

Peptidalapú stratégiák autoreaktív B-sejtek szelektív depléciójára Reumatoid Arthritisben

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Pozsgay Judit



Témavezető: Prof. Sármay Gabriella, egyetemi tanár
ELTE TTK Biológia Doktori Iskola, Immunológia Program
Programvezető: Prof. Erdei Anna, egyetemi tanár

ELTE TTK, Immunológiai Tanszék 2017

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék.....	5
2. Bevezető.....	7
3. Irodalmi áttekintés.....	8
3.1. Immunrendszerünk, a kétélű kard.....	8
3.2. A tolerancia áttörése, a Reumatoid Arthritis (RA) kialakulása.....	12
3.3. Egy poszt-transzlációs módosulás, a citrullináció mechanizmusa.....	16
3.4. A poszt-transzlációs módosuláson átesett fehérjék ellen termelt autoellenanyagok [Anti-modified protein antibodies (AMPAs)].....	16
3.5. A fibrin szerepe az arthritiszben.....	18
3.6. Az RA patomechanizmusa.....	18
3.7. Kezelési stratégiák alkalmazása RA-ban szenvedő betegeknél.....	23
4. Célkitűzéseim.....	26
5. Anyagok és módszerek.....	30
5.1. Betegadatok.....	30
5.2. Peptidszintézis.....	32
5.3. A szérumok és vér gyűjtése.....	33
5.4. PBMC izolálás vérből.....	34
5.5. Mágneses B sejt szeparálás negatív szelekcióval.....	34
5.6. Mágneses monocita szeparálás pozitív szelekcióval.....	35
5.7. A citrullin tartalmú fibrin β 60-74 peptidre specifikus ellenanyagok kimutatása szérumból indirekt ELISA módszerrel.....	35
5.8. A citrullinált fibrin β 60-74 peptid-specifikus ellenanyagok kimutatása RA-s vérből izolált B-sejtek felülszójából.....	36
5.9. Az autoreaktív B-sejtek kimutatása citrullin vagy arginin tartalmú peptidekkel fedett fluoreszkáló mikroyöngyök segítségével.....	36
5.10. U937 monocita sejtvonal kezelése, fenntartása.....	37
5.11. Fc γ receptor expresszió ellenőrzése az U937 sejteken.....	37
5.12. Fc γ RI-hez kötődő peptidek funkcionális integritásának vizsgálata.....	37
5.13. U937 monocita sejtvonalon végzett Bonetto- és Berntzen peptid fagocitózis vizsgálata.....	38

5.14. Makrofág differenciáció.....	39
5.15. B-sejtek makrofágak általi internalizációjának vizsgálata.....	40
5.16. A komplementaktiváló peptid hatásvizsgálata sejtmentes rendszerben.....	40
5.17. A CNN peptid által aktivált komplement útvonalak meghatározása.....	41
5.18. Modell a komplementaktiváló peptid működésének vizsgálatára B-sejteken.....	42
5.19. A biológiailag lebomló PLGA (poli tejsav-glikolsav) nanopolimerek előállítása.....	42
5.20. Peptidek kapcsolása nanorészecskékhez.....	42
5.21. A PLGA nanopolimerek hatásának vizsgálata az autoreaktív B-sejtek ellenanyagtermelésére ELISPot módszerrel.....	43
5.22. A bispecifikus PLGA nanopolimerek sejtpusztító hatásának vizsgálata.....	44
5.23. A komplement-mediált lízis hatékonyságának fokozása a hSCR18-20 fehérje segítségével.....	45
5.24. Statisztikai analízis.....	45
6. Eredmények.....	47
6.1. A citrullin tartalmú fibrin β 60-74 peptidre specifikus ellenanyagok és perifériás vérből izolált B sejtek kimutatása.....	47
6.2. Fc γ RI-hez kötődő peptidek funkcionális integritásának vizsgálata.....	51
6.2.1. Az U937 sejtvonal karakterizálása.....	52
6.2.2. A peptidek kötődése U937 sejtek Fc receptorához.....	53
6.2.3. Az Fc receptorokhoz kötődő peptidek leszorítása humán IgG-vel.....	54
6.2.4. A peptidek fagocitózist kiváltó hatásának vizsgálata.....	55
6.2.5. Módosított Fc résszel rendelkező anti-CD19 ellenanyaggal fedett B sejtek makrofágok általi fagocitózisa.....	58
6.3. A komplement rendszert aktiváló peptidek.....	60
6.3.1. A peptidek funkcionális vizsgálata ELISA módszerrel.....	60
6.3.2. A CNN2 peptidet és Fc γ -receptor peptidet tartalmazó bispecifikus konstrukció vizsgálata „in vitro” primer B-sejteken.....	61
6.4. Irányított lízis PLGA nanopartikulmhoz kapcsolt komplement rendszer aktiváló peptiddel és autoepitóppal.....	64
6.4.1 PLGA nanopolimerek vizsgálata.....	65
6.4.2. A CNN peptiddel fedett biodegradábilis PLGA komplement aktiváló képességének vizsgálata.....	67
6.4.3. A PLGA nanorészecskékhez kötődő bispecifikus peptidkonstrukciók hatása a RA B sejtek in vitro ellenanyag termelésére.....	68

6.4.4. A PLGA nanorészecskékhez kötődő bispecifikus peptidkonstrukciók B-sejt pusztító hatásának kimutatása.....	70
6.4.5. A komplement aktiváció fokozása a H-faktorról kompetáló SCR18-20 doménnel..	71
7. Diskusszió.....	73
8. Új tudományos eredmények.....	82
9. Összefoglalás.....	83
10. Summary	84
11. Köszönetnyilvánítás	85
12. Saját közlemények jegyzéke.....	87
13. Irodalomjegyzék.....	92

1. Rövidítésjegyzék

ACPA - anti-citrullinated protein/peptid antibodies / anti-citrullinált fehérje/peptid antitestek

AMPA - anti-modified protein antibodies

APC - allophycocyanin / allofikocianin

AUC - area under curve / görbe alatti terület

BAFF - B-cell activating factor / B-sejt aktiváló faktor

BSA - bovine serum albumin / marha szérum albumin

CD - cluster of differentiation

CFSE - carboxyfluorescein succinimidyl ester / karboxifluorescein-szukcinimidil-észter

CIA - collagen-induced arthritis / kollagén-indukált artritisz

DAS - disease activity score

DC - dendritic cell / dendritikus sejt

DMARD - disease-modifying anti-rheumatic drugs / betegségfolyást módosító reumaellenes szerek

EDTA - etiléndiamin-tetraecetsav

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay / enzimkapcsolt immunszorbens esszé

FACS - fluorescent activated cell sorter / fluoreszcencia aktivált sejt szorter

Fc γ R - Fc gamma receptor

FCS - fetal calf serum / fetális borjú szérum

FITC - fluoreszcein-izotiocianát

GM-CSF - granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / granulocita-monocita kolónia stimuláló faktor

HBSS - Hank's buffered salt solution / Hanks' puffer

KHS - kevert humán savó

LPS - lipolopiszacharid

MAA - malonaldehid-acetaldehid

M-CSF - macrophage colony stimulating factor

MHC - major histocompatibility complex / fő hisztokompatibilitási komplex

MTX - metotrexát

NHS - normál humán szérum

NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drugs / Nem-szteroid gyulladáscsökkentő
gyógyszerek

OD - optikai denzitás

PAD - peptidil arginin deimináz

PBMC - peripheral blood mononuclear cell / perifériás vér mononukleáris sejtjei

PBS - phosphate buffered saline / foszfát pufferes sóoldat

PE - phycoerythrin / fikoeritrin

PLGA - poly lactic-co-glycolic acid / poli tejsav-glikolsav

PMA - phorbol 12-myristate 13-acetate / forbol 12-mirisztát 13-acetát

RA - reumatoid artritisz

RF - rheumatoid factor / reumafaktor

ROC - Receiver Operator Characteristic

SCR - short consensus repeat

SPS - sodium-polyanethol-szulfonsav

TMB - tetrametilbenzidin

TNF - tumornekrózis faktor

2. Bevezető

Az autoimmun betegségek a becslések szerint a populáció 5-8%-át érintik és az előfordulások száma növekvő tendenciát mutat, míg hatékony, kevés mellékhatással járó kezelés sajnos még sok autoimmun betegségre nem létezik. A jelenlegi terápiás gyógymódok a fájdalom és a gyulladás csökkentését szolgálják, és nem alkalmasak arra, hogy az autoreaktív sejteket szelektíven gátolják, ezért nagy szükség van az ilyen jellegű specifikus terápiák fejlesztésére.

Az antigén specifikus terápiák fő célja, hogy autoimmun betegségekben az autoreaktív sejteket újraprogramozzák vagy eliminálják a szervezetből, és hogy kialakuljon a tolerancia a saját antigénnel szemben. Doktori dolgozatomban bemutatom azokat az irányelveket, amelyek autoepitópok felderítésére, detektálására és autoreaktív sejtpopulációk izolálására, átprogramozására irányulnak, amelyek mentén az antigén specifikus terápiák fejlesztése történik. A jelenleg leggyakrabban alkalmazott terápiák nem autoantigén specifikusak, ezért ezek generalizált immunszuppresszióval járnak, amelynek hatására megnő a kockázat a szervezetet érő fertőzésekre és egyéb súlyos mellékhatásokkal is járhatnak. Ezért lenne előnyös csak a saját-specifikus B-, illetve T-sejtek eliminálása a szervezetből. Munkám során elkezdtek egy lehetséges autoantigén specifikus terápia fejlesztésére alkalmas módszer kidolgozását Reumatoid Arthritisben (RA) szenvedő betegek gyógyítására.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Immunrendszerünk, a kétélű kard

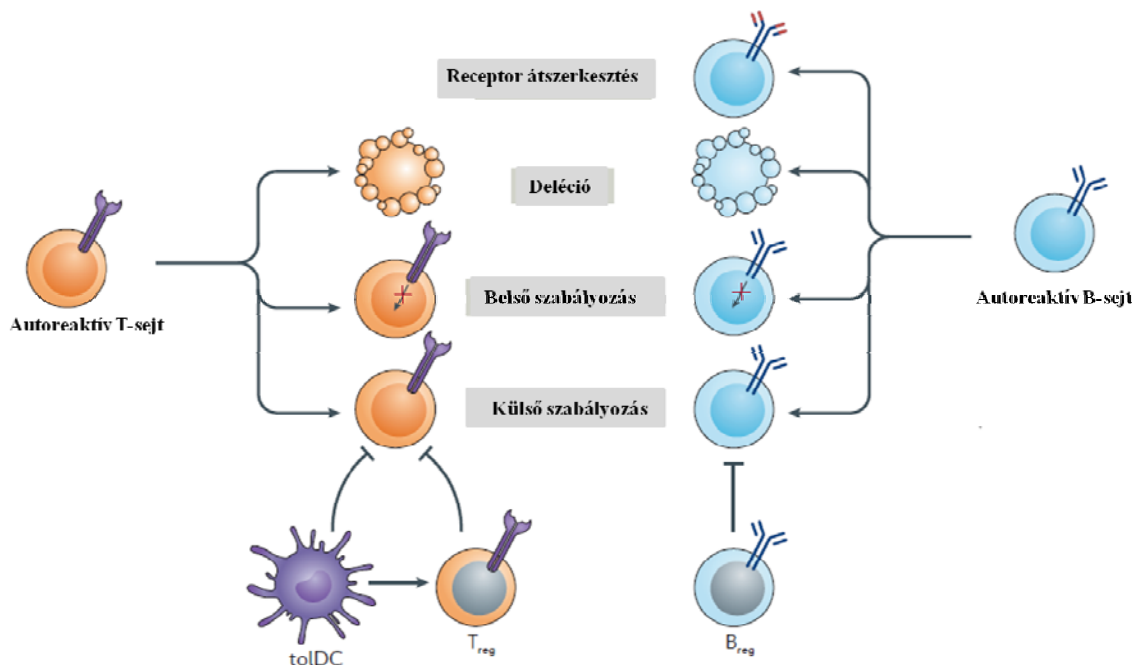
Az immunrendszer azért fejlődött ki az egyedfejlődés során, hogy különbséget tegyen a saját és nem saját között, és megvédje a szervezetet a kórokozóktól, ugyanakkor ez a védelmi rendszer a szervezet sajátját ne ismerje fel és ne támadja meg. A szervezetben előfordulnak autoreaktív sejtek és autoreaktív ellenanyagok, amelyek nem okoznak autoimmun betegséget. Ezért a centrális és a perifériás tolerancia a felelős, melynek kialakításáért és fenntartásáért az immunrendszer többféle szabályozó mechanizmusa felel (1). Ugyanakkor, a genetikai, epigenetikai és környezeti tényezők hatására a regulációs mechanizmusok külső és belső szabályozási útjai sérülhetnek, melyek a tolerancia áttöréséhez, és autoimmun betegségek kialakulásához vezethetnek. Az autoimmun betegségek lehetnek egy vagy több szervre vagy szövetre specifikusak (2), vagy lehetnek szisztémásak (3, 4).

A centrális tolerancia a limfociták ontogenezise során a központi nyirokszervekben, a csontvelőben vagy a tímuszban alakul ki, a perifériás tolerancia pedig a véráramba, nyirokkeringésbe, szöveti környezetbe kikerült, kis affinitással sajátot is felismerő limfociták féken tartásáért, illetve eliminálásáért felel (1, 5, 6).

A T-sejt fejlődés során a tímuszban a sajátpeptidhez nagy affinitással kötődő T-sejt receptorral (TCR) rendelkező T-limfociták elpusztulnak, de a gyengén autoreaktív T-sejtek kikerülhetnek a perifériára. A transzformáló növekedési faktor β (Transforming growth factor β , TGF- β), vagy IL-2 citokin jelenlétében a nagy, vagy közepes intenzitással sajátot felismerő T-sejtekből regulátor T-sejtek fejlődhetnek ki, amelyek a perifériás tolerancia fenntartásában vesznek részt (7, 8) (1. ábra). Gyulladásos környezetben a T-sejtek aktivációs küszöb értéke alacsonyabb, mint a tímuszban és így aktiválódhatnak az autoreaktív T-sejtek (9, 10). A szöveti környezetben enzimek által katalizált poszt-transzlációs módosulások következtében létrejöhetnek megváltozott saját antigének is, mint a - későbbiekben még részletesen bemutatásra kerülő - citrullináció, valamint a karbamiláció (11), a deamidáció (12), a foszforiláció (13), az acetiláció (14), az ubikvitináció (15, 16), továbbá a nem enzimátikus

poszt-transzlációs módosulások, mely esetben a fehérje egy oxidáns vagy egy elektrofil hatásának van kitéve (17, 18). A saját antigének ilyen formában nem kerülnek bemutatásra a tímuszban, tolerancia sem alakul ki ellenük, így az autoreaktív T-sejtek a periférián a megváltozott saját antigén bemutatásának hatására aktiválódhatnak és a szöveti környezetben elősegíthetik az autoimmun folyamatok kialakulását (19). Számos poszt-transzlációs módosulás, illetve az azt végrehajtó enzim hibás működése szerepet játszik autoimmun betegségek kialakulásában, ilyen a glutaminsav-dekarboxiláz az egyes típusú diabéteszben (20), a mieloperoxidáz a vaszkulitisz esetén (21), a piruvát-dehidrogenáz a primer biliaris cirrhosisnál (22), vagy a peptidil-arginin deamináz (PAD) az RA esetében (23, 24).

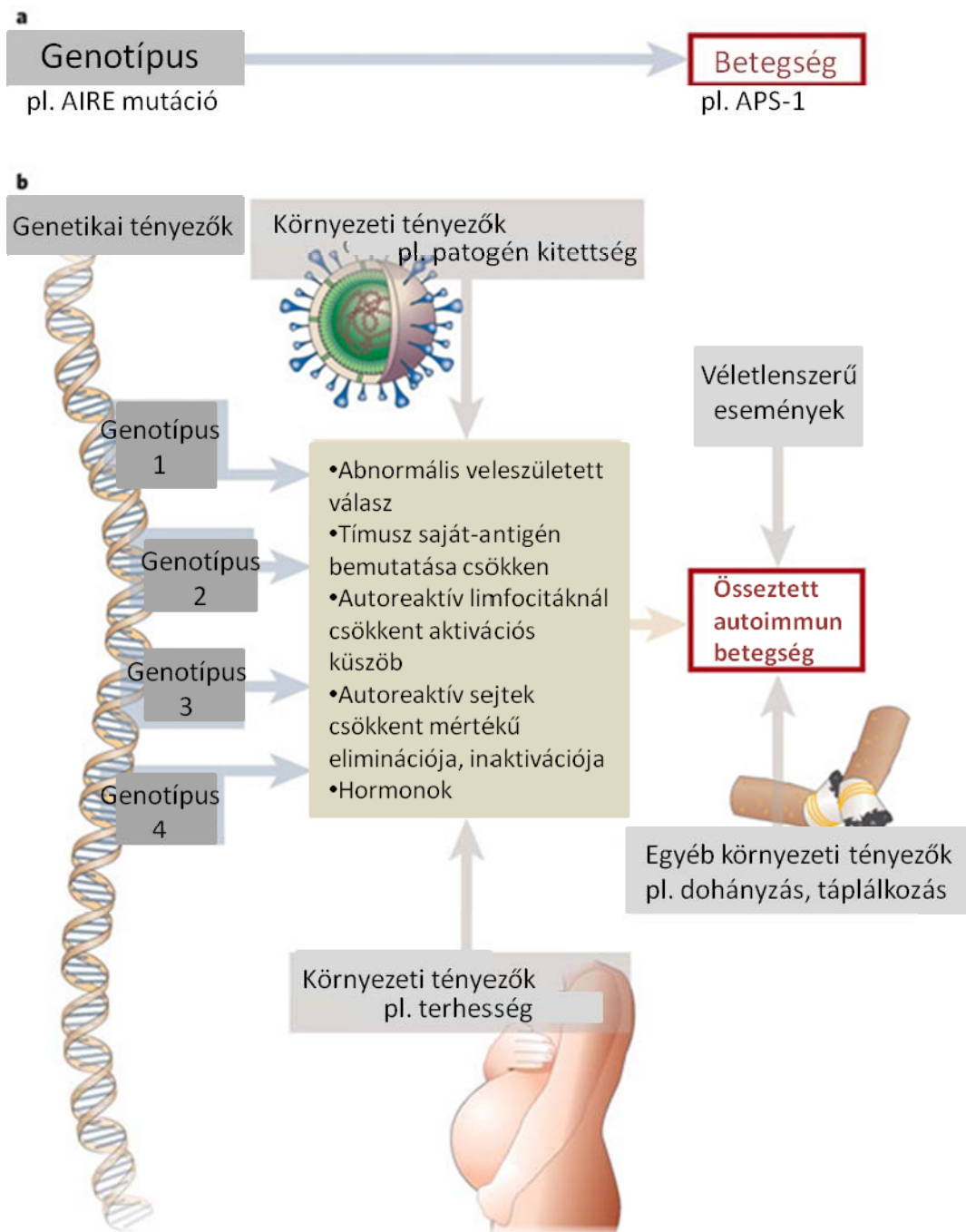
A B-sejtek csontvelői érése folyamán azok a sejtek, amelyeknek B-sejt receptora (BCR) nagy affinitással saját antigént ismer fel, receptor átszerkesztésen mennek keresztül, ami a receptor specifitásváltozását eredményezi. Amennyiben a receptor átszerkesztés nem vezet jól működő, nem autoreaktív BCR kialakulásához, a B-sejt programozott sejthalállal elpusztul. A sajátot gyengén felismerő B-sejtek megmenekülhetnek a negatív szelekciótól és kikerülhetnek a perifériára, ahol a virális/bakteriális fertőzések hatására keletkező ko-stimulációs szignálok jelenlétében ellenanyag termelő plazmasejtekké differenciálódhatnak (1. ábra) (25).



1. ábra. A tolerancia kialakulásának és fenntartásának mechanizmusa. Az autoreaktív B-sejtek receptor átszerkesztésen mehetnek keresztül, vagy programozott sejthalállal elpusztulhatnak, vagy a BCR/TCR közvetítette jelek leszabályozása történhet meg gátló receptorok és jelátvivő molekulák közreműködésével. A perifériára kikerült autoreaktív limfociták a különböző túlélési- és növekedési faktorok hiányában, illetve a

regulátor T- és B-sejtek, valamint a tolerogén DC-k gátló hatására válhatnak válaszképtelenné. APC: antigén prezentáló sejt, T_{REG}: regulátor T-sejt, B_{REG}: regulátor B-sejt, tolDC: tolerogén dendritikus sejt (26).

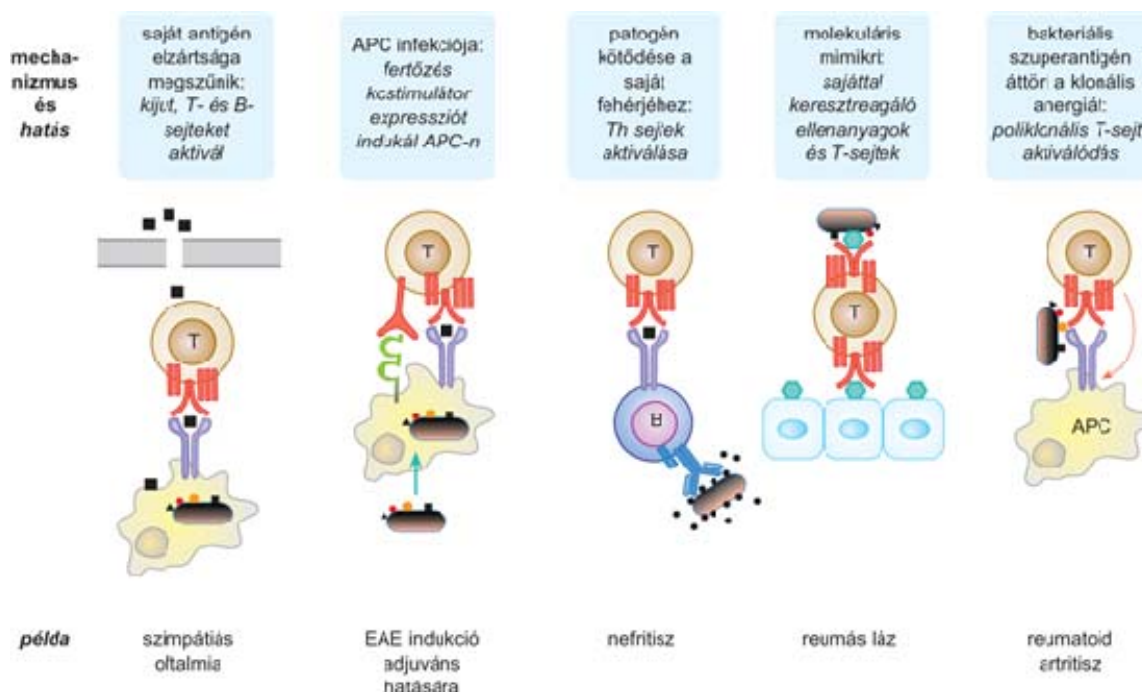
A Nobel-díjas Paul Erlich a huszadik század elején „horror autotoxicus”-nak nevezte el a szervezet azon képességét, hogy nem támadja meg saját magát, eszerint autoimmun betegségek nem alakulhatnak ki (27, 28). Az autoimmun betegségek jellemzően multifaktoriálisak, és kialakulásukban jelentős szerep juthat az öröklött genetikai polimorfizmusnak, a mutációknak [AIRE, CTLA-4, Foxp3, FAS, ptpn22 (27)], az epigenetikai változásoknak, amelyekhez további környezeti rizikófaktorok járulhatnak, mint a fertőzések (29, 30), a stressz (31, 32), a dohányzás (33), a nehézfém szennyezések (34), a szilikonpor (35, 36) és a környezetszennyezés (35, 37, 38) (2.ábra).



2. ábra. Az autoimmun betegségek kialakulhatnak egy gén mutációja következtében, vagy összetett tényezők közrejátszásával. a) A genotípusból (mutációból) egyenesen következik a betegség. b) A betegség genetikai, epigenetikai és környezeti hatások kombinációjából alakul ki (27).

A patogének és az általuk okozott gyulladás különböző patológiás autoimmun válaszokat generálhat, amelyek eredménye az epitóp kiterjedés, a molekuláris mimikri, a poliklonális limfocita aktiváció és a járulékos, „bystander” aktiváció (39).

Megfigyelték, hogy az autoepitópok száma az autoimmun betegség előrehaladtával nő. Ez a folyamat az epitóp kiterjedés, vagy epitope spreading, amelynek következtében a gyulladós környezetben a sejtszétválás, a megnövekedett citrullináció vagy egyéb, például proteolitikus aktivitás révén neo-epitópok keletkeznek, amelyek egyre több limfocita klón aktiválását teszik lehetővé (29, 40, 41). Molekuláris mimikrióról akkor beszélünk, amikor a kórokozó epitópja ellen termelt ellenanyag keresztreagál a saját antigénnel (42, 43). A járulékos (bystander) aktiváció során a gyulladós citokin környezetben a nemspecifikus immunsejtek is aktiválódhatnak (3. ábra) (39, 42, 43).



3. ábra. A saját struktúrákkal szemben kialakuló tolerancia áttörésének módjai.

(Erdei: Immunológia 19.16 ábra ISBN 978-963-226-370-0,

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Immunologia/ch19s03.html)

3.2. A tolerancia áttörése, a Reumatoid Artritisz (RA) kialakulása

Az RA egy krónikus gyulladással járó szisztémás autoimmun betegség, mely az ízületek vissza nem fordítható deformitásával jár. A gyulladást fenntartó immunsejtek infiltrálódnak az ízületi részbe és a szinoviális hártyába, ahol a szinoviumot proliferációra készítetik és így

pannus alakul ki. Ez a burjánzó ízületi belhártya a porc és az ízületet alkotó csont erózióját okozza és az ízület deformálódásához vezet (44). 1987 óta az American College of Rheumatology (ACR) által felállított alábbi kritériumok alapján állapítják meg az RA-t, ha legalább négy tünet jellemző a betegnél (45):

- reggeli merev ízületek, mely legalább egy óra hosszáig nem javul (legalább 6 hétig tartó állapot)
- az ízület körüli szövetek duzzadása legalább 3 ízület esetében (legalább 6 hétig tartó állapot)
- a proximális interphalangealis, metacarpophalangealis vagy csukló ízületek duzzanata (legalább 6 hétig tartó állapot)
- az ízületek szimmetrikus duzzanata (legalább 6 hétig tartó állapot)
- reumás csomók kialakulása
- reumafaktor (RF) jelenléte
- radiografikus felvételeken látható erózió és/vagy periartikuláris osteopenia a kéz és/vagy csukló ízületekben

Ezek a kritériumok a korai betegségre nem jellemzőek, ezért az ACR/EULAR (European League Against Rheumatism) új rendszert állított fel, melyben az ízületi érintettség mellett, a szerológiai eltérések - melyben az anti-citrullinált fehérje ellenanyag (ACPA) pozitivitás is fontos diagnosztikai tényező - és a gyulladásos paraméterek szerepelnek, amelyeket az 1. táblázatban foglaltam össze. Ha a pontszám eléri a hatos értéket, olyan betegeknél, akiknél előfordul legalább egy ízületben klinikailag meghatározott szinovitisz (duzzanat), illetve a szinovitisz nem magyarázható jobban más kórállapottal, akkor RA a diagnózis (1. táblázat) (46).

Izületi érintettség	Pontszám
1 nagyízület duzzanata	0
2-10 nagyízület duzzanata	1
1-3 kisízület duzzanata	2
4-10 kisízület duzzanata	3
>10 kisízület duzzanata	5
Szerológia	
RF és anti-CCP negatív	0
RF+/anti-CCP+	2
RF+/anti-CCP+ (magas titer, >3x)	3
Synovitis fennállása	
< 6 hét	0
≥ 6 hét	1
Akutfázis-reakció	
Normál CRP/normál vérsüllyedés	0
Emelkedett CRP/normál vérsüllyedés	1

1. táblázat. Az RA klasszifikációs kritériumai az ACR és az EULAR 2010-es ajánlása alapján (46).

A betegség prevalenciája 1%-ra tehető, és a betegek körülbelül 70%-a nő. Az RA előfordulhat különböző más megbetegedésekkel kapcsolatban, például a másodlagos Sjögren szindrómával, tüdőrákkal, osteoporózissal, szarkopéniával (47), intersticiális tüdőbetegséggel (48), valamint kardiovaszkuláris szindrómákkal együtt, mint az atherosclerosis, az artériák falának a megbetegedése, a sztrók, az anémia, vagy a vaszkulitisz (49-51). A gyulladás ízületeken kívül is előfordulhat, így reumatoid csomók jelenhetnek meg a bőrben, belső szervekben: tüdőben, szívben, erekben (52).

Az RA-s betegek mintegy 80%-nak szérumban 98%-os specificitással kimutathatóak olyan ellenanyagok (anti-citrullinált fehérje ellenanyagok, angol nyelvű rövidítése: ACPA), amelyek specifikusan kötődnek a citrullin tartalmú fehérje epitópokhoz, illetve azokhoz az epitóp peptidekhez, amelyek ilyen szekvenciával rendelkeznek (53). Az ACPA és a reumafaktor (RF) évekkel a betegség kialakulása előtt kimutathatóak (54, 55). A reumafaktor az IgG Fc részét felismerő ellenanyag, mely az immunkomplexek képződéséhez járul hozzá, és az RA-s betegek 60-86%-nál fordul elő, de kevésbé specifikus a betegségre (56, 57). E patofiziológiás relevanciával rendelkező ellenanyagok kimutatása az RA korai diagnosztizálásában alkalmazható (58). Az ACPA-pozitív betegeknél súlyosabb lefolyású a betegség. Az ACPA az autoantitestekre jellemzően alacsony aviditású, valamint Suwannalai és munkatársai kimutatták, hogy az alacsonyabb aviditás nagyobb mértékű ízületi károsodással járhat (59). A citrullináció a szervezetben egy fiziológiásan lejátszódó poszt-transzlációs módosulás, a citrullinált fehérjékkel szemben autoreaktív folyamatok indulhatnak be. RA-nál a perifériás tolerancia sérül és az immunrendszer gyulladós folyamatokkal reagál ezen fehérjék ellen, melyek legtöbbször módosult ízületi, csont- és porc szöveti fehérje. A citrullinált saját fehérjék nem eliminálhatóak a szervezetből, ezért krónikus gyulladás és szöveti destrukció lép fel, melyet csak folyamatos gyógyszeres kezeléssel lehet kordában tartani (53).

Az ACPA-pozitív RA kialakulásában a genetikai tényezők mellett a dohányzás, vagy egyéb irritációnak való kitettség játszhat szerepet, mint a légszennyezés, szilikonpor, vagy textilpor. A genetikai rizikófaktorok, a szerepet játszó MHC-II gének és a környezeti kitettség hatására a tüdőben alakulhatnak ki az első kóros immunfolyamatok. Az ízületi gyulladás pedig csak jóval később, egyéb, még nem ismert, vagy nem specifikus stimulusok (pl. fertőzés) hatására történik meg (60, 61). További összefüggéseket fedeztek fel a PTPN22 limfoid protein tirozin foszfatázt kódoló gének polimorfizmusa és az RA-ra (valamint SLE-re, 1-es típusú diabéteszre, szklerodermára, juvenilis artritiszre és artritisz pszoriaticára) való hajlam között (62). A PTPN22 620-as kodonjának mutációja a fehérje argininjének egy triptofánra történő szubsztitúcióját idézi elő (R620W), mely a B- és T- sejtek aktivációs küszöbének csökkenésével jár, és ezért megemelkedett számú autoreaktív sejt keletkezik (63, 64). A SE és a PTPN22 R620W allél együttes előfordulása 20-szorosára növeli az RA kialakulásának a kockázatát azokhoz képest, akik nem hordozzák ezeket az alléleket (63).

Egyéb genetikai hajlamósító tényezők az LTA-TNF-et (limfotoxin, tumornekrózis faktor) kódoló gén bizonyos haplotípusai (65), a peptidil-arginin deimináz (PADI4) polimorfizmus, amely enzim ellen termelt ellenanyagok aktiválják azt és így nő a citrullináció mértéke (60, 66), valamint szerepet játszhat még a CTLA-4, CD40 és a STAT4 polimorfizmusa is (67, 68).

