakuló szinovitiszben jelentős mértékű fehérvérsejt infiltráció látható, melyet főleg T- és B-sejtek, makrofágok, granulocyták és dendritikus sejtek alkotnak. Az ezen sejtek által helyileg termelt kemokinek és gyulladáscsökkentő citokinek vezetnek az ízület és a csont pusztulásához. Mind RA-ban, mind a RA állatmodelljeiben leírták a komplement-rendszer kóros aktivációját, a szöveti károsodás kialakulásában a C5a anafilatoxin és a C3b opszonin szerepe is feltételezett. Hagyományosan a RA-t Th1 típusú betegségnek tartották, de az IL-17 felfedezése után a Th17, illetve Th1/Th17 sejtek szerepe is bizonyításra került.

## 1.7 A rheumatoid arthritis állatmodelljei

A RA patogenezisének megértésében fontos szerepet játszanak a betegség állatmodelljei. Az arthritis kialakulhat spontán- és indukált módon, a legtöbb modellben rágcsálókat használnak

A spontán modellek közül a K/BxN-, a TNF-transzgenikus- és az SKG egérmodellek a legjobban karakterizáltak. A K/BxN egerekben az állatok 4-hetes korára spontán, uniform, súlyos gyulladással arthritis jelenik meg, valamint glükóz-6-foszfát izomeráz (GPI) ellenes antitest termelődik. Az arthritises egerekből nyert szérum transzferével a betegség átvihető, arthritis alakul ki a recipiensekben is (szérum transzfer modell). A TNF-transzgenikus egerek overexpresszálják a humán TNF- $\alpha$ -t kódoló, módosított transzgent. Az egerekben szimmetrikus, erozív poliartthritis alakul ki, melyhez főként a szinóvium sejtjei által termelt transzgen TNF- $\alpha$ -expresszió járul hozzá. Az SKG egértörzsben a ZAP-70-t kódoló gén pontmutációja miatt elégtelen T-sejt receptoron keresztüli jelátvitel alakul ki, mely zavart eredményez a T-sejt-szelekció folyamatában. Ennek következtében autoreaktív T-sejtek kerülhetnek ki a perifériára, amelyek hozzájárulnak az autoimmun arthritis kialakulásához.

A leggyakrabban használt indukálható arthritis modell a kollagén-indukált arthritis (CIA), mely DBA/1 egerek komplett Freund adjuvánsban (CFA) feloldott II-es típusú kollagénnel történő ismételt intrakután immunizálásával váltható ki. Munkánk során, egy másik indukálható arthritis modellt választottunk: a rekombináns humán G1 (rhG1)-indukált arthritis (GIA), mely mind immunológiai, mind klinikai képében nagyon hasonlít a humán betegségre. Az arthritis kiváltásához 4-5 hónapos BALB/c nőstény egereket rhG1 antigénnel immunizálunk, mely a humán porc-eredetű proteoglikán aggregátum fehérje G1 doménjét és egy egér IgG-Fc régiót tartalmazó fúziós fehérje. A G1 domén három artritogén T-sejt epitópot is tartalmaz, ami jól jelzi a T-sejtek fontosságát a betegség patogenezisében. A GIA T- és B-sejt-függő-, autoantitest termeléssel (RF, anti-CCP) járó folyamat. A GIA-ban szignifikáns IL-17 és IFN $\gamma$ -termelés figyelhető meg, így a kiváltott arthritis jelentős Th1/Th17 polarizációt mutat. Mindezen klinikai, szövettani és immunológiai jellemzők alapján, valamint a kórfolyamat progresszív és visszafordíthatatlan jellegére való tekintettel kijelenthető, hogy a GIA minden szempontból alkalmas a humán RA komplex modellezésére.

## 2 Célkitűzések

A ZAP-70 mind a T-sejt fejlődésben, mint aktivációban kiemelkedő fontosságú molekula. Kutatócsoportunk korábban részletesen vizsgálta a ZAP-70 szerepét a T-sejt receptoron keresztüli, valamint a glükokortikoidok nem-genomikus jelátvitelében. Néhány éve rendelkezésünkre áll a ZAP-70 knockout egértörzs, amiben lehetőségünk nyílt a ZAP-70 fehérjével kapcsolatos *in vivo* vizsgálatokra. Intézetünkben kutatásokat végzünk a rheumatoid arthritis GIA egérmodelljében, melyben tudomásunk szerint eddig még nem vizsgálták a T-sejt jelátvitelben részt vevő ZAP-70 molekula szerepét.

PhD munkám során ZAP-70 hiányos egerek *in vivo* vizsgálatait tűztük ki célként. A vizsgálatok első részében ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek T-sejt rekonstitúciós vizsgálatát végeztük, ezzel a ZAP-70 T-sejtek fejlődésében betöltött szerepének részletesebb megismerése és a súlyos kombinált immunhiány megszüntetése volt a cél.

1. A ZAP-70<sup>-/-</sup> és ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek immunfenotípusának részletes jellemzése szövettan és áramlási citometria segítségével.
2. A T-sejt rekonstitúció korai kinetikájának és a hosszú-távú változásoknak követése a másodlagos nyirokszervekben és a tímuszban.
3. A transzferált T-sejtek funkcionális vizsgálata.
4. A donor timociták tímuszba való homingjának vizsgálata.

A munkánk másik részében ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben a ZAP-70 részleges hiányának autoimmun arthritis kialakulására való hatását tanulmányoztuk.

1. A GIA kialakulásának és súlyosságának vizsgálata ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben.
2. Az ZAP-70<sup>+/-</sup> állatokban indukált arthritisben bekövetkező immunológiai változások jellemzése (citokinek mintázata, autoantitestek mennyisége, T-sejt válasz).
3. Az autoimmun arthritis és a ZAP-70 részleges hiányának T-sejt-aktivációra és apoptózisra gyakorolt hatásainak vizsgálata.

### 3 Anyagok és módszerek

#### 3.1 Kísérleti állatok

Kísérleteink során BALB/c, ZAP-70-deficiens és EF1 $\alpha$ -GFP transzgenikus egereket használtunk. A kísérleti állatokat a PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézet állatházában, konvencionális körülmények között tenyésztettük és tartottuk. A Jackson Laboratories-tól eredetileg beszerzett ZAP-70 deficiens egereket (B6.129X1-Zap70tm1Weis/J) BALB/c alapra kereszteztük vissza. A transzfer kísérletekben EF1 $\alpha$ -GFP-transzgenikus egereket használtunk donorként. A GIA kísérletekhez 4-5 hónapos BALB/c és ZAP-70<sup>+/-</sup> nőtény egereket használtunk. Minden kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottságának engedélyével végeztünk (BA02/2000-3/2012).

#### 3.2 Timocita transzfer

Az adoptív transzfer kísérletek során a recipiens ZAP-70 homozigóta knockout (ZAP-70<sup>-/-</sup>) egerek vad-típusú társaik (ZAP-70<sup>+/+</sup>) vagy GFP-transzgenikus egerek timocitáit kapták. A donor egerek tímuszát eltávolítottuk, majd PBS-ben egysejt-szuspenziót készítettünk belőlük. A recipiens egerek 3-4-hetes korban 10<sup>7</sup> donor thymocytát kaptak intraperitoneális (i.p.) oltás formájában. A transzfer után a CD3<sup>+</sup> T-sejtek megjelenését vérvétel után, áramlási citometriás mérésekkel követtük. A kísérlet végén az állatok tímuszát, lépét, perifériás és mezenterialis nyirokcsomóit, az omentumot, valamint a Peyer plakkokat szövettani és áramlási citometriás módszerrel elemeztük. A timociták peritoneális homingjának vizsgálatához a donor timocitákat az i.p. oltás előtt karboxifluoreszcein szukcinimidil észterrel (CFSE) jelöltük meg *in vitro*, a gyártó leírásának megfelelően.

#### 3.3 Áramlási citometria

A kísérletek végén izolált szövetek sejtes összetételét áramlási citometria segítségével határoztuk meg. A szerveket (tímusz, lép, nyirokcsomók, Peyer plakk) homogenizáltuk, majd átszűrtük, az alvadásgátolt vért és a lépét hemolizáltuk. A sejtfelszíni jelöléshez mintánként 10<sup>6</sup> sejtet sötétben, 30 percig a megfelelő antitest-keverékekkel inkubáltunk. A regulatórikus T-sejtek meghatározásához szükséges intracelluláris jelölést a sejtfelszíni jelölést követően FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. A kísérlethez az alábbi antitesteket használtuk: anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD3-FITC, anti-TCR $\alpha\beta$  -Alexa Fluor 700, anti-TCR $\gamma\delta$  -BV 421, anti-CD4-PE.Cy5, anti-CD25-APC, anti-FoxP3-PE, anti-B220-PE-Cy7, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE-Cy5.5. A mérést és az adatok analízisét FACS Canto II áramlási citométerrel, FACS Diva Software analízáló programmal végeztük.

