

PhD Tézisek

**Fiziológiás és pathológiás autoimmun modellek
összehasonlító vizsgálata**

Olasz Katalin

PTE-KK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Témavezetők: Dr. Boldizsár Ferenc, Prof. Dr. Németh Péter

Programvezető: Prof. Dr. Németh Péter egyetemi tanár

Pécs

2012

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk fő célkitűzése a fiziológiás és pathológiás autoimmunitás részletes vizsgálata volt, amihez két különböző kísérleti rendszert használtunk fel: humán szérum minták elemzésével a természetes autoantitesteket; míg egy egér rheumatoid arthritis modellben a kóros autoimmunitásban résztvevő lehetséges mechanizmusokat tártuk fel.

A mitokondrium magas fokban konzervált belső membrán enzimét, a citrát-szintázt (CS) modellantigénként használtuk természetes autoantitestek (nAAb) epitóptérképezésére. A vizsgálatokhoz két alapjaiban eltérő módszert alkalmazva (szintetikus átfedő dekapeptid rendszer, és lambda fágkönyvtár) sikeresen kimutattuk a citrát szintáz reaktív nAAb-ek jelenlétét egészséges véradók, autoimmun és szívtranszplantált betegek szérumából egyaránt. Az autoimmun betegek szérumában az IgM izotípusú antitestek voltak jelen emelkedett titerben, míg a szívtranszplantált betegeknél az IgG izotípusba tartozó ellenanyagok szintje növekedett az egészséges véradókhoz képest. Sem a humán sem a bakteriális CS esetén egyik módszerrel sem tudtunk olyan egyéni epitópot azonosítani, amely kizárólag az egészséges vagy az egyes betegcsoportokat jellemezte volna, azonban az epitópok finom mintázata jellegzetes eltéréseket mutatott. A magas CS reaktivitású szérumokból emlős CS-on affinitás tisztított ellenanyagok kizárólag az IgM izotípusba tartoztak, és nem mutattak keresztreaktivitást más mitokondriális enzimekkel, az enzim bakteriális változatával ezzel szemben három keresztreaktív epitópot azonosítottunk.

A pathológiás autoimmunitás vizsgálatát, a rheumatoid arthritis (RA) kísérletes állatmodelljében (rhG1-indukált-arthritis) végeztük olyan T sejt receptor (TCR) transzgenikus egértörzsek felhasználásával, melyekben a CD4⁺ T sejtek a porc eredetű proteoglikán domináns arthritogén epitópját ismerik fel; így részletesen elemezhettük a T sejt jelátvitel RA pathomechanizmusában betöltött szerepét. Kimutattuk, hogy a TCR-on keresztüli jelátviteli folyamatok kritikus szabályozó szerepet töltenek be a RA kialakulásában a T sejt aktiváció, ill. apoptózis egyensúlyának befolyásolásán keresztül. A T sejtek „optimális” jelerősségű aktivációja az autoreaktív T sejtek expansziójához vezet, ami súlyos arthritis fenotípust eredményez. Ezzel szemben a „szupraoptimális” jel hatására dominánssá válik a T sejtek apoptózisa, ami enyhébb arthritis kialakulását eredményezi.

Eredményeink alapján az aktív tolerancia fenntartásában fontos szerepet játszó fiziológiás autoimmunitás egyik kulcseleme a nAAb hálózat. Kóros autoimmunitáshoz vezethet minden olyan sejt szintű működési zavar, amely befolyásolja az autoreaktív limfociták delécióját, vagy azok expanszióját. Általánosan, az immunrendszer három szintje (veleszületett, természetes és adaptív immunrendszer) által kialakított hálózat hibás szabályozása kóros autoimmunitáshoz vezet.

BEVEZETÉS

Az immunrendszer egyik legfontosabb jellemzője, hogy felismerő funkciója révén képes különbséget tenni a normál *saját* illetve a *nem saját* (idegen) és a módosult saját struktúrák között. Míg a szervezetbe bejutó külső antigénekkal, vagy a mutálódott saját struktúrákkal szemben általában támadó jellegű immunválasz alakul ki, addig a normál saját antigéneket az immunrendszer tolerálja. A tolerancia kialakításában két fő mechanizmus játszik szerepet: *i)* a *centrális tolerancia*, amely biztosítja, hogy az elsődleges nyirokszervekből ne kerülhessenek ki potenciálisan autoreaktív lymphocyták; illetve *ii)* a *perifériás tolerancia*, amely a periférián kontrollálja a lehetséges autoimmun folyamatokat.

Az elmúlt évtizedekben több munkacsoportnak sikerült olyan, elsősorban IgM izotípusú, alacsony affinitású ellenanyagokat kimutatni egészséges egyéneknél, melyek éppen a biológiai működésben kulcsfontosságú, többnyire erősen konzervatív antigénekkal reagálnak. Ezek a megfigyelések alapozták meg az „*immunológiai homunculus*” teóriát (Cohen), mely feltételezi egy olyan (IgM izotípusú) ellenanyagokból illetve valószínűleg γ/δ T sejtekből álló hálózat meglétét, mely ezeknek a legfontosabb antigéneknek az állandó felismerését és ezen keresztül az immunrendszer támadóbb elemei elleni védelmét szolgálja. Ennek a hálózatnak a kialakításában fontos szerep jut a CD5⁺ B1 sejteknek és az általuk termelt, alacsony affinitású IgM antitesteknek (úgynevezett „*természetes autoantitestek*”), valamint a γ/δ T sejteknek. Ez a rendszer mintegy átmenetet képez a veleszületett és adaptív immunitás között és az említett két sejt alcsoport egyaránt hordozza a két rendszerre jellemző sajátosságokat. A B1 sejtek által termelt természetes autoantitesteknek (nAAb) sokféle funkciót tulajdonítanak: részt vehetnek az elsődleges immunreakciók felgyorsításában, az elhalt sejtek eltakarításában, a gyulladási folyamatok gátlásában, illetve az immunológiai egyensúly fenntartásában.

Ezek alapján a „*fiziológiás autoimmunitás*” mint biológiai jelenség az „*immunológiai steady-state*” (Radbruch) egyik lényegi és elválaszthatatlan részét képezi. Ebből a szempontból vizsgálva autoimmun betegségeknél ez az immunológiai steady-state megbomlik, ami „*patológias autoimmunitásban*” manifesztálódik: autoreaktív T sejtek és/vagy autoantitestek által kiváltott súlyos, folyamatos szövetkárosodással járó immunreakció a saját sejtek és szövetek ellen. *Autoimmunitásról tehát egyaránt beszélhetünk a fiziológiás immunműködés szerves részeként is és kóros funkció gyanánt, a szervezet homeosztázisát súlyosan veszélyeztető megbetegedésként is.* Mindkét esetben az immunológiai szabályozás egy-egy konkrét funkcionális állapotáról van szó, melyben az immunrendszer egészére általánosságban jellemző folyamatok zajlanak le, *hálózat-szerű* együttműködésben. Autoimmun betegségről, azaz kóros autoimmunitásról akkor beszélünk, amikor az immunológiai történések a szervezet működését károsan befolyásoló szövetkárosodással járnak. Általánosságban elmondhatjuk, hogy az autoimmun betegségek kialakulásában az egész immunrendszert felépítő hálózat dinamikájának (egyensúlyának) megváltozását kell feltételeznünk és csak ritkán lehet egyetlen oki tényezőt kiragadva magyarázatot kapnunk a kóros jelenségekre. Az egyensúly megbomlása egy átmeneti regulációs zavar (pl. fertőzés) után képes az immunológiai szabályozást egy új egyensúlyi helyzetben stabilizálni. Azt, hogy mikortól beszélünk autoimmun megbetegedésről, az dönti el, hogy a kialakult új egyensúlyi állapotnak mennyire domináns eleme az autoreaktív szövetdestrukció. Újabb környezeti hatások (pl. egy újabb fertőzés) ismét megzavarhatják az egyensúlyi állapotot és a „*immunológiai steady state*” további változását, klinikai értelemben pedig a betegség romlását eredményezhetik.

Mivel a konzervált antigének immunológiai felismerése - a *természetes*

autoantitestek hálózatán keresztül - mind a patológiás mind a fiziológias autoimmunitásban fontos szerepet töltenek be, ezért a munkánk első részében ilyen genetikailag konzervált mitokondriális belső membrán enzimekkel (malát-dehidrogenáz, citrát-szintáz és piruvátdehidrogenáz) reagáló természetes autoantitestek epitópmintázatát próbáltuk feltérképezni fág felszínén megjelenített CS antigén fragmens könyvtár, immunszerológiai eljárások és átfedő dekapeptid rendszer segítségével. Vizsgálataink során kimutattuk a CS-t felismerő nAAb-ok jelenlétét. Megvizsgáltuk a nAAb-ok által felismert epitópok lehetséges átfedéseit, valamint tanulmányoztuk a fiziológias autoreaktivitás változásait patológiás és autoimmun állapotokban.

Az európai és az észak-amerikai népesség mintegy 5-7%-a szenved valamilyen autoimmun betegségben. Számos emberi autoimmun megbetegedésre léteznek kísérletes állatmodellek, melyek az elmúlt évtizedekben a betegségek pathomechanizmusainak felderítésében kulcsszerepet játszanak. Munkánk második részében egy ilyen modellben végeztünk vizsgálatokat: a porc eredetű **proteoglikán-aggregán(PG)-indukált arthritis (PGIA)** BALB/c egérben tökéletesen utánozza a rheumatoid arthritis főbb klinikai tüneteit, és laboratóriumin paramétereit. A rheumatoid arthritis (RA) az emberi populációnak kb. 1%-át sújtja. Ez a szisztémás autoimmun megbetegedés az ízületek súlyos gyulladásával, a porc- és csontfelszínnek pusztulásával jár, mely végül teljes deformálódásukhoz és funkcióvesztésükhöz vezet. A PGIA, hasonlóan a humán RA-hez, T sejt dependens és B sejtek ill. az általuk termelt antitestek által mediált autoimmun betegség.