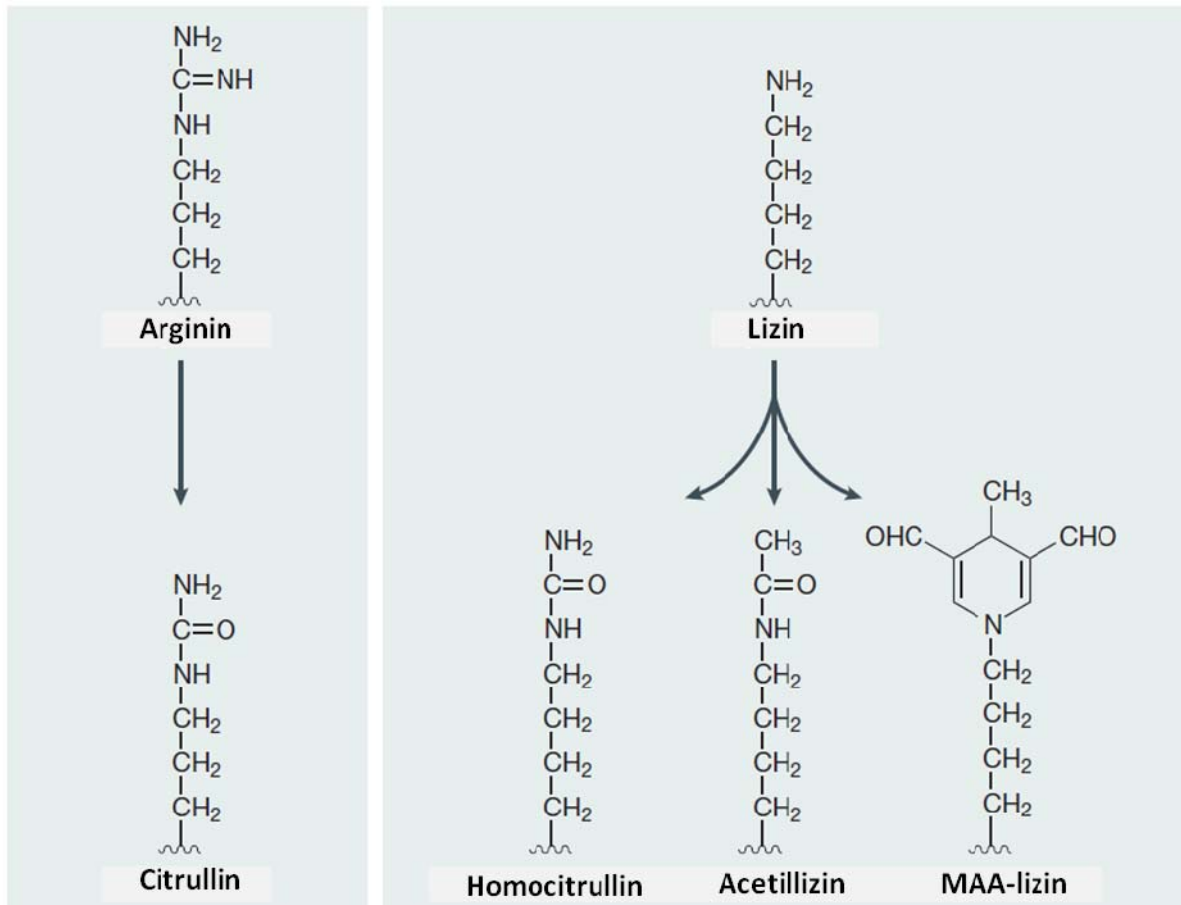
3.3. Egy poszt-transzlációs módosulás, a citrullináció mechanizmusa

A citrullináció során a peptidil-arginin deimináz enzimek (PAD) az arginint citrullinná alakítják, így egy bázikus aminosavból egy semleges töltésű aminosav keletkezik (4. ábra). Öt emberi PAD enzimet ismerünk, melyek közül a PAD2-nek és a PAD4-nek van leginkább szerepe RA-ban (69). Vossenar és munkacsoportja kimutatta, hogy a PAD enzimek aktívak lehetnek RA-s betegek szinoviális folyadékából izolált makrofágokban (70). Fiziológias körülmények között az intracelluláris PAD enzimek inaktívak, mert működésükhöz jóval magasabb kalcium-ion koncentrációra van szükségük, mint amekkora az intracelluláris térben jelen van. A gyulladásos környezetben gyakori sejtpusztulás hatására a sejtek elveszítik membrán integritásukat, ezért az extracelluláris térből beáramló Ca^{2+} -ionok aktiválják az enzimeket (69).

3.4. A poszt-transzlációs módosuláson átesett fehérjék ellen termelt autoellenanyagok [Anti-modified protein antibodies (AMPAs)]

Neinhuis és Mandema 1964-ben írták le a perinukleáris faktort az RA-s betegek szérumfehérjéjének mukóza epitél sejtekhez való kötődése alapján, amelyet fluoreszcensen jelölt anti-humán globulin segítségével, specifikus immunfluoreszcens festődés alapján mutattak ki (71). Young és kollégái 15 évvel később patkány nyelőcsőszöveten kaptak hasonló festődést, az autoellenanyagot anti-keratinnak nevezték el (72). Húsz év múlva Schellekens és munkacsoportja kimutatta, hogy az anti-perinukleáris faktor és az anti-keratin ugyanazt a fehérjét ismeri fel, a citrullinált filaggrint (73). Az RA-s betegek szinoviumában

megtalálható továbbá a citrullinált vimentin (74), a fibrin (75), a tenascin-C (76) és a kollagén (77), míg a filaggrin fehérje nem expresszálódik a színoviális membránban, a citrullinált filaggrint keresztreagáló ACPA ellenanyagok ismerik fel (75). Az ízületben előforduló citrullinált antigének a fibrinogén, a vimentin, a kettes típusú kollagén, az α -enoláz (78), vírus eredetű antigén pedig az Epstein-Barr vírus (EBV) citrullinált peptidje (VCP) (79).



4. ábra. Poszt-transzlációs módosulások az arginin és lizin aminosav oldalláncokon. A citrullináció (A) során a PAD enzim az arginint citrullinné alakítja, míg a karbamiláció során a mieloperoxidáz enzim alakítja át a lizint a citrullinhez szerkezetileg nagyon hasonló homocitrullinné. A lizin acetillizinné és MAA-lizinné (maldonaldehid-acetaldehid) is átalakítható (80).

3.5. A fibrin szerepe az artritiszben

A fibrin depozíció az ízületekben artritist okoz, de a folyamat pontos mechanizmusa nem ismert. Az ízületi duzzadás, a gyulladáshoz vezető reakciók hatására a plazmakomponensek, mint a fibrinogén és zimogének a gyulladáshoz vezető mediátorok hatására révén aktívvá válnak. Ez a fiziológiai folyamat része, míg patológiai esetben a fibrinrögök, fibrin lerakódások eltávolítása nem teljes, és a pannus kialakulásában játszanak szerepet. A gyulladáshoz vezető környezetben a fibrin rögök eltávolítása nem az általánosabb, plazmin-dependens úton történik, hanem az aktív mátrix metalloproteinázok (MMP) hatására. Így ily módon is keletkezhetnek neoepitópok, valamint a citrullináció révén is, amelyek autoantigén anyagok keletkezéséhez vezethetnek, tovább növelve az ízület károsításának mértékét (81).

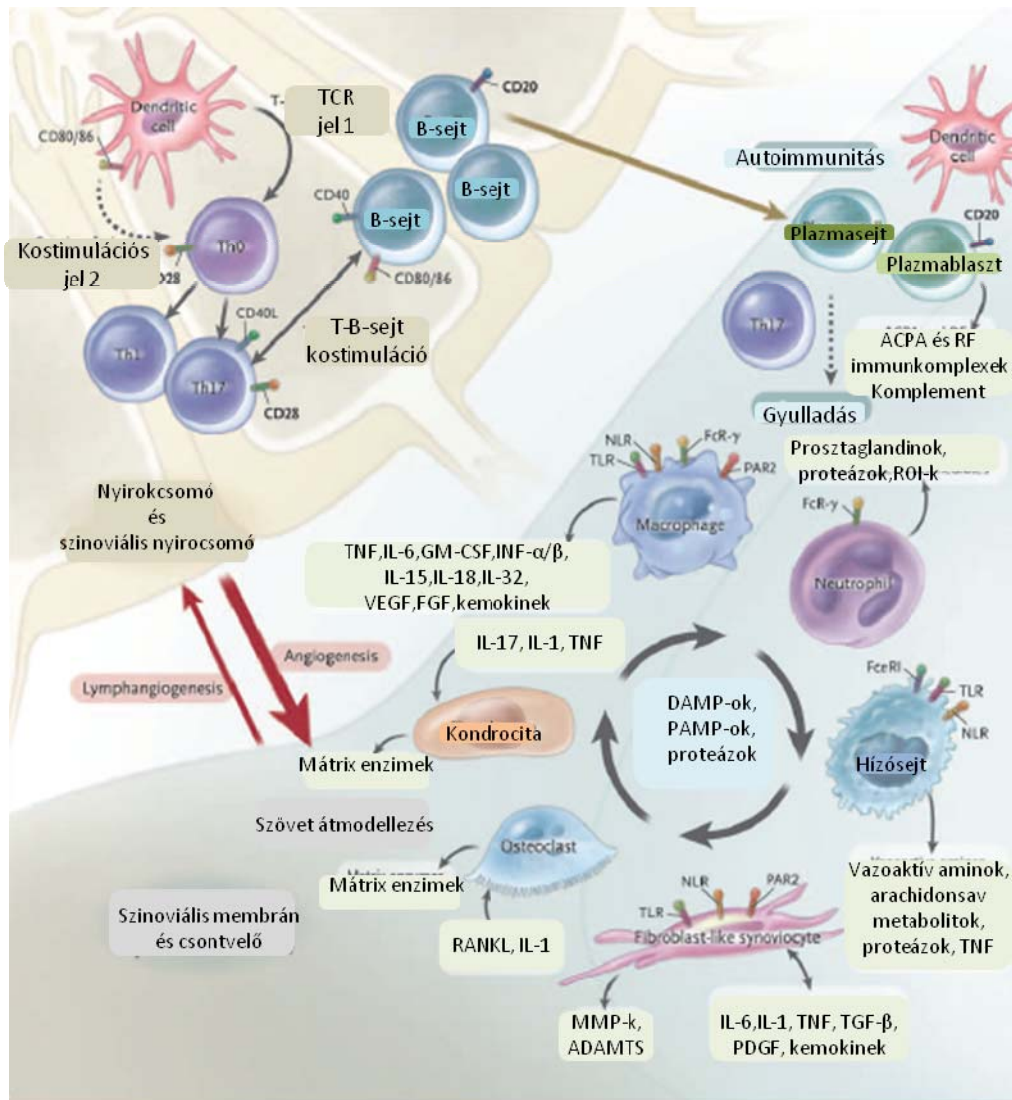
3.6. Az RA patomechanizmusa

Még évekkel az RA tüneteinek kialakulása előtt a dohányzásnak vagy egyéb irritáló, légszennyező körülményeknek való hosszabb ideig tartó kitettség gyulladáshoz vezető folyamatokat generálhat a tüdőben. Az inflammatorikus környezetben emelkedett sejtpusztulás következik be, ami a pusztuló monociták, makrofágok membránintegritásának összeomlásával jár. Ennek következtében a beáramló Ca^{2+} -ionok kedveznek a PAD enzim aktiválásának és így fokozott mértékű citrullináció lép fel (70, 82). Tovább növeli a kockázatot a citrullin-tartalmú peptideket bemutató HLA-DRB1 (shared epitope-ok, SE) kifejeződése, így a gyulladáshoz vezető környezetben megtörténik az autoreaktív T-sejtek aktivációja. A T-sejt aktiváció esélyét a PTPN22 mutációja tovább fokozza. Az antigénprezentáló sejtek (APC) bemutadják a naív T-sejteknek a citrullinált antigént. Az autoreaktív B-sejtek B-sejt receptorukkal felismerik a citrullinált fehérjéket, melyeket internalizálnak, processzálnak és bemutadják az antigént az aktivált T-sejteknek. A T-helper sejtek felszínén kifejeződő kostimulátor molekulák valamint a citokinek hatására a B-sejtek ACPA-termelő sejtekké differenciálódnak (60, 83-85) (5. ábra). A shared epitope P4-es zsebébe a semleges töltésű citrullin tökéletesen illeszkedik, míg a pozitív töltésű arginin nem (86). Ebből kifolyólag az SE allélekkel rendelkező APC több citrullinált epitópot is be tud mutatni, így alakulhat ki az

epitópok terjedése, melynek következménye az ACPA-k érése és a különböző specificitású ACPA pool kialakulása, valamint az ACPA titer növekedése (60) (6. ábra). A betegség kialakulása akár évekkal az ACPA megjelenése után is megtörténhet. Ehhez valószínűleg egy második jelsorozat szükséges, amely beindítja a krónikus gyulladási folyamatokat az ízületekben. Ez lehet egy sérülés, vagy egy ízületi gyulladás, bakteriális vagy vírusos fertőzés, amely esetben az immunrendszer a gyulladásos reakciókat nem képes megfelelően kontrollálni, és autoimmun folyamatok alakulhatnak ki (39).

A *Porphyromonas gingivalis* szájbaktérium, az ínygyulladás egyik kórokozója rendelkezik saját PAD enzimmel, és így hozzájárulhat a saját α -enolázának és a gazdaszervezet fehérjéinek citrullinációjához és autoantigének képződéséhez (87). A gyulladásos környezet beindítja a PAD enzim aktivációját és a fehérjék citrullinációját.

Egérmodellben kimutatták, hogy a citrullinált vimentin elleni ellenanyagok aktiválják az oszteoklasztokat, hozzájárulva így az oszteoporózis kialakulásához (88). Az ACPA NET-formáló (neutrophil extracellular traps, azaz extracelluláris csapda) képessége hozzájárulhat a neutrofilek aktiválásához és a gyulladás generálásához (89). Az RF kötődése az ACPA IgG Fc részéhez immunkomplex képződéssel és az immunkomplexek lerakódásával jár, amely folyamat a gyulladásért felelős immunsejteket a lerakódás helyére toborozva vaszkulitiszhez vezethet. A gyulladás során a szinoviális hártya proliferációja érképződéssel, majd immunsejtek infiltrálásával jár: a makrofágok a citrullinációt fokozzák, a DC-k az ízületi specifikus citrullinált fehérjéket felveszik, a nyirokcsomóban bemutatják a T-sejteknek, így hozzájárulva az epitóp terjedéshez (84, 90). Amara és munkacsoportja kimutatta, hogy az ízületekbe beszűrődött és onnan izolált IgG⁺ B-sejtek mintegy 25% ACPA-termelő B-sejt (91).



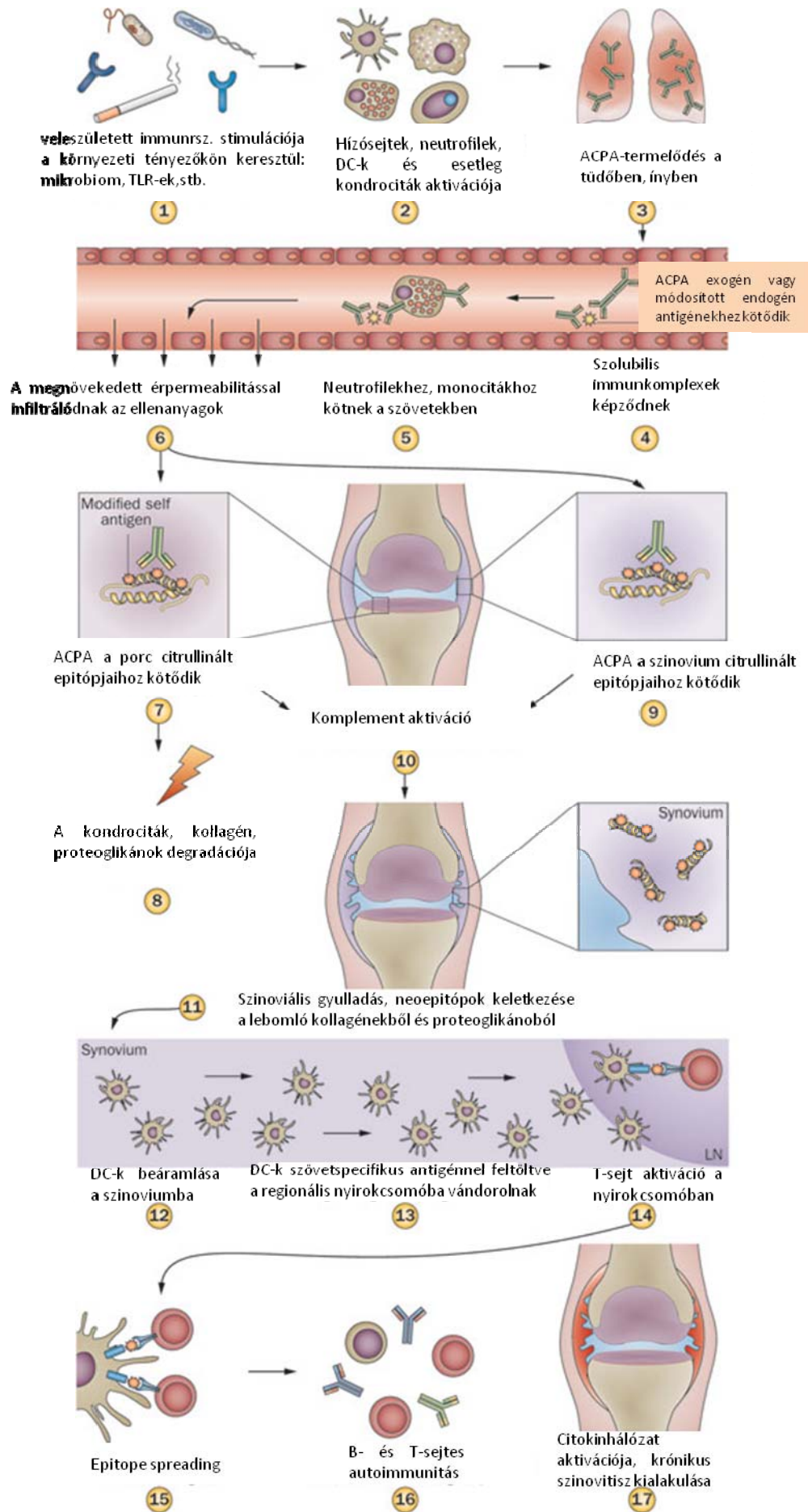
5. ábra. Az ízületekben lejátszódó veleszületett és adaptív immunfolyamatok RA-ban. A kostimulációfüggő kölcsönhatások a DC-k, T-sejtek és B-sejtek között elsődlegesen a nyirokcsomókban játszódnak le. Ezek az események generálják az autoimmun folyamatokat a citrullin-tartalmú saját fehérjék ellen. A szinoviális membránban az adaptív és a veleszületett immunfolyamatok együttesen alakítják ki a szövetkárosodást. A pozitív visszacsatolásban, - amely a krónikus folyamatok kialakításáért felelősek-, részt vesznek mind a leukociták, a szinoviális fibroblasztok, a kondrociták és az oszteoklasztok. Rövidítések: ADAMTS: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs, DAMP: damage-associated molecular pattern, FGF: fibroblast growth factor, GM-CSF: granulocyte–macrophage colony-stimulating factor, MMP: matrix metalloproteinase, NLR: nucleotide-binding oligomerization domain–like receptor, PAMP pathogen-associated molecular pattern, PAR2: protease-activated receptor 2, PDGF platelet-derived growth factor, RANKL receptor activator of nuclear factor κ B ligand, TGF- β transforming growth factor β , TLR: toll-like receptor, VEGF: vascular endothelial growth factor (38).

Az ízületek pusztításáért a fibroblaszt-szerű szinoviociták és a makrofágok az elsődleges felelősök. Pro-inflammatorikus citokintermelésük, mint a TNF, IL-1, IL-6, IL-8 és GM-CSF (granulocita-monocita kolónia stimuláló faktor), a makrofágokat, a fibroblasztokat, és az

oszteoklasztokat stimulálják. További pro-inflammatorikus mediátorok a prosztaglandinok, a leukotriének, amelyek növelik az érpermeabilitást és kemotaktikus ágensek. A reaktív oxigén gyökök, destruktív proteázok, mátrix metalloproteinázok és kollagenázok a porc kollagén mátrixának a lebontásáért felelősek. A szöveti destrukcióhoz az aktív állapotú és nagy számban jelenlevő neutrofilek és kondrociták is hozzájárulnak.

A gyulladásért felelős legfontosabb citokinek a TNF, az IL-1 és az IL-6, melyek autokrin, parakrin és endokrin hatásaik révén a betegség szisztémás kialakulásáért felelősek. Hatással vannak más gyulladási citokinek és mediátorok szintézisére, az adhézións molekulák kifejeződésének növekedésére, az oszteoklasztok aktiválására, az akut fázis reakciókra, valamint a szisztémás folyamatokra, mint a láz, fáradtság, és a B-sejtek aktivációja (92, 93).

Egyéb, a betegség patomechanizmusában szerepet játszó citokinek az IL-15, amely a T-sejt proliferációért felelős, az oszteoklasztokat aktiváló IL-17 és az IL-23, mely a T_H -17 sejtpopuláció differenciálódásáért felelős. A T_H -17 sejtek a regulátor T-sejteket gátló TNF-et és a szinergista hatású IL-17A-t, valamint IL-17F-et, IL-21-et és IL-22 citokineket termelnek. Az IL-21 a T_H -17 sejteket aktiválja és a regulátor T-sejteket gátolja, valamint a B-sejtek plazmablaszttáérését is elősegíti (94, 95). Az IL-22 a kórokozókkal szembeni védelemben kulcsfontosságú citokin, de RA-ban oszteoklasztogenezist is indukál, melynek a csontállomány eltávolításában van szerepe (96, 97) (5. ábra).



6. ábra. Az RA kialakulásának egy feltételezett mechanizmusa. A különféle gyulladási folyamatok hatásai kumulálódnak és elérnek egy határt, mely után a klinikai kórképek alakulnak ki. 1) A veleszületett immunrendszer többszöri stimulációja a mieloid sejtek és feltehetően a kondrociták aktivációjához vezet (2). 3) Helyi gyulladás alakul ki a mukózával határolt szervek mentén, amely ACPA termeléshez vezet. 4) Az ACPA az exogén- vagy módosított endogén antigénekhez kötődik, ami keringésben megjelenő immunkomplexek képződését váltja ki, amelyek kapcsolatba kerülnek a szinoviális keringésben és szövetben jelenlévő mieloid sejtekkel (5). 6) A megnövekedett érpermeabilitás az autoellenanyagoknak az ízületekbe történő diffúziójával jár. 7) Az ACPA a porc specifikus citrullinált epitópjaihoz kötődik, ami a szövet károsodását vonja maga után (8). 9) Az ACPA a szinovium citrullinált epitópjaihoz is kötődhet, és a klasszikus és alternatív komplementaktivációs útvonalat is aktiválhatja (10). 11) A szinoviális gyulladás a szöveti makrofágok infiltrációjával további citrullinációhoz vezet, valamint a szerkezeti fehérjék enzimatis és oxidatív destrukciójával és neopitópok keletkezésével jár. 12) Az ízület-specifikus saját antigénnel feltöltött DC-k jelennek meg a szinoviumban és a módosított saját peptidok feldolgozása után a környéki nyirokcsomóba vándorolnak (13), ahol a T-sejtek aktivációja történik meg (14). 15) Az epitóp kiterjedés hatására kialakul az autoimmunitás a saját epitópokkal szemben (16). 17) A citokin hálózat aktiválódása eredményeként krónikus szinovitisz alakul ki (90).

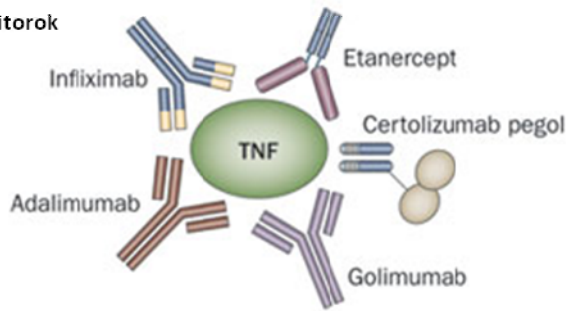
3.7. Kezelési stratégiák alkalmazása RA-ban szenvedő betegeknél

Az RA kezelésében a gyógyszereket négyféle kategóriába sorolhatjuk: a nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs), a glükokortikoidok, és a betegség lefolyását módosító szerek (DMARD, disease-modifying anti-rheumatic drugs), melyek lehetnek biológiai és nem biológiai szerek.

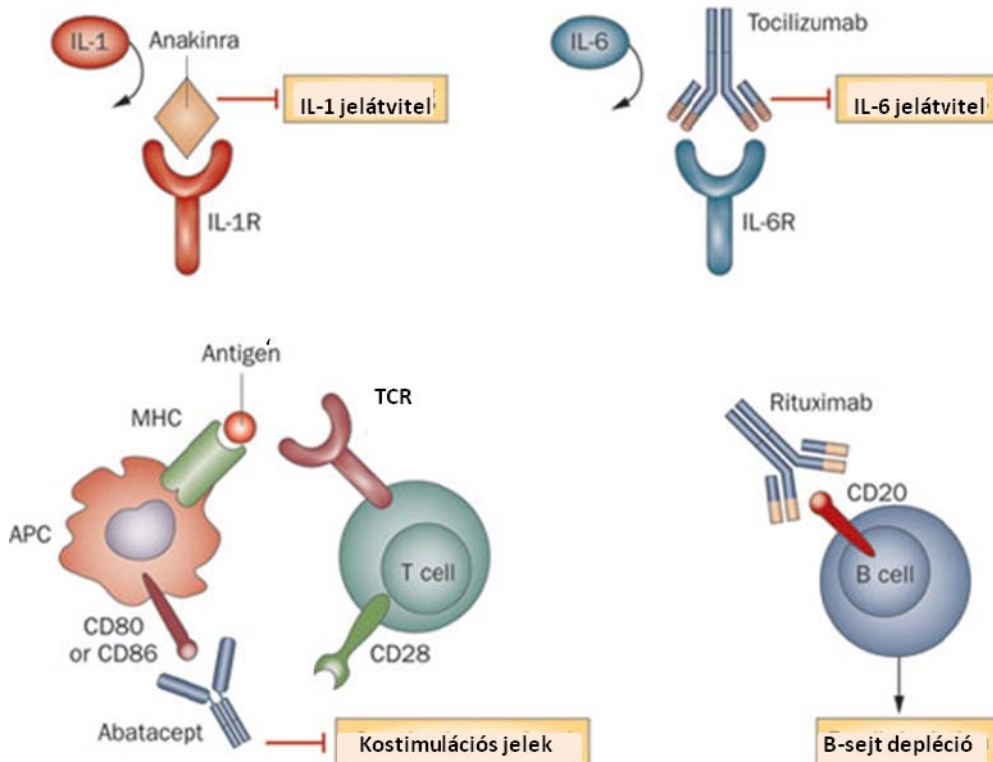
A nem-szteroid gyulladásgátlókat és a glükokortikoidokat alkalmazzák azonnali gyulladáscsökkentő kezelésként, amíg a lassabban ható DMARD-ok elkezdenek hatni.

Az egyik leggyakrabban használt és leggyorsabban ható (4-6 hét) nem biológiai DMARD a metotrexát (MTX), egy sejtciklus-gátló folát-analóg, mely hatóanyagot már 1948-ban is használták a gyermekkori leukémia kezelésére (98). Az első folát-antagonista szert, az aminopterint módosították a könnyebben előállítható metotrexáttá, és a 60-as évek óta alkalmazzák az RA gyógyításában (99). A MTX nagy hatékonysága abban rejlik, hogy a sejtciklus gátlása mellett az immunszuppresszió cAMP feldúsulásával jár, valamint az apoptózisra is érzékenyít (100).

TNF inhibitorok



Egyéb biológiai ágensek

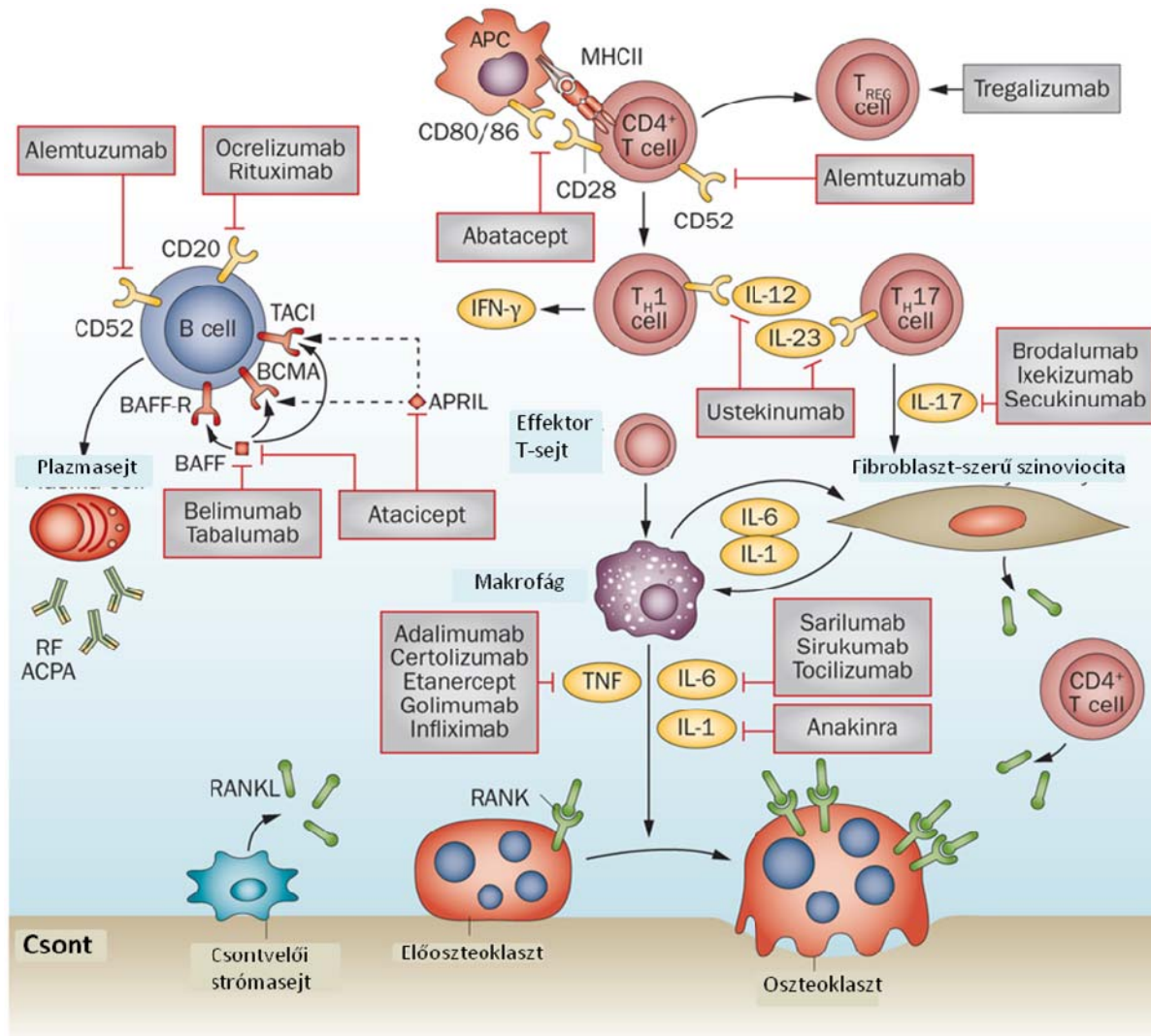


4. ábra. A biológiai terápiák során alkalmazott ágensek Reumatoid Arthritisben. A TNF inhibitorok között humán monoklonális ellenanyagok az adalimumab és a golimumab, az infliximab egy IgG1 kiméra ellenanyag, az etanercept egy TNF receptor-Fc rész fúziós fehérje, a certolizumab pegol pedig egy pegilált humanizált Fab' fragmentum. Más fehérjéket célzó szerek pl az IL-1 receptor antagonistá anakinra, a CTLA-4-Fc fúziós fehérje abatacept, mely a T-sejt kostimulációs útvonalakat gátolja, a humanizált, IL-6 receptort célzó ellenanyag, a tocilizumab és a B-sejteket depletáló, monoklonális anti-CD20 kiméra ellenanyag, a rituximab (101).

Az elmúlt évtizedben a biológiai terápiák forradalmasították az RA kezelést. 1998-ban alkalmaztak RA-ban először biologikumot, az Etanerceptet, mely egy humanizált TNF antagonistá (102-104). RA kezelésére alkalmazzák még az abataceptet, mely egy IgG és a kostimulációs útvonal gátlását előidéző CTLA-4 fehérje fúziójából jött létre, és mintegy tíz éve a B-sejt depléciós terápiát is (7. ábra) (101). A Rituximab terápia CCP-pozitív betegeknél sikeresebb, de a CD20-negatív hosszú életű plazmasejtekre nincs hatással. Rituximab hatására

a szérumban a totál IgG szintje nem, de az ACPA szintje csökken, ami a rövidéletű plazmasejtek eliminálására utal (8. ábra) (105).