#### 3.4 Immunfluoreszcens festés

A tímuszokból, nyirokcsomókból és lépékből fagyasztott metszeteket készítettünk, hideg acetonos fixálás után a metszeteket 5% BSA-tartalmú PBS oldattal blokkoltuk. Az immunfluoreszcens festéshez a megfelelő antitest-keverékkel 1 órán át inkubáltuk, majd PBS-es mosás után lefedtük a metszeteket. A festésekhez a következő, direkt jelölt antitesteket használtuk: anti-CD3-FITC, anti-

B220-Alexa Fluor 647, anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC, anti-Ly51-PE, anti-EpCAM1-FITC. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a tímusz metszeteket a blokkolás után fenilhidrazin oldattal kezeltük az endogén peroxidáz aktivitás gátlására. Ezután jelöletlen anti-EpCAM1 patkány anti-egér elsődleges antitesttel inkubáltuk a metszeteket, majd PBS-es mosás után másodlagos antitestként anti-patkány Ig-peroxidáz antitestet alkalmaztunk. Újabb mosást követően a metszeteket diamino-benzidinnel (DAB) hívtuk elő. A képeket Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal, az alysis szoftver segítségével készítettük. Az intraperitoneális homing kísérletek végén az omentumot whole-mount immunhisztokémia segítségével analizáltuk. Az eltávolított omentumokat 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd mosást követően 5% BSA és 0,1% szaponin tartalmú PBS-sel telítettük. PBS-es mosást követően nyúl anti-fibronectin elsődleges antitestet adtunk a mintákhoz (éjszakán át, 4°C). Újabb mosást követően anti-nyúl-IgG-Cy3 másodlagos antitesttel inkubáltuk a mintákat 3 órán keresztül 4°C-on. A mintákat Olympus Fluo-View FV-1000 konfokális mikroszkóppal analizáltuk.

### **3.5 T-sejt izolálás és in vitro aktiváció**

A recipiens egerek lépéből a transzfert követően T-sejteket izoláltunk az EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit segítségével a gyártó utasításának megfelelően. Az izolált T-sejteket 24, illetve 48 órán keresztül stimuláltuk anti-CD3/CD28 MACSiBead™ hozzáadásával ( $5 \times 10^6$  sejt/lyuk, bead:sejt arány 2:1). Az így aktivált T-sejteket két részre osztottuk: a sejtek proliferációs rátáját Promega CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay segítségével határoztuk ( $2 \times 10^4$  sejt/lyuk, triplikátumokban), a maradék mintákból pedig sejt-lizátumokat készítettünk Western blot analízishez.

### **3.6 Western blot**

Az aktivált T-sejtek líziséhez Triton X-tartalmú lízis puffert használtunk, melyhez proteáz inhibitor és nátrium-ortovanadátot adtunk. A lízist 30 percen keresztül jégen végezzük, majd a mintákat centrifugáltuk, szintén 4°C-on. A felülúszókat merkapto-etanol-tartalmú SDS mintapufferben forraltuk, majd a minták elválasztása SDS-PAGE segítségével történt. Blottolás után a nitrocellulóz membránokat a megfelelő oldatokkal telítettük (2 vagy 5% BSA, vagy 5% NFDM), a megfelelő elsődleges (anti-foszfotirozin, anti-Bcl-2, anti-Bim, anti-Cbl-b, anti-kaspáz-3 (hasított), anti-kaspáz-8 (hasított), anti-kaspáz-9 (hasított), anti-citokróm c), majd a megfelelő másodlagos antitestekkel (anti-egér-IgG-peroxidáz vagy anti-nyúl-IgG-peroxidáz) inkubáltuk. A blotokat kemilumineszcens előhívó reagenssel hívtuk elő, a gyártó utasításainak megfelelően. A kemilumineszcens jelek detektálása Fujifilm LAS 4000 blot imaging system segítségével történt. A minták egyenlő mennyiségének és tisztaságának ellenőrzésére a blotokat anti-β-actin antitesttel is előhívtuk.

### **3.7 Arthritis indukció**

Az autoimmun arthritis kiváltásához háromhetente, háromszor intraperitoneálisan immunizáltunk 4-5-hónapos BALB/c, illetve ZAP-70<sup>+/-</sup> nőstény egereket 40 µg rhG1 és dimetil-dioktadecil-ammónium-bromid (DDA) adjuváns keverékével. A második oltást követően (21. naptól) az arthritis megjelenését



és súlyosságát klinikai pontszámokkal monitoroztuk. A harmadik immunizálást követően az egereket feláldoztuk, majd a szérumokat és a lépeket begyűjtöttük. A szérumokból az autoantitest és a citokin koncentrációk meghatározását végeztük, a lépsejtekből pedig *in vitro* sejt kultúrát indítottunk, valamint áramlási citometriás méréseket, és néhány kísérletekben T-sejt aktivációs vizsgálatokat végeztünk.

### **3.8 In vivo biolumineszcens vizsgálatok**

Az *in vivo* képalkotó vizsgálatok során az altatott egereket luminol PBS-es oldatával oltottuk be intraperitoneálisan (150mg/ttkg). A képeket 10 perccel a luminol beadása után készítettünk el az IVIS Lumina II készülék segítségével ( $\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$ ).

### **3.9 Intracelluláris citokin mérés**

Az intracelluláris citokin méréshez  $10^6$  sejtet PMA/ionomycinnel 12 órán át, Brefeldin A hozzáadása mellett stimuláltunk, majd az IL-17 és IFN- $\gamma$  citokinek intracelluláris mennyiségét áramlási citometriával határoztuk meg, a jelölés a 3.3 pontban ismertetett intracelluláris jelölés protokollja szerint zajlott.

### **3.10 In vitro lépsejtkultúra**

A kísérleti állatok lépéből izolált sejtekből sejt kultúrát létesítettünk ( $1,8 \times 10^6$  sejt DMEM+10% FCS médiumban), majd a sejteket  $1,5 \mu\text{g}$  rhG1 antigén hozzáadásával/hozzáadása nélkül 3 napig tenyésztettük. A felülúszókat begyűjtöttük, majd fagyasztottuk a későbbi citokin ELISA vizsgálatokhoz.

### **3.11 Proliferáció**

Az immunizált állatok lépéből izolált sejtek egy részét 96-lyantigén jelenléte mellett/nélkül 3 napig tenyésztettük ( $3 \times 10^5$  sejt/lyuk, triplikátumokban, DMEM+10% FCS médiumban), majd a proliferáció mértékét Promega CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay segítségével határoztuk meg.

### **3.12 Citokin ELISA mérések**

A szérumokból illetve a lépsejtkultúra felülúszókból különböző citokinek (IL1 $\beta$ , IL4, IL6, IL-17, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) koncentrációját határoztuk meg R&D Systems ELISA kiték segítségével a gyártó utasításának megfelelően. A rhG1 antigénre specifikus autoantitestek szérum-koncentrációját szintén ELISA segítségével határoztuk meg. ELISA lemezekre rhG1 antigént adszorbeáltattunk. A lemezeket 1,5% NFD/ PBS oldattal telítettük szobahőmérsékleten 1 órán keresztül, majd PBS-Tween oldattal mostuk. A szérumokkal 2 órán keresztül inkubáltuk a lemezeket, majd újra mostuk. Másodlagos antitestként anti-IgG1-peroxidáz antitestet használtunk (2 óra, szobahőmérsékleten), majd ortho-pheniléndiamin kromoför és hidrogen-peroxidáz szubsztrát hozzáadásával előhívtuk a lemezeket.

### 3.13 Statisztikai módszerek

Az eredmények statisztikai analízisét a GraphPad szoftverrel végeztük, kétmintás t-próba segítségével, ahol statisztikailag szignifikáns különbségnek a  $p < 0.05$  értéket tekintettük. Az ábrázolt értékek minden esetben átlag  $\pm$  SEM.

## 4 Eredmények

### 4.1 A ZAP-70 knockout egér modell jellemzése

#### 4.1.1 ZAP-70 expresszió ZAP-70 hiányos egerekben

A ZAP-70 fehérje expresszióját Western blot és áramlási citometria technikákkal vizsgáltuk. A ZAP-70<sup>+/+</sup> és ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek nyirokcsomóiban és lépében kimutatható a ZAP-70 fehérje, míg a ZAP-70<sup>-/-</sup> állatok mintáiban a várakozásoknak megfelelően nem expresszálódik. Méréseinket kvantifikálva igazoltuk, hogy a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben a ZAP-70 expressziója kb. fele a ZAP-70<sup>+/+</sup> egerekben mértnek.