A porc eredetű proteoglikán-aggregánt egy kb. 200 kDa nagyságú magfehérje, és a hozzá kapcsolódó több száz szénhidrát (keratán- ill. kondroitin-szulfát) oldallánc építi fel. A molekula G1 globuláris doménje számos domináns/arthritisogén epitópot hordoz, ezért az arthritis kiváltásához használt immunizálásban a teljes hosszúságú PG molekula helyettesíthető a G1 domén rekombináns formájával. Kísérletes munkánk során rekombináns humán G1 (rhG1) domént használtuk BALB/c egerek immunizálására (**rhG1-indukált-arthritis (GIA) modell**). A GIA klinikai megjelenése és hisztopatológiai eltérései megegyeznek az eredeti PGIA modellnél leírtakkal. Szintén a G1 doménben található a nagy valószínűséggel leginkább arthritisogén és domináns „5/4E8”-as epitóp (⁷⁰ATEGRVVRVNSAYQDK⁸⁴). Munkánk során szintén vizsgáltuk azt a T sejt receptor (TCR) transzgenikus (Tg) egértörzset, melynek CD4⁺ T sejtjei az 5/4E8 epitópot ismerik fel. Eredetileg két független pronukleáris injekcióból származó állatokat (mindkettő magas Vβ4 expresszióval) választottak ki, és visszakeresztették az arthritisre hajlamos BALB/c vonalba. Az első TCR-Tg törzset (TCR-TgA) számos immunológiai és adaptív transzfer kísérlethez használtuk már korábbi munkák során, míg a második törzset (TCR-TgB) mostanáig nem karakterizáltuk részletesebben. A két transzgenikus egérvonalnak elméletileg hasonlóan kellett volna reagálnia a PG/rhG1-el történő immunizálásokra. Eredményeink azonban azt mutatták, hogy míg a TCR-TgA törzsnél a vad típusú (WT) BALB/c egerekhez viszonyítva sokkal hamarabb és súlyosabb arthritis fejlődik ki az immunizálások hatására, addig a TCR-TgB törzs inkább a WT egerekkel mutat hasonlóságot. A klinikai fenotípussal ellentétben a TCR-TgB egerek CD4⁺ T sejtjei a TCR-TgA egerekhez viszonyítva kb. kétszeres mennyiségű TCR-t expresszálnak a felszínükön. A két TCR-Tg egértörzs összehasonlító vizsgálata jó eszköznek bizonyult ahhoz, hogy az arthritis kialakulásában szerepet játszó TCR-en keresztüli jelátvitel, aktiváció, kostimuláció, aktiváció indukált sejthalál, regulátoros T sejtek szerepe) ill. B sejtes (ellenanyagtermelés, antigén prezentálás, kostimuláció) mechanizmusokat pontosabban feltérképezzük, és ezáltal bepillantást nyerjünk a patológiás autoimmunitás kialakulásának sejtszintű folyamataiba.

CÉLKITŰZÉSEK

Mitochondrium belső membrán enzimekre specifikus autoantitestek epitóptérképezése – a természetes antitestek autoimmunitásban betöltött szerepe

1. Célunk volt a genetikailag konzervált mitokondriális belső membrán enzimekkel (malát-dehidrogenáz, citrát-szintáz és piruvát-dehidrogenáz) reagáló autoantitestek kimutatása és mennyiségi meghatározása egészséges, autoimmun és szívtranszplantált betegek szérumaiból.
2. Előzetes *in silico* epitóp predikció alapján megszintetizált átfedő dekapeptid rendszer használatával elvégeztük a hCS specifikus autoantitestek epitóptérképezését.
3. A szérumok emlős CS-on történő affinitás tisztítása, majd a tisztított ellenanyagok izotípusának meghatározása.
4. hCS antigén fragmens fág könyvtár létrehozása és az affinitás tisztított autoantitestek epitóptérképezése fág-display technológiával.
5. A CS affinitás tisztított autoantitestek keresztreaktivitásának vizsgálata más mitokondriális enzimekkel valamint a CS enzim bakteriális változatával.

Pathológiás autoimmunitás vizsgálata GIA (rhG1-indukált-arthritis) modellben

1. A rhG1-indukált-arthritis (GIA) klinikai képének összehasonlítása a két TCR-Tg egértörzsben (incidencia, súlyosság).
2. A GIA-ban korábban fontosnak talált szérum paramétereket vizsgálata (rhG1 specifikus antitestek és citokinek) ELISA ill. CBA technikák alkalmazásával. A kapott eredményeket összevetése a klinikai képpel.
3. Az arthritis kialakításában, és a betegség fenntartásában szerepet játszó limfocita populációk sejtfelszíni markereik alapján történő karakterizálása citometria segítségével.
4. Antigénnel történő *in vitro* stimulációt követően a T sejt jelátviteli molekulák foszforilációjának vizsgálata foszfo-flow technikával, áramlási citométerrel.
5. Az aktiváció-indukálta sejthalál összehasonlító elemzése a két transzgenikus egértörzs T sejt kultúráiban.

ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

Mitokondriális enzim-specifikus antitestek epitóptérképezése

1. Humán szérumok gyűjtése az anti-citrát szintáz természetes autoantitest titerek meghatározásához

A minták egy része 63 magyar (pécsi Baranya Megyei Vértranszfúziós Állomástól), 176 finn, és 51 angol egészséges véradótól (Prof. Füst György és Dr. Prohászka Zoltán, SOTE III. Belgyógyászat, által rendelkezésünkre bocsátva), valamint egészséges csecsemőktől származott (utóbbiak a Pécsi Gyermekklinikán végzett vizsgálatokhoz használt minták maradékai). A minták másik része 326 klinikailag dokumentált szisztémás autoimmun betegtől (SLE-ban, RA-ben, differenciálatlan kötőszöveti betegségben, polymyositisben/dermatomyositisben, szisztémás szklerózisban, Raynaud szindrómában és Sjögren szindrómában szenvedő beteg a pécsi Immunológiai és Reumatológiai Klinikáról), és 27 immunszuppresszív kezelésen átesett szívtranszplantált betegtől származott. A begyűjtött minták a Pécsi Tudományegyetem OEC Etikai Bizottságának engedélyével kerültek felhasználásra.

2. Szűrő (screening) ELISA vizsgálatok, mitokondriális enzim specifikus autoantitestek detektálása

A szűrő ELISA vizsgálatok során antigénként sertés szívből izolált citrát-szintáz, malát-dehidrogenáz és piruvát-dehidrogenáz használtunk. Kerestük az olyan eseteket, ahol a szérumban az antigénnel reagáló ellenanyagok emelkedett titerrel voltak jelen. Tehát pozitív esteknek számítottak azok a minták, melyeknek a kiértékelésnél kapott OD (optikai denzitás) értékei az átlagnál 2 SD-vel (standard deviation) voltak magasabbak. 96-lyukú mikrotiter lemezeket sertés szívből izolált citrát-szintázzal (CS), malát-dehidrogenázzal (MDH) és piruvát-dehidrogenázzal (PDH) érzékenyítettünk 0.1M karbonát pufferben. A nem-specifikus kötőhelyek 0.5% zselatinnal telítettük, majd ezt követően mosó pufferben 1:100 hígításban triplikátumban inkubáltuk a szérum mintákat 1 órán át. Másodlagos ellenanyagként HRPO-konjugált anti-humán-IgA, vagy -IgG, vagy -IgM antitesteket használtunk, melyekkel 1 órán át inkubáltuk a lemezeket. A reakciót o-feniléndiaminnal (OPD) hívtuk elő és 492 nm-en mértük le. Minden mérést az általunk korábban kifejlesztett monoklonális anti-CS antitesttel standardizáltunk (klón 4H3E5). A pozitív szérumokból ezután összeválogattunk egy reprezentatív mintacsoportot, melyeket további vizsgálatoknak vettünk alá. A kiválasztott mintákkal végeztünk tényleges epitóp meghatározást CS enzimem.

3. In silico predikció

Ez az eljárás olyan számítógépes technikát takar, mellyel meg tudtuk jósolni a várható epitópokat. Olyan számítógépes adatbázisok léteznek, melyek képesek különböző adatok (fehérjeszerkezet, hidrofilitás, hidrofóbitás, antigenitási index...) alapján megadni az antigéneket azokat a szekvenciákat, melyeket az ellenanyag nagy valószínűséggel majd felismer. Ezeket a vizsgálatokat elvégeztük a CS enzimre is. Az így kapott prediktált epitópok alapján a Peptidkémiai Kutatóintézet (MTA, Budapest) megszintetizáltattuk az enzimet 96 tű hegyére (ELISA formátumnak megfelelő, a tűk az ELISA lemezbe illeszthetők.), oly módon, hogy az egyes tűkhöz kötött fragmentek pontosan lefedjék a megjósolt epitópokat. A fehérjeszakaszok 10 aminosav hosszúságúak voltak, és 5 aminosavas átfedésekkel követték egymást. Ezután tűhegy ELISA módszerrel kerestük meg a tényleges epitópokat, megállapítva ezzel a vizsgált csoportok autoantitestjeinek epitópmintázatát.

4. Szintetikus átfedő dekapeptidekkel végzett soktűs ELISA vizsgálatok

A nem specifikus kötőhelyek blokkolását követően (0,1 % azid, 0,1 % Tween20, 0,5 % zselatin tartalmú PBS-el, 30 percen át), a lemezt a tűkkel együtt háromszor mostuk, majd következett a megfelelő mértékben (1:100 arányban) hígított szérumok felvitele a lemezre. A tűket a mintákba merítettük és 1 órán át inkubáltuk. Újabb háromszoros mosás után a tűket a második antitesteket tartalmazó pufferbe helyeztük (IgG-t 1:6000 arányban, IgM-et 1:1000 arányban hígítva), és ismét 1 órán át inkubáltuk. Az utolsó mosást követően a reakciót (OPD) hívtuk elő, és spektrofotométerrel mértük le.