A biológiai terápiás kezelések jelentős mellékhatásokkal is járhatnak, valamint a fertőzésekre fogékonyabbak lesznek a betegek (101).



5. ábra. Az elérhető és lehetséges jövőbeni biológiai terápiák és célpontjaik RA-ban és egyéb reumatikus betegségekben. Rövidítés: ACPA: anti-citrullinated peptide antibody (anti-citrullinált fehérje/peptid antitestek); APC: antigen-presenting cell (antigén bemutató sejt); APRIL: a proliferation-inducing ligand (proliferáció indukáló ligandum); BAFF: B-cell activating factor (B-sejt aktiváló faktor); BAFFR: BAFF receptor; BCMA: B-cell maturation protein (B-sejt érést elősegítő fehérje); RANK: receptor activator of nuclear factor κ B (receptoraktivátor nukleáris faktor κ B); RF: reumafaktor; TACI: transmembrane activator and CAML interactor (Transzmembrán aktivátor és. CAML interaktor) (106).

4. Célkitűzéseim

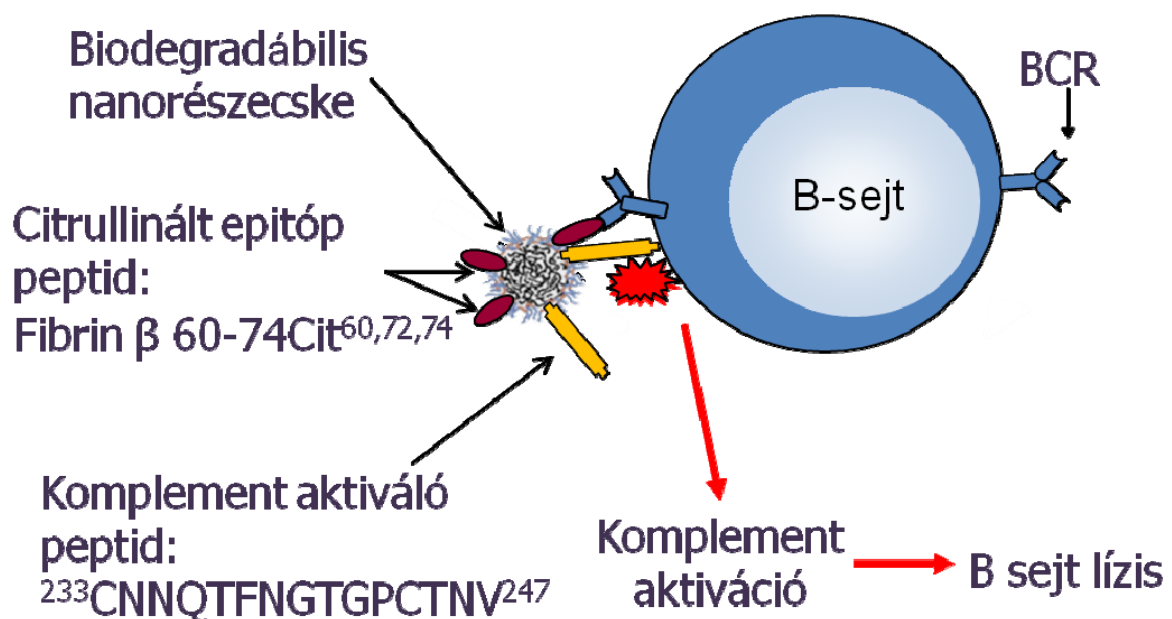
Doktori munkám célja a reumatoid arthritiszben betegek autoreaktív B-sejtjeinek szelektív elpusztítására alkalmas módszer kidolgozása, amely a szervezetet károsító, és a gyulladásos folyamatokat kiváltó ACPA-k termelését csökkenti. Célunk olyan kétfunkciós peptidkonstrukciók létrehozása volt, amelyek egyrészt kötődnek a peptideket felismerő B-sejtek receptoraihoz, másrészt olyan effektor funkciókat aktiválnak, amelyek elpusztítják a peptideket felismerő sejteket.

Elképzeléseink szerint a peptidkonstrukcióban az egyik peptidet (autoantigén epitóp) felismerik azok a sejtek, amelyek a későbbiek során a kóros ellenanyagokat termelik, míg a második peptid az autoantigén epitópot megkötő sejt feloldódását (komplement által közvetített lízisét), vagy falósejtek általi bekebelezését váltja ki. Tehát mind az irányítás, mind a funkció kiváltása szintetikus peptidek segítségével történik. Ezek általában rövid szekvenciák (10-20 aminosav), amelyek szintézise, tisztaságellenőrzése költséghatékony módon megvalósítható. Komplementaktiváló peptidet tudomásunk szerint nem alkalmaztak eddig irányított sejtpusztításra.

Egy peptidekből álló bifunkcionális konstrukció azonban önmagában nem lehet alkalmas effektor funkciók aktiválására, mivel ennek előfeltétele a molekula- illetve receptor komplexek létrejötte. Immunkomplexek kialakulása, illetve az Fc γ receptorok klaszteresedése szükséges a komplement közvetített sejtlyízis, vagy az Fc γ R függő fagocitózis kialakulásához. Ezért szükséges valamilyen keresztkötő ágens, vagy nanopartikulum alkalmazása, amelyhez hozzákapcsolhatjuk a peptideket. A 9-ik ábrán bemutatott modell szerint képzeljük el működésüket. A lényege, hogy a B-sejt epitóp peptideket nanogyöngyök segítségével összekapcsoljuk olyan peptidekkel, amelyek az adott sejt elpusztításáért felelős effektor mechanizmusokat aktiválják (komplement rendszer, vagy a fagocitózis aktiválása). A peptiddel fedett biodegradálható nanopartikulumok szerepük betöltése után kiürülnek a szervezetből. További előny, hogy az autoantigén epitóp peptidek nagy specificitást mutatnak,

így a bifunkcionális konstrukciók az azokat meg nem kötő sejteket nem, csupán az epitóp peptideket felismerő, kóros sejteket pusztítják el.

Munkámat hazai és nemzetközi kollaborációk támogatásával valósítottam meg. A peptideket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban Prof. Hudecz Ferenc és Dr. Magyar Anna irányításával szintetizálták, a biodegradabilis nanopartikulumokat az ELTE Kémiai Intézetében a Határfelületi és Nanoszerkezetek Laboratóriumában Prof. Kiss Éva irányításával Dr. Gyulai Gergő állította elő.



6. ábra. A modell: PLGA nanorészecskére kötött autoepitóp peptid kapcsolódik a BCR-rel, és az effektor peptid elpusztítja a B-sejtet.

A modellben szereplő konstrukció létrehozása előtt szükséges volt a peptidek alkalmasságának vizsgálata, illetve optimalizálása az effektor funkciók kiváltása szempontjából.

Ennek során célkitűzéseink a következők voltak:

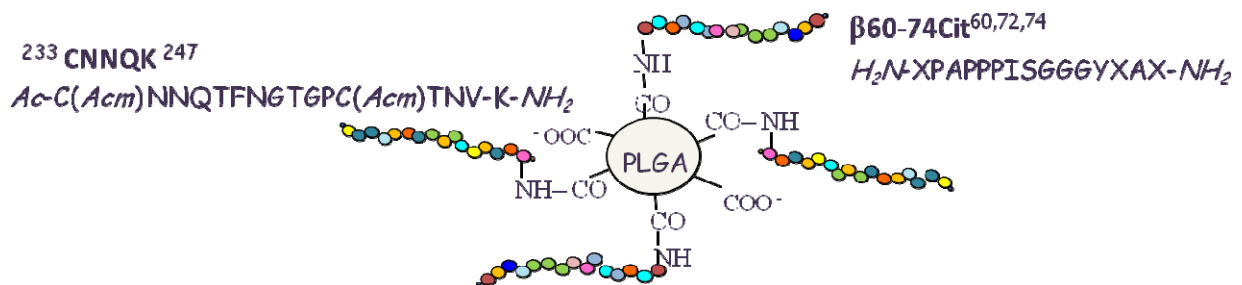
- 1) Az **epitóp peptidek** az RA patogenezise során kimutatottan szerepet játszó citrullinált fehérjék citrullin tartalmú szekvencia részleteinek felelnek meg, amelyeket a beteg szérumban jelenlévő autoantitestek (ACPA-k) felismernek. Francia kollaborációs partnereink (Prof. Guy Serre munkacsoportja, University of Toulouse, Hospital Purpan, Toulouse, Franciaország) a citrullinált fibrin β 60-74 epitópot találták az ACPA-k fő célpontjának (107, 108). Első célkitűzésünk az epitóp peptid jellemzése volt, annak meghatározása, hogy a citrullinált fibrin β 60-74 peptidet a Budai Irgalmasrendi Kórház által rendelkezésünkre bocsátott RA beteg kohort szérumban ellenanyagai, - összehasonlítva egészségesek szérummintáival - milyen szenzitivitással és specificitással ismerik fel. Továbbá, annak vizsgálatát terveztük, hogy alkalmas-e a peptid az autoreaktív B-sejtek kimutatására, s végül, hogy a betegekből kinyert, *in vitro* rendszerben stimulált limfociták képesek-e az epitóp peptidre specifikus ellenanyagot termelni.

- 2) Az irányított fagocitózis vizsgálatához olyan **Fc γ receptorokhoz kötődő peptideket** terveztünk alkalmazni, amelyek a falósejteken kifejeződő Fc γ RIIa-hoz, vagy Fc γ RI-hez kötődnek. A peptideket először sejtvonalon karakterizáljuk, majd a fagocitózist aktiváló hatásukat primer monocitákon is vizsgáljuk.

- 3) Egy másik effektor mechanizmust kiváltó peptid, a HIV-1 gp120 burokfehérjéből származó korábban leírt, **komplementrendszert aktiváló peptid**, mely aktiválja a klasszikus útvonalat anti-gp120 ellenanyagok hiányában (109). Célunk az ismert szekvencia optimalizálása az adott funkció kiváltásához. A komplement rendszernek számos szabályozó fehérjéje van, védve a szervezet sejtjeit a spontán lízistől. Az autoreaktív sejteket elpusztító mechanizmus optimalizálása érdekében a negatívan szabályozó H-faktor fehérje kiiktatását tervezzük.

- 4) **Multimer peptidkonstrukciók létrehozása:**
 - a) a peptideket avidinnel fedett fluoreszcens mikrogyöngyökre kapcsolásával

b) a peptidek biodegradabilis nanopartikulumra kötésével: majdani *in vivo* alkalmazás során biológiailag lebomló nanorészecskék alkalmazására van szükség. Erre alkalmas a Poly(lactic-co-glycolic acid) (poli tejsav-glikolsav, PLGA) nanopolimer, amely nem toxikus, nem reagál az élő szervezet szöveteivel, sejtjeivel és felszínére nagy sűrűségben lehet molekulákat felkötni (110). A politejsav (hidroxikarbonsav poliésztere), olyan monomerekből épül fel, amelyek metabolizálhatóak a testben. A degradációkor hidroxisav képződik, ami biztonságossá teszi a polimer *in vivo* használatát (111, 112). A gyöngyök belsejét fluorescens festékkel töltjük fel, ami láthatóvá teszi a gyöngyöket megkötő sejteket *in vitro* kísérleteinkben (10. ábra).



7. ábra. A PLGA nanopartikulum felszínére kovalensen felkötött autoepitóp és effektor peptid.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Betegadatok

Beszereztük az Egészségügyi Minisztériumtól vizsgálatainkhoz a szükséges etikai engedélyt, amelynek alapján megkezdtük a vér- és szérumminták gyűjtését RA betegektől és egészséges donoroktól írásos beleegyező nyilatkozataik után a Budai Irgalmasrendi Kórház több orvosa bevonásával. A sejtes kísérletekhez vért adó betegek összesített adatait a 2. táblázat mutatja. A szérumok vizsgálatában 170 RA-s beteg vett részt és 138 egészséges véradó.

	Nem	Kor (év)	Betegség időtartam (év)	CRP (mg/l)	RF (IU/ml)	ACPA (IU/ml)	DAS28	ESR (mm/h)	Kezelés	β60-74Cit OD index
Páciens 1	Nő	54	5	8,10	264,0	1841	4,99	15	Sal, Afl, Lefl	10,26
Páciens 2	Nő	55	6	8,20	265,0	1971	4,10	16	Sal, Afl, Lefl	11,26
Páciens 3	Nő	78	9	1,84	16,2	2410	3,70	10	MTX	15,26
Páciens 4	Nő	82	12	2,10	10,9	Neg.	5,05	47	MTX, Med	4,89
Páciens 5	Nő	62	8	0,41	293,6	2403	2,17	21	Trexan	5,94
Páciens 6	Férfi	45	6	0,70	47,0	3200	0,63	2	Del, Trexan	7,74
Páciens 7	Nő	52	4	3,10	264,1	3200	4,09	29	MTX, Med	6,59
Páciens 8	Nő	71	7	2,30	15,0	1759	2,83	19	MTX, Med	7,41
Páciens 9	Nő	39	6	0,50	96,2	3073	2,06	3	MTX	14,81
Páciens 10	Nő	45	3	1,90	394,5	295	1,10	3	MTX, Med	9,97
Páciens 11	Nő	43	3	2,50	10,3	952	1,05	6	Imuran, Metoject	7,65
Páciens 12	Férfi	75	12	37,80	51,5	3200	2,50	4	Med, MTX	6,55
Páciens 13	Férfi	74	19	0,14	360,9	2403	0,84	5	Roactemrat	13,80
Páciens 14	Nő	45	5	4,64	74,4	2991	4,01	9	Medrol, Trexan	20,97
Páciens 15	Nő	64	7	3,10	15,6	951	2,22	13	Lefl, Med	3,58
Páciens 16	Nő	63	5	6,70	673,0	964	2,10	20	Sal, Metoject	9,56
Páciens 17	Férfi	70	9	9,30	25,0	3200	2,63	5	MTX, Sal, Med	14,35
Páciens 18	Nő	76	24	19,70	225,0	2132	7,97	42	Med, MTX	8,31
Páciens 19	Nő	41	1	2,30	129,0	765	3,41	4	Med	6,98
Páciens 20	Nő	60	9	57,86	65,3	349	5,39	97	Med, Nebivolol	6,35

2. táblázat. Az RA betegek demográfiai és klinikai adatai, amelyek vérből izolált sejteken vizsgáltuk a bispecifikus nanopartikulumok hatékonyságát. *ACPA* anti-citrullinated protein antibodies, *Afl* aflamin, *CRP* C-reactive protein, *DAS28* Disease Activity Score of 28 joints, *Del* delagil, *ESR* erythrocyte sedimentation rate, *Lefl* leflunomid, *Med* medrol, *MTX* methotrexate, *RF* reumafaktor, *Sal* salazopyrin

5.2. Peptidszintézis

A peptideket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai szintetizálták, tisztították, és amelyik esetben ez szükséges volt, hosszú-láncú biotinhoz kapcsolták (3. táblázat).

Epitóp	Szekvencia	Hivatkozás
FcγRI peptid	Ac-AQVNSC(Acm)LLLPNLLGC(Acm)GDDK(biotin-6-aminohexanoil)-NH ₂	Bonetto (113)
FcγRI peptid	ADGA(CLRSGRGC)cikloGAAK(biotin-6-aminohexanoil)-NH ₂	Berntzen (114)
FcγRII peptid	biotin-6-aminohexanoil- ²⁵⁵ RTP EVT C(Acm)VVVDVSHEDP ²⁷¹ -NH ₂	Medgyesi (115)
FcγRIIa peptid	WAWVWL TETAVK(biotin-6-aminohexanoil)-NH ₂	Berntzen (116)
CNN ₂₃₃₋₂₅₁ (CNN/Süsal)	Ac- ²³³ C(Acm)NNKTFNGTGPC(Acm)TNVSTVQ ²⁵¹ -NH ₂	Süsal (109)
CNN ₂₃₃₋₂₄₉ (CNN1)	Ac- ²³³ C(Acm)NNKTFNGTGPC(Acm)TNVST ²⁴⁹ -NH ₂	
CNN ₂₃₃₋₂₄₇ (CNN2)	Ac- ²³³ C(Acm)NNKTFNGTGPC(Acm)TNV ²⁴⁷ -NH ₂	
CNNQ ₂₃₃₋₂₄₇	Ac- ²³³ C(Acm)NNQTFNGTGPC(Acm)TNV ²⁴⁷ -NH ₂	
CNNK ₂₃₃₋₂₄₇	Ac- ²³³ C(Acm)NNKTFNGTGPC(Acm)TNV ²⁴⁷ -K-NH ₂	
CNNQK ₂₃₃₋₂₄₇	Ac- ²³³ C(Acm)NNQTFNGTGPC(Acm)TNV ²⁴⁷ -K-NH ₂	
CNN ₂₃₃₋₂₄₅ (CNN3)	Ac- ²³³ C(Acm)NNKTFNGTGPC(Acm)T ²⁴⁵ -NH ₂	
Citrullinált fibrin β 60-74	biotin-6-aminohexanoil-XPAPPPISGGGYXAX-NH ₂	Cornillet (107)
Fibrin β 60-74	biotin-6-aminohexanoil-RPAPPPISGGGYRAR-NH ₂	Cornillet (107)
Citrullinált fibrin β 60-74	Ac-XPAPPPISGGGYXAXK(biotin-6-aminohexanoil)-NH ₂	
Fibrin β 60-74	Ac-RPAPPPISGGGYRARK(biotin-6-aminohexanoil)-NH ₂	
Citrullinált fibrin α 36-50	Ac-GPXVVEXHQSAC(Acm)KDSK(biotin-6-aminohexanoil)-NH ₂	Cornillet (107)
Fibrin α 36-50	Ac-GPRVVERHQSAC(Acm)KDSK(biotin-6-aminohexanoil)-NH ₂	Cornillet (107)

3. táblázat. A kísérleteim során alkalmazott peptidek. Az Fcγ receptorhoz kötődő peptideket a fagocitózis kísérletekben vizsgáltam. A komplement aktiváló peptidek (CNN) közül kiválasztottam a legalkalmasabbat, melyet a nanopartikulumokhoz kapcsolunk. Vizsgáltam továbbá a fibrin α és β lánc epitópjainak megfelelő peptideket is.

Célunk olyan peptid epitóp származékok szintézise volt, melyek alkalmasak a felületükön karboxyl (-COOH) vagy amino (-NH₂) csoportot tartalmazó PLGA nanorészecskékhez történő kapcsolásra. Amennyiben a szekvencia nem tartalmaz lizint – a peptid szekvenciáját C-terminálison egy Lys-nel hosszabbították meg, annak oldalláncán lévő ε-NH₂ csoportot felhasználva a nanopartikulum felületén lévő -COOH csoporttal történő kapcsolásra. A második esetben a peptid analóg C-terminálisán található karboxil csoportján keresztül történik a kapcsolás. Minden esetben az peptidek N-terminálisát acetil csoporttal védtük.

A peptidek szintézisét szilárd fázisú peptidszintézissel végezték, Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoporttal együttműködve. Szilárd hordozóként Rink Amid Chem Matrix gyantát ill. Cl-tritil gyantát használtunk. A peptideket SYRO (MultiSyntech) automata peptidszintetizátor alkalmazásával állítottuk elő.

A peptidek tisztaságának ellenőrzésére analitikai RP-HPLC-t alkalmaztunk (KNAUER készülék, Phenomenex Luna, C18, 250 x 4mm, 5mm szilika, 100 Å oszlop). Az elválasztáshoz lineáris gradiens elúciót alkalmaztunk. Az elválasztásokat szobahőmérsékleten végeztük, a folyási sebesség 1 ml/perc volt. A detektálás abszorbancia mérésével történt.

A peptidek jellemzésére tömegspektrometriás méréseket (Bruker Esquire 3000+ típusú ioncsapdás tömegspektrométer készülék) és aminosav analízist alkalmaztunk.

5.3. A szérumok és vér gyűjtése

A szérumokat 4 ml-s Vacuette natív csőbe (454204, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Ausztria) vetettük le, majd 1 óráig szobahőmérsékleten való inkubálás után 1 óráig jégre tettük, majd centrifugáltuk 4 °C-on, 15 percig 2000 g-n. A felülúszót a porciózás után -80°C-on tároltuk.

A sejtszeparáláshoz 9 ml-es Vacuette lítium-heparinos véralvadásgátlót tartalmazó csöveket (455084, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Ausztria) használtunk, összesen 30-35 ml-vérből izoláltunk PBMC-t (peripheral blood mononuclear cell, perifériás vér mononukleáris sejtei) vagy B-sejteket.

5.4. PBMC izolálás vérből

A vért kétszeresére hígítottuk steril 2% FCS-PBS-sel (fetális borjú szérum - phosphate buffered saline, Gibco, Waltham, Massachusetts). 30 ml vér alá 15 ml szobahőmérsékletű steril fikollt (17-1440-03, GE Healthcare, Chicago, Illinois) rétegeztünk egy pipettor segítségével. A centrifugálás 930 g-n történt 20 percig, szobahőmérsékleten és a leállítás a centrifuga fékjének kikapcsolásával történt.

A PBMC-t leszívtuk a fikoll és a plazma közötti határrétegről, majd 2x megmostuk steril 2% FCS-PBS-ben 324 g-n (1300 rpm) 10 percig és a vérlemezkék eltávolításához 15 percig fugalunk 200 g-n 4 °C-on. Ezt követően a sejteket megszámloltuk.

5.5. Mágneses B-sejt szeparálás negatív szelekcióval (130-091-151, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország)

A PBMC izolálást követően a sejteket steril MACS pufferben [0,5 % BSA (sc-2323, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), 2 mM EDTA PBS-ben] vettük fel, majd 100 µl ellenanyag koktélt adtunk 10^8 sejthez, mely a B-sejteket kivéve minden más sejtet megjelöl, és 10 percig inkubáltuk 4 °C-on. Ezután 200 µl anti-biotin mikrogöngyöt adtunk 10^8 sejthez és 10 percig inkubáltuk 4 °C-on, majd megmostuk 15 ml MACS pufferrel 324 g-n 10 percig 4 °C-on. Az LS oszlopot a mágnesen 2 ml MACS pufferrel nedvesítettük, majd a sejtuszpenziót az oszlopra rétegeztük. Mostuk az oszlopot 3x1 ml MACS pufferrel, majd az átfolyót összegyűjtöttük, lefugáltuk (324 g-n 10 percig 4 °C-on) és megszámloltuk a B-sejteket. A B-sejt tisztaságot minden alkalommal ellenőriztük: fikoeritrinnel konjugált anti-CD19 ellenanyaggal (21260194 ImmunoTools, Friesoythe, Németország) jelöltük a sejteket és áramlási citofluorimetriával lemértük. A B-sejt tisztaság minimum 90 % fölötti volt.

5.6. Mágneses monocita szeparálás pozitív szelekcióval (130-050-201, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország)

A sejteket felvettük MACS pufferben, majd 20 µl CD14 mikroyöngyöt adtunk 10^7 sejthez, és 15 percig inkubáltuk 4 °C-on. A mosás 15 ml MACS pufferben történt 324 g-n 10 percig 4 °C-on. Az LS szeparáló oszlopot úgy készítettük elő, hogy a mágneshez illesztettük, majd nedvesítettük 2 ml MACS pufferrel. A sejt üledéket felvettük 500 µl MACS pufferben, majd az oszlopon áteresztettük. Ezután következett az oszlop mosása 3x3 ml MACS pufferrel, majd levettük az oszlopot a mágnesről és 5 ml sejtmediumban eluáltuk a sejteket és megszámloltuk. A monocita tisztaság 95% fölötti volt: FITC-el konjugált anti-CD14 ellenanyaggal (212620143, ImmunoTools, Friesoythe; Németország) jelöltük a sejteket és áramlási citofluorimetriával lemértük.

5.7. A citrullin tartalmú fibrin β60-74 peptidre specifikus ellenanyagok kimutatása szérumból indirekt ELISA módszerrel

A 96 lyukú ELISA mikrotitráló lemezeket (655001, Greiner bio-one, Kremsmuenster, Ausztria) fedtünk 5 µg/ml β60-74Cit és β60-74Arg peptidekkel és 4 °C-n inkubáltuk egy éjszakán át. Ötszöri mosás (0,05 % Tween 20 / PBS) után a lemezeket fél óráig, 37 °C-on blokkoltuk 200 µl/lyuk blokkoló oldattal (2 % BSA / 150 mM NaCl / PBS). A szérumokat 100x hígításban vittük fel a lemezre (100 µl/lyuk, 2% BSA / 2 M NaCl / PBS-ben oldva), majd 4 °C-on, rázatva inkubáltuk egy éjszakán át. Ötszöri mosást követően, a lemezt nyúl anti-humán IgG-HRPO (6140-05, Southern Biotech, Birmingham, Alabama) másodlagos ellenanyaggal fedtük 2000x hígításban, (2 % BSA / 150 mM NaCl / PBS-ben oldva, 100 µl/lyuk) 1 óráig, 37° C-on. A színreakciót TMB szubsztrát (T4319, Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri,) (50 µl/lyuk) hozzáadása után, 5-15 perc inkubálási időt követően detektáltuk. Az enzimreakciót 2 N H₂SO₄-val állítottuk le (50 µl/lyuk), majd ELISA Reader segítségével 450 nm hullámhosszon olvastuk le az optikai denzitás értékeket (117).

5.8. A citrullinált fibrin β 60-74 peptid-specifikus ellenanyagok kimutatása RA-s vérből izolált B-sejtek felülúszójából

A β 60-74Cit peptidre magasan pozitív szérumú betegekből MACS-sal izolált B-sejteket előaktiváltuk poliklonális nem specifikus metilálatlan CpG oligonukleotiddal (ODN-2006, 5'-tcgtcgttttgcgttttgcgt'-3', 7,5 μ g/ml, Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri) és BAFF (B-cell activating factor, 11343434, ImmunoTools, Friesoythe; Németország) citokin (1,5 ng/ml) stimulusokkal. U aljú lemezen lyukanként 10^5 sejtet 5 napig tartottunk sejt kultúrában, és ezután vizsgáltuk 100 μ l felülúszót kettéosztva két párhuzamos mintához. A B-sejtek β 60-74Cit peptidre specifikus IgG izotípusú ellenanyag termelését a fent leírt ELISA módszerrel (a különbség, hogy szérum helyett a felülúszóval inkubáltuk a lemezt) vizsgáltuk. A felülúszó totál IgG szintjét úgy vizsgáltuk, hogy kecskében termelt anti-humán IgG+M-mel (109-006-127, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) (500 ng/lyuk) fedett lemezen inkubáltuk a felülúszót, majd anti-humán IgG-HRPO-val (6140-05, Southern Biotech, Birmingham, Alabama) és a 3.6. fejezetben részletezett TMB szubsztrát segítségével detektáltuk a kapott jeleket.

5.9. Az autoreaktív B-sejtek kimutatása citrullin vagy arginin tartalmú peptidekkel fedett fluoreszkáló mikrogyöngyök segítségével

A B-sejteket perifériás vérből izoláltuk az 5.5 fejezet szerint. $2,5 \times 10^5$ sejthez 0,5 μ l 1 μ m-es neutravidinnel fedett yellow-green fluoreszcens gyöngy került ($2,5 \times 10^7$ db gyöngy). A kísérlethez kiszámolt gyöngymennyiség megmosása következett 1 ml 2% BSA-PBS-ben eppendorfcsőben asztali centrifugában 10000 rpm-en 4 percig. Ezután a felülúszót leszívtuk, majd a gyöngyöket 2% BSA-PBS-ben vettük fel. Vortexeltük, majd 10 μ g citrullin vagy arginin tartalmú peptidet adtunk a gyöngyökhöz. A gyöngyöket 100 μ l 2% BSA-PBS-ben rázótermostátban 1 h-ig, 4 °C-on inkubáltuk, majd mostuk 4x1 ml 2% BSA-PBS-ben 10000 rpm-en 4 percig. A felülúszót leszívtuk és a gyöngyöket 20 μ l 2% BSA-PBS-ben vettük fel, majd a sejtekhez adtuk. A sejteket a gyöngyökkel inkubáltuk 1 h-ig, 4 °C-on rázóasztalon FCS (fetal calf serum) mentes médiumban. Mostuk 2x1 ml FCS mentes médiumban 8 percig

1300 rpm-en, majd FACS pufferben vettük fel a sejteket és lemértük áramlási citofluoriméteren.

5.10. U937 monocota sejtvonal kezelése, fenntartása

Az U937 sejtekből tízszeri passzálás után új fagyasztott mintát vettünk fel. A sejtek Penicillin és Streptomycin tartalmú RPMI-1640+10% FCS médiumban tenyésztek. A sejteknek hetente ellenőriztük az Fc γ receptoraik expresszióját, melyek 12-es passzázs számnál nem változtak meg (14. ábra).

5.11. Fc γ receptor expresszió ellenőrzése U937 sejteken

Az Fc γ RI receptorhoz FITC-cel jelölt egérben termelt anti-humán CD64 (558592, BD Pharmingen, San Jose, Kalifornia), az Fc γ RII receptorhoz egérben termelt anti-humán CD32 (21330321, ImmunoTools, Friesoythe; Németország) és Alexa647-el jelölt kecske anti-egér IgG-t (A21236, Molecular Probes, Eugene, Oregon), és az Fc γ RIII receptorhoz FITC-cel jelölt egérben termelt anti-humán CD16 (555406, BD Pharmingen, San Jose, Kalifornia) ellenanyagokat használtunk. 5×10^5 sejtet inkubáltunk az Fc γ receptorokra specifikus ellenanyagokkal jégen, majd kétszer 1 ml FACS pufferrel (PBS, 0,5% FCS, 0,1% Na-azid) mostuk a mintákat (1250 rpm, 8 perc, 4 °C). Ezután FACS pufferben vettük fel a sejteket és lemértük FACSCalibur áramlási citofluoriméteren.

5.12. Fc γ RI -hez kötődő peptidek funkcionális integritásának vizsgálata

Fc γ RI és II receptorokhoz kötődő peptid funkcionális integritását az érett makrofágokat modellező U937 sejtvonalon vizsgáltuk. A biotinált peptideket 0,1/1/10/50 μ g/ml-es

koncentrációban inkubáltuk 5×10^5 sejttel 1 óráig jégen. Az inkubáció 100 μ l térfogatban, a peptid bekebelezés gátlása céljából jégen történt. A nem kötődött peptideket kétszeri mosással távolítottuk el (1250 rpm, 8 perc, 4 °C). A peptid kötődését 20 μ g/ml streptavidin-DyLight488 (21832, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts) konjugátum segítségével detektáltuk (1 óra, 4 °C, melyet kétszeri mosás követett). A biotinált peptideket molárisan 4:1 arányban összekevertük a fluoreszcens festékkel jelzett streptavidinnel, és 800 rpm-mel rázótermosztátban ráztattuk 1 óráig 37 °C-on. Molekulásúly alapján el lehetett volna választani a tetramereket a többi konjugátumtól, de ez jelentős anyagveszteséggel járt volna, ezért nem tettük meg. Így nemcsak tetramereket inkubáltuk a sejtekkel, de az egyszerűség kedvéért továbbra is így említem a multimereket. A tetramereket 10 μ g/ml peptidkoncentrációban adtuk a sejtekhez a fent leírt protokoll alapján. A peptidek kötődését áramlási citometriás módszerrel mértük. A humán IgG-vel való leszorítás kísérletének alkalmával a peptiddel való inkubációt és mosást követően adtuk a jelöletlen humán IgG-t a sejtekhez. Miután kimostuk a fölösleget, jelöltük a biotinált peptideket streptavidinDyLight488-al.