#### 4.1.2 A másodlagos nyirokszervek sejtösszetétele

A ZAP-70 knockout egerek vérének, másodlagos nyirokszerveinek és tímuszának sejtösszetételében bekövetkező változásokat áramlási citometriával vizsgáltuk. Ahogy vártuk, a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek szerveiben szinte alig mutathatók ki T-sejtek a ZAP-70<sup>+/+</sup> kontrollhoz képest, míg a B-sejtek aránya szignifikánsan nőtt. A ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek esetében vannak T sejtek a perifériás nyirokszervekben, de százalékos arányuk szignifikánsan csökkent a ZAP-70<sup>+/+</sup> kontrollhoz képest, míg a B sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, bár kisebb mértékben, mint a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerekben. A ZAP-70<sup>+/-</sup> és ZAP-70<sup>+/+</sup> tímuszokban a sejtösszetétel hasonló volt, a timociták kevesebb, mint 1%-a kettős negatív, a többség kettős pozitív, a CD4 egyszeresen pozitív sejtek aránya  $7,4 \pm 0,4\%$ , a CD8 egyszeresen pozitív sejteké  $2,3 \pm 0,2\%$  a ZAP-70<sup>+/+</sup> egérben, a ZAP-70<sup>+/-</sup> tímuszban pedig  $9,8 \pm 0,9\%$ , illetve  $2,4 \pm 0,3\%$ . A ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek tímuszában a timociták szinte mind kettős pozitívak ( $99,9 \pm 0,1\%$ ), a kettős negatív sejtek aránya nem tér el a vad-típustól, az egyszeresen pozitív sejtek viszont szinte teljesen hiányoznak. A ZAP-70<sup>+/-</sup> és ZAP-70<sup>+/+</sup> egerek nyirokszerveiben és vérében megvizsgáltuk a T<sub>reg</sub> sejtek arányát a CD4<sup>+</sup> sejteken belül. A tímuszban és a vérben nem volt különbség a ZAP-70<sup>+/-</sup> és ZAP-70<sup>+/+</sup> egerek T<sub>reg</sub> aránya között, a ZAP-70<sup>+/+</sup> egerek lépében és nyirokcsomóiban azonban nagyobb arányban találhatóak T<sub>reg</sub> sejtek, mint a ZAP-70<sup>+/-</sup> állatokéban.

#### 4.1.3 Szövettan

A ZAP-70<sup>+/+</sup> egerek lépében jól láthatóak a follikulusok a B-sejtekkel és a T-sejtek által alkotott PALS régiók. A T-sejtek arányában tapasztalt csökkenés ellenére a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek lépében a PALS régiók jelen vannak, a szövet morfológiája hasonló a ZAP-70<sup>+/+</sup>-hoz. Ezzel szemben a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek lépéből teljesen hiányoznak a PALS régiók, a centrális artériák mellett nincsenek jelen T-sejt zónák, a B-sejtek viszont itt is follikulusokba rendeződnek. Az inguinális nyirokcsomók esetében a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben a parakortikális T-sejt zóna jelen van, de kevesebb sejtet tartalmaz és kevésbé strukturált, mint a ZAP-70<sup>+/+</sup> nyirokcsomóban, míg a ZAP-70<sup>-/-</sup> mintákban a kevés, elszórtan jelenlévő T-sejt nem alkot rendezett struktúrát a paracortexben. Ezzel szemben a mezenterialis nyirokcsomókban a

változások sokkal kevésbé látványosak: a ZAP-70<sup>+/-</sup> nyirokcsomókban jelentős számú T-sejt található, így a morfológia hasonló a vad-típushoz. Szintén nem elhanyagolható mennyiségű T-sejt található a ZAP-70<sup>-/-</sup> mezenterialis nyirokcsomókban, de ezek sem alkotnak rendezett T-sejt zónát. A ZAP-70<sup>+/+</sup> és ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek tímuszában elkülöníthető a kettős pozitív sejteket tartalmazó cortex és az egyszeresen pozitív timocitákat tartalmazó medulla. A medulla méretében csökkenés figyelhető meg a heterozigóta tímuszban is, de a ZAP-70<sup>-/-</sup> tímuszokból teljes egészében hiányzik a egyszeresen pozitív sejteket tartalmazó medulla, mely összhangban van az áramlási citometriás eredményekkel. A timociták arányában megfigyelt változásokkal párhuzamosan a tímusz epithél sejtek arányában is eltérések figyelhetőek meg. A ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek tímuszában csak elszórtan vannak jelen medulláris epitél sejtek, kortikális epitél sejtek töltik ki a szövet nagy részét, a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben ugyan a medulla és a cortex elkülöníthető, a medulláris epitél sejtek által kitöltött terület azonban kisebb, mint a ZAP-70<sup>+/+</sup> esetében

#### 4.1.4 T-sejt aktiváció és apoptózis

Anti-CD3/CD28 stimulációt követően a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekből származó T-sejtek eltérő mintázatú, csökkent mértékű tirozin-foszforilációt mutattak mind 24, mind 48 h kezelés után a ZAP-70<sup>+/+</sup> kontrollokhoz viszonyítva. A hasított kaszpáz-3 jelenléte az apoptotikus útvonalak aktivitását jelzi. A stimulált ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben kevesebb hasított kaszpáz-3 mutatható ki mind 24, mind 48 h után, mint a BALB/c egerek stimulált T-sejtekben. 48h után a BALB/c és a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek stimulált T-sejtjeiben egyaránt magasabb volt a kaszpáz-3 hasított formájának expressziója, mint 24 h stimuláció után. A hasított kaszpáz-8 az extrinszik útvonal iniciátor kaszpáza. 24 h stimuláció után a BALB/c T-sejtekben kis mértékben csökkent a kaszpáz-8 aktiváció, a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek T-sejtjeiben viszont kifejezettebb volt ez a különbség. 48h után ez a különbség kiegyenlítődik, a stimulálatlan BALB/c T-sejtekben pedig csökken a hasított kaszpáz-8 mennyisége. Az intrinszik apoptotikus útvonal aktiválódását a hasított kaszpáz-9 segítségével vizsgáltuk. ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek T-sejtjeiben mind 24, mind 48h után jelentősen több a hasított kaszpáz-9 mennyisége, mint a BALB/c mintákban. A 24 órás mintákban, valamint a 48 órás minták közül a BALB/c T-sejtekben stimuláció hatására nő a kaszpáz-9 hasított formájának expressziója, azonban 48 óra elteltével a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek stimulált és stimulálatlan T-sejtjeiben körülbelül megegyezik a hasított kaszpáz-9 mennyisége.

#### 4.1.5 T-sejt rekonstitúció ZAP-70<sup>-/-</sup> egerekben

Már 10 nappal az intraperitoneális timocita transzfer után T-sejtek jelentek meg a vérben (kb. 4%), arányuk pedig a kísérlet időtartalma alatt (120 nap) állandó maradt (4 és 6 % között). Az állatok vérében, perifériás nyirokcsomóiban és lépében az  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T-sejtek aránya normalizálódott, a T-sejtek több, mint 80%-a  $\alpha\beta$  T-sejt receptort expresszált. A kísérlet végén a recipiens egerek perifériás nyirokcsomóiból és lépéből immunfluoreszcens szövettani mintákat is készítettünk, melyeken jól látható, hogy a transzfert kapott állatok vizsgált nyirokszerveiben T-sejt zónák jelentek meg. Hogy igazoljuk, hogy a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerekben a timocita transzfer hatására normálizálódik a T-sejtérés, a recipiens egerek tímuszában vizsgáltuk a különböző timocita alcsoportokat. Míg a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek

tímuszában a timociták szinte kizárólag kettős pozitív fenotípusúak ( $99 \pm 0,7\%$ ), a transzfer után ez az arány  $90,5 \pm 3,7\%$ -ra csökkent, valamint megjelentek  $CD4^+$  és  $CD8^+$  egyszeresen pozitív thymociták. A timocita transzfer hosszútávú hatásainak vizsgálatára a transzfert kapott egerek egy csoportját 120 nap elteltével nem dolgoztuk fel, 4 állat esetében pedig egészen 12 hónapig folytattuk a monitorozást. A kimérizmus továbbra is stabilnak bizonyult, a transzfer sikerességét jól mutatja az is, hogy az állatok élettartama jelentősen megnőtt a transzfert nem kapott társaikéhoz képest.