5. Szérumok affinitás tisztítása emlős CS-on

A sertés szívből származó CS-t cianogén-bromid aktivált sepharose 4B-hez kötöttük. 30 egészséges és 14 autoimmun beteg 15 ml szérumát háromszor engedték át a CS-sepharose gyantán. Mosás után az antitesteket pH 2.5 glicib-HCL-el eluáltuk, a frakciókat 1 M TRIS-el neutralizáltuk, majd indirekt ELISA-val teszteltük CS reaktivitásukat HRPO-konjugált anti-humán-IgA, vagy -IgG, vagy -IgM specifikus másodlagos ellenanyagokat használva.

6. Fág-display technológia, CS antigén fragmens könyvtár létrehozása

Egy egészséges véradó perifériás véréből tisztított 3×10^6 mononukleáris sejtől RNS-t izoláltunk. Superscript II RT enzim segítségével 5 µg totál RNS-el reverz transzkripciót végeztünk. A teljes hosszú humán mitokondriális CS-t kódoló cDNS-t a következő primerekkel amplifikáltuk: 5'-ATGGCTTTACTTACTGCGGC-3' és 5'-TTACCTGACTTAGAGTCCAC-3'. A PCR reakció 100 µl végtérfogatban a következőket tartalmazta: 300mM mindegyik dNTP-ből, 1.5 mM MgSO₄, 1 µM mindegyik primerből, 5 µl cDNS és 5 unit ProofStart DNS polimeráz; az amplifikációt a következő profillal végeztük: 95°C 5min, majd 35 ciklus: 95°C 1min, 51°C 30s, 72°C 2min, végső extenzió: 72°C 10 min. A PCR terméket 1.5%-os agaróz gélen választottuk el, majd megtisztítottuk. A-addíció után T/A vektorba klónoztuk. Az inzertet szekvenálással ellenőriztük. A könyvtár létrehozását a lambdaD-bio fág display vektor (Dr. Alessandra Luzzago által rendelkezésünkre bocsátva; Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare, Olaszország) felhasználásával végeztük. Az inzerteket SpeI és NotI helyeket tartalmazó random primerek valamint templátként a fent említett plazmidből BamHI és EcoRI emésztéssel kivágott CS cDNS felhasználásával állítottuk elő. Tisztítás és méret szelekció után az inzerteket SpeI és NotI enzimekkel emésztettük.

Hús ligációs reakciót állítottunk össze, amelyek mindegyike 1 µg SpeI/NotI emésztett lambdaD-bio DNS-t, 25 ng SpeI/NotI emésztett inzertet és 30U T4 DNS ligázt tartalmazott 5µl végtérfogatban, majd 48 órán át 4°C-on inkubáltuk. A ligációs reakciót ezután fenol-kloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk, majd lambda fág részecskébe csomagoltuk. A lambda fágokat log fázisú E.coli BB4 fertőzésével és LB agar lemezekre való felvitelével amplifikáltuk. A plakkok kialakulása után a fágokat eluáltuk, kicsapással koncentráltuk, és proteáz gátlókat tartalmazó pufferben reszuszpendáltuk.

7. A CS antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója

Az affinitás tisztított anti-CS szérumokkal vagy az anti-CS mAb 4H3E5-el mikrotiter lemezeket érzékenyítettünk 10 µg/ml koncentrációban. Blokkolás után 10^{10} faggal inkubáltuk a lemezeket 2 órán át. A lyukakat ötször mostuk, majd a kötődött fágokat, E.coli BB4 sejteknek a lyukakban történő megfertőzésével, visszanyertük. A fertőzött baktériumokat LB agar lemezekre vittük fel, majd a fágokat a fent ismertetett módon₇

eluáltuk és koncentráltuk. Az affinitás szelekciót még egyszer megismételtük, majd egyedi klónokat választottunk ki DNS szekvenálásra.

8. Humán CS-on affinitás tisztított szérumok keresztreaktivitásának vizsgálata

A más mitokondriális enzimekkel való keresztreaktivitást indirekt ELISA-val vizsgáltuk sertés szívből származó MDH-t és PDH-t használva antigénként. Az E.coli CS-al való reaktivitást tühegyre szintetizált decapeptidekkel vizsgáltuk a korábban leírtak szerint.

rhG1-INDUKÁLT ARTHRITIS MODELL

1. Kísérleti állatok

Munkánk során két TCR-Tg egértörzset használtunk (TgA és TgB), melyeknek T sejtjei expresszálják a humán PG G1 doménjén található domináns 5/4E8 epitóra specifikus TCR V α 1.1 és V β 4 láncokat. A két transzgenikus vonal ugyanazon konstrukció különböző idejű pronukleáris injekciójával keletkeztek. A transzgenre pozitív egyedeket tizenkétszer visszakeresztettük az arthritésre hajlamos BALB/c törzsbe (Charles River Laboratory, Kingston Colony). Az állatokkal folytatott kísérletes munkák megfeleltek a Rush egyetem Állatetikai Bizottsága (Institutional Animal Care and Use Committee at Rush University Medical Center, Chicago, IL) által támasztott szabályoknak.

2. Antigének, immunizáció, arthritis klinikai vizsgálata és a minták begyűjtése

A rhG1 domént a rhG1-Xa-mFc2a fúziós proteinből tisztítottuk, Xa faktorról történő hasítás után. A három hónapos vad típusú (WT) BALB/c és Tg (TCR-TgA és TCR-TgB) nőtény egereket háromhetente intraperitoneálisan immunizáltunk összesen háromszor, 20 μ g rhG1 és 2 mg dimethyl-diocadecyl-ammonium-bromide (DDA) adjuváns keverékével (100 μ l PBS-ben oldva). Az egereket a második immunizálást követően hetente három alkalommal megvizsgáltuk. A betegség megjelenésének időpontját és előfordulási gyakoriságát feljegyeztük. A betegség súlyosságát vizuálisan pontoztuk egy 4-es pontrendszer segítségével (minimum 0-tól a maximum 4-ig), így a maximális pontszám egy egér esetében mind a négy lábat tekintve összesen maximum 16 pont lehetett. A pontok nagyságát a lábak duzzadtságának és pirosságának, azaz a gyulladásnak a mértéke szabta meg. Ezután mindhárom csoportból négy egeret áldoztunk fel a következő időpontokban: az immunizálásokat megelőzően (naiv egerek), tíz nappal az első immunizálás után, négy nappal a második és a harmadik immunizálás előtt, és öt nappal a második és a harmadik immunizálás után. Ezeket az időpontokat az előzetes kísérletek alapján határoztuk meg. Áramlási citometriás mérésekhez és élő sejt kultúrának begyűjtöttük az állatok vérmintáit, nyirokcsomóit (brachiális, axilláris és popliteális nyirokcsomók), és a lépeket. A szérum mintákból antitest és citokin koncentrációkat mértünk.

3. Antigén (rhG1) specifikus antitestek meghatározása ELISA-val (enzyme-linked immunosorbent assay) és szérum citokin koncentráció mérése CBA (cytokine bead array) segítségével

Első lépésben maxisorp ELISA lemezeket érzékenyítettük 0.1 μ g rhG1 / lyuk / 100 μ l karbonát coating pufferral (pH 9.5) egész éjszakán át szobahőmérsékleten. A nem specifikus kötőhelyeket zsírmentes tejpor 1.5%-os oldatával (PBS-ben) blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán át. A szérumokat növekvő hígítási sorban (1: 400-tól 1: 16,000-ig) vittük fel a lemezekre, és második ellenanyagként peroxidázzal konjugált patkány anti-egér IgG1 vagy IgG2a antitesteket használtunk. A reakciókat IgG1 esetén o-fenilén-diaminnal (OPD), IgG2a esetén pedig 3,3,5,5-tetrametil benzidin (TMB)

szubsztráttal hívtuk elő. A szérumok IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF α , IL-17A, IL-12p70 és IFN γ koncentrációját citokin gyöngy array (CBA) segítségével határoztuk meg, a gyári protokoll előírásait követve. A mintákat BD FACS Canto II áramlási citométeren mértük le, HTS modul segítségével. Az eredmények kiértékeléséhez FCAPArray (SoftFlow, Magyarország) számítógépes programot használtunk.

4. Áramlási citometriás mérések

Perifériás vérből, nyirokcsomókból és lépéből származó leukociták sejtfelszíni markereit áramlási citometria segítségével analizáltuk. A méréshez és az adatok kiértékeléséhez HTS egységgel ellátott FACS Canto II áramlási citométert és FACS DIVA számítógépes programot használtunk (BD Biosciences). A sejtfelszíni markerek alapján a következő sejtpopulációkat vizsgáltuk: B220⁺: B sejtek; CD3⁺: T sejtek; CD3⁺/CD4⁺: CD4⁺ T sejtek; CD3⁺/CD8⁺: CD8⁺ T sejtek; CD3⁺/CD4⁺/CD25^{high}: aktivált T sejtek; CD3⁺/CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺: regulátoros T sejtek (Treg); CD3⁺/CD4⁺/CD44^{high}: aktivált memória T sejtek. Ezeket a sejtpopulációkat az FSC/SSC (forward/side scatter) paraméterek alapján behatárolt limfoid sejtekből származtattuk.