5.13. U937 monocita sejtvonalon végzett Fc peptid közvetített fagocitózis vizsgálata

Az 1 μ m átmérőjű streptavidinnel fedett yellow-green festékkel feltöltött gyöngyöket (10^7 db/minta) (F8776, Life Technologies, Waltham, Massachusetts) előinkubáltuk eppendorf csőben a biotinált peptidekkel (5 μ g) 100 μ l PBS-ben. Pozitív kontrollként 50 μ g biotinált IgG-t adtunk a gyöngyökhöz, míg negatív kontrollnak olyan gyöngyöket használtunk, melyekhez nem kötöttünk peptidet. Egy órán át rázatva 37 °C-on, sötétben inkubáltuk a keveréket 800 rpm sebességgel, majd háromszor mostuk a gyöngyöket 900 μ l PBS-ben (4 perc, 10000 rpm). A kísérleteinket U937 emberi monocita sejtvonalon végeztük. A sejtek membránját neuro-DiI festékkel (60016, Biotium, Hayward, California) (5 μ g/ml) jelöltük 5 mM glükózt és 1% BSA-t tartalmazó Hanks' pufferben 10 percig 37 °C-on. A sejteket 2x mostuk 10 ml médiumban 1250 rpm-en, 8 percig. A sejteket 8 lyukú kamrába tettük ki 10^5 sejt/lyuk sűrűséggel 100 μ l RPMI-I + 10% FCS médiumban mintánként. A gyöngyöket 100 μ l médiumban vettük fel, majd a sejtekhez adtuk. Az inkubáció O/N történt 37 °C-on. Olympus

Fluoview 500 konfokális mikroszkóppal (Hamburg, Németország) készítettük el a felvételeket.

Az áramlási citofluorimetriás mérésekhez a sejteket a sejttenyésztő lemezről áttettük az inkubáció lejárta után FACS csövekbe, majd kétszer mostuk 1ml FACS pufferben (8 perc, 1200 rpm). 200 µl FACS-pufferben vettük fel a mintákat, és áramlási citofluoriméterrel mértük az FL-1 csatornában a monociták által internalizált gyöngyök mennyiségét.

A fagocita index számítása a következőképpen történt:

$$\text{Fagocita index} = \frac{\text{gyöngy pozitív sejtek \% - a} * \text{pozitív sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása (MFI)}}{\text{kontroll mintában a gyöngy pozitív sejtek \% - a} * \text{kontroll mintában a pozitív sejtek MFI-je}}$$

Az áramlási citofluorimetriás mérések kiértékelésénél a kontroll mintával, azaz a sejtek által felvett üres gyöngyökkel mért aspecifikus jellel elosztottuk a peptidekkel fedett gyöngyökre kapott specifikus jelet, tehát a fagocita index megmutatja, hogy a specifikus gyöngyfelvétel hányszorosa az aspecifikus fagocitózisnak.

5.14. Makrofág differenciáció

A MACS-sal izolált primer monocitákat rekombináns humán M-CSF-fel (macrophage colony stimulating factor) (216-MC-005, R&D System, Minneapolis, Minnesota) stimuláltuk, úgy, hogy 50 ng/ml végkoncentrációban adtuk 10^6 sejt/ml-hez és sejttenyésztő lemezen inkubáltuk 5 napig. Az utolsó 24 órában 20 ng/ml PMA-t (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (P8139, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) és 100 ng/ml LPS-t (bakteriális lipopoliszacharid) (L2880 Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) adtunk a sejtekhez.

5.15. B-sejtek makrofágok általi internalizációjának vizsgálata

Az M-CSF jelenlétében differenciáltot primer humán makrofágokkal és MACS-al izolált 5 μM CFSE-vel (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, 21888, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) feltöltött primer B-sejtekkel végeztük a kísérletet. A CFSE-s feltöltéshez a sejtkoncentrációt 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be 5% FCS-PBS-ben, majd 10 percig inkubáltuk 37 °C-os vízfürdőben, ezt követően pedig feltöltöttük a falkont PBS-sel és 4 °C-on 30 percig inkubáltuk. A mosás (324 g-n 10 percig 4 °C-on), majd a blokkolás következett 10 $\mu\text{g/ml}$ humán IgG-vel jégen. A Xencor cég elleanyagai: 10 $\mu\text{g/ml}$ az XMab5574 anti-CD19 ellenanyag, mely módosított Fc része révén az Fc receptorhoz jóval nagyobb affinitással kötődik és az XMab6184 ellenanyag, melynek az Fc része nem köti az Fc γ receptort. Az ellenanyagokat inkubáltuk a CFSE-cel feltöltött B-sejtekkel jégen 1 óráig. A fölösleget kétszer kimostuk (1250 rpm, 10 perc, 4 °C). A makrofágok sejtmagjának feltöltése 10 μM Draq5 DNS festékkel és a membránjuk festése pedig 5 $\mu\text{g/ml}$ NeuroDiI-al [1 % BSA HBSS (Hank's buffered salt solution) + 5 mM glükóz oldatban] történt 10 percig 37 °C-on. 10^5 Makrofágot 3×10^5 B sejttel inkubáltuk együtt 24 óráig sejtenyésztő körülmények között, (37 °C, 5% CO₂) majd Olympus Fluoview 500 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a sejteket.

5.16. A komplementaktiváló peptid hatásvizsgálata sejtmentes rendszerben

A 96 lyukú lemezt először PBS-ben hígított 5 $\mu\text{g/ml}$ neutravidinnel, majd a 1 $\mu\text{g/ml}$ biotinnal jelölt peptiddel fedtük, és BSA-val blokkoltuk. Negatív kontrollként 10-10 $\mu\text{g/ml}$ humán szérum albumint alkalmaztunk, pozitív kontrollnak pedig humán IgG-t. A későbbiekben elhagytuk a neutravidint az aspecifikus háttérreakciók miatt, és 5 $\mu\text{g/ml}$ peptiddel fedtük a kis molekulákkal is fedhető (high binding) lemezeket. A lemezeket 5x mostuk PBS és 0,05% Tween-20 keverékével. A szabad kötőhelyeket egy blokkoló pufferrel fedtük be (200 $\mu\text{l/lyuk}$, 1 h, 37 °C-on, a puffer összetétele: 40 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% BSA, 0,1% Tween-20). Ezután a lemezre PBS-ben oldott 4mM CaCl₂+2mM MgCl₂ oldatban 1:100-ra hígított friss, egészséges véradóktól gyűjtött kevert szérumot adtunk, mint komplement forrás, majd a lemezt egy órát inkubáltuk 37°C-on. Kontrollként hőinaktivált szérumot, vagy 10 mM

EDTA-val (etiléndiamin-tetraecetsav) előinkubált szérumot, valamint C3 és C1q komplement komponens mentes szérumot alkalmaztunk. A hőinaktiváció 56°C-on történik fél óra alatt, és e hőhatás biztosítja azt, hogy a komplement rendszer komponensei inaktiválódjanak. A mosást követően a szilárd felszínhez kötődő komplement hasítási termékeket a komplement komponens C3-ra specifikus tormaperoxidázzal konjugált ellenanyaggal mutattuk ki, vagy nyúlban termelt anti-C4 és anti-C9 ellenanyagokkal, melyeket egy anti-nyúl-HRPO másodlagos ellenanyaggal detektáltuk. Az előhívás 50 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) szubsztráttal történt, szobahőmérsékleten. A színreakció leállítása 50µl 2N-os kénsavval (H₂SO₄) történt majd a minták optikai denzitásának mérését ELISA leolvasó készülék segítségével 405 nm hullámhosszon végeztük.

5.17. A CNN peptid által aktivált komplement útvonalak meghatározása

Annak vizsgálatára, hogy a komplementaktiválás milyen úton történik, egy klasszikus utat szelektíven gátló szer, a sodium-polyanethol-szulfonsav (SPS) (444464, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri) jelenlétében is végeztünk kísérleteket. Azokban a mintákban, melyekben a komplement rendszer klasszikus útját gátolni szerettük volna, az 50-szeresre hígított szérumot felvitel előtt 60 percig 37°C-on előinkubáltuk SPS-sel 10 mg/ml végkoncentrációban.

A komplement rendszert aktiváló rövid peptidek közül a Ac-²³³CNNKTFNGTGPCTNV²⁴⁷-NH₂ (CNN2) szekvenciáját választottuk ki, amelyet tovább vizsgáltunk az aktiválás mechanizmusának további jellemzése céljából. Összehasonlítottuk különféle specifikus inhibitorok hatását: a lektin útra specifikus MASP1 inhibitort, az SGMI2, a lektin és az alternatív utat egyaránt blokkoló szerin proteáz inhibitor ecotint, valamint ugyanezt az inhibitort Mg-EDTA-t tartalmazó pufferben, ez utóbbi a klasszikus út aktiválódását nem teszi lehetővé. Az NHS-t előinkubáltuk a gátlószerek különböző hígításaival és együttesen tettük a CNN peptiddel fedett lemezre. Az ecotint 10 mM-os, az SGMI-2-t 5 mM-os koncentrációjú oldatból felező hígítással hígítottuk tovább. A Mg²⁺-EDTA-t 10 mM-ban adtuk az inhibitorokhoz.

5.18. Modell a komplementaktiváló peptid működésének vizsgálatára B-sejteken

A CNN2 peptid működését sejteken először egy modellrendszerben próbáltuk ki, olyan bispecifikus konstrukciót hoztunk létre, ahol a biotinált CNN2 peptidet és a szintén biotinált Fc γ RII-höz kapcsolódni tudó, korábban általunk azonosított IgG peptidet (RP peptid (115)) DyLight488-al jelölt streptavidinnel kötöttük össze (10-10-30 μ g/ml arányban). Ennek konstrukciónak a hatását vizsgáltuk Raji B-sejtvonal sejteire. Ebben a kísérleti rendszerben az RP peptid az Fc γ RII-hez kötődve irányítja a komplementaktiváló CNN2 peptidet a sejtekhez, ahol a komplementaktiváció eredményeként sejtlízis következik be, a sejt elpusztul. A két peptidből 5-5 μ g/ml-t használtunk, ezeket 30 μ g/ml jelölt streptavidinnel kötöttük össze. Komplementforrásként 10%-os kevert humán szérumot médiumban hígítva használtunk, kontrollnak pedig hőinaktivált szérumot adtunk.

5.19. A biológiailag lebomló PLGA (poli tejsav-glikolsav) nanopolimerek előállítása

A polimerek szintézise az ELTE Kémiai Intézetének Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriumával való kollaboráció keretében történt.

5.20. Peptidek kapcsolása nanorészecskékhez

A szintetizált peptid epitópokat kovalens/peptid kötések keresztül kapcsoltuk a nanorészecskék felületén lévő karboxyl- vagy amino-csoportokhoz vizes közegben/ pufferben 6-7 pH-n, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropyl)-karbodiimid (EDC) ill. n-hydroxyszukcinimid (NHS) kapcsolószerek jelenlétében.

A kapcsolás menete: ~10-100 mg/ml-es nanorészecskéket tartalmazó oldathoz állandó szonikálás mellett – szobahőmérsékleten - hozzáadtuk a ~10-50 ekvivalens EDC és NHS

tartalmazó oldatot és 15-20 percig reagáltattuk. Közben elkészítjük a ~10-50 ekvivalens 1:1 arányú peptidkeveréket tartalmazó vizes oldatot és az előbbi reakció elegyhez adtuk, tovább szonikáltatjuk 3-5 órán keresztül. A reakcióelegyet desztillált vízzel szemben dializáltuk 24 órán keresztül, az el nem reagált komponensek eltávolítása céljából. A kapcsolódás mértékéről NMR vizsgálat segítségével kaphatunk információt. (A peptidkapcsolást Magyar Anna, az NMR vizsgálatot Schlosser Gitta végezte).

5.21. A PLGA nanopolimerek hatásának vizsgálata az autoreaktív B-sejtek ellenanyagtermelésére ELISpot módszerrel

A MABTECH ELISPOT^{PLUS} for Human IgG (3850-2HW, MabTech, Nacka Strand, Svédország) kiteset alkalmaztuk.

A PBMC in vitro poliklonális stimulálása: a sejteket a TLR7/8 agonista R848-al (1 µg/ml, SML0196, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) és a rhIL-2 citokinnel (10 ng/ml, 11340023, ImmunoTools, Friesoythe; Németország) aktiváltuk, majd 72 óráig inkubáltuk sejttenyésztő lemezen, RPMI I-10 % FCS médiumban, 37 °C-on 5 % CO₂ széndioxid termosztátban.

Lemez előkezelése: steril fülkében a lemezen a nitrocellulózmembránt benedvesítettük steril PBS-sel (50 µl/lyuk), amíg a peptidet kihígítottuk, majd eltávolítottuk a PBS-t. A lemezt 5 µg/ml, steril PBS-ben beoldott β60-74Cit peptiddel fedtük (100 µl/lyuk) és a totál IgG kimutatáshoz a mAbs MT91/145 ellenanyaggal (MabTech, Nacka Strand, Svédország) (15 µg/ml, steril PBS, pH 7,4-ben oldva) 2 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk a megfelelő lyukakat, majd mostuk 5-ször steril PBS-sel (200 µl/lyuk). Ezután a lemez blokkolása következett: 200 µl/lyuk RPMI I + 10 % FCS médiummal, 30 percig, szoba hőmérsékleten.

A sejteket inkubáltuk 1000x mennyiségű PLGA nanorészecskével, 1 óráig jégen, majd mostuk 3x 350 g-n 8 percig 4 °C-on. Ezután 10,5,3,1 %-os aktív vagy inaktív szérumban inkubáltuk egy óráig 37 °C-os CO₂ termosztátban, majd mostuk 3x 350 g-n 8 percig.

Sejtek felvitele a lemezre: Totál IgG detektáláshoz 50 000 sejtet, antigén specifikus IgG detektáláshoz 4x10⁵ sejtet vittünk fel lyukanként, három párhuzamos mintával dolgozva, majd

22 óráig tenyésztettük 37 °C-on, 5 % CO₂ termosztátban. A sejtek eltávolítása után a lemezt 5-ször mostuk 200 µl/lyuk PBS-sel.

Spotok detektálása (többé nincs szükség steril körülményekre): a lemezt inkubáltuk mAbs MT78/145 biotinált ellenanyaggal (MabTech, Nacka Strand, Svédország) (1 µg/ml, PBS-0,5 % FCS-ben oldva, 100 µl/lyuk), 2 óráig, szobahőmérsékleten. Ezután ötször mostuk PBS-sel, 200 µl-el lyukanként. A biotinált anti-humán IgG-t a tormaperoxidáz enzimmal a streptavidin segítségével kapcsoltuk össze (1000x-es hígításban, PBS-0,5 % FCS-ben oldva, 1 óráig, szoba hőmérsékleten). A nem kötődött ellenanyagokat ötszöri mosással távolítottuk el (200 µl/lyuk PBS-sel), majd a szobahőmérsékletű TMB enzim-szubsztráttal (3651 MabTech, Nacka Strand, Svédország) inkubáltuk 10-15 percig (100 µl/lyuk). A reakciót desztillált vízzel állítottuk le, és mostuk át alaposan, majd a nitrocellulózmembránt sötétben szárítottuk ki. A lemezt ImmunoScan készülékkel olvastuk be és az ImmunoSpot (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, Cleveland) programmal értékeltük ki.

5.22. A bispecifikus PLGA nanopolimerek sejtpusztító hatásának vizsgálata

A sejtpopuláció tisztaságát a B-sejtekre specifikus molekulák (CD19) kimutatása alapján áramlási citometriával ellenőriztük. A tisztaság 92-95%-nak bizonyult átlagosan. Miután a naív B-sejtek között a citrullin tartalmú peptideket felismerő sejtek gyakorisága igen alacsony volt, további kísérleteinkben előaktiváltuk a B-sejteket poliklonális nem specifikus stimulusok (CpG, 1 µg/ml és rhIL-2 citokin 10 ng/ml) jelenlétében. Ennek során a sejteket 2 napig tartottuk sejt kultúrában, és ezután vizsgáltuk a peptideket felimerő sejtekre gyakorolt β60-74Cit és CNNQK peptiddel fedett PLGA hatását szérumban jelenlétében. A sejteket 20 percig inkubáltuk 7-AAD DNS-festékkel (A1310, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts), hogy a kultúrában elpusztult sejteket majd kikapuzzuk a mérés során, majd 2x mostuk (1300 rpm, 8 perc 4 °C). A PLGA nanopartikulumokat 5000x mennyiségben inkubáltuk a β60-74Cit peptidre pozitív szérumban betegek B-sejtjeivel 1 óráig jégen. A mosást követően (2x, 1300 rpm, 8 perc 4 °C) a sejteket 20 % KHS-sel (kevert humán savó) inkubáltuk 37 °C-on CO₂ termosztátban, majd TO-PRO®-3 (T3605, Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) DNS-festékkel jelöltük a komplement aktiváció

során elpusztult sejteket. A PLGA-pozitív elpusztult sejteket az FL1/FL4 duplapozitív kvadránsban detektálhattuk a FACSCalibur flow cytometer-en (Becton-Dickinson, San Jose, California), és az adatokat FlowJo software segítségével analizáltuk.

5.23. A komplement-mediált lízis hatékonyságának fokozása a hSCR18-20 fehérje segítségével

A szérumot előinkubáltam egy óráig szobahőmérsékleten 1,2 mg/ml hSCR18-20 és kontrollként hSCR16-17 fehérjékkel. A protokoll a továbbiakban megegyezik a 3.18 és 3.19. fejezetekben leírtakkal.

5.24. Statisztikai analízis

Az RA-s betegek szérumának pozitivitását a vizsgált peptidre kapott optikai denzitás (OD) értékek hányadosaként, a citrullin/arginin tartalmú peptiddel kapott OD indexként ábrázoltuk. Az OD indexek diagnosztikus hatékonyságát ROC (Receiver Operator Characteristic) görbe analízis segítségével vizsgáltuk meg a GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California) szoftver segítségével, valamint a teszt szenzitivitás- és specificitás értékeit is kiszámoltattuk.

A határérték feletti RA betegek száma százalékosan az összes RA beteghez képest adja meg a szenzitivitás értéket. A specificitás (melyet 95%-nál húztuk meg, mert ez a leggyakrabban alkalmazott érték a diagnosztikában) a határérték alatti, illetve az összes kontroll aránya százalékosan kifejezve. A szenzitivitás és specificitás értékeket úgy számoltuk, hogy az adott definíció szerint kiszámoltuk a határértéket, vagyis az egészséges kontroll csoport átlagához hozzáadtuk a kétszeres korrigált tapasztalati szórást (standard deviation, SD). Valamint a ROC görbe analízis eredményeinek alapján az egyes tesztek specificitás értékeit egységesítettük, ezáltal szenzitivitási értékük egyértelműen összemérhetővé vált.

A további kísérletek során a Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk, ha a független minták nem voltak normál eloszlásúak. Ha normál eloszlásúak voltak a minták, és különböző kezelést kaptak (pl. aktív/inaktív szérummal történő inkubáció), akkor páros t-próbát alkalmaztunk. Kettőnél több független csoport vizsgálata esetén az egyszempontos varianciaanalízis próbát (ANOVA) végeztük. A tesztek $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak. A GraphPad Prism 4 (GraphPad software, La Jolla, California, USA) programmal számoltuk ki a statisztikai próbákat.

6. Eredmények

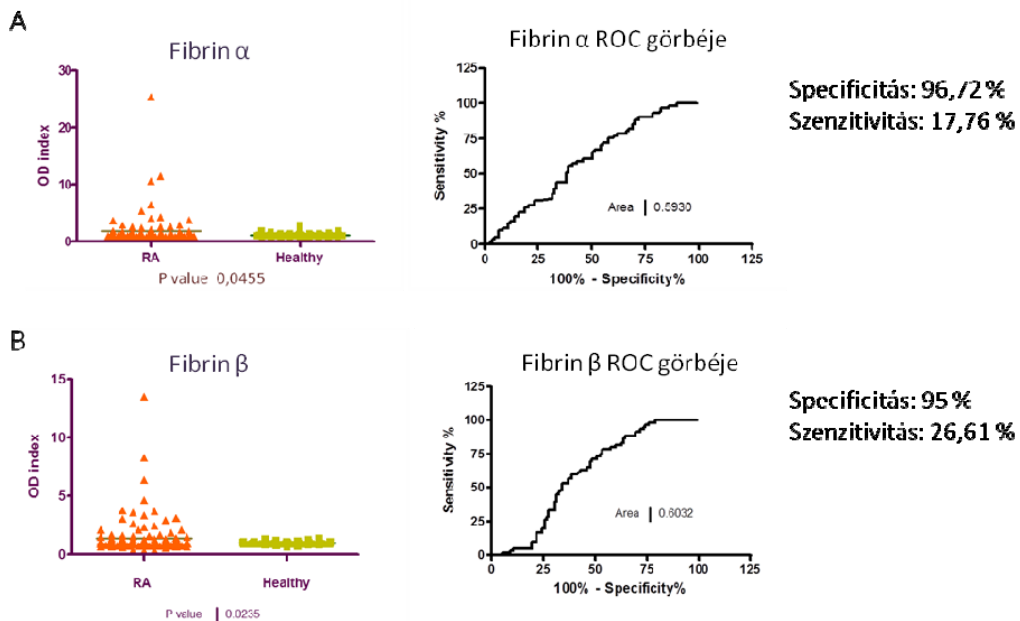
Az ACPA-specifikus B-sejtek elpusztításához olyan bispecifikus konstrukció létrehozását tűztük ki a célul, amelynek egyik tagja célzottan az autoreaktív B-sejtekhez kötődik (6.1. fejezet), másik tagja pedig a B-sejtet elpusztító ún. effektor funkciót aktiválja. Ez történhet a komplementrendszeren keresztül (6.3. fejezet), amelynek eredménye a B-sejt komplement-függő lízise, vagy olyan Fc γ receptortól (Fc γ R) függő fagocitózis révén, amelynek eredményeképpen az autoreaktív B-sejteket fagocita sejtek kebelezik be (6.2. fejezet). Előzetes kísérleteinkben mind a B-sejt célzáshoz, mind pedig az effektor funkciók aktiválásához kiválasztottuk a legalkalmasabb peptideket.

6.1. A citrullin tartalmú fibrin β 60-74 peptidre specifikus ellenanyagok és perifériás vérből izolált B-sejtek kimutatása

G. Serre csoportja által azonosított, a citrullinált fibrin β láncában található 15 aminosav hosszúságú, citrullint tartalmazó szekvencia a **XPAPPISGGGYXAX** (107). Munkánk során előállítottuk a kiválasztott epitópok arginint ill. citrullint tartalmazó, N-terminálison biotinált származékait (3. táblázat). A peptidek szabad N-terminálisát acetileztük, C-terminálisát amidáltuk.

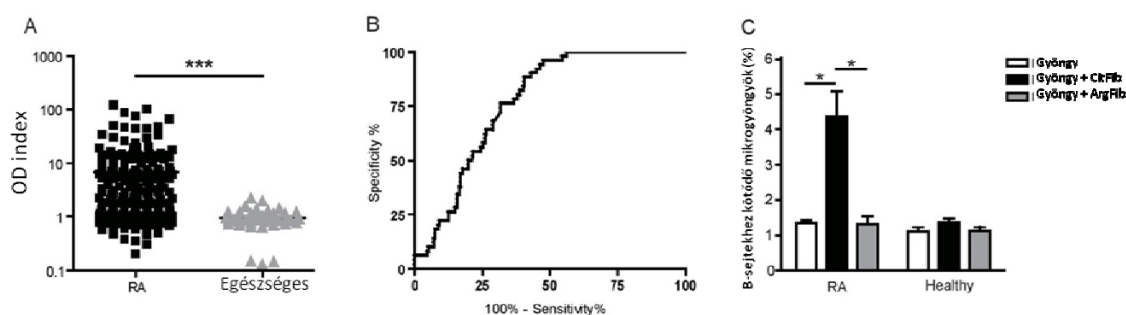
A 170 Reumatoid Artritiszes beteg és 138 egészséges véradó szérumának reaktivitását a fibrin β 60-74Cit peptidre indirekt ELISA módszerrel teszteltük. Az optikai denzitás (OD) értékek hányadosát, az ELISA indexet a citrullin és az arginin tartalmú peptidre kapott OD érték hányadosa adta ki. Rendszerünkben 95%-os specificitásnál az N-terminális végen biotinált fibrin β 60-74Cit peptidre az RA-s szérumok 52%-a bizonyult pozitívnak (12/A ábra). A ROC görbe analízis során a program az összes határértékhez kiszámolja a szenzitivitást és specificitást. Ha a görbe alatti terület 0,5-ös érték alatti, akkor a peptid nem használható fel diagnosztikai teszt fejlesztésére. A β 60-74Cit peptid görbe alatti területe 0,7661-nek

bizonyult. A C-terminálisan biotinált epitóp 26,6%-os szenzitivitás értéket adott 95%-os specificitásnál (11/B ábra). Tehát diagnosztikai szempontból a biotinálás pozíciójának nagy jelentősége van a fibrin β 60-74 peptid esetében is (118) (11/B, 12/A. ábra). Az α fibrin citrullinált epitóp 96,72 %-os specificitás értéknél csak 17,76 %-os szenzitivitás értéket mutatott, ezért ezzel az epitóppal nem foglalkoztunk a későbbiekben (11/A ábra).



8. ábra. A fibrin α (A) és a C-terminális végén biotinált citrullin-tartalmú fibrin β 60-74 (B) peptidre specifikus ellenanyagok kimutatása RA-s betegek szérumból

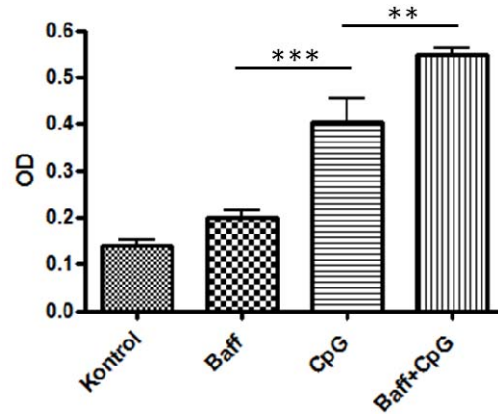
A fibrin β 60-74Cit peptidre specifikus ACPA jelenléte a szérumban arra utal, hogy az RA-s betegek szervezetében ugyanilyen specificitású BCR-rel rendelkező memória B-sejtek és plazmasejtek is előfordulhatnak. Ez utóbbi tulajdonságot használjuk fel arra, hogy a kérdéses epitóp peptid illetve más hasonlóan kötődésre képes peptidek, konjugálva az effektor funkciókat kiváltó peptiddel azokat célzottan a B-sejtekhez irányítsák. A B-sejt receptorukat elvesztett plazmasejteket nem tudjuk ezzel a módszerrel célozni.



9. ábra. Az N-terminális végen biotinált citrullin-tartalmú fibrin β 60-74 peptidre specifikus ellenanyagok kimutatása RA-s betegek szérumból (A, B) és vérből izolált B-sejtekből (C). A) Az N-terminálisan biotinált arginin vagy citrullin tartalmú fibrin β 60-74 peptidok pozitivitása RA-s vagy egészséges szérumokra és ROC görbe analízise (A, B). A β 60-74Cit peptid ROC görbe alatti területe 0,7661. C) A citrullin vagy arginin tartalmú peptideket neutravidinnal fedett fluoreszkáló mikrogyöngyök felszínéhez kapcsoltuk és vérből izolált B-sejtekhez adtuk. A kísérletet 3 egészséges és 3 β 60-74Cit peptide magasán pozitív (a szérumok 9,8-15,4-es OD értékek között vannak) beteg B-sejtjeivel végeztük. Statisztika: *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$.

A gyulladt ízületekben feldúsulhatnak az ACPA termelő B-sejtek, de mi perifériás vérmintákhoz jutottunk hozzá. Először a teljes perifériás mononukleáris sejtpopulációban (PBMC) vizsgáltuk a CD19+ és CD27+ (memória sejtek), valamint a CD19+ CD27- (naív B-sejtek) populációkra kapuzva a fibrin β láncából származó peptid kötődését. Összehasonlítottuk a citrullint és az arginint tartalmazó peptidek sejtekhez való kötődését. Specifikus kötődést először nem tudtunk kimutatni, ami lehetett az autoreaktív B-sejtek nagyon alacsony gyakorisága miatt a perifériás vérben. A következő kísérletekben izolált B-sejtekkel dolgoztunk. Mivel nanopartikulumokhoz kötve szeretnénk volna a célzó és a pusztító peptidet alkalmazni, ezért a citrullin és az arginin tartalmú biotinált fibrin peptidet fluoreszkáló, streptavidinnal fedett gyöngyöz kapcsoltuk és így mutattuk ki a perifériás vérből az autoreaktív B-sejteket. A β 60-74Cit peptidre pozitív betegek vérből izolált B-sejteket stimuláltuk 48 óráig a TLR9 receptor agonista CpG oligonukleotidokkal és TNF családból való B-sejt aktiváló faktorról (BAFF), mely stimulus az irodalmi adatok szerint feldúsítja a memória B-sejteket, valamint az alacsonyabb aktivációs küszöbvel rendelkező autoreaktív B-sejteket (119). A CpG *in vivo* körülmények között bakteriális fertőzés útján, vagy apoptotikus sejtekből kerülhet a B-sejtekbe. Az irodalmi adatok szerint autoimmun betegek szérumban kimutatott magas BAFF szint hozzájárul az autoreaktív B-sejtek túléléséhez (120). A mikrogyöngyöz kötés növeli a stimulált sejtek általi kötés aviditását, így

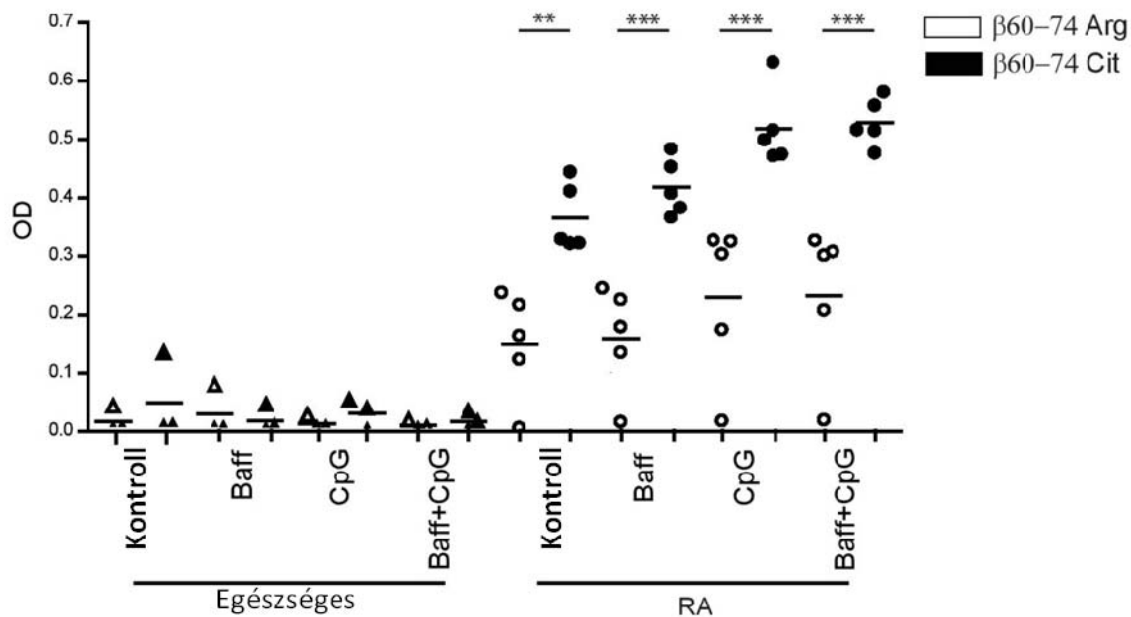
a megfelelő kontrollok alkalmazása mellett a 4-5 %-os volt a β 60-74Cit peptidre pozitív B-sejtek aránya (12/C ábra).



10. ábra. IgG+M termelés 3 egészséges véradó B-sejtjeinek felülúszójából. Statisztika: **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

A továbbiakban a tisztított B-sejtek *in vitro* sejt kultúrában történő peptid-specifikus ellenanyagtermelését vizsgáltuk. Az 13. ábra a CpG és BAFF stimulusokra adott IgG+M ellenanyagtermelés mértékét mutatja 5 napos felülúszóból egészséges véradók mintáiból.

Az ACPA-t kimutató ELISA rendszerben negatív kontrollként az arginin-tartalmú peptidet alkalmaztuk, valamint egészséges véradók B-sejt kultúrájának a felülúszóját is vizsgáltuk. Az RA-s betegek autoreaktív B-sejtjei szignifikánsan több β 60-74Cit ellenanyagot termeltek, mint β 60-74Arg ellenanyagot, valamint az ellenanyagtermelés a stimulálatlan mintákban spontán is előfordult, de a mértéke jelentősen emelkedett a stimulusok hatására (14. ábra). Az egészséges donorok B-sejtjei nem termeltek ACPA-t. Feltehetően az arginin tartalmú peptidre specifikus IgG termelés azzal magyarázható, hogy az erős, nem antigén-specifikus *in vitro* stimulus hatására olyan potenciálisan autoreaktivitással rendelkező B-sejtek is stimulálódhatnak, amelyek az arginin tartalmú peptidre specifikusak. Ezek a sejtek a ún. „alvó autoreaktív” sejtek lehetnek (121), amelyek a szervezetet nem károsítják. Az arginin deaminálása citrullinná a sajátfehérjét megváltoztatja, ami által azt a BCR felismeri. Ugyanez az erős, nem specifikus stimulus az „alvó” autoreaktív sejteket is aktiválhatja, így mindkét esetben az aktivált B-sejt ellenanyagtermelő plazmasejtté differenciálódik.