#### 4.1.6 A tímuszban lezajló korai változások vizsgálata

A tímuszban már az i.p. transzfert követő 10-17. napon láttunk változásokat: a kettős negatív timociták aránya  $0,8 \pm 0,1\%$ -ról  $4,3 \pm 1,1\%$ -ra nőtt (10. nap), ezzel párhuzamosan a kettős pozitív sejtek aránya  $99 \pm 0,7\%$ -ról  $94,7 \pm 1,1\%$ -ra csökkent. Az érett, egyszeresen pozitív timociták aránya folyamatosan emelkedett a negyedik naptól, majd a 17. napon mind a  $CD4^+$  ( $0,6 \pm 0,1\%$ ), mind a  $CD8^+$  timociták ( $0,5 \pm 0,1\%$ ) aránya elérte a maximumát, jelezve a tímuszban zajló T-sejtérés normalizálódását. Érdekes módon a 24. napon az összes timocita alcsoport aránya visszatért a kiindulási értékre. Kíváncsiak voltunk, hogy a timocita csoportokban lezajló változások hatással vannak-e a tímusz morfológiájára is. Tizenhét nappal a transzfer után a szövettan alapján rendezett, medulláris területek jelentek meg foltszerű elrendezésben, a kvantitatív mérések alapján a medulláris részek területe a timocita alcsoportok arányával párhuzamosan változott: a 17. napon látott kezdeti növekedés (0. nap:  $1,3 \pm 0,17$ , 17. nap:  $2,05 \pm 0,27$ ) után a medulla területe ismét csökkent ( $1,17 \pm 0,12$ )

#### 4.1.7 GFP-transzgenit expresszáló timociták transzfere

Hogy bizonyítsuk, hogy a fentiekben ismertetett T-sejt repopuláció valóban a transzferált timociták által kialakított stabil kimérizmus eredménye, GFP-transzgenikus egerekből származó donor timocitákkal is elvégeztük a transzfert. A perifériás vérben a T-sejtek aránya a transzfert követő 7. és 12. hétre  $31,6 \pm 6,4\%$ -ra (ebből  $83,5 \pm 3,9\%$  GFP<sup>+</sup>), illetve  $27,1 \pm 4,4\%$ -ra (ebből  $78,5 \pm 6\%$  GFP<sup>+</sup>) nőtt. A másodlagos nyirokszervekben is vizsgáltuk a donor-eredetű T-sejtek arányát: a perifériás és mezenterialis nyirokcsomókban, lépben és Peyer plakkokban is azt találtuk, hogy a transzfert követően a T-sejtek aránya 16 és 24% között van, a donor sejtek aránya a T-sejteken belül a nyirokcsomókban 70%, a lépben 90%, a Peyer plakkban pedig 87% volt. A donor sejtek elhelyezkedését a lépben szövettan segítségével vizsgáltuk: GFP<sup>+</sup> sejtek csak a T-sejteket tartalmazó PALS régióban láttunk, a B-sejteket tartalmazó folliculusokban nem. A tímuszban szövettan segítségével nem sikerült kimutatni GFP<sup>+</sup> sejteket feltehetően azok alacsony száma miatt, azonban RT-PCR segítségével erős GFP expresszió látható a GFP<sup>+</sup> timocita transzfer kapott egerek tímuszában, míg ugyanezen egerek csontvelő mintáiban igen alacsony volt a GFP expressziója.

#### 4.1.8 A timociták peritoneumból való homingjának vizsgálata

Annak kiderítésére, hogy a peritoneumba beadott sejtek hogyan hagyják el a peritoneumot és jutnak el a keringésbe CFSE-jelölt timocitákkal oltottunk be intraperitoneálisan ZAP-70<sup>-/-</sup> egereket, majd

12, 24, 48 és 72 óra múlva analizáltuk a mediastinális, inguinális és axilláris nyirokcsomókat, valamint a peritoneum különböző szerveit. A legtöbb donor limfocitát az omentumban találtuk, melyben a CFSE<sup>+</sup> sejtek többsége CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> kettős negatív volt. A whole mount szövettan alapján a donor-sejtek nem elszórva, hanem aggregátumok formájában jelennek meg az omentumban, immunfluoreszcens festés segítségével pedig megállapítottuk, hogy a CFSE<sup>+</sup> sejtek az omentum limfoid területein, az úgy nevezett milky spotokban találhatóak.

#### 4.1.9 Funkcionális tesztek

Annak a vizsgálatára, hogy a transzfert követően megjelenő T-sejtek funkcionálisan aktívak-e *in vitro* T-sejt aktivációs tesztek végeztünk. Az anti-CD3/CD28 gyöngyökkel történt stimuláció hatására a transzferált egerek lépéből izolált T-sejtek proliferációs és tirozin foszforilációs mintázata a ZAP-70<sup>+/+</sup> egerek T-sejtjeihez hasonló. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a donor timocitákból differenciálódott T-sejtek aktivációs és proliferációs képessége megközelíti a kontrollokét.

## 4.2 **Rekombináns humán G1-indukált arthritis (GIA) vizsgálata részleges ZAP-70 hiányos egerekben**

### 4.2.1 Az autoimmun arthritis klinikai képe

A kezdeti hasonló klinikai pontszámok után az 52. naptól a ZAP-70<sup>+/-</sup> csoportban szignifikánsan enyhébb arthritist figyeltünk meg. Az arthritis incidenciája a ZAP-70<sup>+/-</sup> csoportban (20%) a fele volt a második oltás időpontjában (42. nap) a ZAP-70<sup>+/+</sup> csoportban megfigyeltnek (40%). Ezután a két csoportban a betegség gyakorisága hasonló módon emelkedett, majd a kísérlet végén mindkét csoportban elérte a 100%-ot. *In vivo* biolumineszcens vizsgálatokkal a gyulladás mértékét kívántuk mennyiségileg is pontosabban jellemezni. A klinikai pontszámoknak megfelelően az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> állatok hátsó lábán szignifikánsan kisebb myeloperoxidáz aktivitást mértünk.

### 4.2.2 Antigén-specifikus proliferáció, citokin- és autoantitest termelés

Az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek lépsejtjei rhG1 stimuláció hatására szignifikánsan kisebb mértékben osztódtak a rhG1 antigénnel stimulált lépsejtkultúrák felülúszójából mért citokinek közül az IL-4, IL-6 és IFN- $\gamma$  mennyisége szignifikánsan kevesebb volt a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek mintáiban, az IL-17 mennyisége szintén csökkent, míg a TNF- $\alpha$  körülbelül hasonló mennyiségben volt jelen az arthritises BALB/c és ZAP-70<sup>+/-</sup> felülúszókban. Az arthritises egerek szérumból mért rhG1 antigén ellenes, IgG1 izotípusú autoantitestek mennyisége szintén kevesebb volt a ZAP-70<sup>+/-</sup> állatokban, de a különbség statisztikailag nem mutatkozott szignifikánsnak. A szérumból mért IL-17 és IL-4 szintek hasonlóak voltak a két csoportban, IL-6 viszont nagyobb mennyiségben volt jelen az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek szérumban.

### 4.2.3 Helper T-sejt alcsoportok meghatározása intracelluláris citokin termelés méréssel

Az IL-17 esetén az arthritises CD4<sup>+</sup> sejtek szintén több IL-17-t termelnek, mint az egészséges állatokból származó CD4<sup>+</sup> sejtek, míg az egészséges és arthritises csoportokon belül a BALB/c és ZAP-

70<sup>+/-</sup> állatok között jelentős eltérést nem figyeltünk meg. Ahogy várható volt: az arthritises egerekből származó CD4<sup>+</sup> sejtek nagyobb arányban termeltek IFN $\gamma$ -t, mint a nem arthritises csoportok CD4<sup>+</sup> sejtjei. Az arthritises csoporton belül a BALB/c egerek CD4<sup>+</sup>sejtjei szignifikánsan nagyobb arányban termeltek IFN $\gamma$ -t, mint a ZAP-70<sup>+/-</sup> egereké, mint az arthritises BALB/c egerek lépsejtjei.

#### 4.2.4 A T-sejt aktiváció és apoptózis mintázat változásai autoimmun arthritisen és ZAP-70 részleges hiányában

A tirozin-foszforilációs mintázat alapján az egészséges és arthritises BALB/c egerek T-sejtjei hasonló mértékben aktiválódnak anti-CD3/CD28 stimuláció hatására, míg ehhez képest az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek T-sejtjeiben csökkent tirozin foszforilációt mértünk a stimuláció után. Mindkét stimulált arthritises mintában nagyobb mértékű foszforiláció látható, mint az egészséges állatokéban