5. Sejtek szeparálása, tenyésztése és in vitro stimulálása

A T sejteket a kísérleti egerek lépéből tisztítottuk EasySep mágneses T sejt dúsító kittel (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). A tisztított T sejteket (8×10^5) irradiált (60 Gy) A20 (BALB/c B sejt lymphoma) antigén prezentáló sejtekkel (ATCC, Rockville, MD) tenyésztettük együtt 48 lyukú steril lemezekben. Az A20-as sejteket (1×10^5 cells/well) a vizsgálat előtt 12 órán át az 5/4E8 peptiddel (5 μ g/ml) együtt, vagy anélkül inkubáltuk, majd szérum mentes DMEM médiummal mostuk. Ezután az apoptózis kísérletekhez a tisztított T sejteket és a peptiddel előinkubált antigén prezentáló A20 sejteket három napon át együtt tenyésztettük 600 μ l 10% FBS tartalmú DMEM médiumban. A jelátviteli tanulmányokhoz 3×10^5 tisztított T sejtet egy rövid centrifugálással (900xg, 3percig) a peptiddel előinkubált A20-as sejtekre ülepítettünk, majd 1 óra inkubációt követően begyűjtöttük őket.

6. Szaturációs kötési teszt

TCR-TgA és TCR-TgB egerek lépéből mágneses szeparáló rendszer segítségével a CD4⁺ T sejteket feldúsítottuk. Mindkét törzstől pontosan egyforma számú T sejtet emelkedő koncentrációban fluoreszcens festékkel jelölt TCRV β 4-et, CD3-at és CD4-et felismerő monoklonális antitestekkel festettünk meg, majd a kötődés mértékét áramlási citometriával analizáltuk. Az átlagos fluoreszcens intenzitás (MFI) értékekből levontuk az izotípus kontrolok átlagos fluoreszcens intenzitás értékeit, majd a kötési görbét a GraphPad Prism 4.0 segítségével (GraphPad, San Diego, USA) a titrációs értékpontokra fektettük.

7. TCR Va1.1 és V β 4 láncok genomiális kópia számának meghatározása kvantitatív PCR (polymerase chain reaction) segítségével

Homozigóta TCR-TgA és TCR-TgB egerek genomiális DNS-ét egérfarokból nyertük proteináz K-val végzett emésztés, és fenol-kloroformos kicsapás után. A DNS precipitációkat Tris-EDTA pufferben oldottuk fel. A DNS mintákat ezután restriktációs endonukleáz enzimekkel emésztettük, oly módon, hogy az általunk PCR-al vizsgálni kívánt régiók ne sérüljenek. Az emésztett mintákat Qiaquick kit (Qiagen, Carlsbad, CA) segítségével tisztítottuk, és a DNS koncentrációkat fotometriásan határoztuk meg. A kvantitatív PCR reakciókat triplikátumokban végeztük 10, 5, 2.5 és 1.25 ng DNS hozzáadásával SsoFastTM Probes Supermixet használva (Bio-Rad). PrimeTimeTM₉

qPCR primerek és kettős próbák (IDT, Coralville, IA) segítségével próbáltuk meghatározni a TCR alfa és béta láncainak genomiális példányszámát. A PCR reakcióhoz iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) műszert használtunk. A kapott értékeket a TATA box kötő fehérje (TBP) génjének promóter régiójára normalizáltuk.

8. Apoptózis detektálása annexinV/7-AAD kettős festéssel

Az annexinV/7-AAD kettős festés segítségével megkülönböztethetőek egymástól a korai és késői apoptotikus T sejtek. A mintákat áramlási citométeren azonnal analizáltuk. A kettős negatív sejtek számítottak nem apoptotikus sejteknek, a csak annexin V⁺ sejtek a korai apoptotózison átesett sejtek voltak és a kettős pozitívak alkották a késői apoptotikus populációt.

9. TCR-hoz kapcsolódó jelátviteli molekulák foszforilációjának mérése

A ZAP-70, ERK1/2 és p38 jelátviteli molekulák foszforilált formáit felismerő monoklonális antitesteket (BD Biosciences) használtunk arra, hogy meghatározzuk a TCR-on keresztül zajló jelátvitel erősségét. Ezt hívják foszfo-flow technikának. A TCR-ok *in vitro* stimulációját követően, a sejteket anti-CD4-PerCP-Cy5.5 és phycoerythrinrel konjugált foszfo-specifikus antitestekkel megfestettük. A mintákat a fehérjék foszforilált formájának instabilitása miatt, rövid időn belül áramlási citométeren lemértük és analizáltuk.

10. Statisztikai analízis

Leíró statisztikák alkalmazásával határoztuk meg a csoportátlagokat, és az átlagok standard hibáját (SEM). Két csoport közötti különbség szignifikanciáját Student t-tesztel adtuk meg, három különböző csoport esetén pedig ANOVA post-hoc Dunnett t-tesztet használtunk. A 0.05-nél kisebb *p* érték számított statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Mitokondriális enzim-specifikus antitestek epitóptérképezése

1. Mitokondriális belső membrán specifikus antitestek kimutatása, és izotípus meghatározása ELISA technikával

ELISA technika használatával, egészséges egyének és szisztémás autoimmun betegek szérumában egyaránt kimutattuk a CS-t, MDH-t és PDC-t felismerő antitestek jelenlétét. Az IgM izotípusú enzim specifikus antitestek gyakrabban vannak jelen az összes vizsgált alcsoportban, mint az IgG vagy IgA izotípusúak. Az egészséges egyének (különböző országokból származó véradók, ill. csecsemők) alcsoportjai között nem találtunk különbséget. Míg az anti-CS és anti-MDH antitestek előfordulási gyakorisága az autoimmun betegekben volt magasabb, addig az IgG izotípusú CS specifikus antitestek a szívtranszplantált betegek szérumában voltak jelen emelkedett titerrel.

A vizsgálatok követő jellegűek voltak, 3-5 évente újból mintákat gyűjtöttünk, és megvizsgáltuk, hogy az egyes izotípusú ellenanyagok mennyisége időben hogy változott. Míg az IgM időben állandó titerrel volt jelen, az IgG-t időszakonként változó egyéni értékek jellemezték. Megállapítható volt, hogy az alacsony affinitású, alacsony titerű fiziológiásan jelen lévő IgM autoantitestek valamennyi vizsgált csoportban jelen vannak, és az egyéni értékek időben nem változtak. Az IgM-nél tapasztalható magasabb pozitív esetszám pedig azzal magyarázható, hogy a természetes autoantitest hálózatot ezen alacsony affinitású immunglobulinok alkotják.

A szívtranszplantált betegek szérumában magasabb titerben található IgG

izotípusú enzimspecifikus antitestek valószínűleg a transzplantációt követő szöveti károsodások révén véráramba jutó allogén sejtalkotók által indukált adaptív immunválasz miatt. A vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a szívtranszplantált betegek szérumban található anti-CS IgG valószínűleg az IgM-ről történő izotípus váltással jöhet létre, mivel ugyanazon epitópot ismerik fel, ugyanakkor ezen betegeknél találtunk olyan lineáris epitópokat is, amelyek az egészséges csoportnál nem jelentek meg.

2. Humán CS specifikus antitestek epitóptérképezése szintetikus átfedő peptidrendszerrel

A mérések során nem találtunk olyan kitüntetett egyedi szekvenciát, amely kizárólag csak az egyik vizsgált csoportot jellemezte volna. A szérumok által felismert epitópok az enzimnek nagyjából azonos régióit fedték le. A különbségek inkább az epitópspecifitások finomabb eloszlásában mutatkoztak.

3. Bakteriális CS specifikus antitestek epitóptérképezése szintetikus átfedő decapeptidekkel

Mivel korábbi vizsgálatok azt sugallták, hogy a természetes antitestek fontos szerepet játszhatnak a humorális immunválasz „természetes” részében, megvizsgáltuk a lehetséges átfedéseket a nAAb-ok által felismert epitópokban a bakteriális CS-on is. A mitokondrium prokarióta eredetéből kiindulva kézenfekvőnek tűnt, hogy megvizsgáljuk a humán CS-on kapott epitópok peptidszekvenciái mutatnak-e homológiát a bakteriális CS-al. A homológia vizsgálatok azt mutatták, hogy bizonyos szakaszok megvannak az enzim bakteriális változatában is. Ebből kiindulva az előzetes epitópredikciót követően megszintetizáltattuk a CS bakteriális változatát is a már használt szintetikus átfedő peptidrendszerben. A soktűs ELISA vizsgálatokat ebben az esetben is elvégeztük, a humán CS-nál is használt szérumokkal. Jól látható volt, hogy itt is megjelentek közös epitópok, melyeket mindhárom vizsgálati csoport szervezete felismert. Az emlős CS-hoz képest azonban több egyedi epitóp van, mely csak egy-egy adott csoportra, és annak is csak egyik izotípusára jellemző.

4. CS reaktív szérumok affinitás tisztítása

Az esetleges zavaró, nem specifikus kötődések elkerülésének érdekében a további vizsgálatokhoz affinitás kromatográfiával anti-CS antitesteket tisztítottunk a nagy anti-CS reaktivitást mutató ($OD_{492} > 1.5$) 44 humán szérumból (30 egészséges és 14 autoimmun beteg: 9 SLE-s, 3 szisztémás szklerózis és 2 RA-es). A szérumokból eluált anti-CS antitestek kizárólag IgM izotípusba tartoztak.

5. Affinitás tisztított CS specifikus antitestek epitóptérképezése hCS-t expresszáló lambda fágkönyvtár (phage-display) segítségével

Az átfedő szintetikus peptidekkel végzett soktűs ELISA vizsgálatokat követően a CS-t expresszáló fágkönyvtár segítségével is megpróbáltuk a CS specifikus antitestek pontos epitóptérképezését. Ezzel a módszerrel sem találtunk olyan kitüntetett epitópokat, amelyek csak az egyes vizsgált csoportokra lettek volna jellemzőek, így a felismert peptid szekvenciák nagyjából az enzim azonos részeit fedték le. A különbség itt is inkább az antitestek specifitásának finomabb mintázatában volt.

6. Affinitás tisztított CS reaktív szérumok keresztreaktivitásának vizsgálata

Az affinitás tisztított anti-CS antitestek MDH-zal és PDH-zal való keresztreaktivitását indirekt ELISA-val vizsgáltuk. Az affinitás tisztított anti-CS antitestek ezek közül egyik antigénnel sem reagáltak. Az emlős CS-on affinitás tisztított szérumokkal megismételtük a méréseket a már korábban használt szintetikus átfedő bakteriális CS peptidrendszerrel is. Három keresztreaktív szekvenciát találtunk: 124-133. aminosav: FRRDHPMAV; 174-183. aminosav: MCKYKYSIGQP; valamint 351-360. aminosav: YFIEKKLYPN. A három felismert szekvencia korlátozott homológiát mutat a humán CS-al. Ezek az aminosavak vagy pozitív, vagy poláros oldalláncokat tartalmaznak, ami összhangban van a nAAb-ok epitópjainak preferált aminosav összetételéről korábban megjelent munkákkal. A háromdimenziós modell szerint ez a három peptid a molekula felszínén foglal helyet. Két peptid (124-133. és 174-183.), a natív fehérje szerkezeti modellen egymáshoz közel helyezkednek el, és valószínűleg ugyanazon antigenitásért felelős régióknak a részeit képezik.

A rhG1-indukált arthritis modell

1. Az arthritis klinikai képe eltér a két PG specifikus TCR-transzgenikus egértörzsben

Korábbi tanulmányokban már leírták, hogy az első pronukleáris injekcióval készült 5/4E8 PG epitóp-specifikus TCR-Tg egértörzs (TCR-TgA) rendkívüli módon hajlamos a PG indukált arthritisre. 12 hónapig tartó longitudinális vizsgálatok során az is bizonyossá vált, hogy ennél az egértörzsnél 5-6 hónapos korban -antigénnel történő immunizálás nélkül- spontán is kialakul a betegség, aminek incidenciája 12 hónapos korra eléri akár a 60%-ot is. Miután befejeződött a második 5/4E8 PG epitóp-specifikus TCR-Tg egértörzs (TCR-TgB) visszakeresztezése a BALB/c törzsbe, megkezdtük a két törzs egyidejű immunizálását rhG1-el. A TCR-TgA egyedek az oltásokra a várt (korábbiakhoz hasonló) módon reagáltak: az arthritis első jelei már a második oltás után néhány nappal megjelentek, és két héttel a második oltást követően már elérték a maximális súlyosságot és a 100%-os előfordulást. Meglepő volt azonban, hogy a TCR-TgB egerek esetében a betegség klinikai megjelenése és karakterisztikája inkább a WT BALB/c egerekkel mutatott hasonlóságot, mintsem a TCR-TgA törzs egyedeivel. Ezek az eredmények azért voltak váratlanok, mert áramlási citometriás mérésekkel megállapítható volt, hogy mindkét egértörzs esetében a CD4⁺ T sejtek 90-94%-a expresszálta az 5/4E8 peptidre specifikus transzgenikus TCR-V β 4 láncot.

2. A rhG1-re adott immunválaszok vizsgálata a TCR-TgA és TCR-TgB egértörzsekben

Kíváncsiak voltunk, hogy a klinikai fenotípusban látható különbségek együtt járnak-e a szérum paraméterek különbségével, ezért antigén-specifikus ELISA és CBA segítségével megmértük a szérum antitest és citokin koncentrációt. A második immunizálás előtt a szérumok anti-rhG1 antitest tartalma mindkét törzsnél alig volt kimutatható. A második oltás viszont szignifikáns mennyiségű IgG1 izotípusú anti-rhG1 ellenanyagtermelést indukált a TCR-TgA egerekben, míg ez a típusú antitest még mindig szinte kimutathatatlan volt a TCR-TgB egerek szérumában. A TCR-TgA törzsnél az anti-rhG1 IgG2a antitestek mennyisége is magasabb volt a TCR-TgB törzs egyedeihez képest. Ez a TCR-TgA egereknél tapasztalt emelkedett ellenanyag termelés magasabb B sejt számmal járt együtt. Nem találtunk eltérést a szérumok IL-1 β , IL-12p70 és IL-17 szintjében a két törzs között, míg az IL-6 a TCR-TgA egereknél végig emelkedett titerben volt jelen a szérumban. Szintén magasabb IFN γ és TNF α koncentrációt mértünk a TCR-TgA egereknél az arthritis akut fázisában.

3. T sejt aktivációs markerek, kostimulációs molekulák és a regulátoros T sejtek mennyiségének változásai a két egértörzsből az immunizálások alatt

A következőkben vizsgáltuk, hogy van-e különbség a két TCR-Tg egérvonal T sejtjeinek aktivációs szintjében, ezért összehasonlítottuk a perifériás nyirokcsomókban és a lépben található $CD4^+$ T sejtek aktivációs markereinek expresszióját. A TCR-TgA egereknél viszonylag korán (már az első rhG1 oltást követően) detektálható volt a növekvő számú $CD25^{high}CD4^+$ T sejt populáció, és ezek a sejtek az egész kísérlet alatt emelkedett számban voltak jelen a TCR-TgA egerekben. Ezzel ellentétben a TCR-TgB egereknél a $CD25^{high}CD4^+$ T sejtek aránya a WT egerekhez hasonlóan végig alacsony maradt. A CD44 molekula (aktivált/memória T sejtek markere) expressziójai is ehhez hasonlóan alakult: a TCR-TgB törzsnél ez az aktivációs marker is szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszálódott a kísérlet folyamán.

Mivel a kostimulációs molekulák alapvetően befolyásolják a T sejt aktivációját és jelátvitelét, ezért fontosnak tartottuk megvizsgálni a CD28, CTLA-4, ICOS és PD-1 molekulák expresszióját mindkét egérvonalban, azonban nem találtunk szignifikáns különbségeket a két törzs között a $CD28^{high}$, $CTLA-4^{high}$ vagy $PD-1^{high}CD4^+$ T sejtek százalékos megoszlásában. Naiv TCR-TgB egerekben az $ICOS^{high}CD4^+$ T sejtek kb. háromszor nagyobb számban voltak jelen a TCR-TgA törzshöz viszonyítva, azonban ezen sejtek száma különösen a perifériás nyirokcsomókban gyors növekedésnek indult az immunizálás hatására a TCR-TgA egerekben is, miközben a TCR-TgB egereknél már az első oltást követően nagyon alacsony számra csökkent. Érdekes volt, hogy mind a CD44 mind az ICOS $CD4^+$ T sejteken való expressziója megugrott a TCR-TgB egerek lépében 5 nappal a második a rhG1 oltás után.

A Treg sejtek nagyon fontos szerepet játszanak az immunfunkciók szabályozásában azáltal, hogy limitálják a T és B sejtek aktivációját, így ha működési zavar, vagy csökkent sejtszám miatt ez a limitáló funkció sérül autoimmunitás alakulhat ki. Ezért feltételeztük, hogy a TCR-TgB egereknél tapasztalt csökkent arthritisre való hajlamnak oka lehet egy magasabb számú Treg populáció, amely tulajdonképpen elnyomhatja az autoreaktív T sejteket. Összehasonlítottuk a Treg sejtek arányát a naiv egerekben, de nem találtunk szignifikáns különbséget a két törzs között, sőt az oltások hatására egy látványos Treg expanzió volt megfigyelhető a TCR-TgA egerekben. Ezen sejtek száma ugyan növekedett a TCR-TgB egerek lépében is a második és harmadik oltás után, mégis az egész kísérlet alatt szignifikánsan alacsonyabb számban maradtak a TCR-TgA egerekhez viszonyítva.

4. A TCR-TgB egerek $CD4^+$ T sejtjei érzékenyebbek az aktiváció indukált sejthalálra

Az arthritogén T sejtek eliminálásának egyik alapvető módja, ezen sejtek aktiváció indukált sejthalála (AICD). Ha ebben a folyamatban zavar lép fel az elősegítheti az arthritis kialakulását. Mivel a TCR-TgA egerek esetében végzett korábbi vizsgálataink megerősítették, hogy a spontán kialakuló arthritis hátterében a T sejtek megváltozott AICD-a állhat, ezért lehetségesnek tűnt, hogy a két TCR-Tg törzs klinikai fenotípusában látott különbségek is a T sejt jelátvitel és apoptózis eltéréseire vezethetők vissza. A TCR-TgB egerek arthritisre mutatott csökkent hajlama magyarázható lenne ezen egyedek $CD4^+$ T sejtjeinek AICD által történő eliminálásával.

A fenti hipotézis vizsgálatára tisztított $CD4^+$ T sejteket *in vitro* körülmények között 3 napig együtt tenyésztettünk 5/4E8 peptiddel előinkubált irradiált A20 sejtekkel, majd lemértük a sejtek antigén stimulációval indukált apoptózisát. A korai apoptotikus T sejtek (annexin $V^+/7$ -AAD⁻) aránya jóval magasabb volt a TCR-TgB eredetű T sejt kultúrákban az immunizálás teljes időtartama alatt, míg a TCR-TgA egerekből nyert T sejtek között sokkal magasabb arányban voltak jelen élő sejtek.

5. Magasabb TCR expressziós szint és erősebb T sejt jelátvitel a TCR-TgB egerekben

Az aktiváció indukált sejthalált a TCR-en keresztül zajló jelátviteli folyamatok és kostimulációs jelek szabályozzák. Habár a két TCR-Tg törzs ugyanarra az epitópra specifikus TCR-t expresszálja (mivel mindkettő ugyanazzal a konstrukcióval készült, két különböző időpontban végzett pronukleáris injekcióval). Így felmerült a lehetőség, hogy a CD4⁺ T sejtek a két egérvonalban nem egyforma mértékben expresszálják a TCR-t. Áramlási citometriás szaturációs kötési teszt segítségével összehasonlítottuk a TCR-V β 4, CD3, és CD4 molekulák sejtfelszíni expresszióját a két vizsgált egérvonal T sejtjein. Meglepő módon, a TCR-TgB egerek kb. kétszer annyi TCR-V β 4-et és CD3-at expresszálnak mint a TCR-TgA egerek. A CD4 molekula esetében ilyen eltérést nem találtunk. Hogy ezeket az eredményeket megerősítsük, kvantitatív PCR segítségével is meghatároztuk a V β 4 és V α 1.1 láncok kópia számát is mindkét törzsből izolált genomiális DNS-ből. Míg a homozigóta TCR-TgA egerekben a V α 1.1 lánc 7, a V β 4 pedig 3 kópia számban volt jelen, addig a homozigóta TCR-TgB egerekben mindkét láncból egyaránt 6-6 kópia volt mérhető. Mivel a TCR mindig heterodimer formájában van jelen a sejtfelszínen, ezért ezek a qPCR eredmények is alátámasztják a korábban kapott adatokat, miszerint a TCR-TgA egerek T sejtjei feleannyi TCR-t hordanak a felszínükön.

Végül megvizsgáltuk, hogy a TCR-TgB egerek T sejtjeiben nagyobb számban expresszálódó TCR-al együtt a TCR jelpálya fokozott működése is kimutatható-e. Ezért foszfo-flow mérésekkel meghatároztuk a T sejt jelátvitelben kulcsszerepet játszó 3 molekula: a ZAP-70, ERK-1/2, és a p38 foszforilációját. Tisztított CD4⁺ T sejteket együtt tenyésztettünk az 5/4E8 szintetikus peptidet prezentáló A20 sejtekkel 1 órán át. Míg a ZAP-70 és p38 molekulák foszforilációja szignifikánsan magasabb volt, addig az ERK-1/2-nél ilyen különbséget nem mértünk.

MEGBESZÉLÉS

Mitochondrium belső membrán enzim specifikus autoantitestek epitóptérképezése – a természetes autontitestek autoimmunitásban betöltött szerepe

Mivel mind a fiziológias, mind a kóros autoimmunitásban megkülönböztetett szerepet töltenek be a konzervatív antigén struktúrák, ezért mitokondriális belső membrán enzimeket, mint genetikailag konzervált antigéneket vizsgáltunk egészséges egyének, ill. autoimmun betegek és szívtranszplantáltak vérszérumaiban lévő autoantitestek immunszerológiai kimutatásával. Minden vizsgált csoportban jelen voltak az IgM izotípusú, alacsony titerű autoantitestek, melyek mennyiségi megoszlása nem mutatott jelentős különbségeket, és az egyéni értékek időben nem változnak. A magas titerű IgM autoantitestek autoimmun betegeknél szignifikánsan gyakoribbak, míg az IgG izotípusú autoantitestek a szívtranszplantált betegekben jellemzőek. Nem véletlen, hogy a szívtranszplantáltak esetében – ahol a beültetett graft elleni immunreakciók hatásaként folyamatosan zajlik szövetkárosító immunreakció – nagy mennyiségben jelennek meg ezek az ellenanyagok. A vizsgált autoimmun betegeknél a kóros immunreakció céltáblája nem ez az antigén, így nem véletlen, hogy az ellenanyag megoszlása ezekben a betegekben sokkal inkább az egészséges egyénekéhez hasonló. Mindhárom vizsgált csoportban az IgG autoantitestek időben változó szintet mutattak az ismételt vizsgálatok során. Feltételezéseink szerint – a szakirodalommal összhangban – az IgM izotípusú ellenanyagok inkább a fiziológias, az IgG izotípusú ellenanyagok pedig inkább a kóros immunválasz részeként értékelhetők. A vizsgálatokat ezután az autoantitestek epitóptérképezésével folytattuk, melyhez egy lambda fág alapú CS antigén fragmens könyvtárat és párhuzamosan egy szintetikus, átfedő decapeptidekből kialakított,

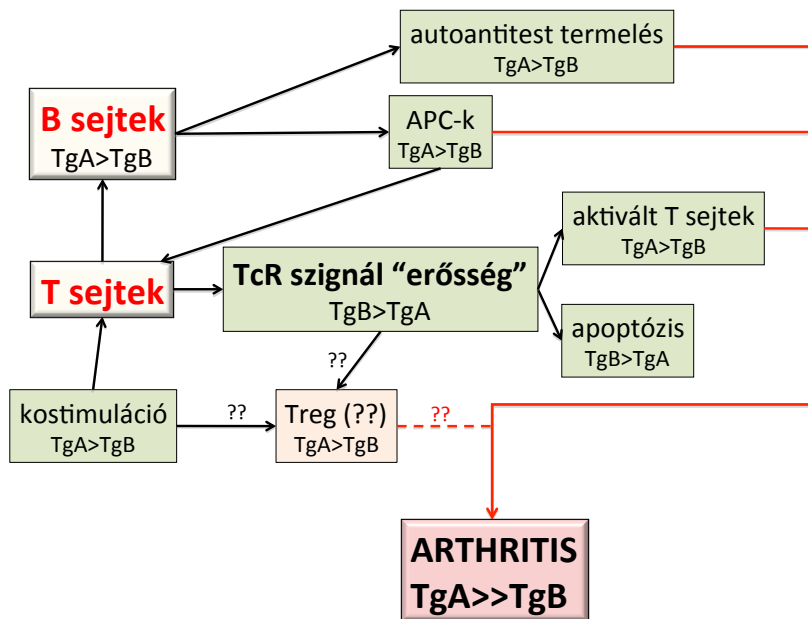
immunszerológiai tesztrendszert is alkalmaztunk. Eredményeink szerint - miközben nincs a hCS molekulának kizárólag az egészséges egyének vagy az autoimmun betegek által felismert kitüntetett része - az epitópok finom mintázata eltérő a vizsgált csoportokban. Megvizsgáltuk a keresztreaktív epitópokat a humán CS-on, és a bakteriális CS-on, így sikerült három keresztreaktív epitópot detektálnunk, azonban a felismert epitópmintázat az enzim humán változatához képest lényegesen több eltérést mutatott az egyes vizsgálati csoportok között. Habár az emlős és bakteriális CS enzim is tartalmaznak hosszabb homológ szekvenciákat, az epitóp felismerésben mégis inkább a hasonló fiziko-kémiai megjelenésű részeknek tulajdonítanak alapvető jelentőséget. Az immunválasz elindításához hasonlóan a tolerancia fenntartása is magában foglalja az immunrendszer mindhárom szintjét. A veleszületett, a természetes és az adaptív immunrendszer összetevői közti együttműködés zavara a támadó immunválasz valamint a tolerancia károsodását egyaránt eredményezheti, elősegítve az immundeficienciák és a pathológiás autoimmunitás létrejöttét.

Pathológiás autoimmunitás vizsgálata GIA (rhG1-indukált-arthritis) modellben

Az autoreaktív CD4⁺ T sejtek és az Ab-termelő B sejtek közötti együttműködés nélkülözhetetlen alapfeltétele a szisztémás autoimmun arthritis kialakulásának, és fenntartásának. Mind az eredeti PGIA, és az új GIA modell a RA-hez hasonlóan T sejt dependens és B sejtek által mediált autoimmun betegség. Adaptív transzfer kísérletek bizonyították, hogy önmagában sem a T sem pedig a B sejtek jelenléte nem elegendő a betegség kialakulásához, kizárólag a két sejtípus együttes transzferje vezetett sikeres eredményhez, bizonyítva ezzel, hogy a PGIA/GIA kialakulásához alapvető a T-B sejtek kooperációja. Kísérletes munkánkban rhG1-el immunizáltunk olyan TCR-Tg egereket, melyeknek T sejtjei a G1 domén legdominánsabb arthritogén epitópját (5/4E8) ismerik fel. Míg a TCR-TgA egerekben a rhG1-el történő immunizálás hatására sokkal hamarabb alakult ki az arthritis egy súlyosabb formája, addig a TCR-TgB egereknél később jött létre a betegség, és klinikai megjelenése inkább a vad típusú BALB/c egereknél korábbi munkákban leírtakra hasonlított. Az eredmény váratlan volt, miután a két TCR-Tg törzs ugyanazt az 5/4E8 epitóra specifikus TCR konstrukciót hordozza. A laboratóriumi eredmények analízise során a TCR-TgA egerek szérumban a második oltást követően, mielőtt még a gyulladás látható tünetei megjelentek volna, már kimutatható volt egy megemelkedett anti-rhG1 ellenanyag (IgG1/IgG2a) titer. A TCR-TgA egerekben tapasztalt gyorsabban és súlyosabb formában kialakuló betegség valószínűleg összefügg ezen keringő antitestek magas koncentrációjával, illetve a szintén magasabb számban jelenlévő B sejteknek. WT BALB/c egereknél már korábbi tanulmányokban bizonyítást nyert, hogy az arthritis súlyossága jól korrelál az antigén specifikus antitestek (különösen az autoantitestek) szérumkoncentrációjával. Az antigén specifikus antitestek termelése mellett a B sejtek központi szerepet töltenek be mint antigén prezentáló sejtek, így kézenfekvő hogy az antigénnel már találkozott T sejtek és az antigén specifikus B sejtek közötti kooperáció a betegség kialakulásának alapvető eleme. A TCR-TgA egerekben emelkedett számban jelen lévő B sejtek sokkal hatékonyabb antigén prezentálásra képesek, felgyorsítva ezzel a T sejtek aktivációját. Ezt támasztotta alá, hogy a rhG1-el történő immunizálások során a TCR-TgA egerek CD4⁺ T sejtjein nagyobb mennyiségben expresszáldottak aktivációs markerek (CD25 és CD44). Mivel a CD4⁺ T sejtek aktivációja központi fontosságú a PGIA/GIA iniciálásában, ezért nem meglepő hogy miután a

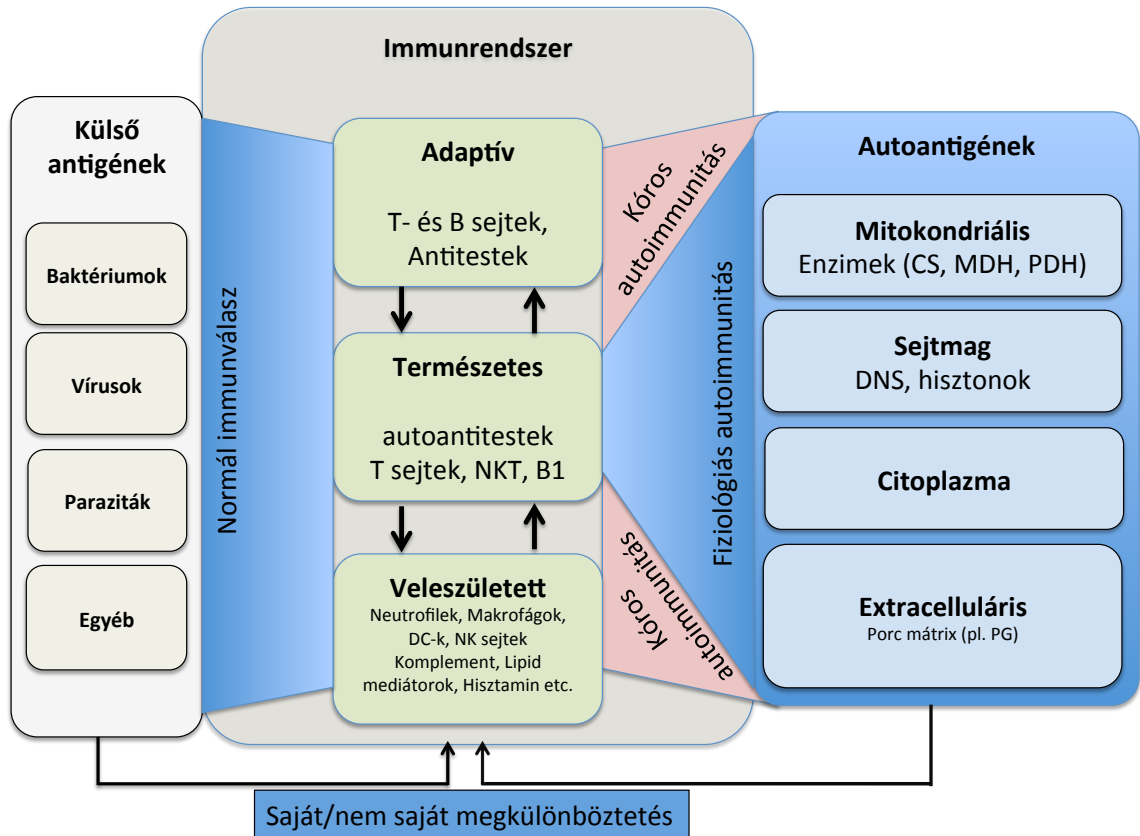
TCR-TgB egerek T sejtjei nem aktiválódtak olyan mértékben, mint a TCR-TgA egerek T sejtjei, ezért a betegség is később, és csak enyhébb formában fejlődött ki. A különbség a két törzs között a kostimulációs molekulák szintjén is jelentkezett, ugyanis a TCR-

TgA egerek nyirokcsomóiban az ICOS^{high} CD4⁺ T sejtek sokkal nagyobb számban voltak jelen, mint a TCR-TgB egerek esetében. Ezt a molekulát főként a folliculáris T helper (Tfh) sejtek expresszálják. Ezen sejtek elősegítik az autoreaktív B sejtek és arthritis kialakulását KBxN egerben (egy másik eger autoimmun arthritis modell). Emiatt a mi esetünkben is feltételezhető, hogy a kisebb számú ICOS^{high} CD4⁺ T sejtek (valószínűleg Tfh sejtek) a TCR-TgB törzsnél hozzájárulnak a csökkent Ab szekrécióhoz és az enyhébb arthritis kialakulásához. A Treg sejtek fontos szerepet játszanak a perifériás tolerancia fenntartásában és a kóros autoimmunitás megelőzésében, azonban a humán RA-ben és a betegség kísérletes állatmodelljeiben betöltött szerepük ellentmondásos. Kézenfekvő magyarázat lenne, hogy a TCR-TgB egereknél esetleg magasabb számban megjelenő Treg sejtek volnának felelősek az alacsonyabb incidenciáért és az enyhébb tünetekért. Azonban az eredmények meglepő módon nem ezt igazolták. Sokkal több Treg sejtet találtunk a TCR-TgA egereknél az immunizálás teljes időtartama alatt, mint a TCR-TgB egereknél, azaz nem találtunk összefüggést a Treg arány és az arthritis súlyossága között. Számunkra a TCR-TgA és TCR-TgB egerek eltérő fogékonysága az aktivációindukált- sejtthálóra (AICD) bizonyult a legérdekesebb megfigyelésnek. Az 5/4E8 peptiddel történő stimulációra sokkal érzékenyebbek voltak a TCR-TgB egerekből izolált T sejtek, és ennek következtében sokkal magasabb volt az AICD aránya is. Az apoptózisban beálló zavar egyik fontos tényezője lehet az autoimmun arthritis kialakulásának. A sejtekben lejátszódó vagy épp hiányzó apoptotikus folyamatokat a T sejt jelátviteli erőssége és a kostimulációs szignálok szabályozzák. A sztaurációs kötési és qPCR tesztek során kiderült, hogy a TCR-TgB egerek CD4⁺ T sejtjei kb. kétszeres mennyiségű TCR-t és CD3-at expresszálnak a TCR-TgA egerekhez képest. A sejtfelszínen expresszált TCR-ek száma jelentősen befolyásolhatja a TCR-en keresztül aktivált a jelátviteli útvonalakat. Ezt a feltételezésünket alátámasztották a T sejt jelátviteli molekulák (ZAP-70 és p38) foszforilációjára irányuló kísérletek eredményei. A sejtfelszíni TCR expresszió szoros összefüggést mutatott ezen jelátviteli molekulák foszforilációjával az 5/4E8 peptiddel való aktiválást követően. Így feltételezzük, hogy a TCR-TgB egerek esetében a rhG1-el (ami tartalmazza az 5/4E8 peptidet is) történő immunizálásra kialakuló túl erős jelátvitel a TCR-okon keresztül, tulajdonképpen az autoreaktív T sejtek nagyszámú pusztulását idézi elő. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy az arthritisre való hajlamot a TCR-on keresztüli jelátviteli erőssége kontrolálja a két TCR-Tg vonalban. A sejtfelszínen eltérő számban megjelenő TCR-ok okozzák a TCR jelátviteli erősségének megváltozását, és ezáltal a betegség fenotípusában jelentkező eltéréseket a két egértörzs között. A TCR-TgA egereknél tapasztalt erős PG-specifikus TCR indukált jelátviteli optimális T sejt aktivációhoz és ezáltal "szuper arthritises" fenotípus létrejöttéhez, míg a TCR-TgB egerek esetében létrejövő „extrém erős” T sejt jelátviteli az autoreaktív T sejtek in vivo apoptózisához, és ezáltal az arthritis egy enyhébb változatának kialakulásához vezetett (1. ábra).



1. ábra A TCR jelátvitel erőssége szabályozza az arthritis klinikai képét a humán PG-specifikus TCR-Tg egerekben.

A két modellben kapott eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a fiziológias immunreguláció elengedhetetlen része az „immunológiai steady-state”, melynek egyik jellemző megjelenési formája nAAb hálózat, amely többek mellett, például a mitokondriális belső membrán enzimekkel (CS) szembeni tolerancia kialakításáért és fenntartásáért felelős (2. ábra). A humorális autoimmunitás mechanizmusainak pontosabb megismeréséhez, illetve ha a jelenleginél megbízhatóbb és specifikusabb autoimmun labormarkereket szeretnénk találni, akkor nem elég csak az általánosan elterjedt antigén-specifikus antitest titer meghatározása, hanem a felismert epitópok finomabb mintázatának jellemzése is szükségessé válhat. Az „immunológiai steady-state” az immunrendszer hálózatos működésének köszönhetően sokféleképp módosulhat pathológias autoimmunitást kialakítva (2. ábra). Erre példa, hogy egy sejt szinten bekövetkező károsodás, mint például az egér arthritis modellben a CD4⁺ T sejtek jelátvitelében és aktiváció-indukált sejthalálában, pathológias autoimmunitást válthat ki, a steady-state megváltozásával, ami tartós szövetkárosodáshoz vezet. Ez az orvosi gyakorlatban arra is rámutat, hogy a széles körben elterjedt autoantitest vizsgálatok mellett a celluláris laboratóriumi vizsgálatok is fontosak lehetnek autoimmun betegségek diagnosztikájában. Az autoimmun folyamatok humorális és celluláris mechanizmusai mellett nem vitatható a genetikai és környezeti tényezők befolyásoló szerepe sem. Ezen eredmények rámutatnak arra, hogy az autoimmunitást illetve az autoimmun betegségek kialakulását csak igen komplex módon lehet megközelíteni és megérteni.



2. ábra A kóros autoimmunitás hátterében az immunológiai szabályozás megváltozása állhat. A normál immunszabályozás biztosítja a saját- és nem saját struktúrák felismerését és megkülönböztetését. A beérkező jeleket az immunrendszer különböző szintjei dolgozzák fel, melyek azonban folyamatosan szoros kapcsolatban vannak egymással. Ennek eredményeképp, az effektor mechanizmusok szintjén, valósul meg a külső antigénnel szemben támadó jellegű, a saját antigénnel szemben pedig elfogadó jellegű immunválasz. Az autoantigénnel szembeni tolerancia fenntartásában kulcsfontosságú a természetes immunrendszer. Az immunrendszerben bekövetkező belső szabályozási zavar esetén a saját antigénnel szembeni immunválasz „kiszélesedik”, és belépnek az adaptív és a veleszületett rendszerek effektor mechanizmusai is, ami a tolerancia elvesztéséhez és kóros autoimmunitáshoz vezet. Az ábrán a fiziológias szabályozás mechanizmusait kék színnel jelöltük, míg a kóros autoimmunitást a rózsaszínű területek jelölik.

A LEGFONTOSABB SAJÁT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Mitokondrium belső membrán enzim specifikus autoantitestek epitóptérképezése – a természetes antitestek autoimmunitásban betöltött szerepe

1. Mindhárom (egészséges, autoimmun- és szívtranszplantált betegek) vizsgált csoport esetében sikeresen kimutattuk a mitokondriális belső membrán enzimeket (citrát-szintáz (CS), malát-dehidrogenáz (MDH), piruvát-dehidrogenáz (PDH)) felismerő autoantitesteket. Míg az egészséges minták egyes alcsoportjai nem mutattak eltérést ezen autoantitestek mennyiségét és izotípusát tekintve, addig az autoimmun betegek szérumában az IgM izotípusú, a szívtranszplantált betegek szérumaiban pedig az IgG izotípusú antitestek voltak jelen emelkedett titerrel.
2. Az előzetes *in silico* B- és T sejt epitóp predikciót követően sikeresen létrehoztuk és alkalmaztuk az átfedő decapeptid rendszert a humán- ill. bakteriális CS enzim epitóptérképezésére. Nem tudtunk kimutatni olyan epitópokat

mely kiemelkedő fontossággal bírnának, és kizárólagosan jellemeznék valamelyik vizsgált csoportot. A különbségek mindkét esetben inkább az epitópok finom eloszlásában mutatkoztak meg.

3. Sertés szívizom eredetű CS-on sikeresen tisztítottunk ellenanyagot autoimmun betegek és egészséges véradók magas CS aktivitást mutató szérumaiból, amely antitestek kizárólag az IgM izotípusba tartoztak.
4. Sikeresen beállítottuk a humán CS random fragmenseket expresszáló lambda fágkönyvtár rendszert, mellyel további epitóptérképezést végeztünk CS affinitás tisztított szérumokkal. Ezzel a módszerrel sem tudtunk kimutatni kiemelkedő fontosságú, egyedi epitópokat.
5. Az emlős CS-on affinitás tisztított szérumok nem mutattak keresztreaktivitást más mitokondriális belső membrán (MDH, PDH) enzimekkel, azonban az enzim bakteriális változatával 3 közös epitópot sikerült azonosítani, melyek csak korlátozott homológiát mutatnak a humán CS enzimmel.

Pathológiás autoimmunitás vizsgálata GIA (rhG1-indukált-arthritis) modellben

1. RhG1 intraperitoneális oltásával sikeresen indukáltunk arthritist olyan T sejt receptor (TCR) transzgenikus egértörzsekben, melyeknek T sejtjei a proteoglikán (PG) molekula G1 doménjében található domináns arthritogén epitópot ismerik fel. Két magas TCR expressziójú alapító állatot BALB/c egértörzsbe visszakeresztezve, megszilárdítottuk a TCR-TgA és TCR-TgB egérvonalakat. Az arthritis klinikai vizsgálata során jelentős különbségeket tapasztaltunk a két törzs arthritisre mutatott hajlamában. Míg a TCR-TgA törzsnél fokozott súlyossággal és incidenciával fejlődött ki a betegség, addig a TCR-TgB egerek esetében az arthritis klinikai megjelenése sokkal inkább hasonlított a vad típusú (WT) BALB/c egerekben leírtakhoz.
2. A szérumparaméterek részletes vizsgálata jól korrelált a klinikai képpel: a TCR-TgA törzsből mind az antigén specifikus antitestek, mind a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek szintje magasabb volt, mint a TCR-TgB egyedekben.
3. Az egyes limfocita populációk jellemzése is alapvető eltérést mutatott ki a két törzs között. A különbség már a TCR expresszió szintjén szembetűnő volt, mivel a TCR-TgB egerek T sejtjei hozzávetőleg kétszeres mennyiségű TCR-t expresszálnak felszínükön. A TCR-TgB egyedekhez képest a TCR-TgA törzs nyirokszerveiben jóval magasabb arányban voltak jelen aktivált (CD25^{high}, CD44⁺) T sejtek. A tolerancia/autoimmunitás szabályozásában fontos szerepet játszó Treg sejtek esetében ellentmondásos eredményt kaptunk, mivel az arthritisre jobban hajlamos TCR-TgA egereknél voltak jelen magasabb arányban. A TCR-TgA egerek nyirokszerveiben nagyobb számban jelen lévő B sejtek a magasabb ellenanyag titerrel, és aktivált T sejt számmal (a hatékonyabb antigén prezentáció révén) mutathatnak összefüggést.
4. Foszfo-flow technika segítségével kimutatható volt, hogy a TCR-TgB egerekben mért magasabb TCR expresszió erőteljesen felfokozott T sejt jelátvitellel járt együtt. Antigénnel történő *in vitro* stimulációra ugyanis a TCR-TgB egerekből származó T sejtek jelátviteli molekulái (ZAP-70, p38) sokkal nagyobb mértékben foszforilálódtak.
5. A fokozott T sejt jelátvitel az *in vitro* antigén stimulációt követően nagymértékű sejtpusztuláshoz vezetett a TCR-TgB egerek T sejt kultúráiban. A két törzs között adódó különbségek minden bizonnyal a TCR-TgB egerek aktivált T sejtjeinek aktiváció indukált sejthalál (AICD) révén történő eliminációjára vezethetők vissza.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Összesített impakt faktor: 52.069

A Tézisek alapját képező cikkek [IF: 21.708]:

1. **Olasz, Katalin**; Boldizsar, Ferenc; Kis-Toth, Katalin; Tarjanyi, Oktavia; Hegyi, Akos; van Eden, Willem; Rauch, Tibor; Mikecz, Katalin; Glant, Tibor: *T cell receptor (TCR) Signal Strength Controls Arthritis Severity in Proteoglycan-Specific TCR Transgenic Mice*. Clin. Exp. Immunol. 67(2): 346-55., 2012.
IF: 3.134*
2. 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. 63(5): 1312-21., 2011.
IF: 8.435*
3. Czömpöly T, **Olasz K**, Nyárády Z, Simon D, Bovári J, Németh P.: *Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies*. Autoimmun Rev. 7(6):463-7., 2008.
IF: 5.371
4. Czömpöly T, **Olasz K**, Simon D, Nyárády Z, Pálinkás L, Czirják L, Berki T, Németh P.: *A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network?* Mol Immunol. 43(11):1761-8., 2006.
IF: 4.768

A Tézisekhez szorosan nem kapcsolódó cikkek [IF: 30.361]:

5. Nagyeri G, Radacs M, Ghassemi-Nejad S, Tryniszewska B, **Olasz K**, Hutas G, Gyorfy Z, Hascall VC, Glant TT, Mikecz K.: *TSG-6 protein, a negative regulator of inflammatory arthritis, forms a ternary complex with murine mast cell tryptases and heparin*. J Biol Chem. 2011 Jul 1;286(26):23559-69., 2011.
IF: 5.328
6. Czömpöly T, Lábadi A, Kellermayer Z, **Olasz K**, Arnold HH, Balogh P.: *Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen*. J Immunol. 186(12):6981-9., 2011. IF: 5.745*
7. Nesterovitch AB, Szanto S, Gonda A, Bardos T, Kis-Toth K, Adarichev VA, **Olasz K**, Ghassemi-Najad S, Hoffman MD, Tharp MD, Mikecz K, Glant TT.: *Spontaneous insertion of a b2 element in the ptpn6 gene drives a systemic autoinflammatory disease in mice resembling neutrophilic dermatosis in humans*. Am J Pathol. 178(4):1701-14., 2011.
IF: 5.224*
8. 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. 62(10):2984-94., 2010.
IF: 8.435

9. Angyal A, Egelston C, Kobezda T, **Olasz K**, László A, Glant TT, Mikecz K.: *Development of proteoglycan-induced arthritis depends on T cell-supported autoantibody production, but does not involve significant influx of T cells into the joints.*
Arthritis Res Ther. 12(2): R44., 2010.
IF: 4.357

10. Bovári J, Czömpöly T, **Olasz K**, Arnold HH, Balogh P.: *Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency.*
Pathol Oncol Res. 2007;13(3):227-35.
IF: 1.272

*Utolsó elérhető (2010.) impakt faktor adat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, **Prof. Dr. Németh Péternek** és **Dr. Boldizsár Ferencnek**, hogy lehetővé tették számomra az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben való munkát, támogatásukért és szakmai segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Glant Tibornak**, hogy lehetővé tette, hogy a Chicagói Rush Egyetemen dolgozhassak két évig, mely alatt megismerkedhettem a reumatoid arthritis kísérletes állatmodelljével és rengeteg modern laboratóriumi technikát sajátíthattam el.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Czömpöly Tamásnak**, és **Dr. Simon Diának** az epitóptérképezésben nyújtott útmutatásért, segítségért, és **Dr. Nyárády Zoltánnak** a témához kapcsolódó bioinformatikai segítségért.

Szeretném köszönetemet kifejezni **Prof. Dr. Czirják Lászlónak**, **Prof. Dr. Füst Györgynek** és **Dr. Prohászka Zoltánnak** az autoimmun betegek, finn és brit véradók szérummintáiért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Alessandra Luzzago-nak** a lambda fág vektor rendelkezésünkre bocsátásáért.

Szeretném megköszönni **Prof. Hudecz Ferencnek** és **Bösze Szilviának**, hogy megszentizálták, és rendelkezésünkre bocsájtották az átfedő decapeptid (sok tűs ELISA) rendszert.

Szeretnék köszönetet mondani férjemnek **Hegy Ákosnak**, hogy munkámat mindig támogatta, és a két éves Chicagói munkám során nyújtott technikai segítségért.

Végül köszönöm a munkám során kapott segítséget és támogatást az **Immunológiai és Biotechnológiai Intézet**, és a **Chicagói Rush Egyetem Molekuláris Medicina Tanszék** minden kedves dolgozójának.