11. ábra. RA-s (n=5) és egészséges (n=3) véradók B-sejt kultúrájának felülúszójából mért peptid-specifikus ellenanyagtermelés. Az RA-s betegek szérumából mért ELISA OD indexek értéke 6-13,8-ig terjedt (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

6.2. FcγRI-hez kötődő peptidek funkcionális integritásának vizsgálata

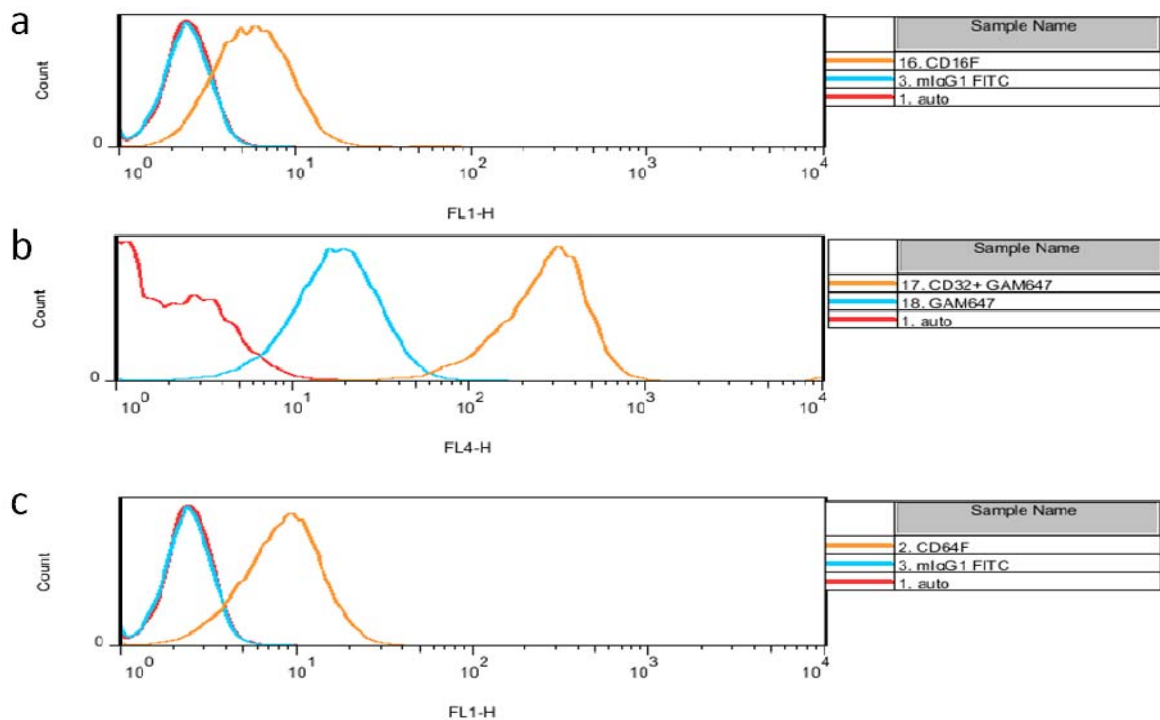
A következőkben az Fc receptortól függő effektor funkció kiváltására alkalmas peptideket vizsgáltuk. Szakirodalmi adatok alapján kiválasztottunk két FcγRI-hez és két FcγRII-höz kötődő peptidet (3. táblázat), amelyek a monociták aktiváló Fcγ receptorához kötődve fagocitózist válthatnak ki.

Medgyesi Dávid és munkatársai azonosították az IgG Fc részén található CH2 domén egy szakaszát, amely kötődik a B sejtek és a monociták II típusú Fc receptorához is (115). Ez a peptid a továbbiakban RP peptid néven szerepel. Az RP peptid (3. táblázat) mellett összehasonlítottuk még további IgG Fc peptidek fagocitózis kiváltó képességét is. Stefan Bonetto fág szelekcióval azonosított peptidje az IgG1 molekula Fc részével kompetál az FcγR-kötő helyért, és mikrogöngyhöz kötött formában képes fagocitózist és oxidatív robbanást kiváltani U937 sejtekben (113). Bernzten és munkatársai is fágkönyvtárból izoláltak egy FcγRI-hez és FcγRIIA-hoz kötődő peptidet, mely mikrogöngyhöz kapcsolva képes receptor-mediált internalizációra és a savas kompartmenben degradációra U937, illetve a krónikus

mieloid leukémia eredetű K562 sejtvonalon végzett kísérletekben (114, 116). Az FcγRI-hez kötődő peptidszakasz tartalmaz két ciszteint is, melyek ciklizálásával egy új peptidet is megvizsgálhattunk.

6.2.1. Az U937 sejtvonal karakterizálása

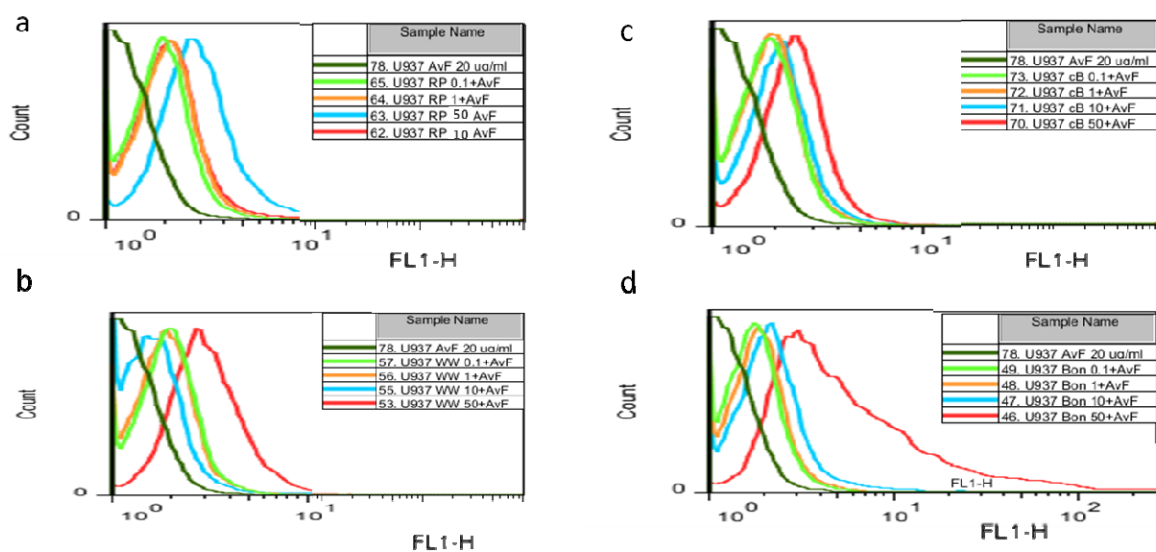
FcγR-hoz kötődő peptidek funkcionális integritását a monocitákat modellező U937 sejtvonalon vizsgáltuk. Az U937 sejteknek hetente ellenőriztem az Fcγ receptorok expresszióját, melyek 12-es passzázs számnál még nem változtak meg, azután új sejtvonalat vettem fel (15.ábra).



12. ábra. U937 monocita sejtvonal Fcγ receptor expressziója. a) FcγRIII b) FcγRII c) FcγRI receptor expressziója. A piros görbe a sejtek autofluoreszcenciáját mutatja (a,c), a kék görbe pedig az izotípus kontrollt, vagy a másodlagos jelölt ellenanyag aspecifikus kötődését (b).

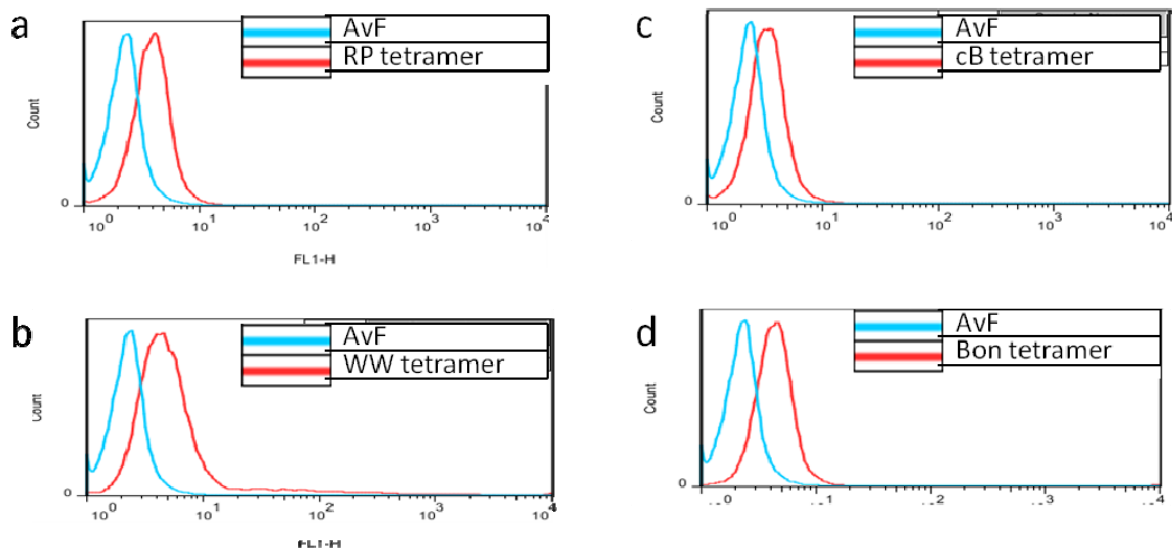
6.2.2. A peptidek kötődése U937 sejtek Fc receptorához

Az Fc peptidek kötődését először dóziszfüggő módon, szekvenciálisan vizsgáltuk meg. A különböző koncentrációjú biotinált peptideket együtt inkubáltuk a sejtekkel, majd a mosást követően DyLight488 festékkel konjugált streptavidinnel tettük a kötődés mértékét láthatóvá (16.ábra).



13. ábra. A peptidek dóziszfüggő kötődése U937 sejtekhez. a) RTPEVTCVVVDVSHEDP b) WAWVWLTETAVK c) ADGA(CLRSGRGC)_{ciklo}GAAK d) AQVNSCLLLPNLLGCGDDK

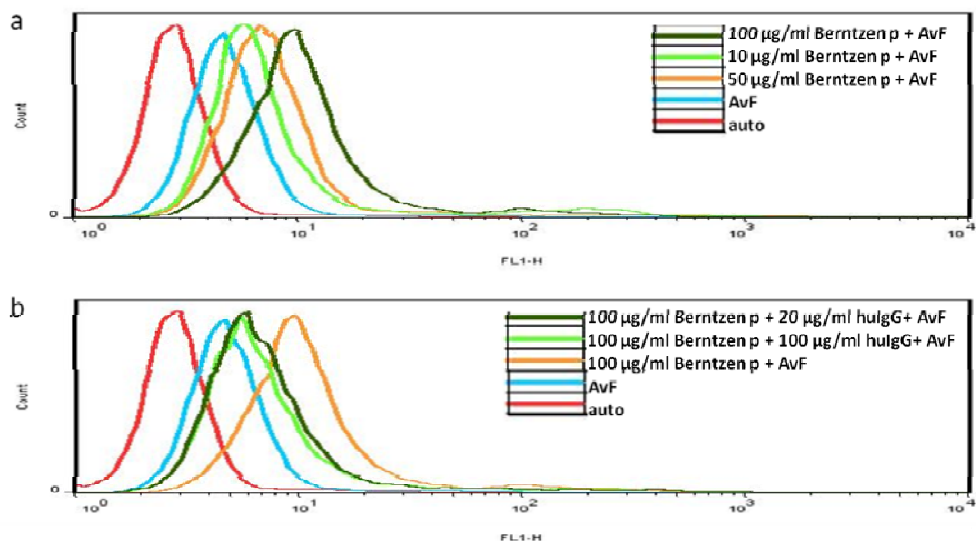
Az avidin és a biotin rendkívül stabil, nagy affinitású kötéssel kapcsolódnak egymáshoz ($K_d=10^{-14}$ M) (122). Egy avidin molekulának négy biotin molekulát kötő helye van, így a mono-biotinilált peptidekből tetramer peptideket alakíthatunk ki, mellyel a peptidkötődés mértékének növelését próbáltuk elérni. A 10 µg/ml-es peptidkoncentráció tetramerizált formában jobban kötődött, mint szekvenciálisan, de nem hozta az elvárt eredményeket. A peptideket 4:1 arányban előinkubáltuk streptavidinDyLight488-al, majd a sejtekhez adtuk (17.ábra).



14. ábra. A tetramerizált Fc peptidek. kötődése U937 sejtekhez. a) RTPEVTCVVVDVSHEDP b) WAWVWLTETAVK c) ADGA(CLRSGRGC)_{ciklo}GAAK d) AQVNSCLLLPNLLGCGDDK biotinált peptidek kötődése.

6.2.3. Az Fc receptorokhoz kötődő peptidek leszorítása humán IgG-vel

Azért, hogy megnézzük, a ADGACLRSGRGC_{ciklo}GAAK peptid az Fc γ receptorhoz kötődik-e, különböző koncentrációjú humán IgG mellett adtuk a sejtekhez. Az IgG Fc része hatékonyabban kötődött az Fc γ receptorhoz, mert molárisan jóval kisebb arányban is hatékonyan leszorította a peptidet (18.ábra).



15. ábra. Az ADGACLRSGRGCGAAK-biotin peptid kötődése U937 sejtekhez és IgG-vel való leszorítása. Egy tipikus, áramlási citometriás mérés. Az a) ábrán a peptid dózisdüggő kötődése látható, a b) ábrán pedig az alkalmazott legnagyobb peptidkoncentráció kötődését mutatom be humán IgG-vel együtt inkubálva.

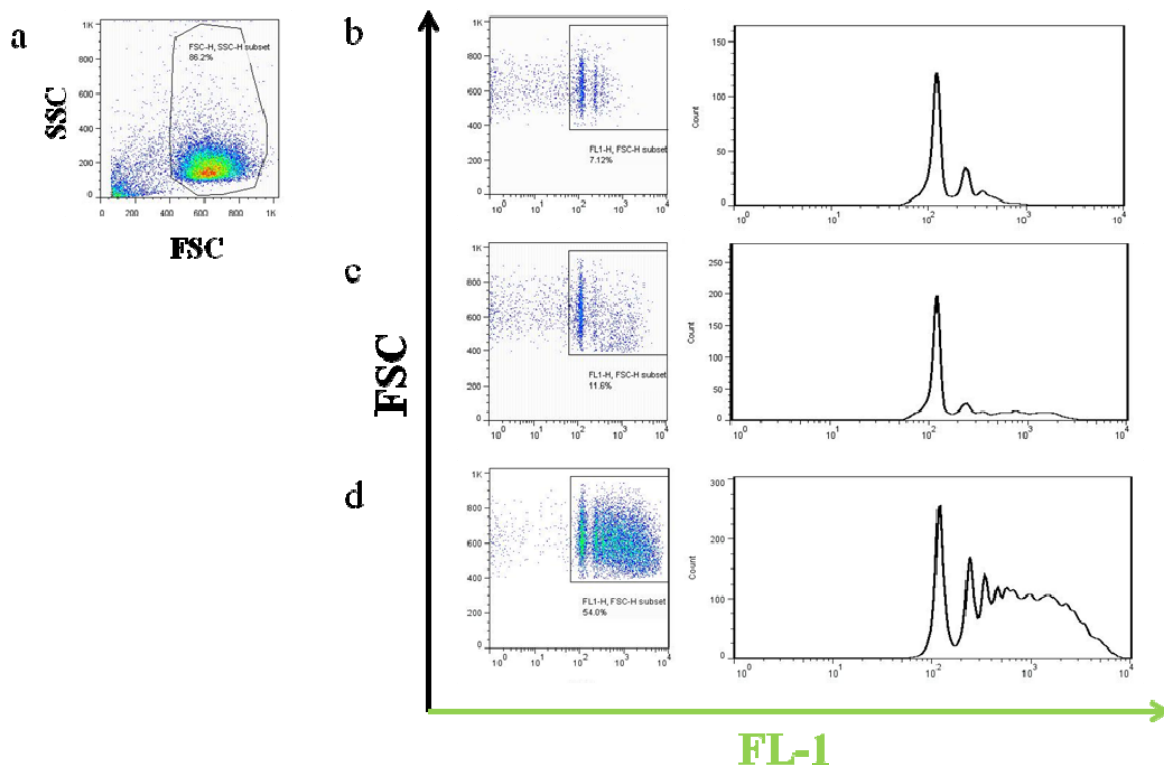
6.2.4. A peptidek fagocitózist kiváltó hatásának vizsgálata

Yellow-green fluorescens festékkal feltöltött, neutravidinnel fedett 1 µm átmérőjű polisztrén alapú mikrogöngyökhöz kötöttük a biotinált IgG Fc peptideket. A fagocitózis mértékét egy fagocita index bevezetésével számszerűsítettük (123). A számításához az alábbi képletet használtuk:

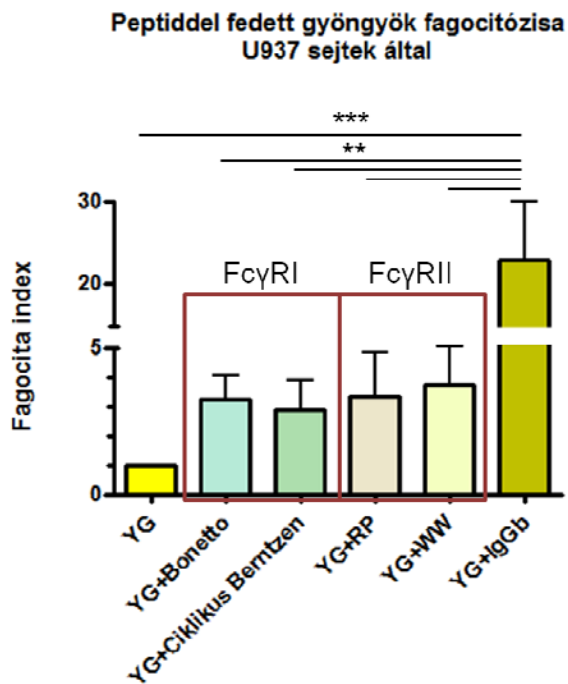
$$\text{Fagocita index} = \frac{\text{göngy pozitív sejtek \% - a} * \text{pozitív sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása (MFI)}}{\text{kontroll mintában a göngy pozitív sejtek \% - a} * \text{kontroll mintában a pozitív sejtek MFI-je}}$$

Az áramlási citofluorimetriás mérések kiértékelésénél a kontroll mintával, azaz a sejtek által felvett üres göngyök átlagos fluoreszcencia intenzitás értékével elosztottuk az Fc γ receptorokhoz kötődő peptidekkel fedett göngyök átlagos fluoreszcencia intenzitás értékét (19. ábra). Tehát a fagocita index megmutatja, hogy a specifikus göngyfelvétel hány-szorosa az aspecifikus fagocitózisnak (20. ábra).

Pozitív kontrollként biotinált humán IgG-vel fedett gyöngyöket alkalmaztunk, ennek fagocita indexe 20-30 közötti értékre tehető, míg a peptiddel fedett gyöngyöké jóval alacsonyabb, 3-5 közötti értéknek mutatkozott (20. ábra). Ez valószínűleg a rövid peptidekkel fedett gyöngyök kötődésének alacsony aviditásával magyarázható, ami nem teszi lehetővé a megfelelő mértékű fagocita funkció kiváltását.

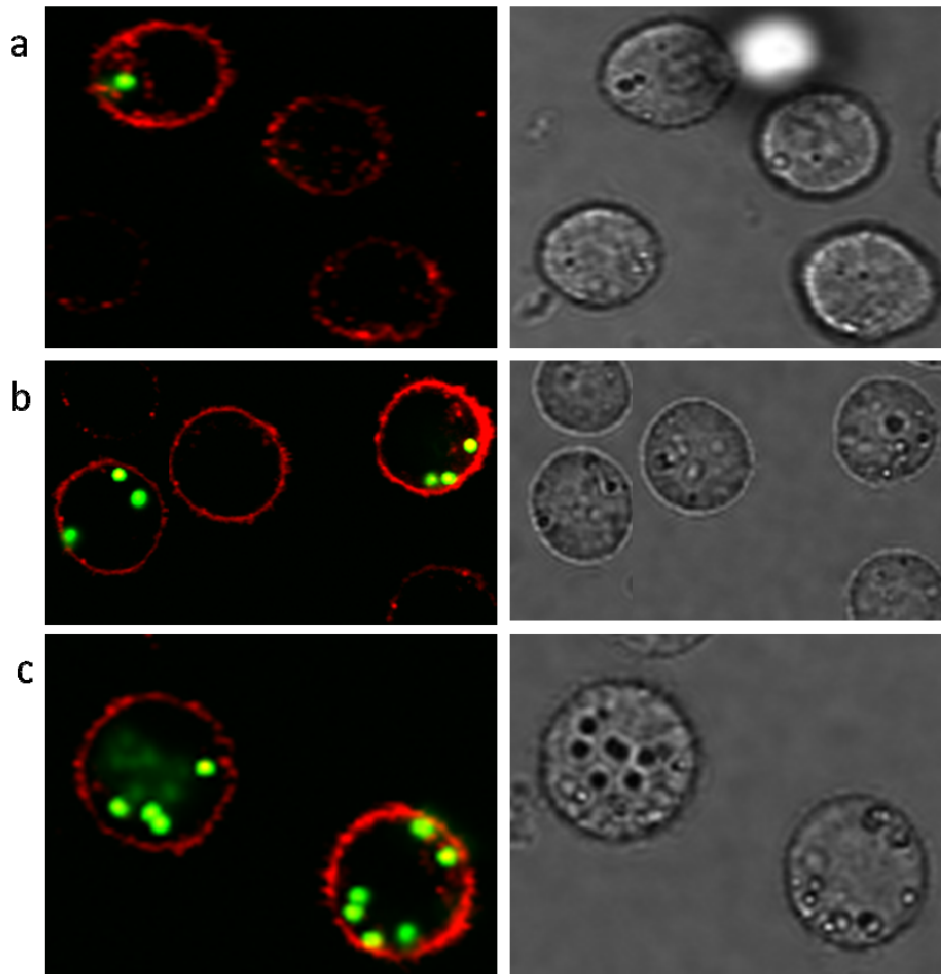


16. ábra. Reprezentatív ábra a mikrogyöngyök fagocitózisáról. a) Az élő sejtek kapuzása a méret, alak és granulátság alapján. A b,c és d alábrákon a bal oldali dot plotokon a gyöngyöt felvett sejtek láthatóak. A sejtek fluoreszcencia intenzitása a felvett gyöngyök számával nő. A jobboldali histogrammokon a gyöngyöt felvett sejtek fluoreszcencia intenzitása látható. b) Kontroll mintánk az üres gyöngy. c) WAWVWLTETAVK-biotinnal fedett gyöngy. d) Biotinált IgG-vel fedett gyöngyök fagocitózisa.



17. ábra. Az Fc γ receptor peptidekkel fedett gyöngyök fagocitózisa U937 sejtek által. YG: 1 μ m átmérőjű yellow-green festékkel feltöltött streptavidinnel fedett gyöngy, RP: RTPEVTCVVVDVSHEDP, WW: WAWVWLTTETAVK-biotin. Öt kísérlet összegzése (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

Az áramlási citofluorimetriás méréseknél nem tudtuk elkülöníteni az internalizált és membránkötött gyöngyök által kapott jelet, mert olyan intenzíven világított a gyöngy, hogy a jel kioltása tripánkéssel nem volt tökéletes. Ezért konfokális mikroszkóppal is megvizsgáltuk, hogy a membránkötött gyöngyöket O/N (over night, éjszakán át tartó inkubáció) sejttenyésztő körülményekkel inkubálva bekebelezik-e a sejtek. Megállapítottuk, hogy az Fc peptidekkel fedett gyöngyöket az U937 sejtek internalizálták (21. ábra).



18. ábra. Mikroszkópos felvételek a sejtek általi fagocitózisról. a) Kontroll minta b) WAWVWLTETAVK peptiddel fedett gyöngyök c) IgG-vel fedett gyöngyök. Pirossal a membránfestés (NeuroDiI festék), zölddel pedig a fluoreszcens gyöngyök láthatóak.

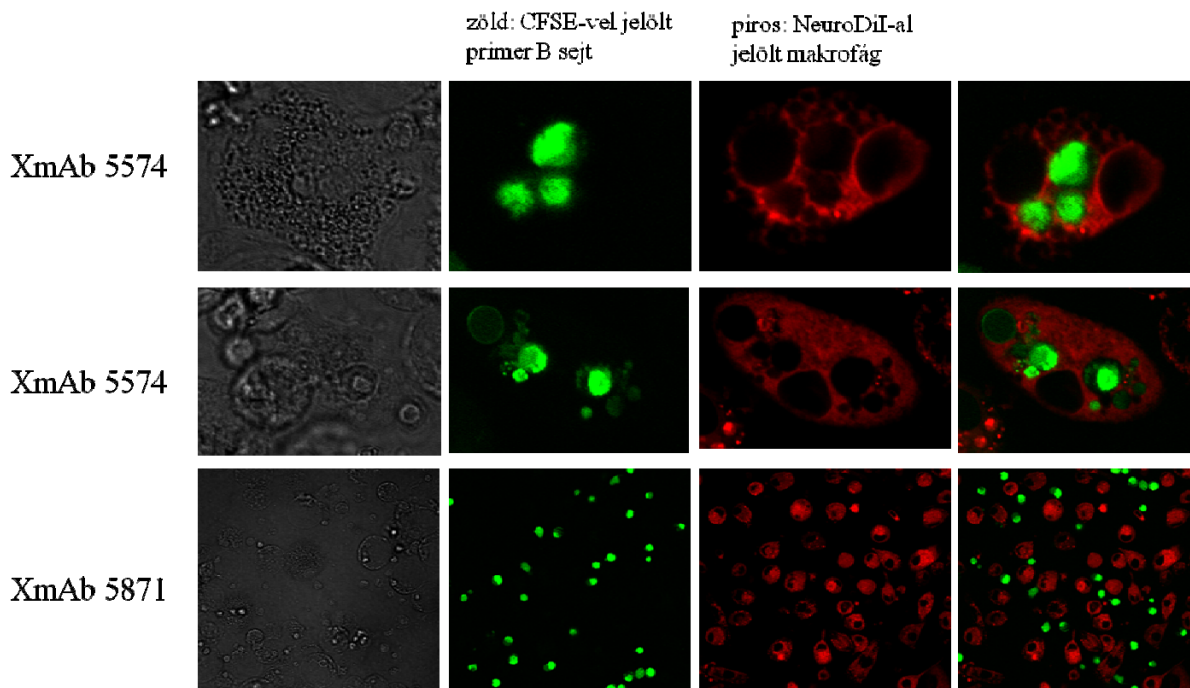
6.2.5. Módosított Fc résszel rendelkező anti-CD19 ellenanyaggal fedett B-sejtek makrofágok általi fagocitózisa

Feltételeztük, hogy az autoepitóp peptiden keresztül az autoreaktív B-sejtekhez kötődő bifunkcionális nanopartikulum a fagocita funkciókat kiváltó peptid segítségével kapcsolódik a makrofágok Fc γ receptorához, majd megtörténik a B-sejt internalizációja.

Annak eldöntésére, hogy a hipotetikus modell alapján a makrofágok képesek-e a B-sejteket internalizálni, további előkísérletként megvizsgáltuk, hogy a Xencor cég által előállított, B-sejtekhez kötődő anti-CD19 ellenanyaggal való kezelést követően, melynek a

módosított Fc része jóval nagyobb affinitással kötődik az aktiváló FcγRIIa és FcγRIII receptorokhoz, képesek-e bekebelezni primer makrofágok a B-sejteket. A makrofágokat vérből izolált primer monocitákból a fent leírt protokoll alapján differenciáltattuk, majd PMA-val és LPS-sel aktiváltuk. Kontrollként egy olyan módosított Fc résszel rendelkező anti-CD19-et használtunk, mely 400-szor nagyobb affinitással kötődik a gátló FcγRIIb receptorhoz.

A 22-ik ábrán látható, hogy a makrofágok bekebelezik az aktiváló receptorhoz kötődő Fc résszel rendelkező CD19 ellenanyaggal fedett B-sejteket. A folyamat FcγRI/III függő, a gátló Fc receptorhoz kötődő ellenanyag nem váltja ki a sejtet fagocitózist.



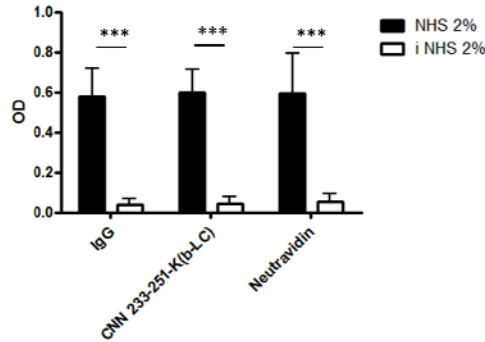
19. ábra. A primer B-sejtek differenciáltatott makrofágok általi fagocitózisa. Az XmAb 5574 anti-CD19 ellenanyag módosított Fc része nagyobb affinitással kötődik az FcγRIIa és az FcγRIII receptorokhoz. A NeuroDiI membránfestéssel (piros) jelölt makrofágok bekebelezték a CFSE-vel feltöltött (zöld) B-sejteket. Az XmAb 5871 anti-CD19 ellenanyag módosított Fc része a gátló FcγRIIb receptorhoz 400-szor nagyobb affinitással kötődik. Itt nem történt fagocitózis.

6.3. A komplement rendszert aktiváló peptidek

6.3.1. A peptidek funkcionális vizsgálata ELISA módszerrel

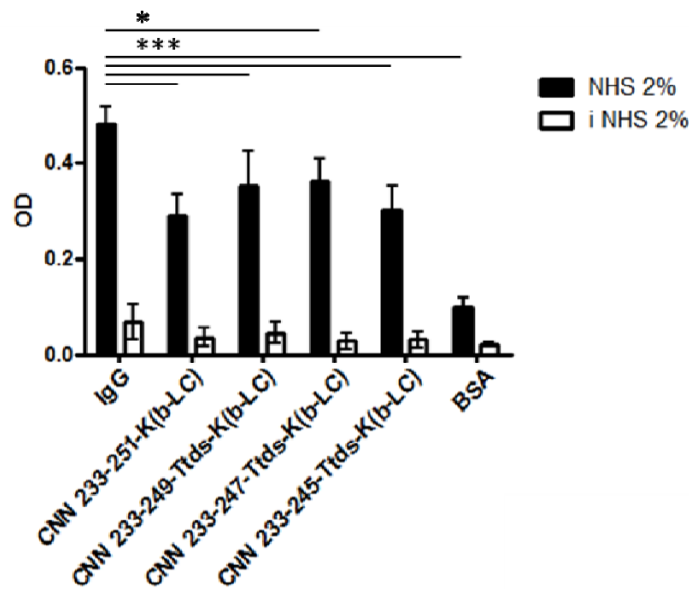
A humán immundeficiencia vírus (HIV) gp120 burokfehérjéjéről kimutatták, hogy anti-gp120 ellenanyag jelenlététől függetlenül aktiválja a komplementrendszer klasszikus útját, ami hozzájárul a vírussal fertőzött sejtek elpusztításához. Kiderült, hogy e hatás kiváltásához nem szükséges a teljes fehérje, hanem elegendő annak egy szakasza is (109). A Süsal és munkatársai által leírt HIV-1 gp120 burokfehérje komplement rendszert aktiváló peptidjének (CNN) szekvenciájából kiindulva szintetizáltunk rövidebb peptideket (3. táblázat), és tanulmányoztuk e peptidek komplementaktiváló hatását. A rövidebb szekvenciájú komplementaktiváló CNN peptidek a komplement rendszert aktiválják, így alkalmassá válhatnak arra, hogy a bifunkcionális konstrukció részeként annak az effektor funkciót aktiváló tagját alkossák (10. ábra). A nanopartikulumokhoz kovalens kötéssel egy beépített lizin ϵ amino csoportján keresztül kötöttük fel a későbbiekben a peptideket, ezért a CNNK peptid 236-os pozíciójában elhelyezkedő lizin aminosavat kicseréltük egy glutaminra, hogy a felkötés kizárólag a peptid C terminális, lizinnel meghosszabbított végén történjen meg (CNNQK).