Az egészséges és arthritises BALB/c egerekből izolált T-sejtekben stimuláció hatására nőtt a Cbl-b mennyisége, az arthritises stimulált mintákban az egészségeshez hasonló expresszió látható. Az egészséges ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben nem tudtuk Cbl-b-t kimutatni stimuláció után sem, azonban az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben megjelenik Cbl-b a stimuláció után a stimulálatlanhoz képest nagyobb, de a BALB/c-nél kisebb mennyiségben. Az apoptotikus útvonalak közös markereként használt hasított kaszpáz-3 mellett a hasított kaszpáz-8 kimutatásával az extrinszik, a hasított kaszpáz-9 vizsgálatával pedig az intrinszik apoptózis útvonal aktivitását kívántuk tanulmányozni. Az arthritises BALB/c stimulált T-sejtjeiben kisebb mennyiségben van jelen hasított kaszpáz-3, mint az egészséges BALB/c egerekében, ezzel szemben az egészséges és arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben hasonló volt az expresszió mértéke. Az arthritises egereket összehasonlítva a hasított kaszpáz-3 mennyisége a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek stimulált T-sejtjeiben több, mint a BALB/c-k stimulált T-sejtjeiben. A hasított kaszpáz-8 az összes mintában kimutatható volt, azonban míg az arthritises egerekben a stimuláció hatására csökkent a szintje, addig az egészséges BALB/c-k T-sejtjeiben nem változott, az egészséges ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben viszont emelkedett. BALB/c egerekben a hasított kaszpáz-9 mennyisége megnőtt a stimuláció hatására mind az egészséges, mind az arthritises T-sejtekben, a stimulált, arthritises BALB/c T-sejtekben nagyobb expressziót találtunk. A hasított kaszpáz-9 mennyisége egészséges ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben a stimuláció hatására nem változott, de már a stimulálatlan mintákban is megjelent az aktivált forma. Az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben stimuláció nélkül is hasonló mennyiségben volt jelen hasított kaszpáz-9, mint az egészséges, stimulált ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben. Anti-CD3/CD28 aktiváció hatására enyhén emelkedett a hasított kaszpáz-9 mennyisége, de az expresszió mértéke kisebb, mint az arthritises stimulált BALB/c mintákban. A Bim a Bcl-2 családba tartozó proapoptotikus fehérje, az intrinszik apoptotikus útvonal egyik fontos szabályozója, izoformái közül a Bim<sub>EL</sub>-t és a Bim<sub>L</sub>-t vizsgáltuk. Mindkét izoforma kimutatható volt az összes mintában 72h anti-CD3/CD28 stimuláció után, nagyobb mennyiségben a Bim<sub>EL</sub> volt jelen. Stimuláció hatására a Bim<sub>EL</sub> mennyisége minden mintapárban emelkedett, az arthritises mintákban nagyobb mértékben. A stimuláció által kiváltott emelkedés az arthritises BALB/c T-sejtekben az egészségeshez viszonyítva jelentősebb, mint az ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben látott különbség, mivel itt az egészséges és arthritises T-sejtekben hasonló mértékű változást

tapasztaltunk a stimuláció hatására. A Bim<sub>L</sub> szintén jelen volt az összes mintában, azonban a stimulációt követő változások nem voltak olyan látványosak, mint a Bim<sub>EL</sub> esetében. Ez alól kivételt képeznek az arthritises BALB/c T-sejtek, ahol stimuláció hatására a legnagyobb expresszió-növekedést tapasztaltunk mindkét izoformát figyelembe véve. A citokróm c az intrinszik apoptotikus útvonal aktiválódásakor jelenik meg a citoplazmában a mitokondriumból felszabadulva. Az egészséges BALB/c T-sejtekben stimuláció hatására kismértékben emelkedik a citokróm c a citoplazmában, míg egészséges ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben a stimuláció hatására inkább ellentétes változást tapasztaltunk. Minden arthritises mintában növelte a stimuláció a citokróm c felszabadulását, a növekedése mértéke hasonló volt a BALB/c és a ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben. Érdekes módon az arthritises stimulálatlan mintákban kevesebb citokróm c-t mutattunk ki, mint az egészséges stimulálatlan T-sejtekben. A Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje, mely az intrinszik apoptózis útvonalban neutralizálja a pro-apoptotikus fehérjét. A BALB/c egerekből izolált T-sejtekben csak stimuláció hatására mutatható ki Bcl-2, az arthritises mintában nagyobb mennyiségben. Ezzel szemben az egészséges ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben csak a stimulálatlan mintában van jelen Bcl-2 kis mennyiségben, ugyanezen arthritises T-sejtekben a stimuláció növeli a Bcl-2 mennyiségét, de a stimulálatlan mintában is kimutatható.

## 5 Megbeszélés

### 5.1 A ZAP-70 hiányos egerek immunfenotípusának jellemzése

Mivel a tervezett kísérleteink során ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekkel is terveztünk dolgozni, elvégeztük az állatok alap immunfenotípusának jellemzését. A ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek perifériás nyirokszerveiben csökkent a T-sejtek aránya a vad-típushoz képest, azonban nem annyira látványosan, mint a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek esetében, melyeknek gyakorlatilag nincsenek T-sejtjeik a periférián. A B-sejtek aránya mind a ZAP-70<sup>+/-</sup>, mind a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerekben nőtt a vad-típushoz képest. A tímuszban kisebb a különbség a vad-típus és a ZAP-70<sup>+/-</sup> állatok sejtarányai között, mint a perifériás nyirokszervekben, a CD4<sup>+</sup> timociták aránya nőtt a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben, de ez a különbség nem volt szignifikáns. Ennek hátterében az állhat, hogy a ZAP-70 a CD8<sup>+</sup> sejtek fejlődésében jelentősebb szerepet játszik, a ZAP-70 pozitív szelekció előtti upregulációja nélkül CD8 SP timociták nem jelennek meg, míg a CD4 SP timociták egy része be tudja fejezni így is a fejlődését, a ZAP-70 csökkent expressziója a heterozigóta állatokban valószínűleg a CD8 SP sejtek érését jobban befolyásolja, mint a CD4 SP timocitákét. Ezzel összefüggésben állhat az a megfigyelésünk is, hogy a ZAP-70<sup>+/-</sup> perifériás nyirokszervekben nagyobb arányban találtak CD4<sup>+</sup> T-sejtek, mint a vad-típusában. A regulatórikus T-sejtek is a CD4<sup>+</sup> populációba tartoznak, ezért vizsgáltuk arányukat vérben, tímuszban, illetve másodlagos nyirokszervekben. A tímuszban és vérben nem találtunk különbséget a vad-típus és a heterozigóta állatok között, a lépben és nyirokcsomókban azonban csökkent T<sub>reg</sub> arányt figyeltünk meg a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben. A tímuszban a természetes T<sub>reg</sub>-ek (tT<sub>reg</sub>) fejlődnek, melyek differenciációjához a pozitív szelekciókor a saját antigén felismerésekor „közepes” erősségű TcR szignál szükséges. Ezzel szemben az indukált T<sub>reg</sub>-ek (iT<sub>reg</sub>) a periférián keletkeznek CD4<sup>+</sup>

sejtekből antigén, IL-2 és TGF- $\beta$  jelenlétében. Ezek alapján feltételezhető, hogy a  $tT_{reg}$ -fejlődéshez szükséges, „közepes” erősségű TcR szignálhoz elegendő a ZAP-70 expressziós szintje a heterozigóta állatokban, így ezekben az állatokban a  $tT_{reg}$  aránya a tímuszban nem tér el jelentősen a vad-típustól. Azonban a csökkent ZAP-70 expresszió a heterozigóta állatokban valószínűleg nem tud olyan effektív TcR jelátvitelt biztosítani antigén hatására, ami elégséges az  $iT_{reg}$ -ek kialakulásához a perifériás nyirokszervekben, ennek eredménye lehet az alacsonyabb  $T_{reg}$  arány a lépben és a nyirokcsomókban. A ZAP-70 fontos szerepet játszik a T-sejtek proximális TcR-n keresztüli jelátvitelében, ezért vizsgáltuk izolált ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtek TcR-n keresztüli aktiválhatóságát és apoptózis érzékenységét. A CD3 és a CD28 kostimulációs molekulán keresztül stimulálva a ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtek csökkent foszforilációt mutattak a vad-típushoz képest mind 24, mind 48 óra elteltével. A csökkent ZAP-70 expresszió eredményeként a ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtek kevésbé aktiválhatóak a TcR komplexen és kostimulációs molekulákon keresztül, mint a vad-típusú T-sejtek. Ez az eredmény összhangban van más tanulmányokkal, melyekben hipomorf ZAP-70 mutációkat hordozó egerek timocitái, illetve T-sejtjei csökkent TcR-n keresztüli jelátvitelt mutattak. Az immunválasz és a T-sejtek aktivációjának egyik szabályozója az apoptózis, melynek intrinszik és extrinszik, kaszpáz-dependens útvonalait vizsgáltuk. A kaszpáz-3 mindkét útvonal közös effektor kaszpáza, melynek hasított formáját a stimulálatlanhoz képest nagyobb mennyiségben mutattuk ki stimulált T-sejtekben, a fehérje mennyisége a stimulált BALB/c mintákban volt a legnagyobb. A kaszpáz-9 hasított formáját a stimulált és stimulálatlan ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben egyaránt ki tudtuk mutatni, körülbelül hasonló mennyiségben, míg a BALB/c T-sejtekben a stimuláció hatására emelkedett meg a hasított kaszpáz-9 mennyisége. A ZAP-70 csökkent expressziója eredményeink szerint nem csak a T-sejtek aktivációjára, hanem apoptózis érzékenységére is hatással van. A ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtek kevésbé aktiválódtak, és kevésbé voltak érzékenyek az apoptózisra 24, illetve 48 óra stimuláció után. A ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben aktív intrinszik apoptotikus útvonal nem okoz megfigyelhető kaszpáz-3 aktivációt, ez feltételezésünk szerint az aktivált kaszpáz-9 inhibitorainak, túlélési faktoroknak (Erk, Akt útvonalak) a következménye lehet.

## **5.2 A T-sejtes immundeficiencia korrekciója timocita transzferrel**

Az irodalomban eddig közölt T-sejt rekonstitúciós tanulmányok főként HSC-k irradiált recipiensekbe történő transzplantációját követő eseményeket vizsgálták. Előkísérletek során többféle módszerrel próbálkoztunk a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek T-sejtjeinek rekonstitúciójára, azonban technikai megfontolások miatt (intrahepatikus beadás újszülött egerekbe nehezen kivitelezhető, magas sejtszám szükséges, amihez sok donor csontvelőre van szükség), valamint timociták adoptív transzferét vizsgáló tanulmányok kis száma miatt a továbbiakban timociták intraperitoneális transzferével dolgoztunk. Munkánk során bebizonyítottuk, hogy ZAP-70<sup>+/+</sup> timociták intraperitoneális transzferével a T-sejtképzés tartósan helyreállítható. Vad-típusú, ZAP-70<sup>+/+</sup> egerekből származó  $5-10 \times 10^6$  timocita egyszeri, intraperitoneális beadása hosszú-távon megszünteti az immundeficienciát, ezzel szignifikánsan megnövelve az egerek élettartamát: míg a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek konvencionális állatházi körülmények között



átlagosan csak 7-10 hetes korukig élnek, a transzferált egerek közül volt, amely 8-12 hónapos kort is megélt. A létrehozott kimérizmus stabilitását jelzi, hogy a vérben és másodlagos nyirokszervekben hónapokkal a transzfer után is jelen voltak érett T-sejtek, melyek többsége  $\alpha\beta$  T-sejt receptort expresszált. A szövettani vizsgálatok alapján a transzferált állatok nyirokcsomói és lépe a ZAP-70<sup>+/+</sup>-hoz hasonló szerkezetet mutatott, mely arra utal, hogy a transzfer után megjelenő T-sejtek képesek helyreállítani a ZAP-70<sup>-/-</sup> egerek másodlagos nyirokcsomóinak morfológiai eltéréseit. A GFP<sup>+</sup> timocitákkal végzett transzferkísérletek pedig egyértelműen bizonyítják, hogy a transzfer után megjelenő érett T-sejtek donor eredetűek. A kimérizmus hosszú-távú fenntartásához folyamatos T-sejt képzésre van szükség, melyhez a tímusz repopulációja is szükséges. Ezt alátámasztja, hogy a tímuszban egyszeresen pozitív timociták jelentek meg 17 nappal a transzfer után, melyet a medulláris régió területének növekedése kísért, így feltételezésünk szerint a transzfer hatására a tímuszba helyreállt a T-sejt-képződés. A T-sejtek érése során a timociták és a tímusz epithél sejtek közti cross-talk ismert jelenség. Megfigyeltük továbbá, hogy a perifériás vérben a tímuszban található egyszeresen pozitív timociták megjelenését pár nap késéssel követve fokozatosan emelkedő mennyiségű, érett T-sejt jelenik meg, valamint, hogy a másodlagos nyirokszervekben a 21. napon az  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T-sejtek aránya már a ZAP-70<sup>+/+</sup>-ra emlékeztet. Ezek alapján a valószínűsíthető, hogy a donor timociták képesek a recipiens egerek nyirokcsomóit érett,  $\alpha\beta$ -T-sejtek formájában repopulálni. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az intraperitoneális transzfert követő első hónapban a T-sejt fejlődés egy hulláma zajlott le, hosszú távon regenerálva a tímuszt, melyben így hónapokon át T-sejt termelés zajlott.

A hasüregbe beadott timociták képesek eljutni a tímuszba, az azonban nem volt ismert, hogy milyen útvonalon hagyják el a peritoneumot. Az irodalmi adatok alapján a hasüregbe intraperitoneálisan beadott sejteket a mediastinális, illetve ipsilaterális inguinális nyirokcsomók drenálják, azonban kísérleteink során nem találtunk CFSE<sup>+</sup> donor sejteket a nyirokcsomókban. Szignifikáns mennyiségű, CFSE<sup>+</sup> sejtaggregátumokat találtunk viszont az omentumban, az úgynevezett milky spot régiókban, melyekről ismert, hogy szerepet játszanak a B2-B-sejtek és dendritikus sejtek homingjában, valamint a tumorok által preferált adhéziós régiók. A milky spotok szerkezete jelentősen különbözik a másodlagos nyirokcsomóktól, a T-sejtek és B-sejtek nem kompartmentalizálódnak, nincsenek afferens nyirokerek, az antigének a nem-folytonos mezotheliális réteg fenestrációin keresztül jutnak be a peritoneumból. Feltételezhetően ezeken az intercelluláris "réseken" keresztül jutnak be az omentumba az i.p. beadott sejtek is. Az általunk megfigyelt CFSE<sup>+</sup> sejtek nagy része CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> kettős negatív, feltételezhetően ez a DN populáció az egyik forrása azoknak a donor timocitáknak, melyek a recipiens tímuszba eljutva hozzájárulnak az érett SP timociták kialakulásához.

Eredményeink alapján az alábbi mechanizmust feltételezzük a ZAP-70<sup>+/+</sup> timocita transzfert követő T-sejt repopulációra ZAP-70<sup>-/-</sup> állatokban. Az intraperitoneális oltás során beadott timociták egy kevert sejtpopulációt alkotnak, így a transzfer során érett és éretlen sejtek keverékét adjuk be a recipiens állatok peritoneumába. Feltételezésünk szerint a donor sejtek összetett módon repopulálják a ZAP-70<sup>-/-</sup> recipiensseket: az érett, egyszeresen pozitív sejtek valószínűleg eljutnak a másodlagos immunszervekbe,

az ott lejátszódó perifériás homeosztatiszikus expanszió pedig az ideiglenes helyreállított immunválasz révén hozzájárul a túléléshez a transzfert követő kezdeti időszakban. Ezzel párhuzamosan, az éretlen sejtek feltehetően képesek az elsődleges nyirokszervekbe, főként a tímuszba vándorolni, és ott hosszú távon helyreállítani a T-sejt-képzést. A kettős pozitív sejtek apoptózis-érzékenysége rendkívül nagy, ezért feltételezzük, hogy nem ez a sejtpopuláció, hanem inkább a kettős negatív timociták játszhatnak fontos szerepet a tímusz repopulációjában. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a transzfer után az omentumban főként a kettős negatív donor timociták akkumulációját figyeltük meg, melyek hipotézisünk szerint később eljuthatnak a csontvelőbe/tímuszba, majd kolonizálják ezen szerveket.

### **5.3 A T-sejt aktiváció/apoptózis jelátviteli útvonalak változásai autoimmun arthritis modellben**

Munkánk során a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben is sikerült arthritist indukálni, a kísérlet végére a betegség incidenciája hasonló volt a BALB/c kontrollokban megfigyelthez, azonban az ízületi gyulladás mértéke a klinikai pontszámok alapján kevésbé volt súlyos, amit az *in vivo* képalkotó vizsgálatok is alátámasztottak. A szérumban mért gyulladásos citokinek (IL-4, IL-6, IL-17) mennyisége hasonló az arthritises BALB/c illetve ZAP-70<sup>-/-</sup> egerekben, azonban ez egy össz-citokin mennyiség, melyet többféle, szisztémás immunválaszban részt vevő immunsejt termel, ami a finomabb különbségek elmosódásához vezethet. Mivel a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben az arthritis indukcióhoz szükséges antigénre specifikus IgG1 autoantitest-produkció csak kismértékben csökkent, ezért feltételezzük, hogy a T-sejtek B-sejtekkel való kooperációja alapvetően nem sérült, és a B-sejtek betegségben betöltött szerepe feltételezhetően változatlan. Az antigén-specifikus immunválaszok az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> állatokban szignifikáns eltérést mutattak a ZAP-70<sup>+/+</sup> kontrollokhoz képest: az *in vitro* lépsejtkultúrában a rhG1 stimuláció hatására mért sejt-proliferáció szignifikánsan csökkent, a felülúszóból mért citokin-mintázat pedig jelentősen eltért. Az arthritises, antigén-stimulált ZAP-70<sup>+/-</sup> lépsejtek szignifikánsan kevesebb IL-4, IL-6 és IFN $\gamma$  citokint termelnek, azonban a termelt IL-17 mennyisége nem változott jelentősen. A szérumból, illetve lépsejtkultúrából mért citokinek esetében nem ismert, hogy melyik sejtcsoport termeli, ezért a T-sejtek által termelt, a GIA-ban kulcsszerepet játszó citokinek mennyiségének meghatározását áramlási citometriával is elvégeztük. Az IL17-termelő CD4<sup>+</sup> T-sejtek aránya hasonló volt az arthritises BALB/c illetve ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben PMA/ionomycin stimuláció hatására, viszont az IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-sejtek arányában azonban itt is csökkentést tapasztaltunk a heterozigóta állatokban. Ezek alapján a ZAP-70 részleges hiánya a Th1/Th17 polarizációt is befolyásolta, a GIA modellre jellemző Th1/Th17 közti intermedier forma helyett a csökkent IFN $\gamma$  produkció mellett inkább az IL-17 termelés marad jellemző.

Jelenlegi és korábbi eredményeink alapján feltételezzük, hogy klinikai képben tapasztalt változások a T-sejtekben a ZAP-70 részleges hiánya miatt megváltozott aktivációs és apoptotikus folyamatok következményei. Ennek részletesebb tanulmányozására egészséges és arthritises egerek izolált T-sejtjeiben vizsgáltuk különböző apoptotikus jelátviteli útvonalak molekuláit CD3/CD28

kostimuláció hatására. A tirozin foszforilációs mintázat alapján az arthritises T-sejtek stimuláció hatására erőteljesebb aktivációt mutatnak, mint az egészséges állatok T-sejtjei. Valószínűsíthető, hogy az arthritises egerekből izolált sejtekben nagyobb arányban találhatóak effektor T-sejtek, ezekre pedig jellemző az erőteljes tirozin foszforiláció. A ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek esetében az arthritis hatására kisebb mértékben szintén emelkedett a tirozin foszforiláció mértéke CD3/CD28 kostimuláció hatására. Ez egyrészt jelezheti, hogy az arthritis indukció során “kiválogatódtak” azok a sejtek, melyek képesek effektíven aktiválódni, másrészt azonban a tirozin foszforilációs mintázat csupán a foszforiláció mértékét mutatja meg, így nem csak az aktivációról ad felvilágosítást, hanem az aktiváció negatív szabályozói, vagy akár a sejthalálhoz vezető folyamatokban részt vevő molekulák foszforilációját is jelezheti. Az immunválasz része a T-sejtek aktivációjának leállítása is, ennek egyik regulátora a Cbl-b, mely a Cbl fehérjecsald tagja, főként perifériás T-sejtekben expresszálódik. A Cbl-b a TcR jelátvitel szabályozójaként a ZAP-70 gátló foszfortirozinjaihoz kapcsolódva gátolja a ZAP-70 aktivált állapotának fenntartását, valamint különböző jelátviteli molekulák (pl. Vav1, PLC $\gamma$  1, PKC- $\theta$ ) gátlásával járul hozzá a T-sejt anergia kialakulásához. A vártan megfelelően stimuláció hatására nőtt a Cbl-b mennyisége az egészséges BALB/c T-sejtekben, azonban ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben nem volt kimutatható mennyiségű stimuláció után sem. Ezt magyarázhatja, hogy mivel a ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtek kevésbé aktiválódnak anti-CD3/anti-CD28 stimuláció hatására, mint a BALB/c T-sejtek, feltételezhető, hogy a az aktiváció szupressziójához nincs szükség a Cbl-b inhibitor hatására. Továbbá, a Cbl-b foszforiláltsági szintje az SLP-76 foszforilációjával együtt változik, és mivel az SLP-76-t a ZAP-70 foszforilálja, elképzelhető, hogy a csökkent ZAP-70 expresszió mindkét molekula esetén alacsonyabb foszforilációt eredményez. Továbbá az is ismert, hogy a ZAP-70 közvetlenül kapcsolódik a Cbl-b-hez, ezért lehetséges, hogy az expressziójában bekövetkező változások befolyásolják a Cbl-b expresszióját is. Érdekes módon az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben indukálódott a Cbl-b expressziója, ennek hátterében elméletünk szerint az aktivált effektor sejtek *in vivo* szelekciója állhat. Mind RA-s betegekben, mind egérmodellekben megfigyelték, hogy a T-sejtekre jellemző az “apoptózis rezisztancia”, mely a folyamatos T-sejt aktiváció mellett hozzájárul a krónikus gyulladás kialakulásához. Ezzel összhangban mi is azt találtuk, hogy az arthritises BALB/c egerekből izolált T-sejtekben csökkent az apoptózis mértéke a hasított kaszpáz-3 mennyisége alapján. Ezzel szemben az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben az egészségeshez hasonló mértékű, az arthritises BALB/c T-sejtekhez képest jelentősebb apoptózis figyelhető meg. Ez részben magyarázhatja a ZAP-70<sup>+/-</sup> egerek enyhébb betegségét, az aktivált T-sejtek a BALB/c egerekben az apoptotikus folyamatok hiányában perzisztáltak, fenntartva a gyulladást és hozzájárulva a súlyosabb szöveti károsodáshoz. Az aktiváció indukált sejthalál fontos útvonala az extrinszik apoptotikus útvonal. Ezzel ellentétben az arthritises egerek T-sejtjeiben anti-CD3/CD28 restimuláció után nem láttunk hasított kaszpáz-8-t, ami összhangban van az apoptotikus folyamatok előzőekben leírt hiányával, azaz BALB/c egerekben, autoimmun arthritisben az aktivált T-sejtek feltételezhetően ellenállnak az aktiváció indukált sejthalálnak is. Az általunk használt egérmodellhez hasonló módon, azonban human eredetű proteoglikán aggregánnal immunizált BALB/c egerek T-sejtjeinél korábban már megfigyelték, hogy

anti-CD3 restimuláció hatására nem zajlik le aktiváció indukált sejthalál az abnormális FLIP expresszió miatt, mely a kaspáz-8 DISC-hez való relokációját gátolja. Ezzel szemben az arthritises egerekből izolált, de nem restimulált T-sejtekben viszont jelentős a hasított kaspáz-8 mennyisége. Ennek hátterében az állhat, hogy az általunk használt arthritis indukciós módszer három immunizációt igényel, amely ismételt antigén-stimulusként aktiváció indukált sejthalált válthat ki *in vivo* az extrinszik útvonalon keresztül. Az arthritises, anti-CD3/CD28 stimulált T-sejteknel megfigyelt aktiváció indukált sejthalált gátló folyamatok valószínűleg azért nem indulnak itt el, mert a FLIP expressziója a TcR-n keresztüli jelátvitel következtében emelkedik meg, a jelátvitel erőssége, a kostimuláció mértéke, valamint a jelátviteli molekulák aktiváltsági szintje más az *in vitro* és *in vivo* stimuláció során. A ZAP-70 fontos szerepet játszik az aktiváció indukált sejthalál folyamatában is, ZAP-70 hiányában a FasL upregulációja nem valósul meg, így az extrinszik apoptotikus útvonal nem aktiválódik. Ez magyarázhatja, hogy az arthritises, anti-CD3/CD28 beadekkel nem stimulált ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben miért alacsonyabb a kaspáz 8 mennyisége, mint a BALB/c egerekében.

Az aktiváció indukált sejthalálnak létezik halál-receptortól független, intrinszik útvonalon keresztül lezajló változata is. A folyamat kulcsfontosságú molekulái a Bim és a Bcl-2. Eredményeink alapján az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben anti-CD3/CD28 stimulációtól függetlenül aktív volt az intrinszik apoptotikus útvonal, melyet a hasított kaspáz-9 jelez. Az arthritises BALB/c T-sejtekben csak a stimuláció hatására aktiválódik az intrinszik útvonal. A pro-apoptotikus Bim mennyisége a stimuláció hatására minden mintában nőtt, azonban az arthritises egerek T-sejtjeiben nagyobb mennyiségben mutattuk ki, mint az egészségesekben. Ehhez hasonlóan változott az anti-apoptotikus Bcl-2 mennyisége; a re-stimulált, arthritises mintákban jelentős expressziót mutattunk ki. A Bcl-2 és a Bim mennyiségének aránya határozza meg a sejt sorsát: ha a Bcl-2 van túlsúlyban, gátolja a Bim pro-apoptotikus hatását és a sejt túlél, ha viszont a Bim mennyisége nagyobb, akkor az intrinszik útvonalon keresztül a sejt apoptózissal elpusztul. A folyamat eredményeként citokróm c szabadul fel a mitokondriumból, ami összhangban van eredményeinkkel, ahol a stimuláció hatására az arthritises egerek T-sejtjeiből származó lizátumban emelkedett citokróm c mennyiséget mértünk. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az arthritises egerekben a stimuláció hatására megnőtt Bim expresszió hatásait nem tudja teljes mértékben semlegesíteni a Bcl-2, ezért a folyamat eredőjeként citokróm c szabadul fel, ami a kaspáz-9 aktivációjához vezet az apoptozómán keresztül. Noha az arthritises BALB/c és ZAP-70<sup>+/-</sup>, anti-CD3/CD28 stimulált T-sejtekben körülbelül hasonló mennyiségű kaspáz-9-t mutattunk ki, a BALB/c T-sejtekben mégis kevesebb a kaspáz-3 mennyisége, ennek oka lehet, hogy a kaspáz-3 kaspáz-9 általi hasítását különböző molekulák befolyásolhatják, másrészt a kaspáz-3 ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben megfigyelt fokozott aktivációja más, általunk nem vizsgált útvonalak is előidézhethet.

Eredményeinket összefoglalva vad-típusú BALB/c T-sejtekben az arthritis hatására nőtt az aktiváció indukált sejthalál (kaspáz-8) mértéke anti-CD3/CD28 stimuláció nélkül, azonban érdekes módon az effektor, hasított kaspáz-3 nem volt kimutatható. Az anti-CD3/CD28 stimuláció hatására csökkent az apoptózis mértéke az arthritises BALB/c T-sejtekben az egészséges T-sejtekhez képest, az

aktiváció indukált sejthalál kaszpáz-8-on keresztül végbemenő formája itt feltételezhetően nem játszik kiemelt szerepet. Azonban a Bim a Bcl-2-höz képest nagyobb mennyiségben expresszálódik, így a Bcl-2 nem képes a Bim apoptotikus hatását gátolni, a mitokondriumból citokróm c szabadul fel, ami a kaszpáz-9 aktiválásához vezet. Elképzelhető, hogy ezután a kaszpáz-3 aktivációja a stimuláció és az arthritis együttes hatásaként nem következik be, különböző, általunk nem vizsgált inhibitorok, illetve anti-apoptotikus molekulák aktiválódása révén. Az arthritis eredményeként a stimulálatlan ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben is megjelenik a Cbl-b, valószínűsíthetően az arthritis indukció során alkalmazott immunizáció és epitóp spreading során bekövetkező aktiváció gátlására. A stimulálatlan arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben az aktiváció indukált sejthalál (kaspáz-8) kifejezettebb, az intrinszik útvonal azonban kevésbé aktív, mivel megjelenik a Bcl-2, mely a Bim hatásait gátolja, a folyamatok eredményeként azonban a kaszpáz-3 nem hasítódik. Az anti-CD3/CD28 stimulált arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben noha nő a Cbl-b expressziója, az aktiváció fokozottabb az egészséges stimulált ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekhez képest. Az arthritises, anti-CD3/CD28 stimulált ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben az intrinszik apoptotikus útvonal hangsúlyosabb, míg az egészséges anti-CD3/CD28 stimulált ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekben az extrinszik útvonal tűnik jelentősebbnek.

## 6 Új eredmények

Munkánk során igazoltuk, hogy ZAP-70<sup>-/-</sup> egerekben ZAP-70<sup>+/+</sup> timociták intraperitoneális transzferével:

1. Tartósan helyreállítható a T-sejt képzés (egerek megnövekedett túlélése, hosszú távú T-sejt rekonstitúció)
2. a transzfer után a tímuszban normalizálódik a T-sejt képzés
3. az újonnan képződött, donor-eredetű T-sejtek funkcionálisak
4. a beadott timociták az omentum milky spotjain keresztül hagyják el a peritoneumot

A rekombináns humán G1 indukált arthritis (GIA) modellt alkalmazva:

1. autoimmun arthritist indukáltunk ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben
2. a heterozigóta egerekben a betegség klinikai képe enyhébb volt
3. az arthritises ZAP-70<sup>+/-</sup> egerekben csökkent antigén-indukált T-sejt proliferációt és IFN $\gamma$  termelést, viszont jelentős IL-17 citokin termelést mértünk

Az arthritises egerekből izolált T-sejtekben

1. anti-CD3/CD28 stimuláció nélkül a ZAP-70 részleges hiányában az apoptózis intrinszik-, a vad-típusban az extrinszik útvonala hangsúlyosabb
2. anti-CD3/CD28 stimuláció után ezek a különbségek eltűnnek, de a vad-típusú T-sejtekben kisebb mértékű az apoptózis a ZAP-70<sup>+/-</sup> T-sejtekhez képest, összhangban az *in vitro* eredményekkel (nagyobb proliferáció, kifejezettebb aktiváció) és a megfigyelt súlyosabb klinikai képpel

## 7 Saját közlemények

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Prenek L, Berki T, Balogh P, Boldizsar F: Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knockout mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY 2018 Jun;192(3):302-314. doi: 10.1111/cei.13114. IF: 3,410

Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Mikecz K, Rauch TA, Glant TT, Boldizsar F. Enigma of IL-17 and Th17 Cells in Rheumatoid Arthritis and in Autoimmune Animal Models of Arthritis. MEDIATORS OF INFLAMMATION 2016;2016:6145810. doi: 10.1155/2016/6145810. IF: 3.232 (megosztott első szerző K.Z.-al)

Kugyelka R, Prenek L, Olasz K, Kohl Z, Botz B, Glant T. T, Berki T, Boldizsár F: ZAP-70 regulates autoimmune arthritis via alterations in T cell activation and apoptosis. Beküldve (bírálat alatt) CELLS (Special issue: „The Molecular and Cellular Basis of Rheumatoid Arthritis”)

### Egyéb közlemény:

Prenek L, Boldizsar F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, Nemeth P, Berki T The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. APOPTOSIS 22:(2) pp. 239-253. (2017) IF: 3,833

### Posztterek, előadások listája:

1. Magyar Immunológiai Társaság 42. Vándorgyűlése, Pécs, 2013. október 16-18.  
*T cell reconstitution studies in ZAP-70 deficient mice* (poszter)
2. Semmelweis Symposium, Budapest, 7-9 November 2013  
*The effect of ZAP-70 deficiency upon the histological composition of primary-and secondary lymphoid organs in mice* (előadás)
3. VI. Nemzetközi XII. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, Pécs, 2014. március  
*Alterations in the lymphoid structures of ZAP-70 deficient mice* (előadás)
4. 21. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely, 2014. március 27-30.  
*Szöveti és sejtszerkezeti eltérések ZAP-70 hiányos egerek centrális és perifériás nyirokcsomóiban* (előadás)
5. 44. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2014. május 20-23.  
*A T-sejt képzés helyreállításának kinetikai vizsgálata ZAP-70 deficiens egerekben* (poszter)
6. Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlése, Velence, 2014. október 15-17.  
*Studies on the reconstitution of T cell production in ZAP-70 deficient mice* (poszter)
7. 45. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 2015. május 19-22.  
*A ZAP-70 kináz részleges hiányának vizsgálata rheumatoid arthritis egér modellben* (poszter)
8. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna, 6-9 September 2015  
*Analysis of partial ZAP-70 deficiency in a rheumatoid arthritis murine model* (poszter)
9. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence, 2015. október 14-16.  
*Investigation of ZAP-70 deficiency in a murine model of rheumatoid arthritis* (előadás)
10. 46. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 2016. május 19-22.

- T-sejt specifikus transzgen-expresszió vizsgálatok egér modellben* (poszter)
11. Magyar Immunológiai Társaság 45. Vándorgyűlése, Velence, 2016.  
*T cell-specific transgene expression studies in murine models* (poszter)
12. Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology, 2016.  
*Investigation of T cell-specific transgene expression in murine models* (poszter)
13. 47. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 2017.  
*Intraperitoneálisan beadott donor thymocyták lehetséges homing útvonalainak vizsgálata* (poszter, majd kiválasztott előadás)
14. Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Velence, 2017.  
*Partial ZAP-70 Deficiency Ameliorates Autoimmune Arthritis In Mice By Controlling T Cell Activation And Apoptosis Sensitivity* (előadás)
15. 14<sup>th</sup> Spring School of Immunology of the German Society of Immunology, Ettal, 2018.  
*Absence of Nkx2.3 transcription factor ameliorates autoimmune arthritis in mice* (poszter)
16. 11<sup>th</sup> International Congress of Autoimmunity  
*Absence of Nkx2.3 transcription factor ameliorates autoimmune arthritis in mice* (előadás)

## 8 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr Boldizsár Ferencnek a támogatást és szakmai segítségét, valamint Prof. Dr. Berki Tímeának, hogy lehetővé tette számomra az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben való munkát.

Hálával tartozok az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának, különösen Prof. Dr. Balogh Péternek, hogy megtanította a szövettani vizsgálatok kivitelezését, valamint Dr. Olasz Katalinnak az arthritises kísérletekhez való hozzájárulásáért.

Dr. Botz Bálintnak (PTE, KK, Radiológiai Klinika) az *in vivo* biolumineszcens vizsgálatok elvégzését szeretném megköszönni.

Külön köszönöm családomnak, hogy mindenben támogattak és segítettek a dolgozat és a különböző előadások, ábrák elkészítésében. Lillának köszönöm a kísérletek során nyújtott rengeteg segítséget, valamint hogy a munkahelyen is ilyen jó barát, örülök, hogy együtt dolgoztunk. Diának köszönöm a hasznos tanácsait, és hogy mindig szívesen látott minket a szobájában. Johannes, thank you for supporting this whole project with your enormous positivity and trust.

Munkám az alábbi támogatások segítségével valósult meg: EFOP-3.6.1.-16-2016-00004), GINOP 2.3.2-15-2016-00050, TÁMOP 4.2.2.B-15 KONV-2015-0011, OTKA K101493, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Boldizsár Ferenc, BO/00086/12/5)