A peptidek komplement aktiváló képességét ELISA rendszerben vizsgáltuk. A kezdeti kísérletekben a biotinált peptideket neutravidinnel fedett lemezre kötöttük ki, majd a kevert humán szérumból a C3 depozíciót mértük. Azt tapasztaltuk, hogy a neutravidinnel fedett kontroll mintában is történt komplement aktiváció, és ezt különböző blokkolási protokollokkal sem tudtuk kiküszöbölni (23. ábra). Erre a jelenségre lehet magyarázat az avidin elleni ellenanyagok jelenléte a szérumban (124), ezért a későbbiekben csak a peptidekkel fedtük be az ELISA lemezt (24. ábra).



20. ábra. Komplement fragmens 3 depozíció detektálása neutravidinnel fedett lemezen kevert normál humán szérumban (NHS) és hőinaktivált normál humán szérumban. Biotinált humán IgG-t és a CNN peptidet vizsgáltuk, negatív kontrollnak pedig a neutravidint használtuk. ***: $p < 0.001$

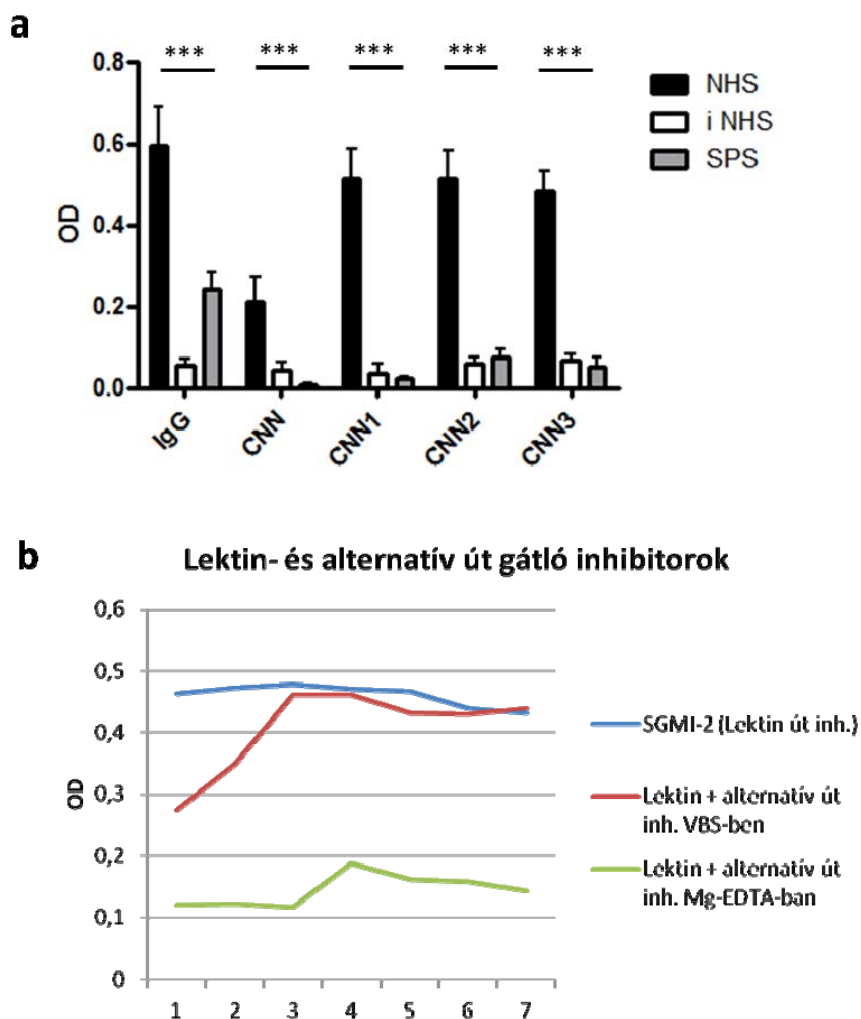
Arról is szeretnénk volna megbizonyosodni, hogy a szérumban valóban a komplement rendszer aktivációját indítják-e el a peptidok, ezért a vizsgálatot elvégeztük a kevert humán savó hőinaktivált változatával is. A hőinaktiváció 56°C -on történt fél óra alatt, és e hőhatás biztosította a komplement rendszer komponenseinek denaturációját. Az inaktivált szérumból nem történt C3 depozíció (24. ábra).



21. ábra. A komplement rendszert aktiváló peptid és annak rövidített változatainak vizsgálata sejt-mentes rendszerben. A mért OD érték arányos a komplementaktiváló képességgel. Pozitív kontrollként humán IgG-t, negatív kontrollként BSA-t alkalmaztunk. A C3 depozíció mértékét 2%-os kevert normál humán szérumban (NHS) és hőinaktivált szérumban detektáltuk. *: $p < 0.05$ ***: $p < 0.001$

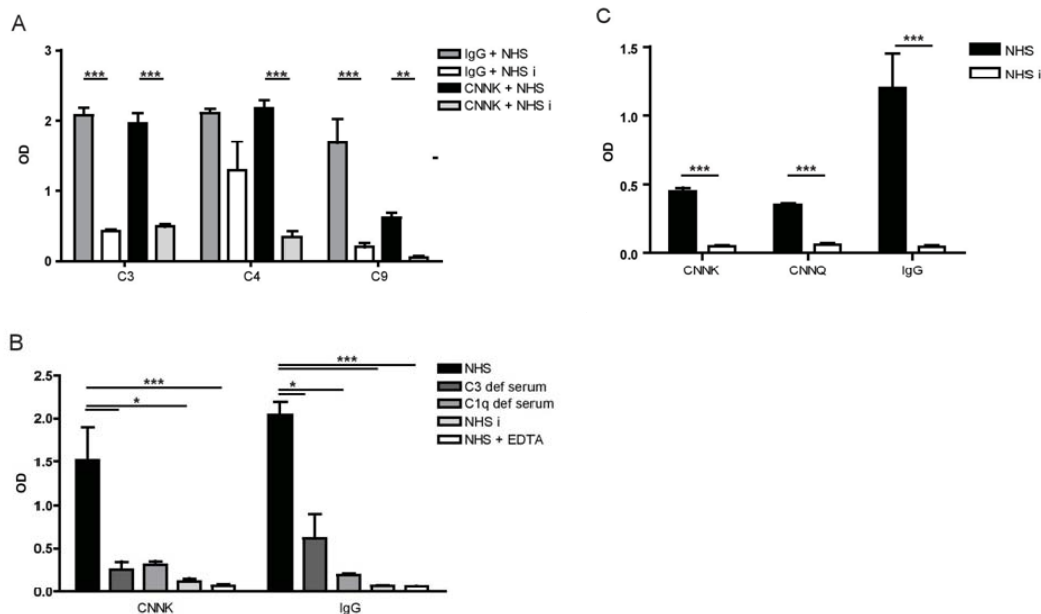
A komplement rendszert aktiváló rövid peptidek közül a CNNKTFNGTGPCT (CNN2) szekvenciáját választottuk ki, amelyet tovább vizsgáltunk az aktiválás mechanizmusának szélesebb körű jellemzése céljából. Annak feltérképezésére, hogy a peptidjeink által indukált komplementaktiváció mely komplement útvonalon történik, különböző szelektív gátlószereket alkalmaztunk kísérleteink során. Összehasonlítottuk különféle specifikus inhibitorok hatását: egy, a klasszikus utat szelektíven gátló szert, a sodium-polyanethol-szulfonsavat (SPS), a lektin útra specifikus MASP1 inhibitor, az SGM12-t, a lektin és az alternatív utat egyaránt blokkoló szerin proteáz inhibitor ecotint, valamint mindhárom útvonal blokkolásához ugyanezt az inhibitor Mg-EDTA-t tartalmazó pufferben alkalmaztuk, mely utóbbi a klasszikus út aktiválódását akadályozza meg. A normál humán szérumot (NHS) előinkubáltuk a gátlószerek különböző hígításaival és együttesen tettük a CNN peptiddel fedett lemezre (25.b) ábra). Az 25/a. ábra mutatja, hogy a HIV-1 gp120 burokfehérje aminosav-szekvenciája alapján tervezett rövid peptidek (CNN1-3) a humán IgG Fc részével összemérhető mértékben aktiválják a komplement rendszert, valamint azt, hogy az aktiváció az ún. klasszikus aktivációs úton történik, mivel SPS-sel gátolható volt. Eredményeink szerint a CNN2 peptid hatására elsősorban a klasszikus, és kisebb mértékben az alternatív út is aktiválódik (25.a,b ábra).

A klasszikus út enzimkaszkája a C1q molekulán keresztül indul el. Ezért C1q- és C3-depletált szérummal is vizsgáltuk a C3 depozíciót a CNN2 peptiddel és IgG-vel fedett lemezen. Sem a C1q-, sem a C3-depletált szérumban, sem az EDTA-val kezelt normál humán szérumban, mely az aktivációhoz nélkülözhetetlen Ca^{2+} -ot kelálja, nem történt komplement aktiváció (26/B ábra).



22. ábra. A komplement aktiváló peptidek a komplement rendszert a klasszikus és az alternatív úton keresztül aktiválják. a) A szérumot a klasszikus utat gátló sodium-polyanethol-szulfonsavval (SPS), illetve SGMI-2 lektin utat gátló inhibitorral és ecotin lektin- és alternatív utat gátló inhibitorral inkubáltuk elő (b). A gátlószereket felező hígítási sorban alkalmaztuk, 10 mM (ecotin) és 5 mM (SGMI-2) koncentrációból kiindulva a CNN2 peptiddel fedett lemezen. ***: $p < 0.001$

A komplement aktiválás során a proteolitikus hasítás eredményeként különböző komplementfragmensek keletkeznek, amelyek egy része lerakódik a komplementaktiváló felszínre, kialakítva a terminális membránkárosító komplexet (MAC), amely a lízishez a sejtmembránon C9 alegységekből álló pórusokat hoz létre. A következő kísérlet bizonyítja, hogy a CNN peptid képes a komplement rendszert a terminális komplex kialakulásáig aktiválni. A C9 lerakódását erre a komponensre specifikus ellenanyag segítségével vizsgáltuk. Az 26/A ábrán látható, hogy a CNNK peptid alkalmas a C3, C4 és C9 depozícióját előidézni az aktiváló felszínen, tehát alkalmas a membránkárosító komplex kialakítására.



23. ábra. Komplement aktiváció CNN peptiddel vagy IgG-vel fedett ELISA lemezen. (A) Komplement komponens C3, C4 és C9 depozíció aktív és hőinaktivált szérumból. (B) C3 depozícióaktív, valamint hővel vagy EDTA-val inaktivált kevert humán szérumból, valamint C3- és C1q-deficiens szérumból. (C) A CNNK peptid lizinjének glutaminra történő aminosavcsereje nem változtatott szignifikánsan a komplement rendszert aktiváló képességen. (*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

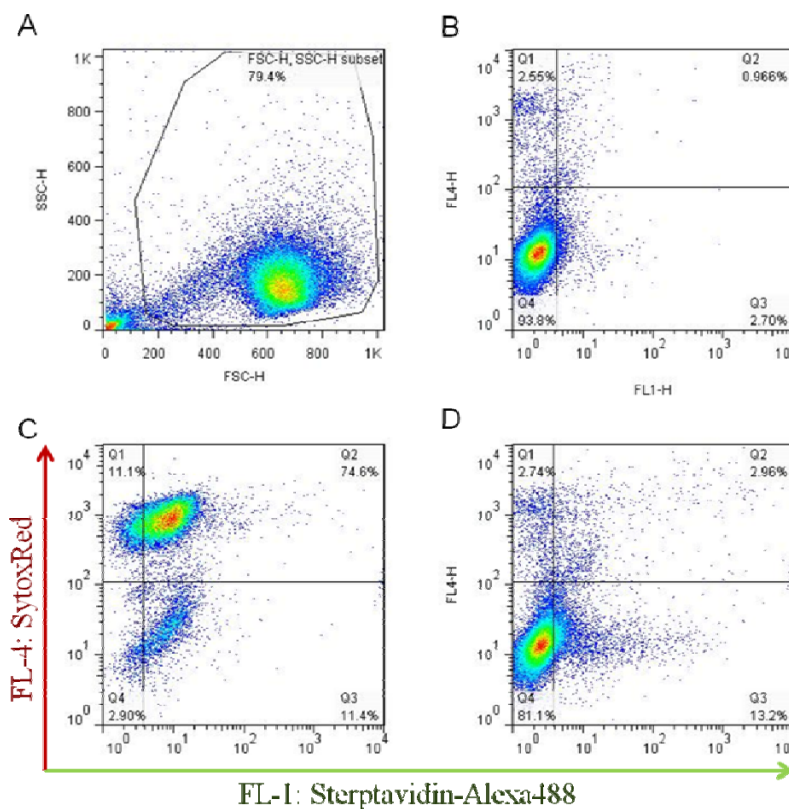
Továbbá megállapítottuk, hogy a CNNK és a CNNQ peptidek komplement rendszert aktiváló hatása között nincs szignifikáns különbség (26/C ábra). Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy az eredeti Süsal-féle peptid rövidítésével és módosításával általunk elsőként szintetizált CNNQ peptid a B sejtekhez irányítva alkalmas lehet a komplement-aktiváláson keresztül sejtpusztulást kiváltani.

6.3.2. A CNN2 peptidet és Fc γ -receptorhoz kötődő peptidet tartalmazó bifunkcionális konstrukció vizsgálata „in vitro” primer B-sejteken

A peptidek közül a CNN2-t választottuk ki további vizsgálatainkhoz. A CNN2 peptid működését sejteken először egy modellrendszerben próbáltuk ki. Olyan bifunkcionális konstrukciót hoztunk létre, ahol a biotinált CNN2 peptidet és a szintén biotinált Fc γ RII-höz

kapcsolódni tudó, korábban általunk azonosított IgG peptidet (RP) Alexa488-al jelölt streptavidinnel kötöttünk össze 2:2:1 arányban. Ennek a konstrukciónak a hatását vizsgáltuk Raji B-sejtvonal sejteiben.

Ebben a kísérleti rendszerben az RP peptid a CD32 molekulához kötődve irányítja a komplementaktiváló CNN2 peptidet a sejtekhez, ahol a komplementaktiváció eredményeként sejtlízis következik be, és a sejt elpusztul. A komplement mediált lízis következtében a sejtek membránja átjárhatóvá válik a SYTOX Red DNS-festék számára, míg az élő sejtek intakt membránján nem tud átdiffundálni a festék. A 27. ábrán látható, hogy normál humán szérumban az Alexa488-pozitív sejtek 74,6%-a elpusztult, míg inaktivált szérumban ez nem következett be.



24. ábra. Raji sejtek CNN2-RP bifunkcionális peptidkonstrukció által kiváltott komplement-függő lízise. A) Raji sejtek autofluoreszcenciája. A sejtörmelék kikapuzásával vizsgáltuk a pusztulás mértékét. B) StreptavidinA488 normál humán szérumban. A bifunkcionális tetramerek által kiváltott sejtpusztulás aktív (C) és inaktív (D) szérumban hatására. A két jobb oldali kvadránsban (Q2,Q3) a streptavidinAlexa488- pozitív sejtek, a két felső kvadránsban (Q1,Q2) pedig a SytoxRed festéket felvett elpusztult sejtek láthatóak.

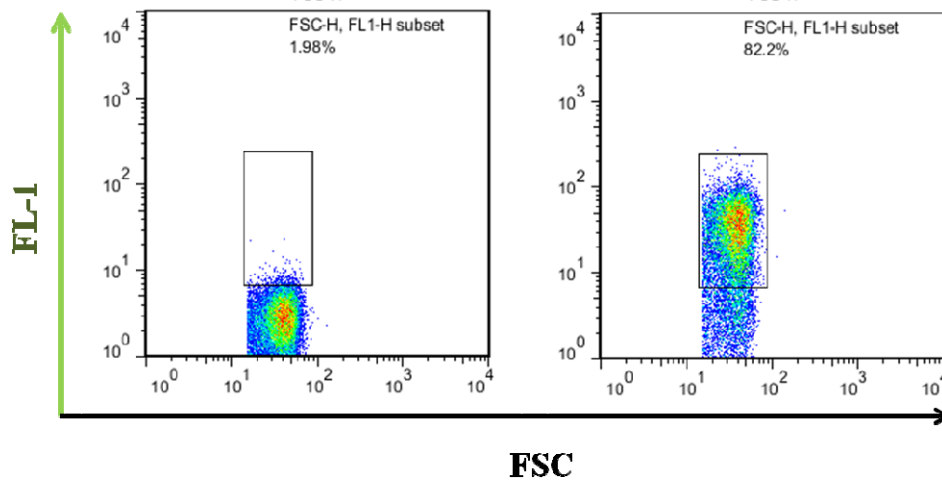
Megállapíthatjuk, hogy a CNN2 jelű peptid a terminális komplex kialakulásáig aktiválja a komplementrendszer és a B sejtekhez irányítva képes kiváltani a komplement-függő citotoxicitást.

6.4. Irányított lízis PLGA nanopartikulmhoz kapcsolt komplement rendszer aktiváló peptiddel és autoepitóppal

A polimer nanorészecskék alapanyaga politejsav/glikolsav kopolimer (PLGA) mely az élő szervezetben nem toxikus, metabolizálható vegyületekké bomlik enzim-katalizált hidrolízis által (125).

6.4.1 PLGA nanopolimerek vizsgálata

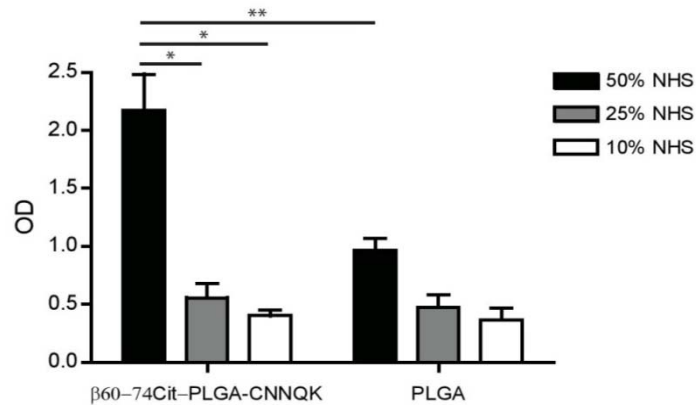
Az általunk alkalmazott PLGA nanopartikulumok mérete körülbelül 130 nm-re tehető. Az áramlási citofluorimetriás vizsgálatokhoz fluorszceinnel töltöttük fel, mely az FL-1 csatornában világít. A mérések során kiderült, hogy nem képez aggregátumokat (28. ábra).



25. ábra. PLGA nanopartikulumok vizsgálata áramlási citofluorimetriával. A bal oldali panelen a festékekkel nem feltöltött nanopolimerek, a jobb oldali panelen pedig a fluoreszcenciával feltöltött, világító PLGA-k láthatóak.

6.4.2. A CNNQK peptiddel fedett biodegradábilis PLGA komplement aktiváló képességének vizsgálata

A CNNQK peptid komplement aktiváló képességét a szolubilis C5b-9 komplex formációjának mérésével vizsgáltuk humán szérumból. 50 %-os szérumhígításnál szignifikánsan több terminális komplex képződött a peptiddel konjugált nanopartikulumok alkalmazásával, mint a fedetlen polimerek esetében (29. ábra).

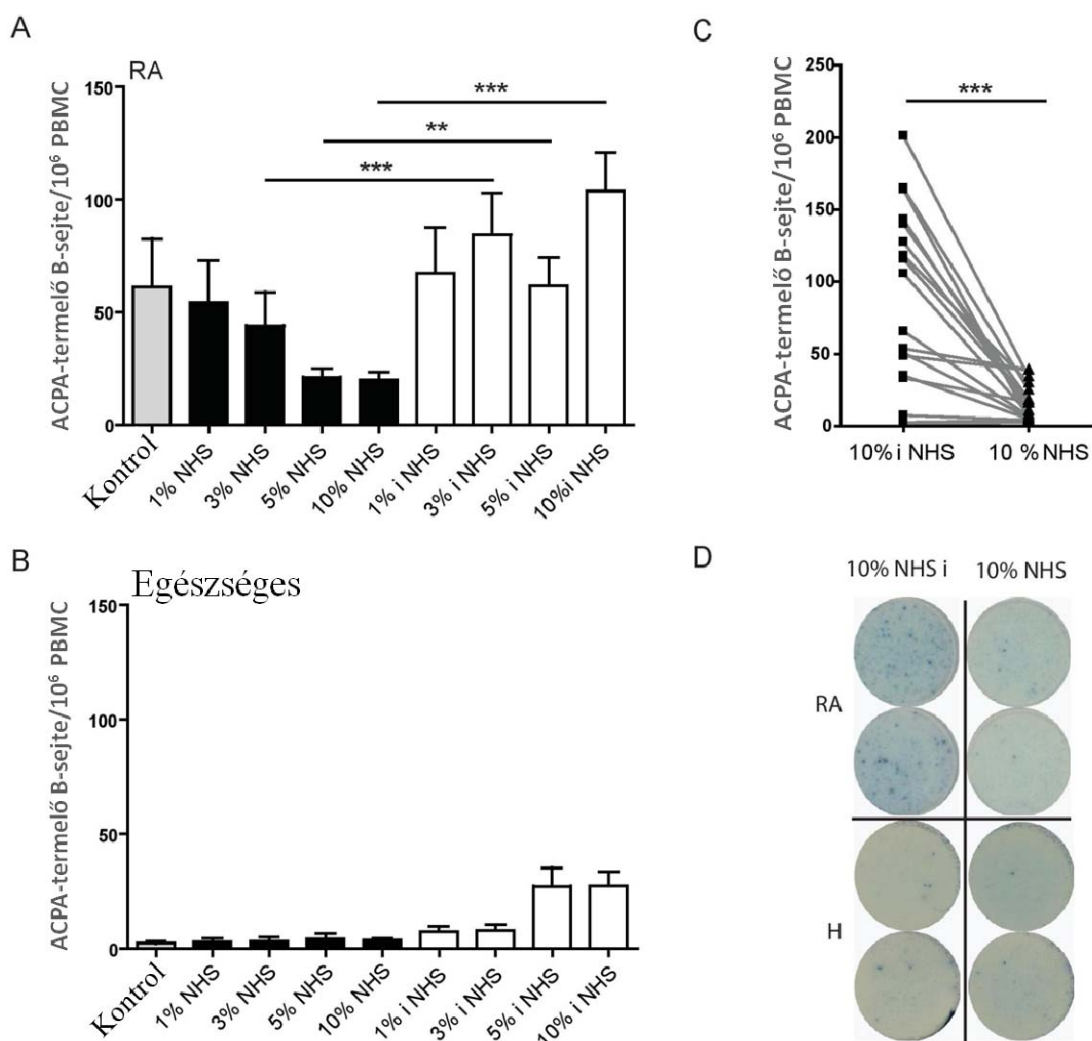


26. ábra. A CNNQK és a β60-74Cit peptidekkel kapcsolt PLGA nanopolimer aktiválja a komplement rendszert. A nanopolimernek 50%, 25% és 10 % normál humán szérummal történő inkubációját követően a szolubilis C5b-9 komplexet mértem a felülűszóból a kit protokollja alapján (*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$).

6.4.3. A PLGA nanorészecskékhez kötődő bifunkcionális peptidkonstrukciók hatása a RA B-sejtek *in vitro* ellenanyag termelésére.

Az RA B-sejtek *in vitro* sejt kultúrában CpG stimulus hatására citrullin tartalmú fibrin β peptid specifikus ellenanyagot termelnek, amelyet ELISA módszerrel mutattunk ki (13. ábra). Következő lépésként beállítottuk az ellenanyagtermelő sejtek ELISpot módszerrel történő detektálását, amely lehetőséget ad az ellenanyagtermelő sejtek számának meghatározására. Ehhez különböző szérumhígítások jelenlétében vizsgáltuk a biológiailag lebomló PLGA nanorészecskékhez kötött fibrin β peptid és a komplement aktiváló CNNQK peptid komplex hatását a peptid-specifikus ellenanyagot termelő sejtekre.

Eredményeink azt mutatják, hogy a β60-74Cit-CNNQK-PLGA nanorészecske konstrukció, amely B-sejtekhez irányító fibrin peptidet és a komplementet aktiváló peptidet is tartalmazza, szérum jelenlétében szignifikánsan csökkenti a peptid-specifikus ellenanyagot termelő sejtek számát, feltehetőleg a β60-74Cit specifikus sejtek irányított, komplement-közvetített elpusztítása miatt, és a pusztulás mértéke nő a szérum koncentráció emelésével (30. ábra).

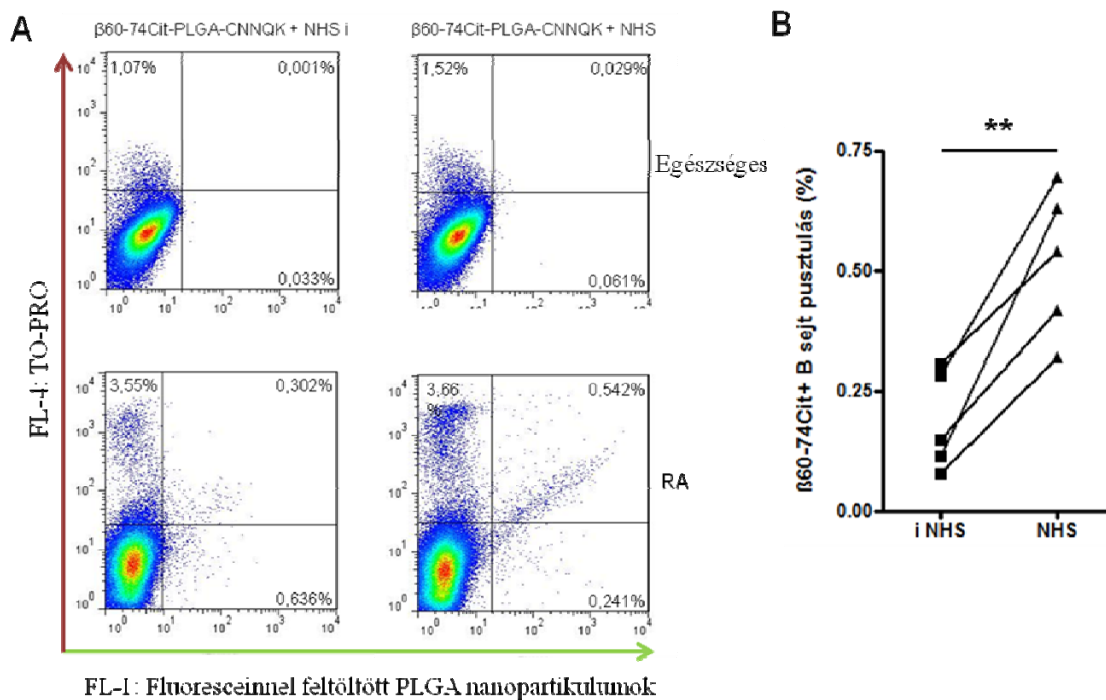


27. ábra. A β 60-74Cit és CNNQK peptidekkel fedett bifunkcionális nanopolimer gátolja a β 60-74Cit-specifikus ellenanyagok szintézisét komplement forrás jelenlétében. A) RA betegek ($n=17$) és B) egészséges véradók ($n=5$) PBMC kultúrái TLR7/8 agonista R848-al és IL-2-vel voltak stimulálva 72 óráig, majd a bifunkcionális nanopartikulumokkal és aktív (NHS) vagy inaktív (iNHS) szérummal voltak inkubálva. A β 60-74Cit-specifikus IgG-pozitív plazmasejtek számát ELISpot módszerrel határoztuk meg. C) A 10% NHS-ben történő inkubáció hatására a betegek β 60-74Cit-specifikus B-sejtejének száma szignifikánsan csökkent. D) Egy reprezentatív ELISpot ábra. Statisztika: párosított t-próba, középérték \pm standard deviációt ábrázoltuk (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). *ACPA* anti-citrullinated protein antibody (anti-citrullinált fehérje/peptid antitestek), *PBMC* peripheral blood mononuclear cell (perifériás vér mononukleáris sejtei), *RA* reumatoid artritisz.

6.4.4. A PLGA nanorészecskékhez kötődő bifunkcionális peptidkonstrukciók B-sejt pusztító hatásának kimutatása

A kísérletben olyan RA-s betegek perifériás véréből izolált tisztított, aktivált B-sejteket vizsgáltuk, amelyeknek a szérumból kimutattuk a citrullinált fibrin epitóra specifikus ellenanyagok jelenlétét. Negatív kontrollként egészséges vérből szeparált B-limfocitákat alkalmaztunk. A fluoreszcenciával feltöltött bifunkcionális nanorészecskéket jégen inkubáltuk a B-sejtekkel, majd a mosást követően aktív vagy hőinaktivált kevert humán szérumot adtunk a mintákhoz. Az áramlási citofluorimetriás mérés során a kultúrában elpusztult B-sejteket 7-AAD sejtmagfestékkel kapuztuk ki, míg a terminális komplex által kiváltott pusztítást TO-PRO-3 DNS festékkel mutattuk ki. A nanorészecskéket felismerő B-sejtek az FL-1-es csatornában világítanak, az elpusztult sejtek pedig az FL-4-es csatornában. A kiértékelés során az elpusztított autoreaktív B-sejt populáció a mindkét fluoreszcens festékre pozitív jobb felső kvadránsban detektálható. Az inaktivált szérumhoz képest aktív szérum jelenlétében szignifikánsan emelkedik az elpusztult, β 60-74Cit-specifikus autoreaktív B-sejtek száma (31/B ábra). Az egészséges vérből izolált B-sejtek között nem mutathatóak ki autoreaktív B-sejtek (31/A.ábra).

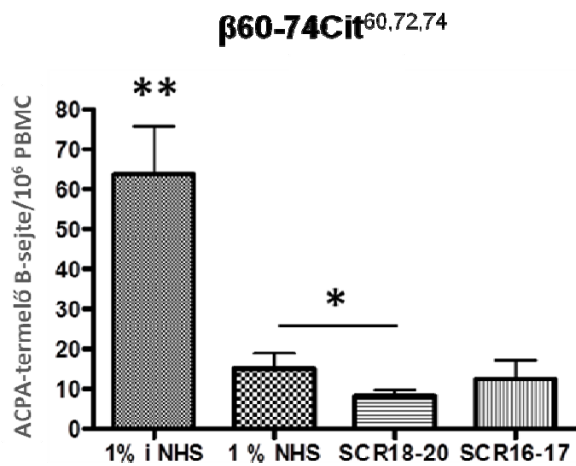
Eddigi eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy sikerült olyan bifunkcionális peptidkonstrukciót létrehozni, amely biológiailag lebomló nanogyöngyökhöz kötve *in vitro* rendszerben szérum jelenlétében irányítottan elpusztítja a citrullinált peptid specifikus autoreaktív B-sejteket.



28. ábra. A komplement-aktiváló peptiddel és autoepitóp peptiddel fedett bifunkcionális PLGA nanopartikulumok citotoxikus hatással vannak szérum jelenlétében a $\beta 60-74\text{Cit}$ -specifikus B-sejtekre. A) A felső panelben egy reprezentatív ábra látható egy egészséges donor B-sejtjeiről, az alsó panelben pedig egy RA-s beteg B-sejtjeiről. A $\beta 60-74\text{Cit}$ -specifikus elpusztított B-sejtek a dot plot jobb felső kvadránsában detektálhatóak. B) 5 RA-s beteg adatai láthatóak összesítve. Statisztika: párosított t-próba, középérték \pm standard deviáció van ábrázolva (** $p < 0.01$).

6.4.5. A komplement aktiváció fokozása a H-faktorról kompetáló SCR18-20 doménnel

Előkísérleteket végeztünk a bifunkcionális konstrukciónk hatékonyabbá tételéhez, amit úgy közelítettünk meg, hogy a komplement rendszer egyik gátló fehérjéjének, a H-faktornak a sejtfelszínhez való kötődését gátoltuk a H-faktor ezen funkciójáért felelős három doménjét tartalmazó SCR18-20 rekombináns fehérjével. Az SCR18-20 hatására a $\beta 60-74\text{Cit}$ peptidre specifikus ellenanyagtermelő B-sejtek száma tovább csökkent, míg a kontrollként alkalmazott SCR16-17 nem befolyásolta a komplement rendszer működését (32. ábra).



29. ábra. A H-faktor sejtfelszínhez való kötődésének gátlása növelte a komplement-mediált lízis hatékonyságát. A kísérletet során 13 RA-s beteg PBMC-jét használtam fel. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

7. Diskusszió

Doktori munkám célja a reumatoid artritiszben patogén autoantitesteket termelő B-sejtek specifikus depléciójára alkalmas módszer kifejlesztése volt. A klinikai vizsgálatok során alkalmazott B-sejt depléciós terápiák jótékony hatása igazolja, hogy a B-sejteknek kulcs szerepe van a betegség lefolyásában (126-128). A rituximab terápia az autoellenanyag titerét csak kis mértékben csökkenti, ellenben a betegek immunszuppresszált állapotba kerülnek, ezért megnő a fertőzések esélye (126, 129, 130). A specifikus, autoreaktív sejteket célzó terápiákkal lehetne kiküszöbölni ezt a problémát.

Ehhez egyfelől az RA B- sejteket célzó, a BCR hez specifikusan kötődő citrullin tartalmú peptidet kerestünk, másfelől Fc γ R-függő fagocitózist, illetve a komplement rendszer aktiválásán keresztül sejt lízist kiváltó peptideket vizsgáltunk meg, majd a megfelelő peptideket optimalizáltuk a bifunkcionális, B- sejteket pusztító konstrukció létrehozásához.

Az epitóp peptid vizsgálata során a Budai Irgalmasrendi kórház RA-s betegek szérummintáinak pozitivitását teszteltük az ismert, citrullint tartalmazó 15mer fibrin β autoepitóp peptiddel szemben (75). Eredményeink szerint az RA-s betegek mintegy 52 %-a bizonyult pozitívnak, amennyiben az N-terminálison biotinált fibrin peptiddel szemben vizsgáltuk. A C-terminálison biotinált fibrin β epitóp nem volt használható diagnosztikai vizsgálatra, ami azt sugallja, hogy a C-terminális végen elhelyezkedő citrullineknak kitüntetett szerepe van a felismerésben, és az autoantitestek számára sztérikusan nehezebben hozzáférhető ez az epitóp, ha ezen keresztül történik a lemezre kötés.

Következő kérdésünk az volt, hogy a szeropozitív RA betegek in vitro sejt kultúrában stimulált B-sejtjei termelnek-e a 15mer citrullinált β fibrin peptidre specifikus ellenanyagot. Az autoreaktív B-sejtek száma nagyon alacsony (131), és az autoellenanyagok a citrullinált peptidre alacsony affinitásúak, (132, 133) ezért stimuláltuk a memória sejteket (134).

A kultúrák felülűszójából készített ELISA mérések alapján megállapítottuk, hogy szignifikánsan több ellenanyagot termelnek az autoreaktív B-sejtek a citrullin-, mint az arginin-tartalmú peptid ellen, és a citrullin-tartalmú fibrin β peptid alkalmas a peptid-

specifikus ellenanyagtermelés kimutatására. Az egészségesekből származó B-sejtek nem termeltek egyik peptid ellen sem ellenanyagot. A nem-specifikus stimulusok jelenléte, mint a TLR9 agonista CPG oligodeoxi nukleotid, és a B-sejt aktiváló faktor (BAFF) jelentősen növelték a ellenanyag termelés mértékét.

A citrullinált peptid kötődése aviditásának növelésére, az N-terminálison biotinált 15mer fibrin β autoepitóp peptid FITC-cel jelölt streptavidinnel konjugált mikrogyöngyhöz kapcsolva specifikusan kötődött a peptidre szeropozitivitást mutató RA betegek B-sejtjeinek 2-3 %-ához, amelyek feltehetően a betegekben a citrullinált fehérjét felismerő B-sejteket reprezentálják, így megállapítottuk, hogy ez a peptid alkalmas a B-sejtek célzására.

Az effektor peptidek vizsgálata során először a különböző Fc γ receptorokhoz kötődő peptidek fagocitózist kiváltó képességét teszteltük, valamint beállítottuk az ellenanyaggal fedett B-sejtek makrofágok általi fagocitózisának kísérletes rendszerét. Az Fc γ receptorokhoz kötődő peptidekkel fedett fluoreszkáló mikrogyöngyök a kontroll, csupasz gyöngyökhöz képest alig váltottak ki nagyobb fagocita aktivitást az U937 sejtekből, annak ellenére, hogy a sejtek fagocitáló képessége jól működött, hiszen a humán IgG-vel fedett gyöngyöket nagymértékben bekebelezték. Egy modell rendszerben bemutattuk, hogy a primer makrofágok képesek bekebelezni az aktiváló Fc receptorhoz kötődő módosított Fc résszel rendelkező CD19 ellenanyaggal fedett, vérből izolált B-sejteket, de ezeket a kísérleteket nem folytattuk. A kis mértékben fagocitózist aktiváló Fc peptidekkel kapott eredményeink alapján megállapítottuk, hogy ezek a peptidek nem alkalmasnak céljaink elérésére, a célzott, citrullinált fehérje-specifikus B-sejtek Fc-függő fagocitózissal való elpusztítására.

Ezért a továbbiakban áttértünk egy másik sejtpusztító effektor mechanizmus, a komplement-mediált lízis vizsgálatára. A korábban leírt, HIV-1 gp120 fehérjéből származó peptid rövidített, szubsztituált szekvenciáit használtuk, amelyek közül kiválasztottuk az optimális szekvenciát, amellyel B-sejtek lízisét lehet majd kiváltani. Szérum jelenlétében a peptid hatására a komplement kaszkád egészen a terminális komplex kialakulásáig végigmegy. A komplement útvonalak szelektív gátlása alapján elmondható, hogy a peptid a klasszikus és az alternatív úton keresztül indítja el a komplement kaszkádot.

A PLGA nanopartikulumok felszínére kapcsolva a CNNQK peptid humán szérumban inkubálva elősegítette a szolubilis C5b-9 terminális komplex képződését, így feltételezhetően a bifunkcionális részecskék képesek lesznek sejt-lízist kiváltani.

A célzás kivitelezéséhez és az aviditás mértékének növeléséért kapcsolunk nanopartikulumokhoz a peptideket, amelyek biodegradábilisak, nem immunogének és nem toxikusak, ezért *in vivo* alkalmazhatóak (135). A bifunkcionális nanopartikulumok gátolták a szeropozitív RA-s betegek véréből izolált autoreaktív B-sejtek fibrin β 60-74Cit peptidekre specifikus ellenanyagtermelését. Az áramlási citofluorimetriás mérések pedig bizonyították, hogy a β 60-74Cit-specifikus B-sejt populáció a bispecifikus konstrukció hatására szérumban jelenlétében elpusztult.

A komplement-mediált lízis fokozása céljából a C3 inaktivációjáért felelős szérumban fehérje, a H-faktor funkcióját gátoltuk, úgy, hogy a sejtfelszínhez való kötődésért versengenie kell a csak ezért a funkcióért felelős doménjeivel. A kísérletekből kiderült, hogy bifunkcionális konstrukció által kiváltott komplement függő sejtpusztulás valóban szignifikánsan növekedett, bizonyítva, hogy a kombinált terápia esetleg hatékonyan működhetne *in vivo* is.

Sikerült tehát előállítanunk egy biodegradábilis nanopartikulumokhoz kapcsolt, kettős funkció kiváltására alkalmas peptid konstrukciót, amely *in vitro* rendszerben szelektíven képes elpusztítani azokat a B-sejteket, amelyekhez hozzákötődik. Ez alapja lehet további konstrukciók előállításának, melyekben a szérumban ACPA jelenléte alapján lehetne szűrni, hogy a beteg mely autoepitóp peptidekre pozitív és így a jövőben, új, személyre szabott terápia fejlesztése válhatna lehetővé. Bár csak egy autoepitóppal végeztük el kísérleteinket, feltételezzük, hogy a bispecifikus konstrukció működne más epitóp peptiddel is. A betegség előrehaladtával nő az autoantigének száma (41), ezért egy előzetes szérumban tesztelést követően többféle epitóp peptiddel fedett nanopartikulumból készült keveréket is lehetne alkalmazni egy személyre szabott terápia során.

Munkánkban újdonságnak számít, hogy peptidekből alakítottuk ki a bifunkcionális konstrukciót, és az is hogy biodegradábilis (biológiai úton lebomló) nanopartikulumokhoz kötöttük azokat. A B-sejtek elpusztítására irányuló, RA-ban jelenleg alkalmazott biológiai terápia során a B-sejteken jelenlevő CD20 molekulákat specifikusan felismerő kiméra monoklonális ellenanyagot (Rituximab, MabThera) alkalmazzák. Ez a terápia a keringésben levő valamennyi B-sejtre kifejett hatása következtében átmenetileg immunszuppresszált állapotot hozhat létre, amely alatt a beteg védtelen a különféle fertőzésekkel szemben. A hatásmechanizmust tekintve az anti-CD20 terápia többek között fagocitózis indukció, és ellenanyagtól függő citotoxikus reakció útján valósulhat meg (136).

Korábbi szabadalmak és tudományos szakfolyóiratokban megjelent közlemények is ismertek, amelyekben célul tűzték ki bispecifikus konstrukciók készítését autoreaktív B-sejtek szelektív eltávolítása céljából (WO00216414A2, WO03068822A2), míg mások tumor sejtek eltávolítására alkalmaztak bifunkcionális ellenanyag konstrukciókat (137).

Mindezekről az általunk alkalmazott konstrukció több szempontból is eltér. Mi szintetikus peptideket alkalmazunk mind a célzásra, mind az effektor funkciók aktiválására, ezzel jóval nagyobb szelektivitást biztosítva. A peptidek nagy előnye, hogy kis méretük miatt jóval kisebb az immunogenitásuk, mint a fehérjéknek. Ezek általában rövid szekvenciák (10-15 aminosav), amelyek szintézise, tisztaságellenőrzése költséghatékony módon megvalósítható. További előny, hogy a peptidek nagy specifikitást mutatnak, a bifunkcionális konstrukciók az azt nem megkötő sejteket nem, csupán a peptideket felismerő, kóros sejteket pusztítják el. Továbbá lényeges, hogy kapcsoló ágensként biológiailag lebomló nanopartikulumokat alkalmazunk, melyek egyben biztosítják a megfelelő felszint és denzitást a peptidek számára és nagyobb aviditású kötődést tesznek lehetővé.

A PLGA nanopolimerek előnyös tulajdonsága, hogy felszínükre nagy sűrűségben lehet molekulákat kapcsolni. A nano- ill. mikrogyöngyöket többféle célra alkalmazzák: legtöbbször valamilyen hatóanyag célzott sejtbejuttatására (111). Ebben az esetben a nanopartikulumok belsejében van a hatóanyag, a felszínen pedig az irányítást végző molekula, amely az adott célsejtbe viszi a mikrogyöngyöt. Irányításra mindaddig valamilyen fehérje molekulát, vagy ellenanyagot alkalmaztak (36. ábra).

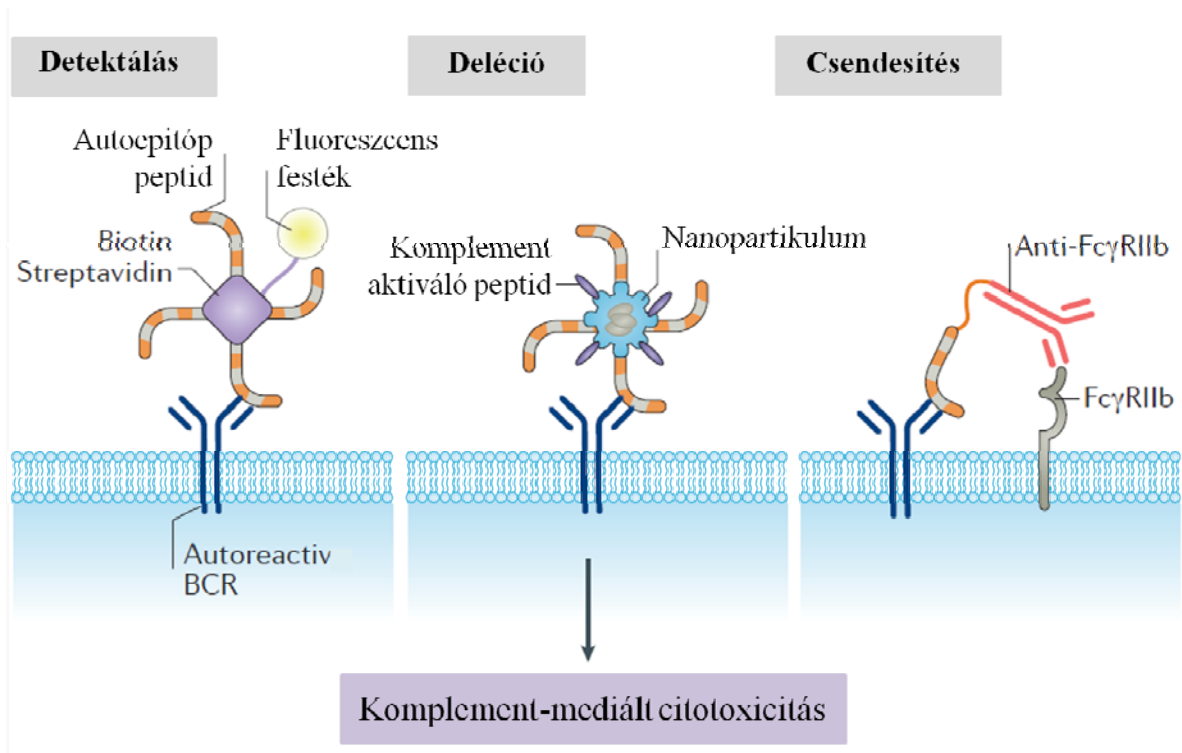
A nanopolimerek felszínén kialakított bifunkcionális peptidkonstrukció a szervezet saját effektor mechanizmusait aktiválva, kétféle sejt, vagy a célsejt és komplement fehérjék összekapcsolását válthatja ki, ami a kóros sejtek célzott elpusztítását eredményezi, miközben más sejtek nem sérülnek. Tudomásunk szerint egyik funkció kiváltására sem alkalmaztak eddig szintetikus peptideket, sem ezek kombinációját biológiailag lebomló gyöngyökkel.

Az autoantigén-specifikus immunterápiák fejlesztéséhez első lépésként az autoreaktív B- és T-sejtek által felismert autoepitópok azonosítására van szükség amelyekkel célozni lehet ezeket a kóros folyamatokért felelős immunsejteket. Az autoreaktív sejteket nehéz kimutatni alacsony előfordulásuk miatt. Ezen kísérletek nagy részét állatmodellekben vagy *in vitro* rendszerekben dolgozták eddig ki.

Autoreaktív B-sejtek kimutatásában úttörő volt Diamond és munkacsoportja, akik anti-dsDNS ellenanyagokat felismerő duplaszálú DNS mimotóp peptideket szintetizáltak fág bemutató technikával (138). A biotinizált DWEYSVWLSN epitópot tetramerizálták és fluorkrómmal jelölték, így az SLE egérmodelljében és lupusos betegek perifériás véréből is ki tudták mutatni a dsDNS-specifikus B-sejteket (139, 140) (33. ábra).

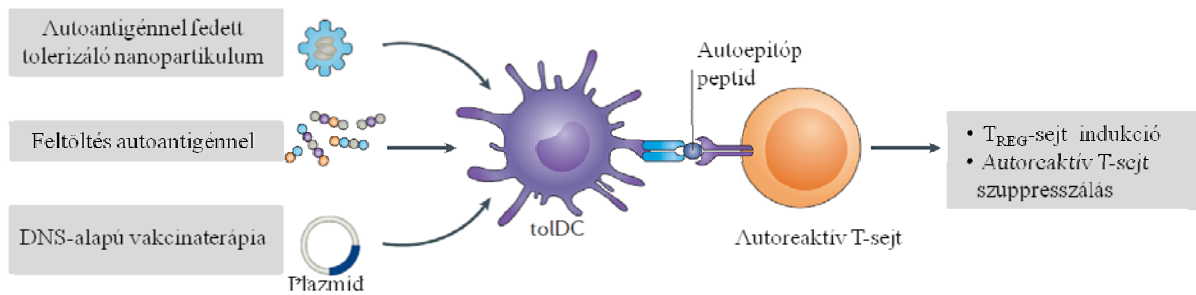
ACPA⁺ B-sejteket először Kerkman és munkacsoportja mutatott ki és karakterizált RA betegek perifériás véréből fluoreszcensen jelölt, streptavidinnel tetramerizált CCP2 peptiddel. A kultúrába kitett izolált B-sejtek ACPA-termelő képessége alapján bizonyították, hogy az autoreaktív B-sejteknek felelnek meg (131) (33. ábra).

Az autoepitópokkal csak a BCR-rel rendelkező B-sejteket lehet célozni. Az érett plazmasejtek felszínén a BCR expressziója nem kimutatható, mivel az a B-sejt receptorral megegyező specificitású ellenanyagot szekretál. A plazmasejtek célzásához egy plazmasejt-specifikus ellenanyag F(ab)₂ fragmentuma, mint a CD138, és az antigén vagy autoantigén epitóp konjugációja lehet egy megoldás (141). Taddeo és munkatársai kifejlesztettek egy stratégiát, melyben a plazmasejtek felszínéhez szelektíven kötődő komplexben az antigénhez kötődő szekretált elleneanyag a sejt komplement-mediált lízisét válthatja ki (142). Az autoreaktív plazmasejtek így a többi, védelmi funkciót ellátó plazmasejt depléciója nélkül eliminálhatóak (143) (33. ábra).



30. ábra. Stratégiák az autorektív B-sejtek vagy autoellenanyagok kimutatására és/elpusztítására vagy elcsendesítésére. Az autorektív B-sejtek **detektálása** fluoreszcensen jelölt avidin és a biotinilált autoepitópok tertamerjein keresztül. Az autorektív B-sejtek szelektív **depléciója** nanopartikulumokhoz (NP) kapcsolt komplement rendszert aktiváló és autoepitóp peptiddel. A NP kapcsolódik a BCR-hez és a komplement kaskád lizálja a sejtet. Egy autoepitóp peptid és egy anti-CD32 ellenanyag keresztköti a BCR-t és a gátló FcγRIIb receptort, ezáltal **csendesíti** az autorektív B-sejteket (26).

Az autorektív sejteket közvetlenül el lehet pusztítani, ahogy azt mi is kidolgoztuk, vagy a regulátor B-sejtek, regulátor T-sejtek, tolerogén dendritikus sejteken keresztül immuntoleranciát is lehet indukálni, mely gátló hatással bír a káros sejtekre. Az autológ DC-eket *in vitro* fel lehet tölteni az autoepitópokkal és visszajuttatni a szervezetbe, vagy az autoepitópot egy plazmával is be lehet juttatni a szervezetbe a DNS-alapú vakcina terápia során (144) (34. ábra).



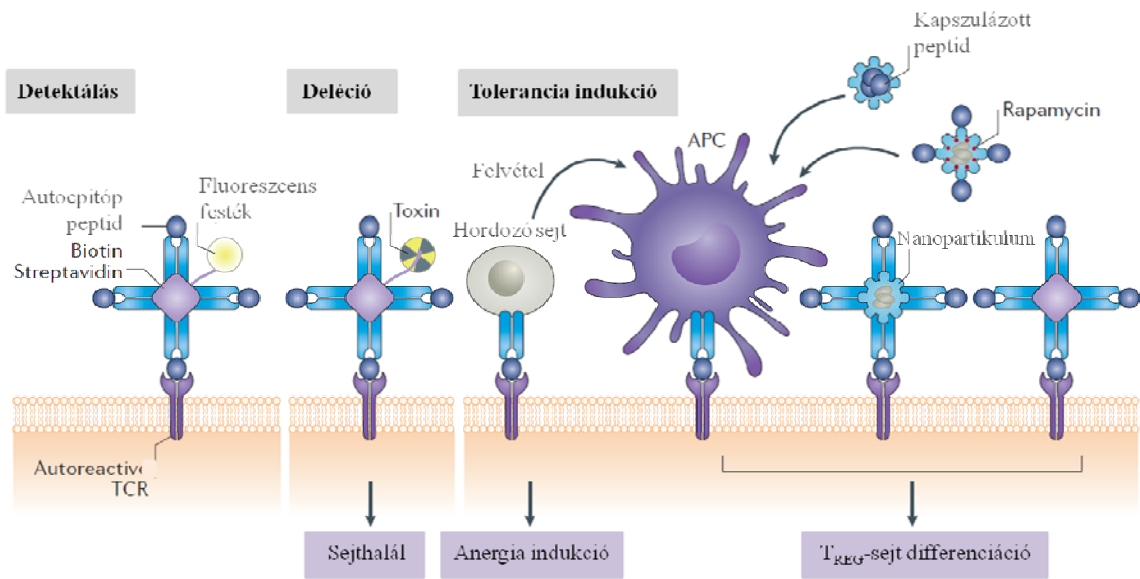
31. ábra. A tolerogén DC-k indukciója és feltöltése autoantigénnel vagy autoantigénnel fedett nanopartikulummal toleranciát válthat ki az autoraektív T-sejtektől. A DNS-alapú vakcina terápia során egy plazmiddal van lehetőség bevinni a tolerogén DC-be az autoepitópot, amelynek prezentációjával az autoreaktív T-sejt aktivitása gátlódik vagy a T-sejt T_{REG} -sejtté alakul (26).

Az autoantigén-specifikus célzásnál azt is figyelembe kell venni, hogy az RA-betegek B- és T-sejtjei különböző citrullinált epitópotokat ismerhetnek fel és ezeknek a száma a betegség előrehaladtával tovább nőhet (41). Ennek a problémának a kiküszöbölésére Gertel és munkatársai több citrullinált autoantigén epitópjaiból szintetizáltak egy citrullinált multi-epitóp peptidet, tolerancia kiváltása céljából. A multi-epitóp peptidet adjuváns indukálta artritisz állatmodellen vizsgálta patkányokban, ahol a betegség javulása a megnövekedett regulátor T-sejt populáció és a T_H17 populáció emelkedett mértékű apoptózisával volt összefüggésbe hozható (145, 146).

A tolerogén DC-k (tolDC) a saját-antigén bemutatással egyidőben immunszuppresszív citokineket is termelnek, így egyszerre gátolják az autoraktív T-sejteket, valamint stimulálják a regulátor T-sejteket és RA-ban a T_H2 -es immunválaszt is erősítik. A tolDC-ket IL-4 és retinolsav vagy IL-10 és TGF- β jelenlétében lehet generálni. Az RA állatmodelljeiben a tolDC-k TGF- β -t termeltek, T_{REG} és T_H2 választ stimuláltak, melyek hatására csökkent a betegség kialakulásának mértéke (147) (1. ábra). Egy nyílt jelölésű (open-label) klinikai kísérlet alkalmával (Rheumavax) 18 HLA-DR shared epitóp-pozitív RA-s betegből differenciáltattak autológ tolDC-t, majd citrullinált peptidekkel feltöltve juttatták vissza a szervezetükbe. A kezelés a T_{REG} sejtek indukcióját, ugyanakkor az effektor T-sejtek számának, valamint gyulladási citokinek mennyiségének csökkenését eredményezte (148). Egy másik klinikai kipróbálás során, (AuToDeCRA) a szinoviális folyadék antigénjeivel töltötték fel az autológ DC-eket és ezt adták vissza a betegnek, ami után a gyulladás mértékének csökkenése volt megfigyelhető (149) (34. ábra).

A tímuszban termelődő regulátor T-sejteknek fontos szerepük van a tolerancia fenntartásában. A T_{REG}-sejtek homeosztázisát érintő rendelleneségek okozhatják az artritisz vagy egyéb autoimmun betegségek kialakulását (150). Leavenworth és munkatársai az RA egyik állatmodelljében, a kollagén indukált artritiszes egerekben T_{REG} sejteket indukáltak, mely a gyulladás mértékének, valamint a kollagén-specifikus ellenanyagok termelődésének csökkenésével járt. A tetramerizált, MHC Ib molekulacsaládba tartozó Qa-1 fehérjét kapcsolták a HSP60p216 hősokkfehérjéhez, mely CD8⁺ T_{REG}-sejtek aktivációját és expanzióját indukálta, amely a patogénikus folliculáris T-helper sejtek és a T_H17-sejtek funkcióját gátolták és ennek következtében a gyulladás és az autoellenanyagok termelődésének csökkenése mérhető volt (151) (35. ábra). Ez arra utal, hogy a regulátor T-sejtek indukálása, - akár autoepitóp peptidekkel - szintén egy lehetséges jövőbeni terápiás lehetőséggé válhat.

Clement-Casares és munkatársai a FOXP3-CD4⁺CD25⁻, IL-10 és IL-21 citokineket termelő T_R1 regulátor T-sejt populáció indukációját nanorészecskék felszínére kapcsolt MHC II - autoepitóp peptid komplexekkel érték el különböző autoimmun betegségek egérmodelljeiben. Ezen nanorészecskék hatására az autoreaktív T-sejtek T_R1-sejtekké differenciálódtak, melyek gátolták az antigénprezentációt és serkentették a gyulladáscsökkentő regulátor B-sejtek keletkezését anélkül, hogy az immunrendszer egyéb mechanizmusai módosultak volna. Az egyes típusú diabétesz non-obese diabetic (NOD) egérmodelljében, a szklerózis multiplex experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) egérmodelljében és az RA CIA (collagen induced arthritis) modelljében is képesek voltak a betegségre specifikus peptid-MHC II komplexekkel fedett nanorészecskék segítségével T_R1-szerű helper T-sejteket létrehozni, melyek enyhítették a betegségek tüneteit (152). Tehát a peptid-MHC-komplexen alapuló nanomedicina is egy lehetséges terápiás megközelítés, amely képes a komplex autoimmun választ betegség- és szervspecifikusan gátolni (35. ábra).



32. ábra. Stratégiák az autoreaktív T-sejtek neutralizálásához vagy újraprogramozásához. Az autoreaktív T-sejteket fluoreszcens festékekkel kapcsolt MHC-peptid tetramerekkel lehet detektálni, illetve MHC-peptid tetramerek toxinnal konjugálva a peptid-specifikus T-sejteket pusztítják el. Ha az MHC-vel feltöltött autoepitópokat apoptotikus testhez kapcsoljuk, akkor az anergiát fog kiváltani az epitópot felismerő T-sejtnél. A tolerogén DC-k indukciója és feltöltése autoantigénnel fedett vagy feltöltött nanopartikulummal T-sejtes toleranciát indukálhat. A tetramerizált, vagy nanopartikulumokhoz kapcsolt MHC-peptid komplexek direkt módon is indukálhatnak toleranciát (26).

A jelenleg alkalmazott terápiák autoimmun betegségekre nem nyújtanak végső megoldást, inkább a tüneteket enyhítik és - mellékhatásként - az immunrendszert gyengítik. Az antigénspecifikus terápiák nagy előnye, hogy csak az autoreaktív sejteket célozzák. Ehhez a megközelítéshez a legnagyobb kihívás, hogy az autoantigének pontos ismerete szükséges egyénenként. A már ismert epitópok alkalmazásával a közeljövőben is várhatóak új, autoantigén-specifikus terápiák fejlesztése autoimmun kórképekre.

8. Új tudományos eredmények

- RA-s betegek perifériás véréből kimutattuk a 15mer citrullinált fibrin β peptide pozitív autoreaktív B-sejteket.
- Az *in vitro* aktivált RA B-sejtek sejt kultúrájában kimutattuk a citrullinált fibrin β peptide specifikus autoellenanyag-termelést.
- Szintetizáltunk és optimalizáltunk egy módosított, a komplement rendszert aktiváló peptidet (CNNQK, ²³³CNNQTFNGTGPCTNV²⁴⁷-K és kimutattuk, hogy szérumban jelenlétében kialakul a komplementaktiváció terminális komplexe, így a módosított peptid alkalmas a komplement függő sejt lízis kiváltására. (A szintézis az MTA-ELTE Peptidkémiai munkacsoportban professzor Hudecz Ferenc és dr. Magyar Anna irányításával történt)
- Előállítottunk bifunkcionális, biodegradábilis, nem immunogén és nem toxikus PLGA nanopartikulumokat (kollaborációban Dr. Kiss Éva professzorasszonnyal, Kémiai Intézet, Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriuma), melyek felszínéhez kapcsolva a citrullinált fibrin β epitóp peptid és a komplement aktiváló peptid szérumban jelenlétében *in vitro* képes szelektíven elpusztítani a fibrin β peptid-specifikus autoreaktív B-sejteket.
- A fenti rendszerben a komplement-mediált lízis hatékonyságát növeltük az SCR18-20 rekombináns fehérje segítségével, mely megakadályozta a H-faktor sejtekhez való kötődését.

9. Összefoglalás

Doktori munkám során egy szisztémás autoimmun betegség, a Reumatoid Arthritis gyógyítására kerestem a ma elérhető terápiáknál kedvezőbb, autoantigén-specifikus megközelítést. Célunk az volt, hogy ne immunszuppresszív állapot révén csökkenjen a gyulladás és a fájdalom az ízületekben, - mert így az immunrendszer védekezőképessége is romlik -, hanem specifikusan az autoimmun folyamatokban résztvevő autoreaktív B-sejteket távolítsuk el. Ha ezek a kóros B-sejtek elpusztulnak, akkor ez csökkenti az autoellenanyagok mennyiségét, amelyek az immunkomplex lerakódások révén folyamatos gyulladást generálnak az ízületekben.

A BCR-rel rendelkező autoreaktív B-sejteket egy autoepitóp peptidet és egy komplement rendszert aktiváló peptidet több kópiában tartalmazó biodegradábilis PLGA nanopartikulummal céloztuk *in vitro*. Az alkalmazott peptideket optimalizáltuk. A komplement aktiváló peptid egy rövidített, módosított szekvenciáját használtuk, amelyről az előkísérletekben bizonyítottuk, hogy nem-sejtes rendszerben hatékonyan aktiválja a komplement rendszert.

Eredményeink azt mutatják, hogy a β 60-74Cit-CNNQK-PLGA nanorészecske konstrukció, amely B-sejtekhez irányító citrullinált fibrin β peptidet és a komplementet aktiváló CNNQK peptidet is tartalmazza, szérumban jelenlétében csökkenti a peptid-specifikus ellenanyagtermelő sejtek számát oly módon, hogy a komplement aktiválás hatására a sejtmembránra lerakódó komplementhasítási termékek a sejtmembránt kilyukasztják és ezáltal a sejt elpusztul.

A bifunkcionális nanopartikulomok által irányítottan aktivált komplement rendszer sejtpusztító mechanizmusát sikerült tovább tökéletesíteni oly módon, hogy a sejtmembránhoz kötődő, a C3 központi fehérjét inaktiváló H-faktor sejtekhez való kötődését gátoltuk az SCR18-20 H-faktor doménekkal, melyek csak a sejtmembránhoz kötődtek regulátor funkció nélkül.

In vitro kísérletek során kimutattam, hogy ez a konstrukció hatékonyan működik. A jövőben ez a módszer alapul szolgálhat a kóros B-sejtek elpusztítását célzó személyre szabott terápia kifejlesztéséhez.

10. Summary

During my PhD I investigated a new more specific and more efficient therapeutic approach in Rheumatoid Arthritis instead of the resent used treatments. I projected to omit the suppression of the immune system which is now accompanied with the reduction of pain and inflammation in the joints under the treatments therefore I aimed specifically the autoreactive B cells. The selective depletion of these abnormal B lymphocytes leads to the decreasment of the autoantibody production which cause via the immuncomplex deposition a persistent inflammation in the joints.

I targeted autoreactive B cells through their BCR with biodegradable poli lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles covered with several copies of an autoepitope peptide (the fibrin β 60-74Cit epitope) and a complement activating peptide *in vitro*. We used a shortened and modified form of the described complement activating peptide which effectively activated the complement system in the non-cellular experiments.

Based on our results, the β 60-74Cit-CNNQK-PLGA nanoparticle construction which contain the citrullinated fibrin β peptide to target the autoreactive B cells and the CNNQK complement activating peptide in the presence of normal human serum the number of fibrin peptide specific antibody secreting cells decrease due to the pores formed by the complement fragments onto the surface of the cell membrane causing lysis of the autoreactive cell.

I improved the killing mechanism of the complement system with the inhibition of the cell surface binding complement regulator factor H which inactivates the complement component C3 with the SCR18-20 surface recognition domains without the regulator of factor H.

I demonstrated in the *in vitro* experiments that our bifunctional construction is effective. After screening RA patients' sera for ACPAs, the corresponding autoepitope peptides could be coupled to the surface of the nanoparticles with the complement activating peptide thus our invention might be suitable for future development of personalized autoantigen-specific depletion therapy.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Sármay Gabriellának, hogy biztosította számomra a doktori munka elvégzésének lehetőségét, hasznos tanácsait, útmutatását, szakmai fejlődésem előremozdítását, türelmét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Erdei Annának és Prof. Dr. Kacs Kovics Imrének, hogy doktori munkámat az ELTE Immunológiai Tanszékén végezhettem.

Köszönöm Dr. Nagy Györgynek, Dr. Rojkovich Bernadettnek, Dr. Gáti Tamásnak és a Budai Irgarmasrendi Kórház munkatársainak az RA-s minták folyamatos biztosítását, illetve betegadatok rendelkezésemre bocsátását.

Köszönöm Prof. Dr. Prohászka Zoltánnak az egészséges donorokból származó szérummintákat.

Köszönettel tartozom Dr. Babos Fruzsínának, Dr. Urai Katalinnak, Dr. Magyar Annának és Prof. Dr. Hudecz Ferencnek az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársainak a peptidek szintéziséért.

Köszönöm Dr. Kiss Évának és Dr. Gyulai Gergőnek a nanopartikulumok szintézisét.

Köszönettel tartozom Prof. Guy Serre-nek, Dr. Leonor Nogueira-nak és Dr. Mirelle Sebbagnak az együttműködést az autoepitóp peptid feltérképezésében.

Köszönöm Dr. Józsi Mihálynak a komplement aktiváló peptiddel folytatott kísérletekben a hasznos tanácsokat.

Köszönöm Dr. Bánki Zoltánnak és Prof. Heriber Stoibernek az SCR18-20 és SCR16-17 rekombináns fehérjéket.

Köszönöm a B sejt és autoimmunitás labor munkatársainak, elsősorban Dr. Szarka Eszternek, valamint az Immunológiai tanszék összes dolgozójának a munkámhoz kapott segítséget és biztatást.

Köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy biztosították a kiegyensúlyozott háttérrel, és mindenben támogattak.

12. Saját közlemények jegyzéke

Összesített impact factor: 32,87

Tudományos közlemények az értekezéssel kapcsolódó témában:

2017

Judit Pozsgay, Zoltán Szekanecz, Gabriella Sármay

Autoantigen-specific immunotherapies in rheumatic diseases

Nature Reviews Rheumatology 2017, doi:10.1038/nrrheum.2017.107 IF: 10,531

2016

Pozsgay J, Babos F, Uray K, Magyar A, Gyulai G, Kiss E, Nagy G, Rojkovich B, Hudecz F, Sarmay G

In vitro eradication of citrullinated protein specific B-lymphocytes of rheumatoid arthritis patients by targeted bifunctional nanoparticles

Arthritis Research and Therapy 18: Paper 15. 12 p. (2016) IF: 3,979

2013

E. Szarka, F. Babos, A. Magyar, K. Huber, Z. Szittner, K. Papp, J. Prechl, J. Pozsgay, G. Nagy, B. Rojkovich, T. Gáti, J. Kelemen, Z. Baka, M. Brózik, B. Pazár, G. Poór, F. Hudecz and G. Sármay

Recognition of new citrulline containing peptide epitopes by autoantibodies produced *in vivo* and *in vitro* by B cells of Rheumatoid arthritis patients

Immunology (2013) 141(2):181-91. IF: 4,078

Egyéb közlemények:

2017

Bankó Z, Pozsgay J, Gáti T, Rojkovich B, Ujfalussy I, Sármai G

Regulatory B cells in rheumatoid arthritis: Alterations in patients receiving anti-TNF therapy.

Clinical Immunology, 2017, doi: 10.1016/j.clim.2017.05.012. IF:4,034

Zs. Bankó, J. Pozsgay, D. Szili, M. Toth, T. Gati, Gy. Nagy, B. Rojkovich, G. Sarmay

Induction and Differentiation of IL-10–Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients

The Journal of Immunology, 2017, 198, /doi/10.4049/ IF: 4,985

2011

Balogh A, Pozsgay J, Matko J, Dong Z, Kim CJ, Varkonyi T, Sammar M, Rigo J, Meiri H, Romero R, Papp Z, Than NG

Placental protein 13 (PP13/galectin13) undergoes lipid raft-associated subcellular redistribution in the syncytiotrophoblast in preterm preeclampsia and HELLP syndrome

American Journal of Obstetrics and Gynecology 205:(2) Paper 156.e114.14 p. (2011) IF: 3,973

Könyvfejezet:

2016

Judit Pozsgay, Eszter Szarka, Krisztina Huber, Fruzsina Babos, Anna Magyar, Ferenc

Hudecz, Gabriella Sármai

Synthetic Peptide-Based ELISA and ELISpot Assay for Identifying Autoantibody Epitopes

In: Marina Cretich, Marcella Chiari (szerk.)

Peptide Microarrays: Methods and Protocols, pp. 223-233. (2016)

(ISBN:978-1-4939-3036-4) IF: 1,29

Konferenciaközlemények, absztraktok:

2016

Zs. Banko, J. Pozsgay, D. Szili, M. Toth, Gy. Nagy, T. Gati, B. Rojkovich, G. Sarmay
Regulatory B Cells in Healthy Volunteers and Rheumatoid Arthritis Patients: Induction,
Signalling and Differentiation

Konferencia helye, ideje: Leipzig, Németország, 2016.04.06-2016.04.10., 2016.

(10th International Congress on Autoimmunity)

Judit Pozsgay, Zsuzsanna Banko, Tamas Gati, Bernadette Rojkovich, Ilona Ujfalussy,
Gabriella Sarmay

The number of IL-10 producing regulatory B cells increases in responder Rheumatoid
Arthritis patients with the duration of anti-TNF therapy

Konferencia helye, ideje: Leipzig, Németország, 2016.04.06-2016.04.10. ,2016.

(10th International Congress on Autoimmunity)

2015

Z Bankó, J.Pozsgay, Gy Nagy, T Gáti, B Rojkovich, G Sármay

Rheumatoid arthritis patients possess a reduced number of IL-10 producing CD27+ regulatory
B cells

Annals of the Rheumatic Diseases 74:(Suppl. 1) pp. A6-A7. (2015)

Magyar A, Gyulai G, Pozsgay J, Schlosser G, Uray K, Szarka E, Rojkovich B, Nagy Gy, Kiss
É, Sármay G, Hudecz F

Identification and targeting by citrulline containing B-cell epitope peptides related to
rheumatoid arthritis as recognition unit with nanoparticles

23th Polish Peptide Symposium: Book of Abstract. Spala: Univerzita Mateja Bela

(UMB), 2015. p. 42.

(ISBN:978-83-61479-69-7)

J Pozsgay, A Magyar, G Gyulai, F Babos, K Uray, B Rojkovich, F Hudecz, G Nagy, É Kiss, G Sármai

Selective depletion of citrullinated protein specific B cells in rheumatoid arthritis by an auto-epitope peptide and a killing peptide coupled together to the surface of biodegradable nanobeads

4th European Congress of Immunology Vienna 2015

Zsuzsanna Banko, Judit Pozsgay, Gyorgy Nagy, Tamas Gati, Bernadette Rojkovich, Gabriella Sarmay

Rheumatoid Arthritis patients possess a reduced ratio between regulatory and effector B cells as compared to healthy controls

4th European Congress of Immunology Vienna 2015

2013

Szarka E, Huber K, Pozsgay J, Babos F, Gáti T, Magyar A, Hudecz F, Rojkovich B, Nagy Gy, Sármai G

Detection of ACPA producing B cells by a citrullin-peptide panel

33rd European Workshop for Rheumatology Research. Paper A5.11., 2013.

2012

Szarka E, Pozsgay J, Huber K., Kemenes K, Babos F, Baka Z, Magyar A, Hudecz F, Nagy Gy, Sarmay G

New possibility of characterization of rheumatoid arthritis B-cells: citrulline containing peptides

European Journal of Clinical Investigation 42:(Suppl. S1) pp. 63-64. (2012)

2011

Sármay G, Szarka E, Pozsgay J, Szili D, Babos F, Nagy Gy, Rojkovich B, Magyar A, Hudecz F

Citrullincontaining peptides as Bcell epitopes

4th European Conference on Chemistry for Life Sciences 4 ECCLS. 126 p., Budapest, 2011

Szili D, Hancz A, Pozsgay J, Herincs Z, Sarmay G, Koncz G

Cooperation between signalling pathways leading to survival, proliferation or death of B cells

Annals of the Rheumatic Diseases 70:(2) p. A15. 1 p. (2011)

13. Irodalomjegyzék

1. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435: 590-7
2. Park CO, Kupper TS. 2015. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med* 21: 688-97
3. Marshak-Rothstein A. 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6: 823-35
4. Shi GX, Zhang JY, Zhang ZX, Zhang X. 2013. Systemic Autoimmune Diseases. *Clinical & Developmental Immunology*
5. Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T, Lee YJ, Purtha WE, Lu JV, Nelson RW, Fife BT, Orr HT, Anderson MS, Hogquist KA, Jenkins MK. 2016. Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol* 17: 187-95
6. Mueller DL. 2010. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 11: 21-7
7. Li MO, Rudensky AY. 2016. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 16: 220-33
8. Moran AE, Hogquist KA. 2012. T-cell receptor affinity in thymic development. *Immunology* 135: 261-7
9. Enouz S, Carrie L, Merkler D, Bevan MJ, Zehn D. 2012. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J Exp Med* 209: 1769-79
10. Kyewski B, Derbinski J. 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4: 688-98
11. Pruijn GJ. 2015. Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 6: 192
12. van Lummel M, Duinkerken G, van Veelen PA, de Ru A, Cordfunke R, Zaldumbide A, Gomez-Tourino I, Arif S, Peakman M, Drijfhout JW, Roep BO. 2014. Posttranslational modification of HLA-DQ binding islet autoantigens in type 1 diabetes. *Diabetes* 63: 237-47
13. Faruki S, Geahlen RL, Asai DJ. 2000. Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci* 113 (Pt 14): 2557-65
14. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, Gillard M, Close P, Malaise O, Laguesse S, Cornez I, Rahmouni S, Ormenese S, Belachew S, Malgrange B, Chapelle JP, Siebenlist U, Moonen G, Chariot A, Nguyen L. 2009. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136: 551-64
15. Xu G, Paige JS, Jaffrey SR. 2010. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol* 28: 868-73
16. Wang YC, Peterson SE, Loring JF. 2014. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res* 24: 143-60
17. Vasil'ev YV, Tzeng SC, Huang L, Maier CS. 2014. Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification. *Mass Spectrom Rev* 33: 157-82
18. Weerapana E. 2017. Redox regulation: Taking AKTion on HNEs. *Nat Chem Biol*
19. Zavala-Cerna MG, Martinez-Garcia EA, Torres-Bugarin O, Rubio-Jurado B, Riebeling C, Nava A. 2014. The clinical significance of posttranslational modification of autoantigens. *Clin Rev Allergy Immunol* 47: 73-90

20. Jun HS, Khil LY, Yoon JW. 2002. Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cell Mol Life Sci* 59: 1892-901
21. Lee SS, Adu D, Thompson RA. 1990. Anti-myeloperoxidase antibodies in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 79: 41-6
22. Fregeau DR, Roche TE, Davis PA, Coppel R, Gershwin ME. 1990. Primary biliary cirrhosis. Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex activity by autoantibodies specific for E1 alpha, a non-lipoic acid containing mitochondrial enzyme. *J Immunol* 144: 1671-6
23. Luban S, Li ZG. 2010. Citrullinated peptide and its relevance to rheumatoid arthritis: an update. *Int J Rheum Dis* 13: 284-7
24. Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. 2007. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1108: 323-39
25. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301: 1374-7
26. Pozsgay J, Szekanecz Z, Sarmay G. 2017. Antigen-specific immunotherapies in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*
27. Rioux JD, Abbas AK. 2005. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* 435: 584-9
28. Silverstein AM. 2001. Autoimmunity versus horror autotoxicus: the struggle for recognition. *Nat Immunol* 2: 279-81
29. Boettler T, von Herrath M. 2011. Protection against or triggering of Type 1 diabetes? Different roles for viral infections. *Expert Rev Clin Immunol* 7: 45-53
30. Loyola-Rodriguez JP, Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patino-Marin N, Seymour GJ. 2010. Rheumatoid arthritis and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol* 2
31. Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. 2005. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol* 1: 607-28
32. Stojanovich L, Marisavljevich D. 2008. Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 7: 209-13
33. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI. 2014. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci* 15: 22279-95
34. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. 2014. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol* 2: 49
35. Speck-Hernandez CA, Montoya-Ortiz G. 2012. Silicon, a Possible Link between Environmental Exposure and Autoimmune Diseases: The Case of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis* 2012: 604187
36. Stolt P, Kallberg H, Lundberg I, Sjogren B, Klareskog L, Alfredsson L. 2005. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis* 64: 582-6
37. Farhat SC, Silva CA, Orione MA, Campos LM, Sallum AM, Braga AL. 2011. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmun Rev* 11: 14-21
38. McInnes IB, Schett G. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365: 2205-19
39. Arleevskaya MI, Kravtsova OA, Lemerle J, Renaudineau Y, Tsibulkin AP. 2016. How Rheumatoid Arthritis Can Result from Provocation of the Immune System by Microorganisms and Viruses. *Front Microbiol* 7: 1296
40. Powell AM, Black MM. 2001. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol* 26: 427-33
41. van der Woude D, Rantapaa-Dahlqvist S, Ioan-Facsinay A, Onnekink C, Schwarte CM, Verpoort KN, Drijfhout JW, Huizinga TW, Toes RE, Pruijn GJ. 2010. Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann Rheum Dis* 69: 1554-61
42. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. 2012. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 42: 102-11

43. Deng X, Crowson CS, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, Matteson EL, Kyle RA, Katzmann JA, Gabriel SE, Davis JM, 3rd. 2015. Elevation of serum immunoglobulin free light chains during the preclinical period of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 42: 181-7
44. Choy E. 2012. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51: V3-V11
45. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. 1988. The American-Rheumatism-Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid-Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 31: 315-24
46. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative (vol 69, pg 1580, 2010). *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1892-
47. de Souza S, Bansal RK, Galloway J. 2016. Rheumatoid arthritis - an update for general dental practitioners. *Br Dent J* 221: 667-73
48. Kim EJ, Collard HR, King TE, Jr. 2009. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: the relevance of histopathologic and radiographic pattern. *Chest* 136: 1397-405
49. Kaplan MJ. 2010. Cardiovascular complications of rheumatoid arthritis: assessment, prevention, and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* 36: 405-26
50. Liou TH, Huang SW, Lin JW, Chang YS, Wu CW, Lin HW. 2014. Risk of stroke in patients with rheumatism: a nationwide longitudinal population-based study. *Sci Rep* 4: 5110
51. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Hagen M, Kleinheksel SM, Cathey MA. 1994. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 481-94
52. Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. 2010. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Maedica (Buchar)* 5: 286-91
53. Vossenaar ER, van Venrooij WJ. 2004. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 107-11
54. Nielsen SF, Bojesen SE, Schnohr P, Nordestgaard BG. 2012. Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study. *BMJ* 345: e5244
55. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2741-9
56. Dubucquoi S, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerie L, Sibilia J, Goetz J, Dutoit V, Fauchais AL, Hachulla E, Flipo RM, Prin L. 2004. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 63: 415-9
57. Greiner A, Plischke H, Kellner H, Gruber R. 2005. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-citrullin antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1050: 295-303
58. De Rycke L, Nicholas AP, Cantaert T, Kruithof E, Echols JD, Vandekerckhove B, Veys EM, De Keyser F, Baeten D. 2005. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum* 52: 2323-30
59. Suwannalai P, van de Stadt LA, Radner H, Steiner G, El-Gabalawy HS, Zijde CM, van Tol MJ, van Schaardenburg D, Huizinga TW, Toes RE, Trouw LA. 2012. Avidity maturation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 64: 1323-8
60. Catrina AI, Ytterberg AJ, Reynisdottir G, Malmstrom V, Klareskog L. 2014. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 10: 645-53
61. Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA. 2004. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 5: 151-7

62. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. 2011. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett* 585: 3689-98
63. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Huizinga TW, Klareskog L, Alfredsson L. 2007. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 80: 867-75
64. Schickel JN, Kuhny M, Baldo A, Bannock JM, Massad C, Wang H, Katz N, Oe T, Menard L, Soulas-Sprauel P, Strowig T, Flavell R, Meffre E. 2016. PTPN22 inhibition resets defective human central B cell tolerance. *Sci Immunol* 1
65. Newton JL, Harney SM, Timms AE, Sims AM, Rockett K, Darke C, Wordsworth BP, Kwiatkowski D, Brown MA. 2004. Dissection of class III major histocompatibility complex haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 2122-9
66. Reyes-Castillo Z, Palafox-Sanchez CA, Parra-Rojas I, Martinez-Bonilla GE, del Toro-Arreola S, Ramirez-Duenas MG, Ocampo-Bermudes G, Munoz-Valle JF. 2015. Comparative analysis of autoantibodies targeting peptidylarginine deiminase type 4, mutated citrullinated vimentin and cyclic citrullinated peptides in rheumatoid arthritis: associations with cytokine profiles, clinical and genetic features. *Clin Exp Immunol* 182: 119-31
67. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. 2008. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19396-401
68. Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. 2013. Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 45: 170-9
69. Witalison EE, Thompson PR, Hofseth LJ. 2015. Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation. *Curr Drug Targets* 16: 700-10
70. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, van Venrooij WJ. 2004. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 63: 373-81
71. Nienhuis RL, Mandema E. 1964. A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis* 23: 302-5
72. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. 1979. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 2: 97-9
73. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101: 273-81
74. Menard HA, Lapointe E, Rochdi MD, Zhou ZJ. 2000. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res* 2: 429-32
75. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. 2001. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 166: 4177-84
76. Schwenzer A, Jiang X, Mikuls TR, Payne JB, Sayles HR, Quirke AM, Kessler BM, Fischer R, Venables PJ, Lundberg K, Midwood KS. 2016. Identification of an immunodominant peptide from citrullinated tenascin-C as a major target for autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 75: 1876-83
77. Yoshida M, Tsuji M, Kurosaka D, Yasuda J, Ito Y, Nishizawa T, Yamada A. 2006. Autoimmunity to citrullinated type II collagen in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 16: 276-81
78. Szarka E, Babos F, Magyar A, Huber K, Szittner Z, Papp K, Prechl J, Pozsgay J, Neer Z, Adori M, Nagy G, Rojkovich B, Gati T, Kelemen J, Baka Z, Brozik M, Pazar B, Poor G, Hudecz F, Sarmay G. 2014. Recognition of new citrulline-containing peptide epitopes by autoantibodies

- produced in vivo and in vitro by B cells of rheumatoid arthritis patients. *Immunology* 141: 181-91
79. Pratesi F, Tommasi C, Anzilotti C, Puxeddu I, Sardano E, Di Colo G, Migliorini P. 2011. Antibodies to a new viral citrullinated peptide, VCP2: fine specificity and correlation with anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) and anti-VCP1 antibodies. *Clin Exp Immunol* 164: 337-45
 80. Trouw LA, Rispens T, Toes REM. 2017. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 13: 331-9
 81. Sanchez-Pernaute O, Largo R, Calvo E, Alvarez-Soria MA, Egido J, Herrero-Beaumont G. 2003. A fibrin based model for rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis* 62: 1135-8
 82. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25: 1106-18
 83. Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2011. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* 23: 92-8
 84. van Gaalen F, Ioan-Facsinay A, Huizinga TW, Toes RE. 2005. The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 175: 5575-80
 85. Willemze A, Trouw LA, Toes RE, Huizinga TW. 2012. The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. *Nat Rev Rheumatol* 8: 144-52
 86. Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2008. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 26: 651-75
 87. Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. 2004. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 28: 311-8
 88. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, Schett G. 2012. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 122: 1791-802
 89. Chowdhury CS, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. 2014. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Research & Therapy* 16
 90. Arend WP, Firestein GS. 2012. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol* 8: 573-86
 91. Amara K, Steen J, Murray F, Morbach H, Fernandez-Rodriguez BM, Joshua V, Engstrom M, Snir O, Israelsson L, Catrina AI, Wardemann H, Corti D, Meffre E, Klareskog L, Malmstrom V. 2013. Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med* 210: 445-55
 92. Bartok B, Firestein GS. 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233: 233-55
 93. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. 2000. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2: 189-202
 94. Liu R, Wu Q, Su D, Che N, Chen H, Geng L, Chen J, Chen W, Li X, Sun L. 2012. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14: R255
 95. Niu X, He D, Zhang X, Yue T, Li N, Zhang JZ, Dong C, Chen G. 2010. IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 71: 334-41
 96. Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, Park MK, Cho ML, Lee SH. 2012. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 64: 1015-23
 97. Roeleveld DM, Koenders MI. 2015. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine* 74: 101-7

98. Farber S, Diamond LK. 1948. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med* 238: 787-93
99. Black RL, O'Brien WM, Vanscott EJ, Auerbach R, Eisen AZ, Bunim JJ. 1964. Methotrexate Therapy in Psoriatic Arthritis; Double-Blind Study on 21 Patients. *JAMA* 189: 743-7
100. Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Sulli A, Serio B, Villaggio B. 2006. Anti-inflammatory effects of leflunomide in combination with methotrexate on co-culture of T lymphocytes and synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 65: 728-35
101. Woodrick RS, Ruderman EM. 2011. Safety of biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7: 639-52
102. Scheinecker C, Smolen J, Yasothan U, Stoll J, Kirkpatrick P. 2009. Tocilizumab. *Nat Rev Drug Discov* 8: 273-4
103. Schett G, Dayer JM, Manger B. 2016. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 12: 14-24
104. Garrison L, McDonnell ND. 1999. Etanercept: therapeutic use in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1: I65-9
105. Modi S, Soejima M, Levesque MC. 2013. The effect of targeted rheumatoid arthritis therapies on anti-citrullinated protein autoantibody levels and B cell responses. *Clin Exp Immunol* 173: 8-17
106. Her M, Kavanaugh A. 2015. Advances in use of immunomodulatory agents--a rheumatology perspective. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12: 363-8
107. Cornillet M, Sebbag M, Verrouil E, Magyar A, Babos F, Ruysen-Witrand A, Hudecz F, Cantagrel A, Serre G, Nogueira L. 2014. The fibrin-derived citrullinated peptide beta60-74Cit(6)(0),(7)(2),(7)(4) bears the major ACPA epitope recognised by the rheumatoid arthritis-specific anticitrullinated fibrinogen autoantibodies and anti-CCP2 antibodies. *Ann Rheum Dis* 73: 1246-52
108. Sebbag M, Moinard N, Auger I, Clavel C, Arnaud J, Nogueira L, Roudier J, Serre G. 2006. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol* 36: 2250-63
109. Susal C, Kirschfink M, Kropelin M, Daniel V, Opelz G. 1996. Identification of complement activation sites in human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein gp120. *Blood* 87: 2329-36
110. Steenblock ER, Fahmy TM. 2008. A comprehensive platform for ex vivo T-cell expansion based on biodegradable polymeric artificial antigen-presenting cells. *Mol Ther* 16: 765-72
111. Makadia HK, Siegel SJ. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 3: 1377-97
112. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. 1999. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev* 99: 3181-98
113. Bonetto S, Spadola L, Buchanan AG, Jermutus L, Lund J. 2009. Identification of cyclic peptides able to mimic the functional epitope of IgG1-Fc for human Fc gammaRI. *FASEB J* 23: 575-85
114. Berntzen G, Brekke OH, Mousavi SA, Andersen JT, Michaelsen TE, Berg T, Sandlie I, Lauvrak V. 2006. Characterization of an Fc gammaRI-binding peptide selected by phage display. *Protein Eng Des Sel* 19: 121-8
115. Medgyesi D, Uray K, Sallai K, Hudecz F, Koncz G, Abramson J, Pecht I, Sarmay G, Gergely J. 2004. Functional mapping of the Fc gamma RII binding site on human IgG1 by synthetic peptides. *Eur J Immunol* 34: 1127-35
116. Berntzen G, Andersen JT, Ustgard K, Michaelsen TE, Mousavi SA, Qian JD, Kristiansen PE, Lauvrak V, Sandlie I. 2009. Identification of a high affinity Fc gammaRIIA-binding peptide that distinguishes Fc gammaRIIA from Fc gammaRIIB and exploits Fc gammaRIIA-mediated phagocytosis and degradation. *J Biol Chem* 284: 1126-35
117. Pozsgay J, Szarka E, Huber K, Babos F, Magyar A, Hudecz F, Sarmay G. 2016. Synthetic Peptide-Based ELISA and ELISpot Assay for Identifying Autoantibody Epitopes. *Methods Mol Biol* 1352: 223-33

118. Babos F, Szarka E, Nagy G, Majer Z, Sarmay G, Magyar A, Hudecz F. 2013. Role of N- or C-terminal biotinylation in autoantibody recognition of citrullin containing filaggrin epitope peptides in rheumatoid arthritis. *Bioconjug Chem* 24: 817-27
119. Lepse N, Land J, Rutgers A, Kallenberg CGM, Stegeman CA, Heeringa P, Abdulahad WH. 2012. Interleukin-21, B Cell Activating Factor and Unmethylated CpG Oligodeoxynucleotides Synergize in Promoting Anti-Proteinase 3 Autoantibody Production in Vitro. *Arthritis and Rheumatism* 64: S375-S
120. Abu-Rish EY, Amrani Y, Browning MJ. 2013. Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology (Oxford)* 52: 1190-201
121. Zikherman J, Parameswaran R, Weiss A. 2012. Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature* 489: 160-4
122. Green NM. 1975. Avidin. *Adv Protein Chem* 29: 85-133
123. Ackerman ME, Moldt B, Wyatt RT, Dugast AS, McAndrew E, Tsoukas S, Jost S, Berger CT, Sciaranghella G, Liu Q, Irvine DJ, Burton DR, Alter G. 2011. A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. *J Immunol Methods* 366: 8-19
124. Bubb MO, Green F, Conradie JD, Tchernyshev B, Bayer EA, Wilchek M. 1993. Natural antibodies to avidin in human serum. *Immunol Lett* 35: 277-80
125. Joachim Loo SC, Jason Tan WL, Khoa SM, Chia NK, Venkatraman S, Boey F. 2008. Hydrolytic degradation characteristics of irradiated multi-layered PLGA films. *Int J Pharm* 360: 228-30
126. Bingham CO, Looney RJ, Deodhar A, Halsey N, Greenwald M, Codding C, Trzaskoma B, Martin F, Agarwal S, Kelman A. 2010. Immunization Responses in Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Rituximab Results From a Controlled Clinical Trial. *Arthritis and Rheumatism* 62: 64-74
127. Jacobi AM, Dorner T. 2010. Current aspects of anti-CD20 therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol* 10: 316-21
128. Sibia J, Gottenberg JE, Mariette X. 2008. Rituximab: a new therapeutic alternative in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 75: 526-32
129. Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B, Barnard J, Owen T, Cushing E, Kelly J, Milner ECB, Fisher RI, Sanz I. 2007. B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clinical Immunology* 122: 139-45
130. Gottenberg JE, Ravaut P, Bardin T, Cacoub P, Cantagrel A, Combe B, Dougados M, Flipo RM, Godeau B, Guillemin L, Le Loet X, Hachulla E, Schaevebeke T, Sibia J, Baron G, Mariette X, AutoImmunity I. 2010. Risk Factors for Severe Infections in Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Rituximab in the AutoImmunity and Rituximab Registry. *Arthritis and Rheumatism* 62: 2625-32
131. Kerkman PF, Fabre E, van der Voort EI, Zaldumbide A, Rombouts Y, Rispen T, Wolbink G, Hoeben RC, Spits H, Baeten DL, Huizinga TW, Toes RE, Scherer HU. 2016. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 75: 1170-6
132. Ioan-Facsinay A, El-Bannoudi H, Scherer HU, van der Woude D, Menard HA, Lora M, Trouw LA, Huizinga TWJ, Toes REM. 2011. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a collection of anti-citrullinated protein antibodies and contain overlapping and non-overlapping reactivities. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70: 188-93
133. Ossipova E, Cerqueira CF, Reed E, Kharlamova N, Israelsson L, Holmdahl R, Nandakumar KS, Engstrom M, Harre U, Schett G, Catrina AI, Malmstrom V, Sommarin Y, Klareskog L, Jakobsson PJ, Lundberg K. 2014. Affinity purified anti-citrullinated protein/peptide antibodies target antigens expressed in the rheumatoid joint. *Arthritis Research & Therapy* 16
134. Jahnmatz M, Kesa G, Netterlid E, Buisman AM, Thorstensson R, Ahlborg N. 2013. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *Journal of Immunological Methods* 391: 50-9

135. Horvati K, Bacsa B, Kiss E, Gyulai G, Fodor K, Balka G, Rusvai M, Szabo E, Hudecz F, Bosze S. 2014. Nanoparticle Encapsulated Lipopeptide Conjugate of Antitubercular Drug Isoniazid: In Vitro Intracellular Activity and in Vivo Efficacy in a Guinea Pig Model of Tuberculosis. *Bioconjugate Chemistry* 25: 2260-8
136. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PW, Glennie MJ, Cragg MS. 2010. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica* 95: 135-43
137. Schlereth B, Quadt C, Dreier T, Kufer P, Lorenczewski G, Prang N, Brandl C, Lippold S, Cobb K, Brasky K, Leo E, Bargou R, Murthy K, Baeuerle PA. 2006. T-cell activation and B-cell depletion in chimpanzees treated with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Cancer Immunol Immunother* 55: 503-14
138. Gaynor B, Putterman C, Valadon P, Spatz L, Scharff MD, Diamond B. 1997. Peptide inhibition of glomerular deposition of an anti-DNA antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1955-60
139. Jacobi AM, Zhang J, Mackay M, Aranow C, Diamond B. 2009. Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 4: e5776
140. Newman J, Rice JS, Wang C, Harris SL, Diamond B. 2003. Identification of an antigen-specific B cell population. *J Immunol Methods* 272: 177-87
141. Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, Radbruch A. 1995. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1921-5
142. Taddeo A, Gerl V, Hoyer BF, Chang HD, Kohler S, Schaffert H, Thiel A, Radbruch A, Hiepe F. 2015. Selection and depletion of plasma cells based on the specificity of the secreted antibody. *Eur J Immunol* 45: 317-9
143. Hiepe F, Radbruch A. 2016. Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations. *Nat Rev Nephrol* 12: 232-40
144. Gottlieb P, Utz PJ, Robinson W, Steinman L. 2013. Clinical optimization of antigen specific modulation of type 1 diabetes with the plasmid DNA platform. *Clin Immunol* 149: 297-306
145. Gertel S, Serre G, Shoenfeld Y, Amital H. 2015. Immune tolerance induction with multiepitope peptide derived from citrullinated autoantigens attenuates arthritis manifestations in adjuvant arthritis rats. *J Immunol* 194: 5674-80
146. Gertel S, Shoenfeld Y, Amital H. 2015. Tolerogenic citrullinated peptide for arthritis. *Oncotarget* 6: 19344-5
147. Ahmed MS, Bae YS. 2016. Dendritic Cell-based Immunotherapy for Rheumatoid Arthritis: from Bench to Bedside. *Immune Netw* 16: 44-51
148. Benham H, Nel HJ, Law SC, Mehdi AM, Street S, Ramnoruth N, Pahau H, Lee BT, Ng J, Brunck ME, Hyde C, Trouw LA, Dudek NL, Purcell AW, O'Sullivan BJ, Connolly JE, Paul SK, Le Cao KA, Thomas R. 2015. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med* 7: 290ra87
149. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, Fouweather T, MacDonald C, Chadwick T, McColl E, Dunn J, Dickinson AM, Hilkens CM, Isaacs JD. 2017. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 76: 227-34
150. Wehrens EJ, Prakken BJ, van Wijk F. 2013. T cells out of control--impaired immune regulation in the inflamed joint. *Nat Rev Rheumatol* 9: 34-42
151. Leavenworth JW, Tang X, Kim HJ, Wang X, Cantor H. 2013. Amelioration of arthritis through mobilization of peptide-specific CD8+ regulatory T cells. *J Clin Invest* 123: 1382-9
152. Clemente-Casares X, Blanco J, Ambalavanan P, Yamanouchi J, Singha S, Fandos C, Tsai S, Wang J, Garabatos N, Izquierdo C, Agrawal S, Keough MB, Yong VW, James E, Moore A, Yang Y, Stratmann T, Serra P, Santamaria P. 2016. Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. *Nature* 530: 434-40

ADATLAP
a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve:Pozsgay Judit Katalin.....

MTMT-azonosító: 10020335

A doktori értekezés címe és alcíme: Peptidalapú stratégiák autoreaktív B-sejtek szelektív depléciójára Reumatoid Arthritisben

DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2017.137.....

A doktori iskola neve: ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Immunológia Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Prof. Sármay Gabriella, egyetemi tanár

A témavezető munkahelye: ELTE TTK Immunológiai Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt:2017. augusztus 31.

.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

**ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet*