

Az immunreguláció szintjei Rheumatoid Arthritisben és annak egér modelljében, kollagén-indukált arthritisben

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Huber Krisztina



Témavezetők: Prof. Dr. Sármay Gabriella, egyetemi tanár
Dr. Kövesdi Dorottya, tudományos főmunkatárs

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola, Immunológia Program

Iskola és programvezető: Prof. Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár

B-sejt és autoimmunitás Kutatócsoport

ELTE-TTK Immunológia Tanszék

2017

Tartalomjegyzék

1	Rövidítésjegyzék	4
2	Bevezetés	8
3	Irodalmi áttekintés	10
3.1	Rheumatoid arthritisz	10
3.1.1	Citrullináció szerepe és képződésének jelentősége rheumatoid arthritiszben.....	11
3.1.2	A rheumatoid arthritisz patogenezise	14
3.1.3	A genetikai háttér és a környezeti tényezők szerepe	15
3.1.4	Az ACPA-k fajtái és a diagnosztikában betöltött szerepük.....	17
3.1.5	„Multi-epitóp” peptid	20
3.2	Kollagén-indukát arthritisz egér modell	21
3.3	Regulátor B-sejtek jellemzése	22
3.3.1	Egér regulátor B-sejtek.....	24
3.3.2	Humán regulátor B-sejtek	27
3.3.3	Eredetük és differenciálódásuk folyamata.....	27
3.3.4	Szuppresszív mechanizmusok	29
3.4	Marginális zóna B-sejtek jellemzése egérben.....	30
3.5	T-bet transzkripciós faktor.....	33
3.5.1	T-bet szerepe B-sejtekben	34
4	Célkitűzések	36
5	Anyagok és módszerek	38
5.1	Anyagok és reagensek	38
5.2	Vizsgált peptidek	38
5.3	Citrullin tartalmú peptidekre specifikus ellenanyagok affinitás tisztítása betegek szérum mintáiból	39
5.4	Felszíni plazmon rezonancia vizsgálatok	40
5.5	Betegcsoportok / vizsgált állatok.....	42
5.6	Kollagén-indukát arthritisz indukciója, a betegség nyomon követése	43
5.7	Egér lép B-sejt alpopulációk izolálása.....	44
5.7.1	Mágneses sejtszeparálás	44
5.7.2	Sejtszeparálás fluoreszcens jelölés alapján	45
5.8	Izolált lép B-sejtek in vitro vizsgálata	46
5.9	ELISA vizsgálatok.....	46
5.9.1	RA betegek szérummintáiból citrullin tartalmú peptidekre specifikus ellenanyagok kimutatása indirekt ELISA módszerrel	46

5.9.2	Egér kollagén specifikus IgG2a izotípusú ellenanyagok kimutatása indirekt ELISA módszerrel	47
5.9.3	Egér lép B-sejtkultúrák felülúszájából IL-10 citokin detektálása szendvics ELISA módszerrel	47
5.10	Sejtfelszíni és intracelluláris molekulák detektálása áramlási citometriával.....	48
5.11	Génexpressziós vizsgálatok valós idejű PCR segítségével	48
5.12	Karragén-indukált gyulladási modell	49
5.13	A sejtek migrációs képességének vizsgálata	50
5.14	Statisztikai analízisek	51
6	Eredmények	52
6.1	RA szérum minták szűrése citrullinált peptid epitópokkal.....	52
6.2	Affinitás vizsgálat felszíni plazmon rezonancia készülék segítségével	56
6.3	A kollagén-indukált arthritisz nyomon követése.....	63
6.4	B-sejt populációk in vitro IL-10 termelésének karakterizálása	64
6.5	MZ B-sejtek IL-10 és T-bet expresszójának in vivo vizsgálata kollagén-indukált arthritisz indukciója során	69
6.6	Marginális Zóna B-sejtek IL-10 és T-bet expresszójának in vitro vizsgálata	71
6.6.1	Az IL-10 és T-bet génexpresszójának változása az idő függvényében.....	72
6.6.2	IL-10 és T-bet kettősen pozitív MZ B-sejtek detektálása	74
6.7	A Tbet ⁺ /CXCR3 ⁺ Marginális Zóna B-sejtek migrációjának vizsgálata in vitro.....	75
6.8	A Tbet ⁺ /CXCR3 ⁺ MZ B-sejtek IL-10 termelésének vizsgálata "gyulladású környezet" modellezését követően	79
7	Diszkusszió	82
8	Új tudományos eredmények	92
9	Összefoglalás	93
10	Summary	94
11	Köszönetnyilvánítás	95
12	Saját közlemények jegyzéke	96
12.1	Közlemények az értekezés témájával kapcsolatban	96
12.2	Egyéb közlemények.....	96
12.3	Konferencia közlemények, absztraktok.....	97
13	Irodalomjegyzék	98

1 Rövidítésjegyzék

ACPA	anti-citrullinated protein/peptide antibody/anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyag
ADI	arginin-deimináz
AF	„air-pouch” fluid / folyadék
AFC	antibody-forming cell / ellenanyag termelő sejt
AKA	anti-keratin antibody / anti-keratin antitest
APC	Allophycocyanin
APF	anti-perinuclear factor / anti-perinukleáris faktor
ATP	adenozin trifoszfát
AUC	area under curve / görbe alatti terület
BAFF	B-cell activating factor / B-sejt aktiváló faktor
BCR	B cell antigen receptor / B-sejt receptor
Breg	regulatory B cell / regulátor B-sejt
BSA	bovine serum albumin / szarvasmarha szérum albumin
CAIA	collagen-antibody induced arthritis / kollagén antitest indukált arthritisz
CCP	citrulline containing protein/peptide / citrullin tartalmú fehérje/peptid
CD	cluster of differentiation
CFA	Complete Freund's Adjuvant / komplett Freund's adjuváns
CIA	collagen-induced arthritis / kollagén-indukált arthritisz
CII	type II collagen / 2-es típusú kollagén
CMP	Common Myeloid Progenitor / közös mieloid progenitor
CpG	CpG-Oligonukleotide
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	chemokine (C-X-C motif) receptor
DAS28	disease activity score 28
DC	dendritic cell / dendritikus sejt
DCp	plasmacytoid dendritic cell
DMARD	disease-modifying anti-rheumatic drugs
DNS	Deoxyribonucleic acid / deoxiribonukleinsav
DTH	Delayed Type Hypersensitivity

EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EBNA	Epstein–Barr nuclear antigen / Epstein-Bar vírus nukleáris antigén
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay / enzimkapcsolt immunszorbens esszé
FACS	fluorescent activated cell sorting / áramlási citométer
FasL	Fas ligand
FcεRII	FC-epsilon-receptor / kis affinitású IgE receptor
FITC	fluorescein isothiocyanate
FO B	follicular B cell / follikuláris B-sejt
FOXP3	forkhead box P3
FSC	forward scatter / előre irányuló fényszórás
GATA3	Transcription factor GATA-3
H	healthy / egészséges
HLA	human leukocyte antigen / humán leukocita antigén
HRPO	horse radix peroxidase / tormaperoxidáz
HSC	hematopoetic stem cell / hematopoetikus őssejt
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant / inkomplett Freund's adjuváns
IFN γ	interferon γ
Ig	immunglobulin
IL	interleukin
IL-10	interleukin 10
IRF4	Interferon regulatory factor 4
IVIG	humán intravénás immunoglobulin
KD	dissociation constant / disszociációs konstans
LPS	lipopoliszacharid
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCV	mutated citrullinated vimentin
Mf	macrophage / makrofág
Mfm	metallofil macrophage / metallogil makrofág
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrix metalloprotease

MPP	multipotent progenitor / multipotens progenitor
MZ B	marginal zone B cell / marginális zóna B-sejt
MZ	marginal zone / marginális zóna
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells 1
NK	natural killer cell / természetes ölő sejt
OD index	citrullinated peptide OD/ arginin peptid OD
OD	optical density/ optikai denzitás
PAD	peptidil arginin deiminase / peptidil arginin deimináz
PALS	Periarteriolar lymphoid sheaths / periarterioláris limfoid hüvely
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PE	Phycoerythrin
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
Prdm1	PR domain zinc finger protein 1
PTPN22	protein tyrosine phosphatase / protein tirozin foszfatáz
RA	rheumatoid arthritis / rheumatoid arthritisz
RANKL	receptor activator of NF κ B ligand
RF	rheumatoid faktor / rheuma faktor
RNS	Ribonucleic acid / ribonukleinsav
ROC	receiver operating characteristic
ROR γ	RAR-related orphan receptor gamma
ROS	reactive oxygen species / reaktív oxigén gyökök
RU	resonance unit / rezonancia egység
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
S1P	szfingozin-1-foszfát
SE	shared epitope
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SNP	single-nucleotide polymorphism / egyponyos nukleotid poliformizmus
SPR	surface plasmon resonance / felszíni plazmon rezonancia
SSC	side scatter / oldalra irányuló fényszórás
STAT	signal transducer and activator of transcription

T1/2 B	transitional 1/2 B-cell / tranzícionális 1/2 B-sejt
T2-MZpre	transitional 2-marginal zone precursor
Tbx21	T-box transcription factor 21 / T-bet
TD	T-cell dependent / T-sejt függő
TGF β	Transforming growth factor beta
Th1/2/17	helper T1/2/17 cell / segítő T1/2/17 sejtek
TI	T-cell independent / T-sejt független
TLR	Toll-like receptor / Toll-szerű receptor
TMB	3,3',5,5' tetramethylbenidine
TNF α	tumor necrosis faktor α / tumor nekrozis faktor α
Treg	regulatory T cell / regulátor T-sejt
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor / vaszkuláris endothel növekedési faktor
XBP1	X-box binding protein 1

2 Bevezetés

Az immunrendszer feladata, hogy megvédje a szervezetet a külső, idegen behatásoktól, ellenük fellépjen és hosszú távú védeltséget alakítson ki. Az immunrendszer legfontosabb tulajdonsága, hogy különbséget tud tenni saját és nem saját struktúrák között és azokra eltérően reagál. Nem csak védelmet biztosít a patogén kórokozókkal szemben, hanem az immunsejtek fejlődésük során megtanulják megkülönböztetni, tolerálni a saját struktúrákat, ezekkel szemben válaszképtelenséget, toleranciát alakítanak ki. Amennyiben sérül az immuntolerancia, például az immunrendszer saját struktúrákat ismer fel pl. egy fehérje poszt-transzlációs módosulása következtében, autoimmunitás léphet fel. Egészséges szervezetben is kimutathatóak autoreaktív B- és T- sejtek, amelyek aktiválódás hiányában mindenféle káros következmény nélkül eliminálódnak a szervezetből. Az autoimmun betegségek általában multifaktoriálisak, kialakulásukban több tényező is szerepet játszhat, patomechanizmusuk hátterében genetikai tényezők, hibás immunregulációs folyamatok, hormonális és környezeti faktorok (dohányzás, stressz, fertőzések) egyaránt szerepet játszanak [1].

A rheumatoid arthritisz (RA) az egyik leggyakoribb szisztémás autoimmun kórkép, amely elsősorban a kéz és láb ízületeit érintő gyulladásos betegség. Prevalenciája világszerte 0,5-1 %, előfordulása nők esetében kb. 3-szor gyakoribb. A ma ismert leghatékonyabb, legnagyobb specificitású laboratóriumi diagnosztikai módszer, a citrullinált epitópokat felismerő ellenanyagok (anti-citrullinated protein/peptide antibody - ACPA) kimutatása betegek szérumból. Ezen ellenanyagok kimutathatók akár évekkel a betegség tüneteinek kialakulása előtt és a diagnosztizálásban betöltött fontos szerepük mellett, bizonyították szerepüket a betegség patomechanizmusában is [2]. Az elmúlt évtizedekben számos tesztet fejlesztettek ki az ACPA-k kimutatására, és számos auto-epitópot azonosítottak. Mivel az auto-antitestek már akár évekkel a tünetek megjelenése előtt jelen vannak a betegek vérében, fontos a tesztek érzékenységének javítása a betegség minél korábbi diagnosztizálása és a gyógyszeres kezelés minél hamarabbi elkezdésének szempontjából. A betegség korai stádiumában elkezdett terápia nagymértékben képes lassítani a betegség kialakulását és megelőzhetők vele az ízületi és a szöveti károsodások.

A betegség lefolyása hullámzó, akut és tünetmentes szakaszok váltják egymást, de teljes gyógyulás – megfelelő terápia nélkül - sajnos nem érhető el a betegeknél [2]. A tünetmentes, remissziós időszakok kialakulásában az immunrendszer úgynevezett „regulátor” sejtjeinek,

például a regulátor T- és B-sejteknek, kulcsfontosságú szerepét írták le, amelyek számos szuppresszív mechanizmus révén képesek szabályozni a gyulladási folyamatokat [3]. A szuppresszív sejtek vizsgálatára irányuló alap kutatások nagyon fontosak a betegségek mechanizmusának jobb megértéséhez, a patológiás folyamatok feltárásához. Mivel a rheumatoid arthritisben szenvedő betegeknél a remisszió elérése nehézkes és hosszú időt vesz igénybe és egyénfüggő, hogy egyáltalán kialakul-e, alternatívaként nagyon jól alkalmazhatóak a betegség modellezésére használt állat kísérletek, mint például a mi általunk használt egér modell, a kollagén-indukált arthritisz (collagen-induced arthritis, CIA) [4, 5].

Doktori munkám során egyrészt célul tűztük ki az általunk kifejlesztett peptid-alapú rendszer [6] tovább fejlesztését, amelyet egy nagyobb érzékenységgű és specificitású diagnosztikai teszt kidolgozására lehet alkalmazni. Másrészt szeretnénk volna a betegség remissziójában feltehetőleg fontos szerepet játszó úgynevezett regulátor B-sejtek (Breg) differenciálódásának feltételeit tanulmányozni, szabályozó funkciójukban fontos molekulákat azonosítani.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Rheumatoid arthritisz

A rheumatoid arthritisz (RA) egy szisztémás autoimmun betegség, elsősorban a kéz és láb kis ízületeit érintő ízületi gyulladás, de a betegek nagy részénél ízületen kívüli (extraarticularis) érintettséggel is jár (pl. „reumás csomók” a bőrben, tüdőfibrozis, érlemezés, vesekárosodás). A gyulladás folyamata, ha nem kezelik, progresszíven halad előre, ízületi funkció károsodásokat, deformításokat alakítva ki. Az immunrendszer sejtjei kórosan működnek, a saját kötőszöveti elemeket idegenként azonosítják és ellenük gyulladásos reakciót indítanak. Az RA a leggyakoribb autoimmun betegségek közé tartozik, világszerte a lakosság kb. 0,5-1%-t érinti és jellemző rá a női túlsúly, kb. 3-szor annyi nő érintett, mint férfi. Az RA nem csak egy életminőséget rontó kór állapot, megrövidíti a várható élettartamot kb. 3-7 évvel, mert e betegségben szenvedő egyének hajlamosabbak a fertőzésekre és a szív és érrendszeri betegségekre. A betegség hátterében a genetikai tényezők a legmeghatározóbbak, ikervizsgálatokkal igazoltan az RA konkordanciája 15-30 % közötti, a hajlam átörökíthető. A betegség multifaktoriális, a genetikai hajlam mellett a környezeti tényezők is nagyon fontosak, amelyek közül a dohányzás a legjobban kutatott, bizonyították, hogy növeli a betegség kialakulásának kockázatát [7, 8]. Iniciációjában nagy szerepet tulajdonítanak még a különböző virális és bakteriális fertőzéseknek [9, 10]. Az RA patogenezisét tekintve, megfigyelhető a Th1 és Th17 sejtek, illetve a citokinek közül a TNF α , IL-1, IL-6, IL-17 dominanciája. Ezenkívül fontos szerepet játszhat a szervezet saját - a szervezetben is megtalálható - fehérjéinek posztranszlációs módosulása [2]. A betegek kb. 60-70 %-ának szérumban kimutathatóak citrullinált fehérje/peptidek ellen képződő antitestek (anti-citrullinated protein/peptid antibody – ACPA). Ez annak az eredménye, hogy egy enzim, a peptidilarginin deimináz, egyes fehérjék arginin aminosavait deiminálja és citrullinné alakítja. Ezen módosult, az immunrendszer számára idegen motívumok ellen immunválasz alakul ki és autoantitestek termelődnek. A citrullináció fiziológiásan is végbemegy a szervezetben, de rheumatoid arthritisz kialakulása során felételezhetően a módosult fehérjék áttörik a toleranciát. Az ACPA-k kimutathatók az RA-ban szenvedő betegek szérumból akár évekkel a tünetek megjelenése előtt [11] és fontos kapcsolat van a citrullinált antigének ellen képződő antitestek megjelenése és a betegség kialakulása között. RA-ban az anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyagok kimutatása a legfontosabb szerológiai diagnosztikai eszközök közé tartozik [2].

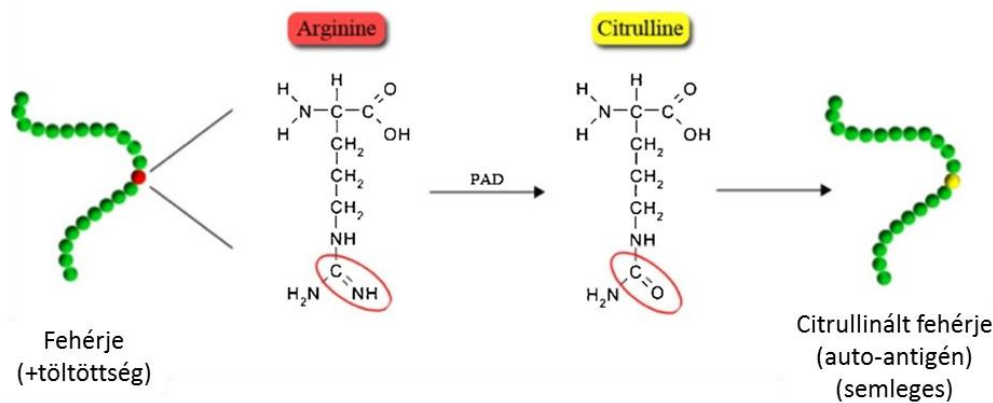
A rheumatoid arthritis nem gyógyítható, de megfelelő, hatékony kezelésekkel elérhető, hogy a betegség visszaszoruljon, a panaszok csökkenjenek, illetve átmeneti tünetmentes időszakok alakuljanak ki. A diagnózis után a betegek kezelését az úgynevezett DMARD szerek, a betegség lefolyását módosító reumaellenes szerek (disease-modifying anti-rheumatic drugs – DMARD) alkalmazásával kezdik meg. A hagyományos DMARD szerek közül a legelterjedtebb és a legtöbbet alkalmazott a metotrexát. Csak a metotrexát kezeléssel nagyon hatékony javulás érhető el a betegek kb. 25-50 %-ánál 6-12 hónapon belül. Ha a hagyományos kezelés nem segít, áttérnek a biológiai terápiákra, amelyek közül a legelterjedtebb a proinflammatorikus citokint, a TNF α -t célzó ellenanyag terápia (Infliximab, Adalimumab). Ezen kívül még célozzák az IL-1 receptort (Anakinra), az IL-6 receptort (Tocilizumab) és a B-sejteken lévő CD20 molekulát (anti-CD20 – Rituximab) [2, 12].

A betegség kezelése és diagnosztizálása az utóbbi évtizedben nagyon sokat fejlődött, a tünetek megjelenése után a kezelést azonnal el tudják kezdeni. Az anti-citrullinát protein/peptid antitestek, akár évekkel a tünetek megjelenése előtti jelenléte a vérben és a detektálásukra fejlesztett tesztek biztosítják a betegség korai diagnosztizálását.

3.1.1 Citrullináció szerepe és képződésének jelentősége rheumatoid arthritisben

Az immunrendszer a saját struktúrákkal szemben immunológiai válaszképtelenséget, toleranciát alakít ki. A szervezetben végbemenő poszt-transzlációs módosulások következtében létrejöhetnek olyan auto-antigének, amelyek képesek a tolerancia áttörésére [13].

A legfontosabb ilyen poszt-transzlációs módosulás a citrullináció - fiziológiásan is végbemenő - folyamata, amely során egy enzim, a peptidil arginin deimináz (PAD), módosít bizonyos fehérjéket, a bennük lévő arginint átalakítja citrullinra. E folyamat következtében megváltozik a fehérje töltése (pozitív→semleges), ennek következtében módosulhat a fehérje harmadlagos szerkezete és a funkciója (1. ábra) [14]. A szerkezetváltozás befolyást gyakorolhat más fehérjékkel történő interakciókra [15, 16]. Az arginin pozitív töltésű, hidrophil aminosav, gyakran a fehérje felszínén helyezkedik el, ahol részt vehet ionos kölcsönhatásban más aminosav oldalláncokkal. A poszttranszlációs módosulás következtében megváltozó szerkezet feltárhat az immunrendszer számára eddig fedett epitópokat [13].

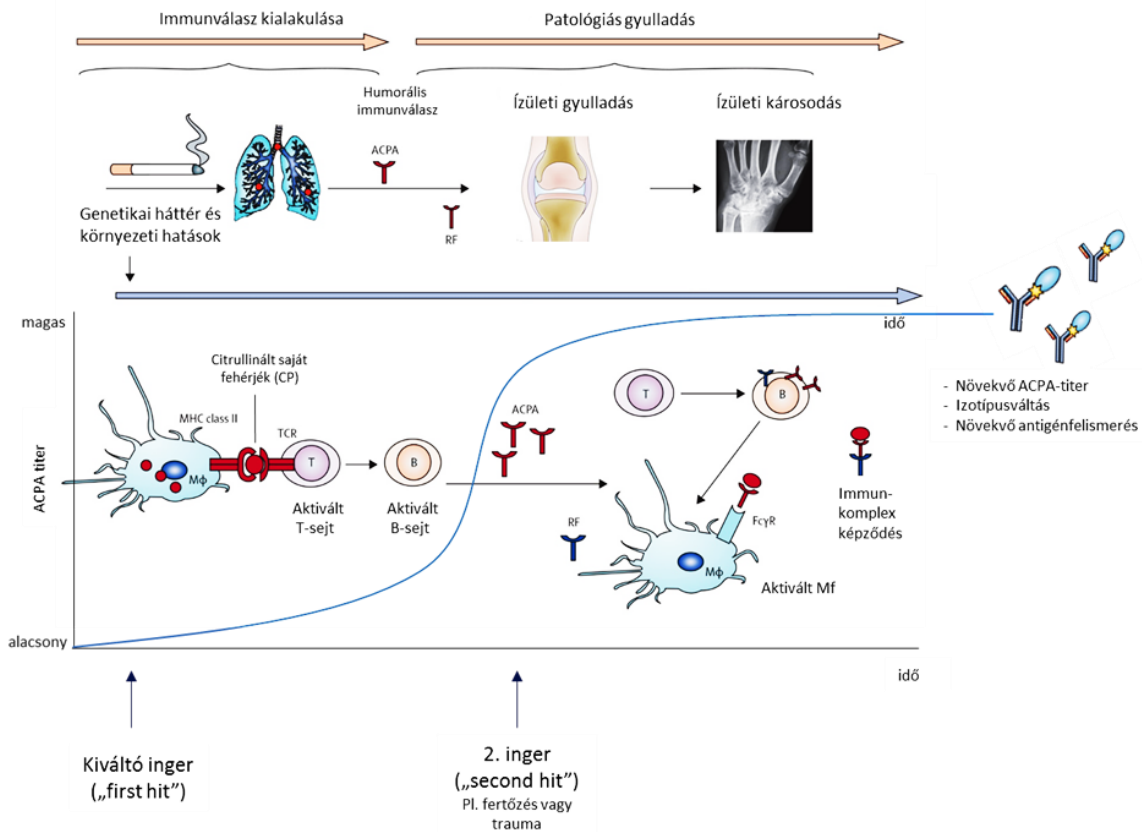


1. ábra: *Citrullináció folyamata* - Kumar és mtsai. alapján módosítva [16]. A citrullináció folyamata során az arginin aminosavról egy imino csoport távozik, ezzel megváltoztatva az aminosav tulajdonságát, töltése pozitívról semlegesre változik.

PAD enzimek 5 izotípusa ismert emlős sejtekben (PAD 1, 2, 3, 4, 6). Normálisan az enzim inaktív, a citoszolban lokalizált, aktivitását megnövekedett Ca^{2+} koncentráció esetén éri el [15]. Az enzim izotípusok szöveti eloszlása heterogén. A rheumatoid arthritisz szemszögéből a két legfontosabb izotípus - a PAD2 és a PAD4 - közül a PAD2 kimutatható izomban, a központi idegrendszerben, makrofágokban, monocitákban, oszteoklasztokban, míg a PAD4 hematopoetikus sejtekben és gyulladt rheumatoid ízületben expresszálódik [13, 15]. A citrullináció folyamata fiziológiásan végbemehet gyulladás következtében, epitél sejtek keratinizálódása során [17], szabályozza a transzkripciót a hisztonok citrullinációjával, apoptózis során előkészíti az intracelluláris fehérjék lebontását [11, 18]. Intracelluláris és extracelluláris fehérjék egyaránt módosulhatnak a PAD enzimek által. A synovialis membrán normál esetben alig vagy egyáltalán nem tartalmaz citrullinált fehérjéket, míg a gyulladás következtében nagymértékű citrullináció jellemzi [2]. Az hogy RA betegekben miért nagyobb az enzim aktivációja, még feltáratlan, elképzelhető hogy a gyulladt ízületre jellemző oxigén anyagcsere egyensúlyának eltolódására vezethető vissza. Gyulladás következtében reaktív oxigén gyökök (ROS – reactive oxygen species) képződnek, amelyek aktiválják a PAD enzimeket expresszáló sejteket [19].

A módosult, citrullinált auto-antigének antigénprezentáló sejtek közreműködése által aktiválják a T-sejteket, amelynek következményeként a B-sejtek ellenanyag termelő plazmasejtté differenciálódnak. A nagy prediktív értékkel rendelkező citrullin tartalmú epitópokat felismerő ellenanyagok (ACPA) még a patológiás gyulladás, a tünetek megjelenése előtt kimutathatóak a betegek szérumból. A citrullinált antigének ellen kialakuló immunválasz és a betegség

tüneteinek megjelenése közötti kapcsolatot az úgynevezett szekvenciális („two-hit”) modell magyarázza, miszerint az antitest termelés és a betegség tüneteinek kialakulása két külön esemény (2. ábra) [2, 20].

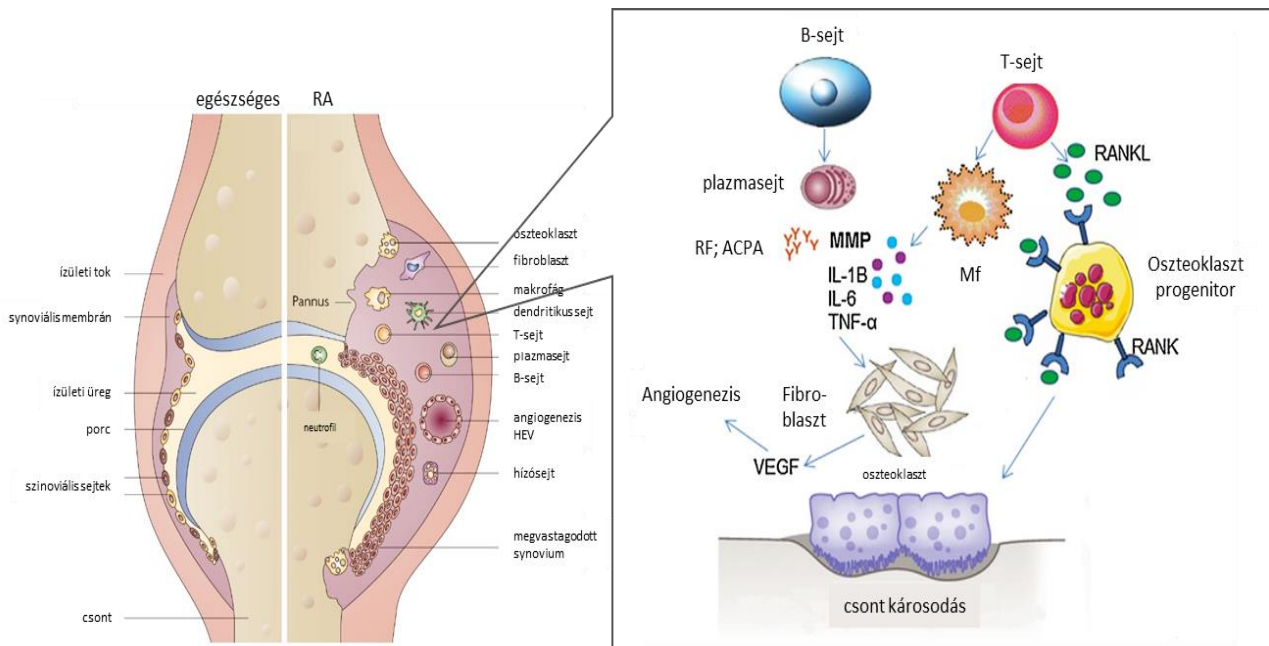


2. ábra: Az ACPA pozitív RA patogenezisének hipotetikus modellje – Klareskog és mtsai alapján módosítva [2, 20] - Az autoantitestek már a betegség preklinikai fázisában jelentkeznek. A különféle környezeti hatások és a genetikai tényezők együttesen járulnak hozzá az ACPA kialakulásához („first hit”). A második hatás („second hit”), ami lehet egy fertőzés, felel az ACPA válasz további terjedéséért és éréséért. A betegség előrehaladtával az ACPA titere nő, különféle izotípusok és rajtuk különféle glikozilációs mintázatok figyelhetők meg [21] - RF=rheuma faktor.

E feltételezés szerint az ACPA pozitív betegek esetében, a citrullinált saját molekulák elleni ellenanyagok először még a pre-klinikai fázisban az ízületen kívül (pl. a tüdőben) alakulnak ki (pl.: dohányzás és szennyező anyagok hatására – „first hit” = első inger), majd ezt követően később egy második inger (pl. fertőzés, sérülés – „second hit”) hatására alakul ki a gyulladás más szervekben, például az ízületekben [2, 20-22]. A betegség előrehaladtával az ellenanyag koncentrációja és felismerő képességének diverzitása nő [7, 21], az antitestek variábilis régióján nagymértékű szomatikus hipermutáció mutatható ki [23].

3.1.2 *A rheumatoid arthritisz patogenezise*

A rheumatoid arthritiszben szenvedő betegek krónikus, általában a láb és kéz ízületeket érintő gyulladásban szenvednek. A gyulladásos folyamat, megfelelő kezelés hiányában, progresszíven halad előre, ízületi funkció károsodásokat, deformitásokat alakítva ki. A betegség központi eleme az ízületi tokot, az inakat, a szalagokat és a csont ízületi felszíneit borító synovialis membrán gyulladása. Ez a normál körülmények között 1-2 sejtrétegből álló mesenchymalis eredetű hártya felel az ízületi folyadék termeléséért, amely minimalizálja a porc felületek közötti súrlódást és lehetővé teszi az ízület szabad mozgását. A gyulladás során az ízületi membrán sejteit több osztódáson mennek keresztül, amely során a megvastagodott sejtréteg ráhúzódik a porc felszínére, kialakul az úgynevezett „pannusz”. A gyulladt ízületeknek a fő sejtselemei a T- és B-sejtek, a monociták, a makrofágok, a dendritikus sejtek és a fibroblasztok (3. ábra) [12]. Mint ahogy már említésre került, a módosult, citrullinált saját antigének ellen termelődő antitestek fontos szereppel bírnak a betegség patogenezisében, immunkomplex képződést követően aktiválják a komplement rendszert és aktiválják a makrofágok gyulladásos citokin (TNF α , IL-1, IL-6) termelését. A citokinek a gyulladás kiváltása mellett, hozzájárulnak a mátrix-metalloproteázok (MMP) felszabadulásához, amelyek a porc foltos degradációját és ennek következményeként szabad csontfelszín kialakulását okozzák. Ezen túlmenően a citokinek, közvetve a csont eróziójáért felelős oszteoklasztokra is hatással vannak. Az RA patogenezisében kulcsfontosságú TNF α serkenti a fő oszteoklaszt differenciáló faktor, a RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand) expresszióját, továbbá aktiválja a Th17 sejteket. Az aktiválódott T-sejtek IL-17 citokinen keresztül szintén serkentik a RANKL megjelenését az oszteoklasztokon és ezáltal az oszteoklasztogenezist [24, 25]. RA-ra jellemző az angiogenezis folyamatát serkentő faktorok felszaporodása. A vaszkuláris endothel növekedési faktor (VEGF) mellett, számos más növekedési faktor, citokinek (TNF α , IL-1, IL-6, IL-17, IL-18), kemokinek (CXCL8, CXCL12, CCL12, CXCL3L1), proteázok (metalloproteázok - MMP) és adhéziós molekulák (integrinek, VCAM-1, ICAM-1) fontos részt vesznek az angiogenezis folyamatának (3. ábra) [26, 27].



3. ábra: Rheumatoid arthritisz patogenezise – Dolati és mtsai. alapján módosítva [12, 24]. A plazmasejtek által termelt rheumatoid faktor (RF) és a citrullinált antigének ellen képződő ellenanyagok (ACPA) fontos szereppel bírnak a betegség patogenezisében, immunkomplex képződést követően aktiválják a komplement rendszert és aktiválják a makrofágok gyulladásos citokin (TNF α , IL-1, IL-6) termelését. A citokinek hozzájárulnak a mátrix-metalloproteázok (MMP) felszabadulásához és serkentik a RANKL expresszióját az oszteoklaszt progenitor sejteken. RA-ra jellemző az angiogenezis folyamatát serkentő faktorok felszaporodása, például a vaszkuláris endothel növekedési faktor (VEGF), citokinek, kemokinek, proteázok és adhéziós molekulák jelenléte. A patológias gyulladás végeredményeként degradálódik a porc állománya és ennek következményeként károsodik a csontszövet.

3.1.3 A genetikai háttér és a környezeti tényezők szerepe

A rheumatoid arthritisz kialakulását több tényező is befolyásolhatja, de a *genetikai tényezők* a legmeghatározóbbak. Régóta ismert, hogy a fő hisztokompatibilitási génkomplex II osztályához (MHCII) tartozó humán leukocita antigén (HLA) DRB1 allél asszociációt mutat az ACPA pozitív RA-val („shared epitope = SE” elmélet) [22]. Az úgynevezett „shared epitope” az MHCII molekula β láncán helyezkedik el [17, 28]. A fehérjék módosulása, az arginin-citrullin konverzió növeli a peptid és az MHC kötődésének mértékét [17].

A HLA gén mellett kimutattak egy másik nagyon fontos genetikai tényezőt, a protein tirozin foszfatáz (PTPN22) génjében rejlő „single”-nukleotid polimorfizmust (SNP). A génben bekövetkező mutáció fokozza a tímuszban a T-sejt receptor jelátvitelt, amelynek következményeként az auto-reaktív T-sejtek megmenekülhetnek a klonális deléciótól [11]. Sőt

további kutatások kimutatták, hogy a HLA-DRB1 és a PTPN22 gén együttes jelenléte jobban hajlamosít az RA kialakulására [22].

A genetikai tényezők mellett számos környezeti tényező is szerepet játszik, például kb. 30 éve ismert, hogy a *hosszútávú dohányzás* és egyéb szennyező anyagok (pl. szilícium dioxid, szénpor) citrullinációt okoznak a tüdőben és ezáltal fokozzák az ACPA pozitív rheumatoid arthritis kialakulását az arra genetikailag fogékony - „shared epitope”-t hordozó - egyéneknél [22]. A HLA-DRB1-PTPN22 kapcsolathoz hasonlóan, a dohányzás és a DRB1 allél között kimutatták a gén és a környezeti faktor asszociációját RA-ban [29]. A dohányzás több szinten befolyásolhatja az immunrendszert és segítheti az RA kialakulását, például fokozhatja a citrullinációt a PAD enzimek aktiválásával [30], a dohányfüstben lévő káros anyagok a sejtek apoptózisát (sejthalálát) indukálhatják, a sejtekből kiszabaduló PAD enzimek módosíthatják a jelenlévő fehérjéket [22].

A dohányzás mellett a különféle *fertőző organizmusokat* tartják a másik legfontosabb környezeti faktornak. Kimutatták, hogy számos krónikus fertőzésért felelős mikroorganizmus (*Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, retrovírusok) sejtfalában megtalálhatóak a „shared-epitope” (SE) által felismert szekvenciára nagymértékben hasonló epitópok. Ezzel magyarázható, hogy bizonyos bakteriális fertőzéseket követően autoimmun betegség alakulhat ki [31]. Szintén szoros kapcsolat mutatható ki az RA és a periodontitis betegség között, amelynek kórokozója, a *Porphyromonas gingivalis* (PG), az egyetlen olyan prokarióta, amely rendelkezik PAD enzimmel. Előfordulása gyakoribb a rheumatoid arthritisben szenvedő betegeknél, sőt a baktérium okozta gyulladás erősebb kimenetelű. A mikroorganizmus az arginin-deimináz (ADI, emlősnél PAD) enzimet használja anaerob úton való energianyerésre, az arginin degradálására. Deimináció során felszabaduló NH₃ növeli a baktérium túlélését a parodontális zsebben, semlegesíti a savas környezetet, optimalizálja a PAD funkciót, inaktíválja a hemagglutinint és elősegíti az ATP előállítását. A baktérium nemcsak a saját fehérjéit képes citrullinálni, hanem a gazdaszervezet fehérjéit is. A baktérium által termelt α -enoláz megtalálható a betegek ízületeiben, a citrullinált α -enoláz ellen képződő autoantitestek kimutathatók RA-ban szenvedők 40-60 %-ában. Az enzimből az immunológiailag domináns epitóp (citrullinált α -enoláz peptid-1) ellen képződő ellenanyagok nem csak az RA-ra specifikusak, kimutatták szisztémás lupus erythematosus-ban (SLE), lupus nephritisben és sclerodermában is jelenlétüket [13, 32].

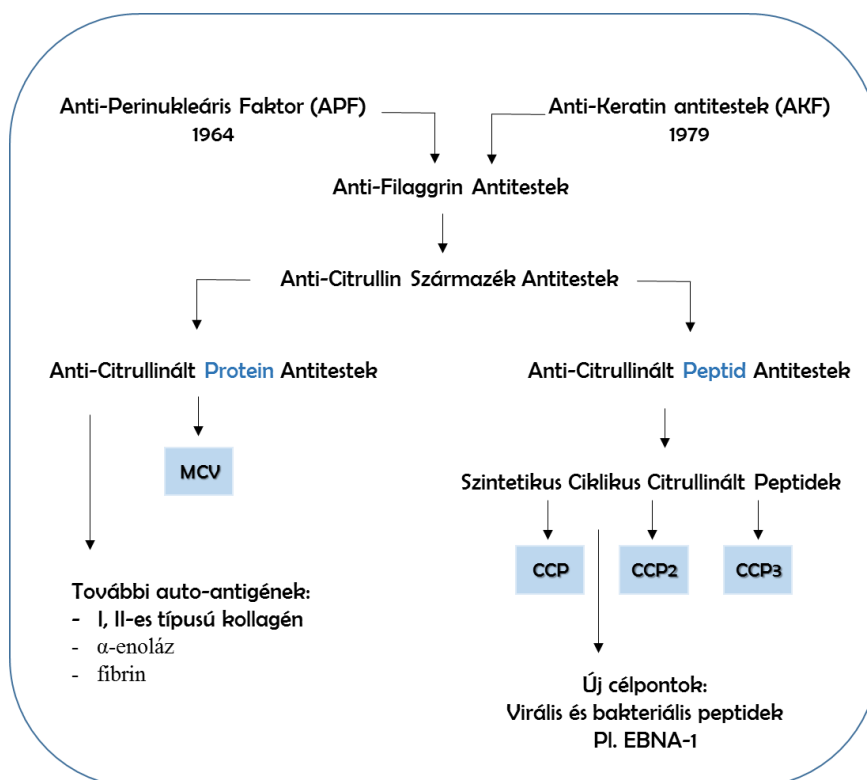
Az elmúlt évtizedben figyeltek fel az Epstein-Bar vírus nukleáris antigénje (EBNA) ellen képződő ellenanyagok jelenlétére RA-ban. Kimutatták, hogy bizonyos arginin-glicin

szekvenciákat tartalmazó virális antigének is képesek deiminálódni, az így kialakuló virális eredetű citrullinált epitópok keresztreakálhatnak a szervezetben lévő ACPA-kal. Rheumatoid arthritisben szenvedő betegek kb. 45-50 %-ának szérumban kimutathatók az immunogén epitópot tartalmazó EBNA-1 elleni ellenanyagok [33].

3.1.4 Az ACPA-k fajtái és a diagnosztikában betöltött szerepük

Rheumatoid arthritisben a módosult saját fehérjék ellen képződő, anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyagok (ACPA) kimutatása a legfontosabb diagnosztikai eszköz [2]. Az első ilyen antitesteket, anti-perinukleáris faktor (anti-perinuclear factor – APF) és anti-keratin ellenanyag (anti-keratin antibody – AKA) néven detektálták 1964-ben és 1979-ben. Mindkét, a nyelőcső epithél sejtek keratohialin szemcséivel reagáló, ellenanyag kimutatható volt RA-sok kb. 50-70 %-ában [34]. Mindkét ellenanyag célpontját tévesen azonosították, 1993-ban tisztázódott, hogy a keratin helyett a filaggrin az antigén, ami a keratin-filamentumokhoz aggregáltan helyezkedik el elszarusodó hámsejtekben [17]. Az azonosításukat követően arra is fény derült, hogy ezek az ellenanyagok olyan fehérjéket ismernek fel, amelyek az arginin helyett citrullint tartalmaznak. Ezt a jelenséget más RA-specifikus antitesteknél is megfigyelték és bár a specificitásuk és citrullináltságuk mértéke változó volt, abban megegyeztek, hogy mindegyik a citrullinált auto-antigéneket ismert fel. Ezért kapták az anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyag (anti-citrullinated protein/peptid antibody – ACPA) elnevezést [34]. Innen, ahogy az ACPA-k fejlődését összefoglaló 4. ábrán is jól látható, két irányba indult el a fejlesztés, párhuzamosan zajlott a citrullinált fehérje és a citrullinált peptid alapú tesztek fejlesztése [15]. A peptid alapú tesztekben a deimináció folyamata, vagyis a citrullin beépítése szintézis közben zajlik, míg a protein alapú tesztekben a citrullinációt a szintézis után izolált PAD enzimek segítségével végzik. Kb. a kétezres évek elejére tehető, amikor kifejlesztették az első generációs ciklikus citrullinált peptidek keverékéből álló tesztet (cyclic citrullinated peptide – CCP), amelynek alapját a humán filaggrinból származó, szintetikus és ciklizált peptidek adták. A továbbfejlesztett második és harmadik generációs teszteket (CCP2 és CCP3) már egy teljesen más, a filaggrinnal nem homológ, peptid-keverékben állították össze [15]. E tesztek igen magas specificitással (kb. 90-98 %) bár nem túl erős, 60-80 % körüli, szenzitivitás értékkel rendelkeznek. Egy diagnosztikai teszt specificitásának értéke, arról ad nekünk információt, hogy a teszt az egészséges minták közül, hány mintát talál pozitívnak (fals pozitív). Míg egy teszt szenzitivitás értékéből leszűrhetjük, a teszt a beteg minták hány százalékát találta

tényleg pozitívnak. Habár a tesztek érzékenysége (szenzitivitás) csak elfogadhatónak tekinthető, manapság ezek a CCP2 és CCP3 tesztek a leginkább használt és elfogadott assay-k a klinikumban [34, 35]. Fontos előnye ezeknek a második és harmadik generációs teszteknek, hogy olyan betegekben is kimutatható anti-CCP2 ellenanyag (kb. 20-30 %-ban), amelyek a másik fontos bio-markerre, a rheumatoid faktorra (RF) negatívak voltak [17]. Az RF a humán IgG Fc régiója ellen termelt IgM izotípusú ellenanyag, szenzitivitása kb. 70 % körüli, specificitása alacsonynak mondható, sok egészséges, fertőzésen átesett és más autoimmun betegségben szenvedő egyénben is kimutatható [36].



4. ábra: *Anti-citrullinált fehérje/peptid antitestek (ACPA) felfedezésének folyamata és az eddig kifejlesztett diagnosztikai tesztek összefoglalása* – Suzuki és mtsai alapján készített [15].

Ki kell emelnünk, a diagnosztikában használatos másik fontos diagnosztikai eszközt a citrullinált fehérje alapú tesztek közül, a mutáns-citrullinált vimentin (mutated citrullinated vimentin – MCV) tesztet (4. ábra). A mutáns citrullinált vimentint felismerő ellenanyagokat 2004-ben azonosították először. Magas, kb. 92-98 % körüli specificitása mellett 65-70 %-os érzékenységgel rendelkezik. Az RF, a CCP2 és CCP3 tesztek mellett az MCV a harmadik legfontosabb szerológiai eszköz az RA diagnosztizálásában [17].

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a citrullinált antigének felfedezése és a detektálásukra alkalmas tesztek kifejlesztése nagy áttörést jelentett a rheumatoid arthritisz laboratóriumi diagnosztikájában. Mivel az ACPA-knak magas prediktív és prognosztikai értéke van RA-ban, fontos a korai diagnosztizálást és a személyre szabott terápiákat segítő további antigének keresése és érzékenyebb tesztek fejlesztése. Emellett nagyon fontos kiemelni, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható és a legáltalánosabban használt tesztekkel a betegek kb. 30%-a negatívnak adódik [35], ezért nagyon fontos új epitópok keresése, hogy az úgynevezett „ál-negatív” betegek a betegség korai fázisában kiszűrhetőek legyenek.

Munkacsoportunk tagjaként részt vettem, a CCP2 tesztek analógiájára, egy úgynevezett „4-peptid-panel” ELISA teszt kidolgozásában, amelyet ismert auto-antigén fehérjékből (filaggrin 5- és 19-mer, kollagén, vimentin) származó szintetizált citrullin tartalmú peptid szekvenciák keverékéből állítottunk össze [6]. A keverékbe külön-külön már vizsgált, a citrullinált fehérjéket/peptideket felismerő ellenanyagok célpontjaiként számon tartott epitópokat választottunk, amelyeket így együtt, ebben az összeállításban még nem vizsgáltak. A *vimentin* egy ígéretes molekula, ahogy említettem az MCV teszt tárgyalásánál, fontos auto-antigénként tartják számon rheumatoid arthritiszben, megtalálható az ízületi membránban és extracellulárisan is [26, 37]. A *filaggrin* az epidermisz keratin-filamentumaival asszociált fehérje, a terminális differenciálódás során profilaggrinból alakul ki. Szerepe RA-ban még nem teljesen tisztázott, mivel az ízületekben nem mutatható ki, nagy valószínűséggel a citrullin tartalmú filaggrin fehérjét felismerő ellenanyagok esetében keresztreakcióról lehet szó [38]. A *kollagén* a kötőszövet egyik fő alkotójaként az ízület fő komponense. A kollagén ellen képződő auto-antitestek a betegek kb. 30 százalékában jelen vannak [38, 39]. A peptidek szintézisét, kollaborációs partnerünk, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai - Dr. Magyar Anna és Prof. Hudecz Ferenc vezetésével - végezték.

A citrullin tartalmú peptidek felismerésén alapuló ELISA teszt szenzitivitás értékei külön-külön tesztelve, rögzített 95 %-os specificitás érték mellett 40-60 % között mozogtak. Amikor a szérum minták eredményeit (összes peptiddel tesztelve) összesítettük azt tapasztaltuk, hogy a betegek 21 %-a nem ismert fel egy, általunk a tesztben vizsgált peptidet sem, tehát a betegek maradék kb. 80 %-a pozitívnak adódott (szenzitivitás érték). A peptid-panel teszt ilyen magas fokú érzékenysége és a teszt multiplex peptid felismerése diagnosztikai értékű, alkalmas lehet egy kit tovább fejlesztéséhez. Eredményeinket összevetettük az anti-CCP tesz, az anti-MCV kit és a DAS28 index (a betegség súlyosságát kifejező index) értékeivel. A betegek széruma által felismert peptid epitópok száma korrelációt mutatott a betegség súlyosságával. Az itt felsorolt

eredmények egy, a társszerzőségemmel készült publikációban [6] illetve Szarka Eszter doktori dolgozatában (2014) olvashatóak.

3.1.5 „Multi-epitóp” peptid

Eddigi eredményeinkből kiindulva munkacsoportunk az MTA Peptidkémia Kutatócsoport munkatársainak segítségével egy olyan „multi-epitóp” peptid szekvenciát tervezett, amelyet feltehetőleg nagymértékben felismernek a szérumban lévő anti-citrullinált protein/peptid ellenanyagok (ACPA). Az RA betegek szérumban kimutatható ACPA-k felismerő képessége a betegség diagnosztizálásától eltelt idő előrehaladtával nő, egyre több epitópot képesek felismerni (epitope spreading) [40], azonban úgy tűnik, vannak olyan fontos ismétlődő szekvencia részletek, amelyek szükségszerűek az antitest-antigén kapcsolat kialakulásához.

Egy 2015-ös vizsgálat szerint (Trier és mtsai., [41]) a citrullinált antigéneket felismerő auto-antitestek felismerésében a deimináció (citrullináció) kívül nagyon fontos szerepet játszanak a citrullin környezetben elhelyezkedő aminosavak. Kimutatták, hogy a peptidben lévő citrullin-glicin (Cit-Gly) motívumok elengedhetetlenek a peptid auto-antitest általi felismerésében. Például az EBNA-1 és EBNA-2 peptidek N-terminális részén számos Cit-Gly ismétlődés figyelhető meg, sőt a többi általunk tesztelt peptid szekvenciában szintén megfigyelhetőek ilyen motívumok. Ugyanakkor a felismeréshez fontos a motívumot körülvevő semleges aminosavak által biztosított szerkezet is. Összehasonlítva az általunk vizsgált citrullin tartalmú peptidek szekvenciáit, munkacsoportunk megállapította, hogy a citrullin-glicin motívumok mellett az alanin-citrullin motívumok is előfordulnak a legtöbb peptidben (5. ábra).

filaggrin 19-mer	S	H	Q	E	S	T	X	G	X	S	X	G	R	S	G	R	S	G	S		
fibrin β	X	P	A	P	P	P	I	S	G	G	G	Y	X	A	X						
kollagén	A	X	G	L	T	G	X	P	G	D	A										
vimentin	S	A	V	R	A	X	S	S	V	P	G	V	R								
α-enoláz	K	I	H	A	X	E	I	F	D	S	X	G	N	P	T	V	E				
EBNA-2	G	Q	S	X	G	Q	S	X	G	X	G	X	G	X	G	X	G	X	G	K	G

5. ábra: Kutatásaink során vizsgált peptidek szekvenciái – kiemelve az ismétlődő citrullin-glicin (Cit-Gly – X-G) és alanin-citrullin (Ala-Cit – A-X) motívumokat.

Mindezeket figyelembe véve, az eddigi ismereteket összesítve – munkacsoportunk megtervezett egy olyan „*multi-epitóp*” peptidszekvenciát, amelyben a citrullin-glicin és az alanin-citrullin motívumok 2-2 kópiában vannak jelen semleges aminosavakat tartalmazó távtartóval elválasztva (1. táblázat).

peptid	szekvencia
" <i>multi-epitóp</i> "	Ttds-ARARGSGSGRGRG-NH ₂
	Ttds-AXAXGSGSGXGXG-NH ₂

1. táblázat: A „*multi-epitóp*” peptid szekvenciája (*R=arginin; X=citrullin*).

3.2 Kollagén-indukát arthritisz egér modell

Az autoimmun betegségek patomechanizmusának jobb megértésére irányuló kutatások fontos jelentőséggel bírnak. A fejlettebb nyugati országokban az autoimmun megbetegedések a súlyos egészségügyi kockázatot jelentő betegségek közé tartoznak, magas egészségügyi költséget jelentenek az államháztartás számára és mivel manapság egyre több fiatal felnőttet érintenek, a társadalom és a gazdaság szempontjából is fontosak a korai diagnosztizálás és a hatékony terápiák fejlesztésére irányuló kutatások. Az autoimmun betegségek vizsgálata humán szervezetben - az etikusság kérdésén kívül - több nehézségbe ütközik, a gyulladási deformitások nehezen hozzáférhetőek, a kutatók kénytelenek közvetett módon vizsgálni a sejtpopulációkat, továbbá tudjuk, hogy a limfociták közül csak egy-két klón specifikus egy bizonyos auto-antigéne, ami szintén nehezíti megtalálásukat és vizsgálatukat [42]. Az autoimmunitás jelentőségének felismerése és a humán vizsgálatok nehézségeinek realizálásával párhuzamosan egyre gyorsabban fejlődtek a betegségeket megfelelően reprezentáló állatmodellek kifejlesztésére irányuló törekvések [43].

Humán autoimmun betegségek patogenezisének *in vivo* tanulmányozására régóta használnak egér modelleket [4]. A spontán modellekkel ellentétben, ahol a kórkép mindenféle behatás nélkül spontán alakul ki, az indukált modellek esetében a kutatók mesterségesen alakítják ki a betegséget az arra fogékony állatokban. A betegség hatékony indukálásához nagyon fontos a modellben használt egértörzs MHC haplotípusa, az immunizálás módja és a létrejövő citokin

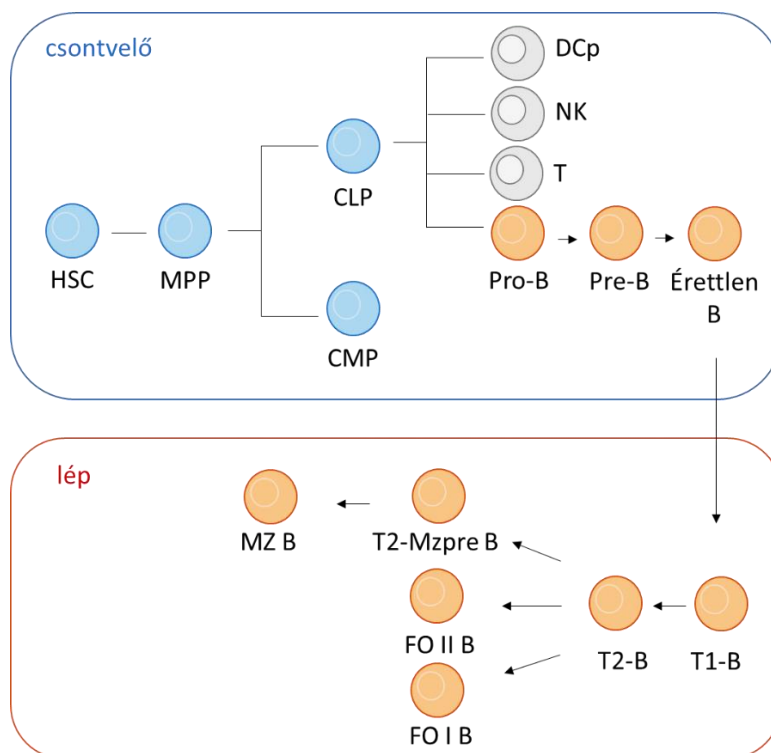
környezet [44, 45]. Az indukált modelleken belül megkülönböztetünk aktív és passzív immunizálást alkalmazó módszereket. A humán rheumatoid arthritisz tanulmányozására használt legelterjedtebb indukált (aktív) modell, a kollagén-indukált arthritisz esetében a betegséget egy genetikailag fogékony egértörzsből (DBA/1) heterológ, 2-es típusú kollagén (CII) és adjuváns emulziójával váltják ki [5]. A 2-es típusú kollagén a porc fő állományát adja és az ellene kialakuló reaktivitást kimutatták humán RA betegek esetében is. Számos a humán rheumatoid arthritiszre jellemző tulajdonság megtalálható a CIA-ban is, ugyanúgy kimutatható a synovium gyulladása, kialakul a pannusz (agresszív fibrovaszkuláris szövet), csontkárosodás jelei detektálhatóak és mindemellett kimutatták a humán RA-ra jellemző rheumatoid faktor (RF) és az anti-citrullinált fehérje/peptid antitestek jelenlétét is [46]. CIA-ban a Th-17 citokin mediált immunválasz - a humán betegség patomechanizmusához hasonlóan – fontos szerepet tölt be [47, 48]. Az indukált modellek közül a Kollagén Antitest-Indukált Arthritisz (collagen-antibody induced arthritis - CAIA) modell esetében, passzív immunizálást alkalmaznak. Az immunizálás során a kollagén több epitópja ellen kialakuló ellenanyag-keveréket használnak [49, 50]. Számos előnnyel rendelkezik a CIA-val szemben, például a betegség kialakulásának ideje sokkal rövidebb, akár már 8 nap alatt elérhető az akut szakasz csúcsa és olyan egértörzsekben is alkalmazható a módszer, amelyek genetikailag nem fogékonyak. Ezzel ellentétben viszont a CAIA immunkomplexek kialakulásán alapul és a maga az indukció T- és B-sejtek független, így nem alkalmas a humán rheumatoid arthritisz során végbemenő reakciók és immunfolyamatok teljeskörű modellezésére [51]. Ebből kiindulva választottuk in vivo vizsgálatainkhoz, a humán RA patogenezisét komplexen modellező, kollagén-indukált arthritisz egérmodellt.

3.3 Regulátor B-sejtek jellemzése

A B-sejtek fontos részt vevői az immunrendszernek, számos funkciót látnak el, de elsősorban úgy tekintünk rájuk, mint a humorális immun-választ pozitívan szabályozó sejtekre. Képesek a terminális differenciáció során ellenanyagtermelő plazmasejtté differenciálódni [52], hatékony antigén prezentáló sejtként részt vesznek a T-sejtek aktivációjában [53] és számos citokin termelésével járulnak hozzá az immunrendszer megfelelő működéséhez [54, 55].

Az emlősökben a B-sejtek a hematopoetikus őssejtekből (HSC) képződnek (6. ábra). A csontvelőben, különböző őssejt faktorok hatására a HSC asszimmetrikus osztódással létrehozza saját klónját és egy a vérképzés irányába elkötelezett multipotens progenitor sejtet (MPP). E

progenitor sejtéből (MPP) válik szét a limfoid és a mieloid sejtvonallal. A mieloid sejtek a közös mieloid progenitorokból (CMP), a limfoid sejtek a közös limfoid progenitorokból (CLP) alakulnak ki. A CLP-ből differenciálódnak az immunrendszer B és T limfocitái, a természetes ölő sejtek (NK), továbbá a plazmacitoid dendritikus sejtek (DCp). A B-sejt fejlődés irányába elkötelezett sejtek több stádiumon keresztül differenciálódnak a csontvelőben, amelynek során először a pre-BCR (pre B sejt receptor), majd az átrendeződött végleges BCR jelenik meg a felszínükön. Azokat a B-sejteket, amelyek képesek a funkcionálisan működőképes IgM izotípusú B-sejt receptor (BCR) sejt felszíni megjelenítésére, éretlen B-sejteknek hívjuk [56]. A csontvelőből kilépő éretlen B-limfociták a keringésen keresztül a lépbe vándorolnak, ahol tranzicionális B-sejteké (TB) alakulnak. Az I-es típusú tranzicionális (T1) B-sejtekből a II-es típusú tranzicionális sejteken (T2) keresztül képződnek az I-es és a II-es típusú follikuláris B-sejtek (FO I B, FO II B), valamint a marginális zóna B-sejtek (MZ B) egy prekursor sejt populáción keresztül (marginális zóna B sejt prekursor - MZpre) [57, 58] (6. ábra).



6. ábra: A konvencionális B-sejtek (B2) fejlődésének ábrázolása a csontvelőben és a periférián, a lépben – HSC (hematopoetikus őssejt), MPP (multipotens progenitor), CMP (közös mieloid progenitor), CLP (közös limfoid progenitor), T1/T2 B (tranzicionális B-sejt), T2-MZpre B (2-es típusú MZ prekursor sejt) - Matthias és mtsai alapján módosítva [56].

Hogy a B-sejtek képesek az immunfolyamatokat negatívan befolyásolni, először az *1970-es* évek közepén írták le. Beteg állatokba való olyan lép sejtuszpenzió adoptív transzfere - amelyekből előzőleg a B-sejteket eltávolították - képtelen volt csökkenteni a késleltetett-típusú túlérzékenységi bőrreakciót (DTH) [59, 60]. Húsz évvel később (*1996*) az a felfedezés, hogy B-sejt deficiens (μ MT) egerek képtelenek voltak meggyógyulni kísérletes autoimmun encephalomyelitisből (EAE - Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) hívta fel a figyelmet arra, hogy a B-sejtek korlátozhatják az autoimmun betegség kimenetelének súlyosságát [61]. *2002-ben* két mérföldkőnek tekinthető vizsgálatban kimutattak olyan B-sejteket amelyek képesek voltak IL-10 citokint termelni. Ma már tudjuk, hogy a regulátor B-sejtek azonosítására szolgáló legfontosabb marker az IL-10 citokin termelés képessége. Olyan egerekben, amelyekben a B-sejtek IL-10 deficiensek voltak, az EAE-ben szenvedő állatok képtelenek voltak remisszióba kerülni, meggyógyulni [62]. Mizoguchi és munkatársai vezették be a köztudatba a „regulátor B-sejt” elnevezést, miután azonosítottak egy IL-10 termelő B-sejt populációt spontán colitis modellben. Ezen CD19 pozitív CD1d-t magasan expresszáló populáció mérete folyamatosan növekedett a gyulladás tetőzéséig, amellyel egyidőben csökkent a betegség súlyosságának mértéke. Ők írták le először, hogy a CD1d fontos fenotípusos markere lehet a regulátor B-sejtek azonosításának [63]. *2003-ban* Claudia Mauri és kutatócsoportja kimutatta, hogy kollagén-indukált arthritiszben (CIA) szenvedő egerekből izolált lépsejtek in vitro anti-CD40 ellenanyaggal való stimulálást követően képesek voltak IL-10 termelő sejtekké differenciálódni. Mindemellett, ha ezeket az indukált sejteket adoptív transzferrel bejuttatták beteg állatokba, a sejtek csökkentették a Th1 választ, a betegség kimenetelét és a gyulladás súlyosságát az ízületben [64].

3.3.1 Egér regulátor B-sejtek

Ezek a kezdeti kísérletek a regulátor funkcióval bíró B-sejtek jelenlétét és fontosságát bizonyították, de hogy vajon melyik B-sejt populációból kerülnek ki és milyen úton differenciálódnak, még feltáratlan volt és ellentmondásos tények övezték [65].

A következő táblázat (2. táblázat) összefoglalja a legfontosabb IL-10 termelő regulátor B-sejteket és fenotípusos markereiket egérben. Ezek közül kiemelendő három lép B-sejt populáció, amelyek között közös a CD1d receptor magas szintű expresszálása (T2-MZpre B; MZ B; B10 sejtek) [66].

sejt típus	fenotípus	szuppresszív mechanizmus
T2-MZpre sejt	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgD ^{hi} CD1d ^{hi}	IL-10
MZ B-sejt	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ⁻ CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgD ^{lo} CD1d ^{hi}	IL-10
B10 sejt	CD19 ^{hi} CD1d ^{hi} CD5 ⁺	IL-10
B-1a sejt	CD5 ⁺	IL-10
Plazma sejt	CD138 ^{hi} IgM ⁺ TACI ⁺ CXCR4 ⁺ CD1d ^{hi} Tim1 ^{int}	IL-10, IL-35
Plazmablaszt	CD138 ⁺ CD44 ^{hi}	IL-10
Killer B-sejt	CD5 ⁺ CD178 ⁺	FasL

2. táblázat: *Egér regulátor B-sejtek fenotípusos csoportosítása* - Mauri és mtsai alapján módosítva [66] - (hi-high-magas), (lo-low-alacsony), (int-intermediate-közepes).

2007-ben C. Mauri és munkatársai humán rheumatoid arthritis egérmodelljében, kollagén indukált arthritisben (CIA) azonosítottak egy szuppresszív funkcióval bíró éretlen lép B-sejt populációt, a *tranzicionális 2-es típusú marginális zóna prekurzor sejtek csoportját* (T2-MZpre - CD19⁺CD21^{hi}CD23^{hi}CD24^{hi}IgM^{hi}IgD^{hi}CD1d^{hi}). In vitro, CIA-s állatokból izolált T2-MZpre sejtek szarvasmarha kollagénnel való stimulációra IL-10 citokin termeléssel válaszoltak, amelyet tovább növelt a hozzáadott anti-CD40 kezelés. Továbbá, ha ezeket a kezelt sejteket visszajuttatták a CIA indukálásával egy időben az állatokba, a betegség kisebb mértékben alakult ki [67]. Több kutatás megerősítette, hogy e kevert, éretlen lép sejt populáció szuppresszív funkcióval bír, amelyet az IL-10 citokin termelésen keresztül fejt ki. Kimutatták, hogy a T2-MZpre Breg sejtek képesek szuppresszálni az ovalbumin-indukált allergiás légúti gyulladást FOXP3⁺ regulátor T-sejtek infiltrálódását indukálva a *Schistosoma mansoni* fertőzésen átesett tüdőben [68]. Egy másik kutatás hasonló eredményt hozott, a T2-MZpre sejtek képesek voltak negatívan befolyásolni a *Helicobacter*-indukált gyomor gyulladás kimenetelét azáltal, hogy indukálták az 1-es típusú regulátor T-sejtek (Tr1) IL-10 termelését [69].

Az egerek lépében egy másik CD1d-t magasan expresszáló, és a T2-MZpre sejtekkel fenotípusosan átfedő – és belőlük differenciálódó - sejtcsoport a *MZ B-sejt* populáció (CD19⁺CD21^{hi}CD23⁻CD24^{hi}IgM^{hi}IgD^{lo}CD1d^{hi}), amely megfelelő stimulációt követően, szintén képes IL-10 citokint szekretálni és rendelkezik regulátor funkcióval [70, 71]. Toll-like receptoron (TLR) keresztüli és apoptotikus sejtek által kiváltott jelátvitel hatására ez a lép B-sejt populáció termel a legnagyobb mértékben IL-10 citokint [72], sőt apoptotikus sejtekkel

stimulált MZ B-sejtek adoptív transzfere megvédte az egereket az arthritisz kialakulásától CIA indukció során [73].

A lépben találhatóak a szintén CD1d-t magasan expresszáló úgynevezett *B10* sejtek, amelyek a CD1d mellett CD5 pozitívak [74]. Ez a nagyon kis százalékban jelen levő sejtcsoport a leginkább vizsgált szuppresszív funkcióval bíró Breg populáció a lépben. Kimutatták, hogy ezek a CD5⁺CD1d^{magas} B10 sejtek számos immunrendszerrel kapcsolatos betegség szabályozására képesek. A sejtek IL-10 citokint termelnek in vitro LPS, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ionomycin and monensin (L+PIM) kezelés hatására [75]. Normál, vad típusú egerek lép B-sejtjeinek kb. 0,5-1 %-a mutat citoplazmatikus IL-10 termelést 5 órás PMA, Ionomycin és monensin kezelés után, amely kétszeresére tovább növelhető LPS hozzáadásával [52].

Egészen a közelmúltig úgy gondolták, hogy a Breg sejtek még a plazmasejtté való végső differenciálódás előtt alakulnak ki [55]. Azonban új bizonyítékok vannak arra, hogy a B-sejtek a fejlődési folyamat későbbi fázisában is képesek IL-10 termelésre és rendelkeznek szuppresszív funkcióval. Matsumoto és munkatársai mutatták ki 2014-ben, hogy EAE-ben szenvedő egerek nyirokcsomóiból származó IL-10 termelő *CD138⁺ B-sejtek* fontos szerepet játszanak a gyulladás mértékének csökkentésében azáltal, hogy a sejtek gátolták a dendritikus sejtek T-sejt aktiváló mechanizmusait [76]. Szintén a plazmasejtek regulátor funkcióját bizonyíthatja az az eredmény is, hogy a plazmasejt irányba történő differenciálódás fontos génjeinek (IRF4, Prdm1) hiánya sokkal erősebb betegség kialakulásához vezetett EAE-ben [77]. A nyirokcsomó *CD138⁺* plazmablasztokhoz hasonlóan, a lép *CD138⁺* B-sejtjei is képesek szuppresszálni a gyulladást EAE-ben és a Salmonella fertőzést követő immunválaszokat IL-10 és IL-35 citokinek termelésén keresztül [78].

Míg az eddig tárgyalt Breg sejt csoportok a konvencionális B2 sejtekből eredeztethetők, leírtak szuppresszív funkcióval bíró B1 sejteket. A B1 sejtek a veleszületett immunrendszerhez tartozva leginkább polireaktív, úgynevezett természetes IgM izotípusú ellenanyagokat termelnek, amelyek fontos szereppel bírnak a patogének eltávolításában. Tovább oszthatóak két populációra a CD5 expresszió alapján B1a (CD5⁺) és B1b (CD5⁻) sejtekre. A peritoneumban elhelyezkedő *B1a* sejtek adják az IL-10 termelő B1 sejtek fő populációját [79, 80]. Továbbá azonosítottak egy FasL⁺ B1a sejt populációt, az úgynevezett „killer Breg” sejteket, amelyek IL-10-független módon képesek negatívan szabályozni az immun választ azáltal, hogy apoptózist indukálnak CD4⁺ T-sejteknél Schistosoma fertőzést követően [81].

3.3.2 Humán regulátor B-sejtek

Emberekben, az egér modellekhez hasonlóan, a regulátor B-sejtek legfőbb azonosítására használatos marker, a sejtek IL-10 termelő képessége [55]. Míg egerek esetében a Breg sejtek leginkább a lép B-sejt populációiból differenciálódnak, embereknél az IL-10 termelő B-sejteket a perifériás vérből azonosították [66]. Egészséges egyének perifériás vérből azonosították az éretlen CD19 pozitív, CD24-et és CD38-at magasan expresszáló B-sejt csoportot, amely in vitro CD40-en keresztüli aktiváció után a legnagyobb mértékben termelt IL-10 citokint. A Th1 válasz elnyomása és a TH17 irányba történő differenciálódás gátlása mellett indukálták a CD4⁺ T-sejtek regulátor T-sejt irányba való differenciálódását [82]. Számos autoimmun betegségben pl. szisztémás lupus erythematosusban (SLE), RA-ban leírták, hogy ezen CD19⁺CD24^{magas}CD38^{magas} Breg populáció csökkent számban van jelen és funkcionálisan működésképtelen [82, 83]. SLE-s betegből izolált CD19⁺CD24^{magas}CD38^{magas} Breg sejtek kevesebb IL-10 citokint termeltek a kontroll, egészséges sejtekhez képest in vitro anti-CD40 stimulációt követően [83]. Egyesek úgy gondolják, hogy a Breg sejtek autoimmun betegségekben leírt funkcionalitásbeli defektje adódhat abból, hogy ezek a sejtek az erős gyulladási stimulusok hatására „túl” aktiválódnak, kimerülnek és elvesztik szuppresszív funkciójukat [55]. Egy nemrégiben készült humán tanulmány (2014) úgy véli, léteznek regulátor funkcióval bíró plazmablasztok is. Ezek a CD27 receptort közepesen és CD38-t magasan expresszáló plazmablaszt-fenotípusú sejtek CpG, IFN γ , IL-6 és IL-2 stimulációt követően, a Blimp1, IRF4 és XBP1 (plazmasejt differenciálódást irányító faktorok) gének felszabályozása mellett érték el a maximális IL-10 termelést [76]. Munkacsoportunk eredményei azt támasztják alá, hogy a CD19⁺CD27⁺ memória B-sejtek a regulátor transzformációra legfogékonyabb Breg populáció, TLR9 és CD40 receptoron keresztüli együttes aktiváció hatására ezek a sejtek termeltek a legnagyobb mennyiségben IL-10 citokint [84].

3.3.3 Eredetük és differenciálódásuk folyamata

Mind az egér, mind a humán regulátor B-sejtek egy rendkívül heterogén csoportot képeznek és a differenciálódásukat segítő faktorok is nagyon sokfélék. Hogy elkötelezett prekurzor sejtekből képződnek, vagy bármely B-sejt képes átprogramozni magát megfelelő környezetben,

még nem feltárt teljes mértékben. Egyesek szerint három hipotetikus modell létezik, annak magyarázására, hogy a regulátor B-sejtek hogyan differenciálódnak (7. ábra):

1 „Multi-lineage” („több vonal/eredet”) modell:

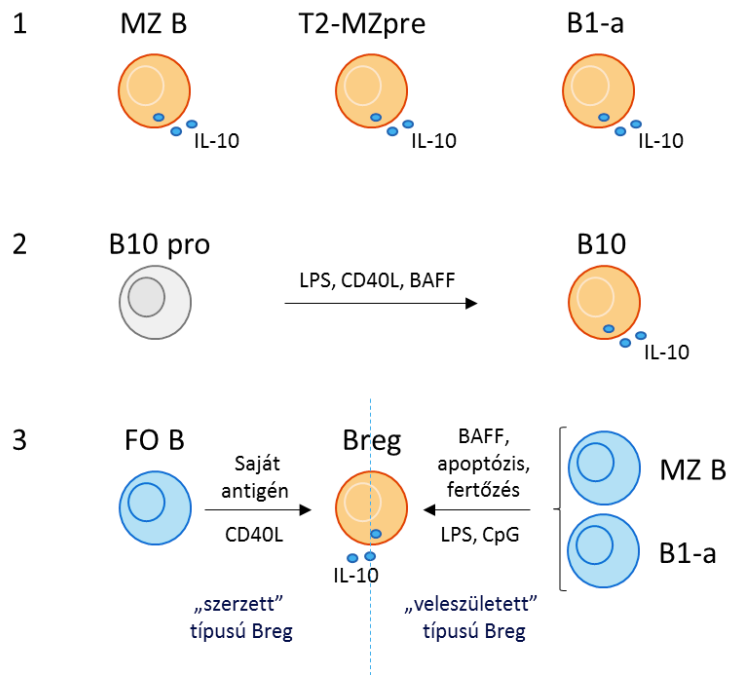
A különböző Breg alpopulációk egyedi progenitorokból fejlődnek ki. Ez a modell az IL-10 termelő Breg sejtpopulációk átfedő fenotípusos markerein alapul, a prekursor populációk, mint például a B-1a sejtek, az érett MZ B és az éretlen T2-MZpre sejtek megfelelő stimulusok hatására képesek IL-10 termelő sejté differenciálódni (7. ábra 1) [52].

2 „Single-lineage” („egy vonal/eredet”) modell:

A lépben megtalálható IL-10 termelő úgynevezett B10 sejtek egy ősből, a B10 progenitor (B10pro) sejtéből fejlődnek ki LPS, CD40L vagy BAFF stimulust követően (7. ábra 2) [52, 74].

3 „Indukált” modell:

Ez a modell Mizoguchi és munkatársai nevéhez fűződik. Állítása szerint bármely B-sejt képes IL-10 citokint termelni a megfelelő környezeti faktorok hatására [66, 85]. Ezt a hipotézist erősen támogatja az a tény, hogy különböző citokinek hatására különböző Breg alpopulációk alakulnak ki [86, 87]. Attól függően milyen behatás éri a különböző sejtpopulációkat, megkülönböztetünk „szerzett” („acquired”) és „veleszületett” („innate”) regulátor B-sejteket [85]. A „szerzett” típusú Breg sejtek, ezen elképzelés szerint, a follikuláris B-sejtekből differenciálódnak saját antigén B-sejt receptoron keresztüli felismerés és CD40-CD40L keresztkötetést követően. A másik populáció, a „veleszületett” regulátor B-sejtek kialakulásához nélkülözhetetlen a Toll-like és BAFF Receptorokon keresztüli stimulálás (7. ábra 3).



7. ábra: *Regulátor B-sejtek differenciálódásának feltételezett útjai* - Bocian és mtsai alapján módosítva [3] – „Több eredet” modell (1); „egy eredet” modell (2); „indukált” Breg differenciálódási modell (3).

Lampropoulou és munkatársai úgy vélik a regulátor funkció két lépésben alakul ki a B-sejteknél, ezt nevezik az úgynevezett „szekvenciális” modellnek. A Toll-like Receptorokon keresztüli iniciátor stimulus beindítja a differenciálódási folyamatot, amely után a második lépésben, a BCR – CD40 keresztükötését követően a sejtek IL-10 termelő B-sejtté differenciálódnak [88].

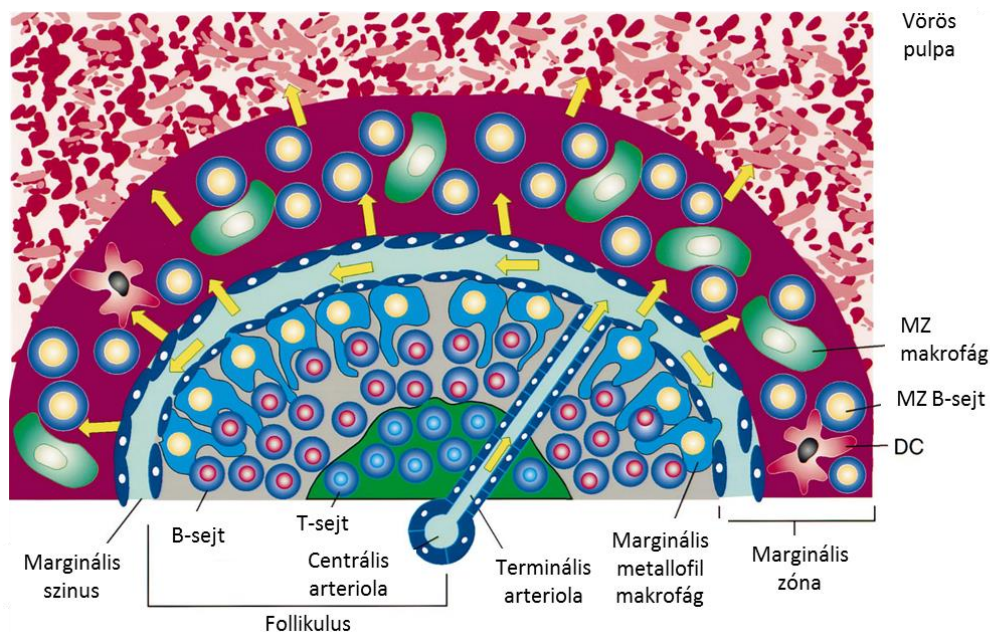
3.3.4 Szuppresszív mechanizmusok

A regulátor B-sejtek sokféle módon és számos sejt típust képesek szabályozni, mint például dendritikus sejteket [89], makrofágokat [90], valamint a segítő T1 (Th1) és T2 (Th2) sejteket [91, 92]. A legjelentősebb effektor funkciójukat a szuppresszív hatású IL-10 citokin termelésén keresztül fejtik ki, de nem csak IL-10 segítségével, hanem más citokineken (TGF- β -t és IL-35) keresztül is szabályozhatják az immunrendszert, illetve a Breg sejtek képesek IL-10 független módon is szuppresszálni a sejteket közvetlen sejt-sejt kapcsolaton keresztül. A Breg sejtek IL-10 citokinen keresztül gátolják az effektor T-sejteket, például a Th1 és a Th17 sejteket,

proliferációját és pro-inflammatorikus citokin termelését ($\text{IFN}\gamma$, IL-17), szuppresszálják a monociták $\text{TNF}\alpha$ termelését és képesek a szintén IL-10 termelő regulátor T-sejtek differenciálódását indukálni [66]. IL-10 független módon szabályozzák a citotoxikus T-sejtek aktivitását IL-35 citokinen, ICAM-1/LFA-1 és Fas/FasL kapcsolaton keresztül [78]. Továbbá bizonyítékok vannak arra, hogy a regulátor B-sejtek felszínén fokozódik a FAS Ligand (FasL) és programozott sejt halál ligand-1 (programed death-ligand 1 – PD-L1) expressziója, amelyek a receptorokkal való kölcsönhatást követően közvetlenül apoptózist indukálnak a célsejtben [81, 93]. Az IL-10 citokinen kívül a $\text{TGF}\beta$ termelésén keresztül negatívan szabályozzák a dendritikus sejtek aktivitását és indukálják a Treg sejtek differenciálódását [94, 95].

3.4 Marginális zóna B-sejtek jellemzése egerben

A marginális zóna B-sejtek a legnagyobb másodlagos nyirokszervben, a lépben helyezkednek el, amely a nyirok keringéssel ellentétben a véráramhoz csatlakozik. A lép legfőbb szerepe a vérbe kerülő antigének kiszűrése. Szerkezeti struktúrája jellegzetes, a lép limfocita gazdag struktúrákból álló része, a fehér pulpa a lép belső részében helyezkedik el, amelyet körülvesz a lép teljes állományának 80 %-át kitevő vörös pulpa, amely egyedülálló vérszűrő hatékonysággal rendelkezik a szöveti vázát behálózó vénás rendszer miatt és fontos szerepet játszik az előregedett vörösvérsejtek eltávolításában. A fehér pulpát, a periarteriolaris limfoid hüvely (PALS), a lépfollikulusok, továbbá a marginális zóna „szövedéke” alkotja. A centrális arteriola a fehér pulpát körülvevő marginális szinuszokba nyílik. Ezekben a szinuszokban lépnek ki a keringésből a limfociták a lép állományába, valamint itt jutnak a lép nyirokszövetébe a vérben található antigének is. A marginális szinuszt övező nyirokszövet a marginális zóna, amelynek szerkezeti vázát a retikuláris sejtek adják, amelyek között a MZ B-sejtek, dendritikus sejtek (DC) és marginális makrofágok elszórtan helyezkednek el. A marginális szinusz falát egy réteg vastagságban endothél sejtek bélelik, amelyeket a fehér pulpa irányából makrofágok (metallofil) határolnak. A marginális zóna kiemelt szereppel bír a vérben lelhető antigének és kórokozók felismerésében, a vérantigének és az immunsejtek képesek átjutni a marginális szinusz falát alkotó endothél sejteken, ezzel biztosítva a hatékony immunválaszt (8. ábra) [96].



8. ábra: A lép marginális zónájának szerkezeti felépítése – Morse és mtsai alapján módosítva [97].

Az egér lépétől eltérően az emberi lépben nincs marginális szinusz és a marginális zóna makrofágok sem lelhetőek fel. A vérben keringő antigének a lép perifollikuláris zónájában kerülnek kölcsönhatásba a MZ B-sejtekkel, amelyek az egerekkel ellentétben nemcsak a lépben helyezkednek el, hanem más perifériás nyirokszervek, nyirokcsomók, mandulák, Peyer plakkok környékén elhelyezkedő MZ-szerű szövetekben is megtalálhatóak [96, 98].

A marginális zóna B-sejtek egyik legfontosabb sajátága, hogy nagyon gyorsan képesek reagálni a vérbe került antigénekre, képesek kemokin gradiens irányított módon a follikulusba vándorolni, az antigént prezentálni a FO B-sejteknek és ellenanyag termelő plazmasejtté differenciálódni. A vérben szállított, a marginális zónán áthaladó, szfingozin-1-foszfát (S1P) és e molekulának receptora, a MZ B-sejtek felszínén megjelenő S1P receptor felelős a MZ B-sejtek marginális zónába tartásáért. Az ellentétes irányú, a follikulusok felé történő, vándorlást a follikuláris dendritikus sejtek által termelt CXCL13 kemokin és receptora, a CXCR5 irányítja [96].

A MZ B-sejtek fenotípusára jellemző, hogy CD19 pozitívak, nagy számban fejeznek ki polireaktív IgM molekulát, CD21 receptort és CD1d-t, valamint alacsony szinten expresszálnak IgD-t. Fontos sajátáguk, hogy a B1 sejtekhez hasonlóan képesek spontán, úgynevezett „természetes” IgM izotípusú ellenanyagot termelni és részt venni a természetes immunitás kialakításában. A CD1d molekula, amely módosított lipidek felismerésére és prezentálására

hivatott, fontos szerepet tölt be, ezen keresztül a MZ B-sejtek képesek aktiválni az invariáns „természetes ölü” T-sejteket (iNKT) és részt vesznek egy alternatív T-sejt függő immunválasz kialakításában. Fontos azonosításukra használható marker, hogy a MZ B-sejtek felszínéről hiányzik a CD23 (FcεRII) molekula (kis affinitású IgE receptor) [99], ellenben az egér MZ B-sejtekre jellemző, hogy nagymértékben expresszálnak Toll-szerű receptorokat (TLR). A MZ B-sejtek fontos részt vevői a gyors adaptív immunválasznak, BCR/TLR receptoron keresztüli egyidejű aktivációt követően kis affinitású ellenanyag termelő plazmasejtté alakulhatnak, amelyek a FO B-sejtek aktiválódásáig (nagy affinitású ellenanyagok megjelenéséig) biztosítják a gyors és hatékony immunválaszt [98].

Ahogy már említettem, a MZ B-sejtek legfőbb tulajdonsága, hogy nagyon gyorsan képesek reagálni a véráramból a marginális zónába kerülő antigénekre, amelynek következtében ellenanyag termelő plazmasejteké differenciálódhatnak. Az eddigi elképzelésekkel ellentétben a MZ B-sejtek nem csak, a bakteriális fertőzések ellen irányuló, T-sejtektől független (T-cell independent – TI), hanem a T-sejt függő (T-cell dependent – TD) immunválaszban is részt vehetnek [98]. Leírták, hogy a MZ B-sejtek képesek a felszínükön, nagymértékben expresszált komplement receptor 1 (CD21) és receptor 2 (CD35) segítségével immunkomplexeket a folliculusba szállítani és azokat a FO B-sejteknek bemutatni [100]. Aktiválódásukban részt vesznek a B-sejt receptoron, Toll-szerű receptorokon, CD40/CD40L, BAFF/BAFFR receptoron keresztüli jelátviteli utak, ezen kívül a vörös pulpában lévő dendritikus sejtek és makrofágok által termelt citokinek, mint például az IFN- γ is fontos szerepet játszik [98].

A marginális zóna B-sejtek a B1 sejtekkel együtt az úgynevezett veleszületett/természetes („innate-like”) B-sejtek közé tartoznak. Polireaktív B-sejt receptoruk miatt gyorsan képesek válaszolni a TI antigénekre és nagymértékben termelnek alacsony affinitású ellenanyagot [72, 101]. Úgynevezett „innate” - TLR4 vagy TLR9 receptorokon keresztüli – aktivációt követően gyors és nagy mennyiségű antitest és IL-10 termeléssel válaszolnak [71].

Kimutatták, hogy a marginális zóna B-sejtek fontos szerepet játszhatnak a tolerancia áttörésében humán rheumatoid arthritisz egérmodelljében, kollagén indukált arthritiszben (CIA). A MZ B-sejteknek valószínűleg komoly szerepük van az immunizáláskor a szervezetbe nagy mennyiségben bejuttatott 2-es típusú kollagénnel (CII) szembeni tolerancia áttörésében. Az immunizációt követően a MZ B-sejtek egyrészt bemutatják a feldolgozott antigént a helper T-sejteknek (Th), másrészt pedig T-sejtektől független módon kis affinitású ellenanyag termelő plazmasejtté differenciálódnak. Az aktiválódott Th sejtek segítik a FO B-

sejtek IgM, majd IgG izotípusú, leginkább a kollagén indukált arthritiszre jellemző IgG2a termelő plazmasejtje történő differenciálódását [102]. Mint ahogy az egér regulátor B-sejtek csoportosításánál (3.3.1 fejezet) tárgyaltam, fontos csoportját alkotják az IL-10 termelő regulátor B-sejteknek [71], amelyeknek fontos szerepet tulajdonítanak a CIA remissziójában.

3.5 T-bet transzkripciós faktor

A T-box fehérjecsaldába tartozó T-bet (Tbx21) transzkripciós faktor az immunrendszer számos sejtípusában meghatározó, mind a veleszületett és az adaptív immunsejtekben egyaránt. Szerepét legkorábban a segítő T-sejtek differenciálódásában tárták fel, úgynevezett meghatározó (master) szabályozója a Th-1 irányú polarizációnak és a sejtvonalra jellemző citokin profil kialakításának [103]. A Th-1 irányú polarizáció segítése mellett, több szinten képes gátolni a Th-2 irányú differenciálódást és az effektor funkciók kialakulását, ezáltal a T-bet kulcsfontosságú szabályozó faktora a Th sejtvonalak elválásának [104]. Az IFN γ mellett számos citokin és jelátviteli szabályozó faktor szabályozza expresszióját a CD4⁺ T-sejtekben és számos célgénjét is feltárták már [105]. Például T-sejt receptoron, IFN γ -STAT1 és IL-12R-STAT4 jelátviteli utakon keresztüli indukció gyors T-bet aktivációt eredményez és szabályozza a Th-1 irányba való polarizációt [103, 106]. A Th-1 sejtek effektor funkciójának és migrációs képességének szabályozásában számos T-bet által vezérelt molekula vesz részt, ilyen például a TNF, CCL3, CCL4 kemokin ligandok, CCR5, CXCR3 kemokin receptor [104, 105]. A pozitív szabályozás mellett, a TGF- β citokinen keresztüli szignálok negatívan szabályozzák a T-bet expresszáldódásának mértékét CD4⁺ T-sejtekben [107, 108].

A T-bet amellet hogy a Th-1 polarizációt indukálja, a Th-2 és a Th-17 irányba történő differenciálódást gátolja. A Th-2 irányba történő differenciálódás negatív szabályozását a polarizáció fő transzkripciós faktorának, a GATA3-nak direkt gátlásán keresztül fejt ki. T-bet egy poszt-transzlációs módosulást követően kapcsolódik GATA3-hoz, amellyel gátolja annak kötődését, a polarizációt irányító két fő citokin, az IL-5 és IL-13 promoteréhez. Mindemellet a Th-1 irányba való polarizációt segíti, hogy a másik Th-2 polarizációban fontos jelátviteli út, IL-4-STAT6, szintén gátlódik T-bet vezérelt módon. A Th-17 sejtvonal meghatározó transzkripciós faktora a ROR γ (Retionic acid receptor related orphan receptor- γ t). A T-bet nem közvetlenül gátolja a ROR γ expresszáldódását, hanem indirekt módon RUNX1-en keresztül szabályozza a transzkripciós faktor funkcióját [104, 109, 110].

A regulátor T-sejtek (T-reg) domináns transzkripciós faktora a FOXP3 (Forkhead box P3), de leírtak már kettősen pozitív, CD4⁺FOXP3⁺T-bet⁺ regulátor T-sejt populációt [111, 112], sőt kimutattak már egyszeresen T-bet pozitív regulátor T-sejteket is (CD4⁺FOXP3⁻T-bet⁺) [113]. Kialakulásuk szintén IFN γ R-STAT1 jelátviteli útvonalon keresztül indukálódik. A regulátor T-sejtek esetében a T-bet kulcsfontosságú szerepe, a sejtek migrációs képességének fokozása. A Th-1 sejtekkel hasonlóan a T-bet közvetlenül képes szabályozni a CXCR3 kemokin receptor expresszióját [105, 111]. Több autoimmun betegségben feltárták jelentőségét a T-bet és a CXCR3 pozitív, a Th-1 sejtvonal két fő molekuláját expresszáló FOXP3⁺ regulátor T-sejteknek [114], pl. az 1-es típusú diabétesz szabályozásában, T-bet/CXCR3 hiányában a betegség súlyosabb lefolyású volt [112, 115, 116].

3.5.1 T-bet szerepe B-sejtekben

A T-bet aktivitását számos faktor szabályozza a B-sejtekben, de az általa szabályozott célgénekről nagyon keveset tudunk [103, 117]. IFN γ -stimulált B-sejtekben azonosítottak T-bet szabályozása alatt álló molekulákat, például kimutatták T-bet közvetlen kötődését az IFN γ , IL-2R β , RAD51, STAT1, CXCR3, CCL3, CALM2 és MAPK1 molekulák promoteréhez [118]. Kiemelendő, hogy az IFN γ aktiváló faktorként serkenti a T-bet expresszióját B-sejtekben, amely pozitív visszacsatolásként fokozza annak termelődését [105]. A T-bet transzkripciós faktor leginkább feltárt szerepe a B-sejtek életében, hogy IFN γ citokinen keresztül serkenti az IgG2a irányú izotípus váltást és az ellenanyag termelést [119, 120]. Kimutatták, hogy mind a T-bet, mind az IFN γ nélkülözhetetlen a B-sejtek izotípusváltásához, in vitro kísérletekben bizonyították, hogy a két gén együttes kiütése esetén nem volt kimutatható IgG2a expresszió [119], illetve a T-bet hiánya csökkentette az IgG2a izotípusú memória B-sejtek antigén specifikus válaszát in vivo [121]. Az B-sejt receptoron (BCR) és IFN γ citokinen keresztüli jelpályák szinergisztikus és STAT1-függő módon képesek növelni a T-bet expressziót B-sejtekben [120]. A TLR9 jelátvitel szintén nagyon fontos regulátora a T-bet expresszióknak [105, 117, 122]. Munkacsoportunk a B-sejt receptor (BCR) és a Toll-like receptor 9 (TLR9) jelpályák kapcsolódási pontjaként újonnan azonosította a T-bet transzkripciós faktor jelentőségét B-sejtekben. A két jelpályának szimultán aktiválása szinergisztikusan módon növelte mind a T-bet, mind pedig a T-bet szabályozása alatt álló RAD51 kifejeződését [118, 122]. Hasonlóan a Th1 sejtekhez, B-sejtekben a CXCR3 kifejeződése szintén T-bet függő [118]. A CXCR3 receptor biztosítja a sejtek kemokin (CXCL9, 10, 11) grádiens vezérelt migrációját a

szervezetben. Serre és munkatársai kimutatták, hogy a germinális centrum B-sejtek és az ellenanyag termelő plazma sejtek (antibody-forming cell – AFC) CXCR3 expressziója és liganduma felé való migrációs képessége T-bet és IFN γ függő [123].

Összességében elmondhatjuk, hogy a T-bet transzkripciós faktor szerepe mind a T-sejtekben, mind pedig a B-sejtekben sokrétű. Ezen ismereteink alapján, vagyis hogy a plazmasejtek és a memória B-sejtek effektor funkciójának szabályozásában fontos szerepet tölt be [120, 121], hogy az IL-10 termelő CD4⁺ regulátor T-sejtek egy kis populációjának szuppresszív mechanizmusai T-bet függőek [114], úgy gondoltuk fontos lenne megvizsgálni, a T-bet jelentőségét az IL-10 citokint termelő regulátor B-sejtek, legfőképpen a MZ B-sejtek életében.

4 Célkitűzések

Doktori munkám során egyrészt célul tűztük ki, hogy jellemezzük a rheumatoid arthritisben szenvedő betegek szérumában előforduló anti-citrullinált protein/peptid ellenanyagokat (ACPA) specificitásuk és affinitásuk szempontjából, továbbá hogy összefüggést keresünk a betegség prognózisa és az ACPA affinitása között (I). Másrészt célunk volt kollagén indukált arthritisben, a rheumatoid arthritisz egyik egér modelljében, az IL-10 termelő B-sejtek differenciálódásához vezető aktiválódási utak jobb megértése, szabályozó funkciójukban fontos molekulák azonosítása. A lépben elhelyezkedő IL-10 termelésre képes B-sejt populációk közül figyelmünket a marginális zóna B-sejtek (MZ B) felé fordítottuk. Célul tűztük ki, hogy e sejttípusban megvizsgáljuk, hogy a BCR és a TLR9 által aktivált jelpályák közötti kapcsolódási pontként azonosított T-bet transzkripciós faktornak van-e szerepe a marginális zóna B-sejtek regulátor funkcióinak kialakulásában. (II).

Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- I. - Növelhető-e a korábban kidolgozott peptid alapú teszt („4-citrullin-peptid-panel”) diagnosztikai érzékenysége - az RA-val bizonyítottan asszociált - további peptidek (EBNA1/2, α -enoláz, fibrin- β) bevonásával?
 - Felismernek-e az egyedi citrullin tartalmú peptidek segítségével affinitás tisztított ellenanyagok más citrullin tartalmú peptideket is, vagyis kimutatható-e keresztreakció az affinitás-tisztított ellenanyagok és a peptidek között?
 - Alkalmazható-e diagnosztikai célokra a munkacsoport által tervezett, több citrullinált epitópot tartalmazó, úgynevezett „multi-epitóp” peptid?
 - Arra a kérdésre szeretnénk választ találni, hogy van-e összefüggés az ACPA affinitása és az RA súlyossági foka között, vagyis hogy az ACPA affinitása befolyásolja-e a patológiás folyamatokat?
- II. - In vivo, kollagén-indukált arthritisz lefolyása során, hogyan változik az IL-10, a T-bet és a T-bet szabályozása alatt álló CXCR3 kemokin receptor expressziója MZ B-sejtekben?

- In vitro, BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon való aktiválást követően, kialakulnak-e IL-10 és T-bet kettősen pozitív MZ B-sejtek?
- A T-bet szabályozása alatt álló CXCR3 kemokin receptor milyen szerepet játszik a MZ B-sejtek életében, képesek a sejtek a receptor liganduma – a gyulladási területeken is megtalálható kemokin – irányába vándorolni?
- Milyen hatással van a BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztül pre-aktivált T-bet⁺/CXCR3⁺ MZ B-sejtek IL-10 termelésére, ha újra aktiválódnak, „gyulladási környezetet” modellező közegbe kerülnek?

5 Anyagok és módszerek

5.1 Anyagok és reagensek

Ellenanyagok és reagensek

Anti-egér IgM-Alexa647 (BD), anti-egér CD19-FITC (BD), anti-egér CD21-PE (BD), anti-egér B220-PerCpCy5.5 (BD), anti-egér CD5-APC (BD), anti-egér CXCR3-APC (BD), anti-egér T-bet-PE-Alexa647 (BD), anti-egér IL-10-APC (BD); HRP-konjugált anti-egér IgG2a (Southern Biotechnology), anti-IgM F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch), CpG-ODN1826 (InvivoGen), rekombináns egér IFN γ (R&D System), anti-CD40 (R&D), Phorbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA; Sigma Aldrich), Ionomycin (Sigma Aldrich), Monensin (GolgiStop; Beckton Dickinson), Cytotfix/Cytoperm kit (Beckton Dickinson), OptEIA mouse IL-10 ELLISA set (Beckton Dickinson), TRIzol (Life Technologies – Ambion), TaqMan Gene Expression Assay (ThermoFisher), TaqMan Universal PCR MasterMix (ThermoFisher), RNase free DNase (ThermoFisher), dNTP (ThermoFisher), Superscript II enzim (ThermoFisher), λ -karragén (carrageenan) (Sigma Aldrich).

Médiumok, pufferek

RPMI-1640 (10% FCS, 50 μ M β -merkaptóetanol, 2 mM glutamin, 100 U/mL penicillin és 100 μ g/mL streptomycin); HANK's puffer (NaCl; 0,5M Na₂SO₄; 1M KCl; 1M NaH₂PO₄; 1M glükóz; 1M HEPES; H₂O), FACS puffer (PBS, 1% FCS, 0,09% Na-azid), PBS, Coating Buffer (kötő puffer) – IL-10 ELISA (0,2 M Sodium Phosphate, pH 6,5); MACS puffer (0,5% BSA-PBS, pH7), Superscript puffer (InvitroGen-ThermoFisher).

5.2 Vizsgált peptidek

Vizsgálataink során szintetikus peptid párokat teszteltünk, az eredeti szekvencia arginint (R), a módosított citrullint (X) tartalmazott. A peptidek szintézisét az MTA Peptidkémia Tanszék Kutatócsoportja végezte, az irodalomban leírt szekvenciák alapján. Összehasonlítottuk a virális (Eppstein Barr vírus nukleáris antigén – EBNA-1 és EBNA-2) és a bakteriális antigénből származó (α -enoláz), valamint a fibrin- β lánc legfontosabb epitópjának megfelelő, illetve az általunk tervezett „multi-epitóp” peptidek felismerését ELISA módszerrel (3. táblázat).

peptid	szekvencia	szekvencia pozíció	hivatkozás
EBNA-1	Ac-GGDNHGRGRGRGRGRGGGRPGAPG-NH2 Ac-GGDNHG XGXGXGXGXGGGX PGAPG-NH2	35 - 58	Pratesi 2011
EBNA-2	Ac-GQSRGQSRGRGRGRGRGRGKGNH2 Ac-GQ SXGQSXGXGXGXGXGXG KGNH2	341 - 361	Pratesi 2011
α -enoláz	Ac-KIHAREIFDSRGNPTVE-NH2 Ac-KIH A XEIFDS X GNPTVE-NH2	6 - 32	Lundberg 2008
fibrin- β	H-RPAPPPISGGGYRAR-NH2 H- X PAPPPISGGGY XAX -NH2	60 - 74	Sebbag 2006
"multi-epitóp"	Ttds-ARARGSGSGRGRG-NH2 Ttds- AXAXG SGSG XGXG -NH2		

3. táblázat: *ELISA* esszéiben vizsgált peptidek szekvenciái – Vizsgáltuk a peptidek módosított, citrullint tartalmazó és kontrollként a vad típusú, arginint tartalmazó szekvenciáit (Arginin- R; cutrullin- **X**) (EBNA-1/2 - [124]; α -enoláz - [125]; fibrin- β - [126]).

5.3 Citrullin tartalmú peptidekre specifikus ellenanyagok affinitás tisztítása betegek szérum mintáiból

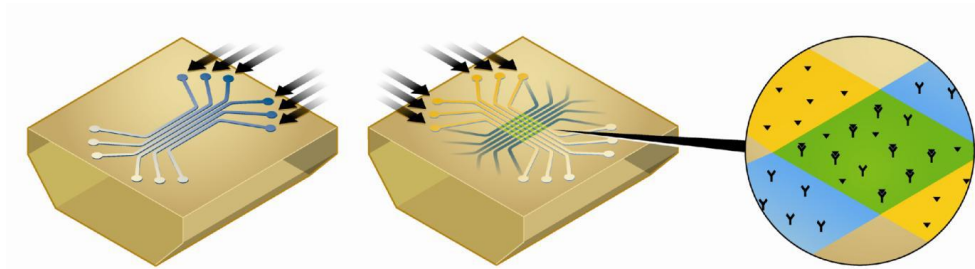
Rheumatoid arthritisben szenvedő egyének szérum mintáiból az IgG izotípusú ACPA-k kinyerése céljából a hígított mintákat Protein G oszlopra vittük (30'). A nem kötődő fehérjék eltávolítása után az oszlopra kikötődött IgG ellenanyagokat HCl-glicin pufferrel (0,1M, pH 2,5) eluáltuk az oszlopról és NanoDrop készülék segítségével megmértük a szűrlet IgG koncentrációját. PBS-sel szemben történt dialízist követően második lépésként az ellenanyag szuszpenziót - az előzőleg citrullin tartalmú peptidekkel telített (5 mg/ml) – oszlopokra (GE; NHS HiTrap 1ml) injektáltuk és kötő pufferben (0,1 M NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH=7) három napon keresztül áramoltattuk az oszlopon. Mosási lépést követően a citrullin tartalmú peptidekre (filaggrin-19mer, vimentin, fibrin, α -enoláz, „multi-epitóp”) specifikus IgG izotípusú ACPA-kat glicin pufferrel (1M) eluáltuk az oszlopról. A kapott citrullin tartalmú peptid specifikus, affinitás tisztított IgG ellenanyagokat az SPR vizsgálatok beállítására és a

szérumok peptid specifikus IgG koncentrációjának meghatározásához használtuk fel. Mindemellett vizsgáltuk a peptid-specifikus ACPA-k keresztreakcióját más peptidekre nézve.

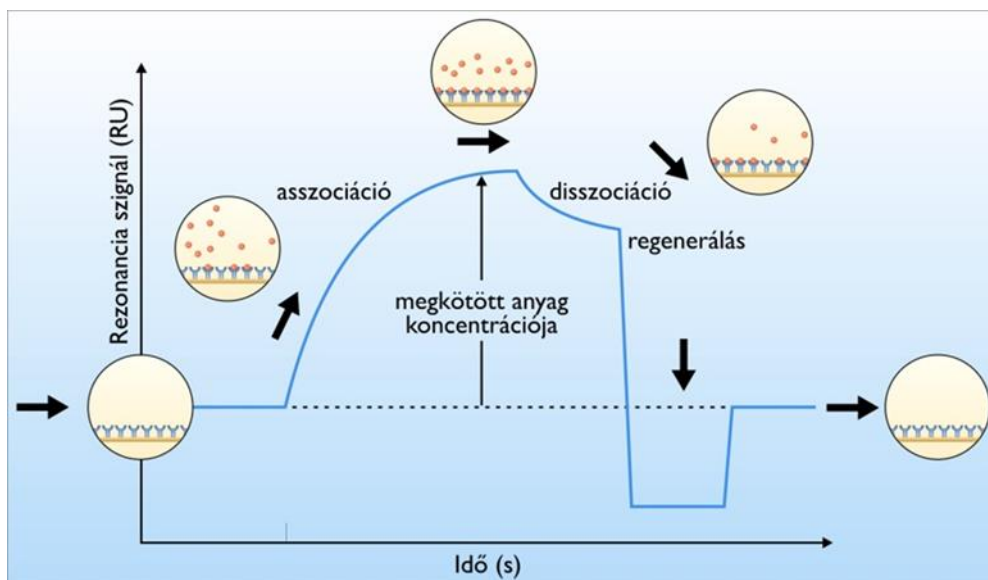
5.4 Felszíni plazmon rezonancia vizsgálatok

A citrullinált peptidek és a specifikus ellenanyagok interakcióját felszíni plazmon rezonancia (SPR – Surface Plasmon Resonance) bioszenzor ProteOn XPR36 (Bio-Rad) készülékkel, a kis molekulák detektálására alkalmas kovalens GLH szenzor chipen vizsgáltuk.

Az SPR mérés során a kölcsönható partnerek egyikét egy chip felszínén immobilizáljuk, majd fölötte áramoltatva a másik partnert vagy puffert, a kötődés illetve a disszociáció sebességi állandója (*kon* és *koff*) meghatározható. A felszínhez kötődő anyagot (tömeget) spektroszkópiai úton méri a készülék. A chip tulajdonképpen egy üveglemez, amelynek felszínét vékony fémréteggel, általában arannyal vonják be. Ezt egy olyan „fedőlemez” fedi, amiben csatornák vannak kialakítva, lehetővé téve, hogy a felszín fölött folyadékot áramoltassunk (9. ábra). A chip a készülékben egy prizmán helyezkedik el. A mérés során a chipet lézertűnyel világítják meg, majd a visszavert sugár egy detektorra vetődik. Ha a chip felszínére kikötődik az áramoltatott oldatból molekula, akkor a felület menti folyadékréteg törésmutatója megváltozik, a felszínhez kötődő molekulák eltolják a beesési szöveget, ami SPR válaszként detektálható. Ez az eltolódás fehérjék esetében egyenesen arányos a felszínen megkötődő anyagmennyiséggel. Értékét származtatott mennyiségben, rezonancia egységben (resonance unit – RU) adják meg ($1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$). Az SPR jel időbeni változását követve – úgynevezett „szenzogram”-on ábrázolva (10. ábra) - meghatározható a kötődéshez tartozó asszociáció sebességi állandója, vagyis más néven a k_{on} vagy „on-rate”. Majd a felszín fölött ligandummentes puffer áramoltatásával a disszociáció sebességi állandóját, az „off-rate”-t is mérhetjük. A kettő hányadosa a K_D , a disszociációs konstans a kötés erősségéről ad információt [127] (elte.prompt.hu).



9. ábra: A ProteOn XPR36 működési elve – Bal oldalon látható, hogy a vertikális csatornákon történik a „ligand” immobilizációja, amire merőlegesen, a horizontális csatornákon áramoltatjuk az „analitot”, az interakciós partnert (középen). A csatornák kereszteződésében kialakuló úgynevezett „interakciós fokokban” jön létre a ligand és az analit közötti interakció (jobbra) (www.bio-rad.com).



10. ábra: Egy „szenzogram” sematikus ábrázolása - Cooper és mtsai alapján módosítva [127](elte.promt.hu).

Előkísérleteink során kiválasztottuk az egyes peptidok optimális kötődését biztosító, megfelelő pH értékű puffereket. Az ELISA vizsgálatokban vizsgált összes peptid kötődési erősségét szeretnénk volna megvizsgálni, de a kovalens chip (GLH) felszínére csak három peptidet sikerült kikötnünk az általunk vizsgált körülmények között. A citrullin tartalmú filaggrint (10 µg/ml) acetát pufferben (pH=4), a vimentint (10 µg/ml) pH=9-es, míg a „multi-epitóp” peptidet (100 µg/ml) pH=9,5-ös TRIS pufferben kötöttük fel. A chip felszín, 400 mM EDAC és 100mMSulfo-NHS 1:1 arányú keverékével való (30 ul/perc, 5') aktiválását követően az adott pH tartományú pufferben és adott koncentrációban kikötöttük a felszínre a peptidokat (30

ul/perc, 5'). A felszín 1M Ethanol-Amin-HCl oldattal való deaktiválását követően (30 ul/perc, 5'), 50ul/perc áramlási sebességgel mértük a szérum, az affinitástisztított IgG vagy kontrollként az IVIg minták asszociációjának (2 percig) és disszociációjának (10 percig) időbeni változását. A szérumokat ötszörös kiindulási hígításban, majd onnantól felező hígítási sorban vittük fel a chipre. Az egyes mérések között 10 mM-os glicinnel (pH2) regeneráltuk a chipet. A chip felszínének mosását 0,005% PBS-Tween20 pufferrel (pH7,4) végeztük (90ul/perc, 2,5'). A hat csatornából 5 csatornában a mintákat 5 hígítási sorban, a 6. csatornában pedig vak mintaként csak PBS-Tween20-t áramoltattunk.

Kiértékelés során a Langmuir-modellt alkalmaztuk, mely az 1:1 arányú kötődést tételezi fel az antigén és az antitest között [128].

5.5 Betegcsoportok / vizsgált állatok

Humán betegcsoportok

A vizsgálatokhoz 177 RA beteg szérum és vérmintáit használtuk fel, melyet Dr. Nagy György és Dr. Rojkovich Bernadette bocsátott rendelkezésünkre a Budai Irgalmasrendi Kórházból. A betegek közül 147 nő és 30 férfi volt, átlagéletkoruk (\pm SD) 57 ± 14 év (tartomány: 22-83 év) volt. Összehasonlításként kontrollként 104 egészséges (H) személy (ezeket Dr. Prohászka Zoltán, a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika munkatársa bocsátotta rendelkezésünkre) szérum mintáit vizsgáltuk meg. Az etikai engedély száma: 376/PI/10, 5257-0/2010-1018EKU.

Kísérleti állatok

Vizsgálataink során DBA/1 (H-2^q MHC haplotípus) egértörzset használtunk, amelyet széles körben használnak a humán rheumatoid arthritis modellezésére [5]. Ezekben az állatokban 2-es típusú kollagén és komplett Freund adjuváns emulziójával való immunizálást követően kb. 80 %-os hatékonysággal kialakul az autoimmun betegség, a súlyos arthritisz. Az állatok a Charles River Laboratories International cégtől származtak és az ELTE Immunológiai Tanszékének állatházában tartottuk meghatározott kórokozóktól mentes (SPF-patogen-free) körülmények között.

Az állatkísérletek a hatályos állatvédelmi jogszabályokkal összhangban kerültek elvégzésre, a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélye alapján és az egyetem állatkísérleti szabályzatában foglaltaknak megfelelően.

5.6 Kollagén-indukát arthritisz indukciója, a betegség nyomon követése

8-10 hetes nőstény DBA/1 egereket immunizáltunk szarvasmarhából származó II-típusú kollagénnel (CII, Chondrex, USA). Az első oltás (0. nap) állatonként 100 µg CII és komplett Freund adjuváns (CFA) szubkután, faroktöbbe történő injektálásával történt, amelyet a 21. napon 100 µg CII és inkomplett Freund adjuváns (IFA) emulziójának ráoltása követett. A CII előzőleg 0,05 M ecetsavban került beoldásra. A kontroll csoportban lévő állatok CII helyett PBS és adjuváns keverékével lettek oltva ugyanazon protokoll szerint. A betegség előrehaladtát egyedileg követtük nyomon az állatoknál, a betegség kialakulásának mértékét a látható klinikai tünetek alapján hetente jellemeztük egy vizuális standard pontozási rendszer segítségével. Az állatok végtagjait a duzzadtságtól, a bőrpírtól és a deformáltságtól függően 0-4 pontig értékeltük. A pontozás a következő skála alapján történt: 0: normál, bőrpír és duzzadás mentes; 1: a boka ízületeket érintő enyhe duzzanat; 2: enyhe duzzadás a metatarzális/metakarpális ízületekben; 3: közepes duzzanat az ujjakra is kiterjedve; 4: súlyosan duzzadt végtag, beleértve az ujjak duzzanatát és a súlyos deformitást is. Egy végtagra maximálisan 4 és egy állatra maximálisan 16 betegség súlyosságát jellemző pontszám volt adható (11. ábra) [5, 129]. Az állatokból kísérletenként vért vettünk, amiből a szérum mintákat -20 fokon tároltuk felhasználásig. Az in vitro vizsgálatokhoz a B-sejt populációkat a túlaltatott állatok lépéből a betegség akut és remisszió fázisából izoláltuk.



11. ábra: *CII*-vel immunizált állat hátsó végtagjai. A képek jól demonstrálják, hogy a gyulladás hogyan erősödik a betegség előrehaladtával („e” ábrától az „a” felé haladva: „e” – 0 pont; „d” – 1 pont; „c” – 2 pont; „b” – 3 pont; „a” – 4 pont) [5].

5.7 Egér lép B-sejt alpopulációk izolálása

5.7.1 Mágneses sejtszeparálás

Az egerek lépéből a B-sejteket anti-B220 mágneses gyöngyök, míg a Marginális zóna és Follikuláris B-sejteket a „MZ and FO B cell isolation kit” segítségével a gyártó leírását követve szeparáltuk (magnetic activated cell sorting, MACS, Miltenyi Biotec GmbH).

Marginális zóna és Follikuláris B-sejt izolálás

Az egerek lépéből készített sejtszuszpenzióban beállítottuk a sejtszámot MACS pufferben (10^8 sejt/minta - 0,5% BSA-PBS, pH7). $100\mu\text{l}/10^8$ sejt Biotin-Antibody koktéllal való inkubációt követően (negatív B-sejt szelekció; anti-egér-CD43/CD4/CD93/Ter119 - 15 perc, 4°C) a sejteket mágneses gyöngyökhöz konjugált anti-biotin ellenanyagok (15 perc, 4°C) jelenlétében inkubáltuk. A sejtszuszpenziót MACS szeparáló oszlopra vittük, az oszlopot mágneses térbe helyeztük és az átfolyó sejteket összegyűjtöttük. A sejtszuszpenzió mosása után a sejteket inkubáltuk az anti-CD23 gyöngyökkel (15 perc, 4°C), majd ismét szeparáltuk a sejteket MACS oszlop segítségével. Az átfolyó frakció tartalmazta a MZ B-sejteket, míg az oszlopra kötődve maradt a FO B-sejt populáció, amelyeket a mágnes eltávolítása után gyűjtöttünk össze az oszlop atmoszárával. A sejtek sejttenyésztő médiumban való felvétele után - fluoreszcensen jelölt ellenanyagok használatával (antiCD23-FITC, antiCD21-PE, antiB220-PerCpCy5.5, antiCD5-APC) - ellenőriztük a sejtpopulációk tisztaságát FlowCytometer segítségével (FACS Calibur). A MZ B-sejtek tisztasága kb. 80-85 %, míg a FO B-sejteké 90-95 % volt.

B220⁺ B-sejt izolálás

A lép B-sejtek izolálását anti-B220 mágneses gyöngy (MACS) jelöléssel végeztük. A protokoll megegyezik a MZ és FO B-sejt izolálásnál leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben kimarad az első, negatív szelekciós lépés. Esetünkben, a jelölt, az oszlopra kötődött, pozitívan szelektált B220⁺ B-sejt populációt izoláljuk az oszlopról.

5.7.2 Sejtszeparálás fluoreszcens jelölés alapján

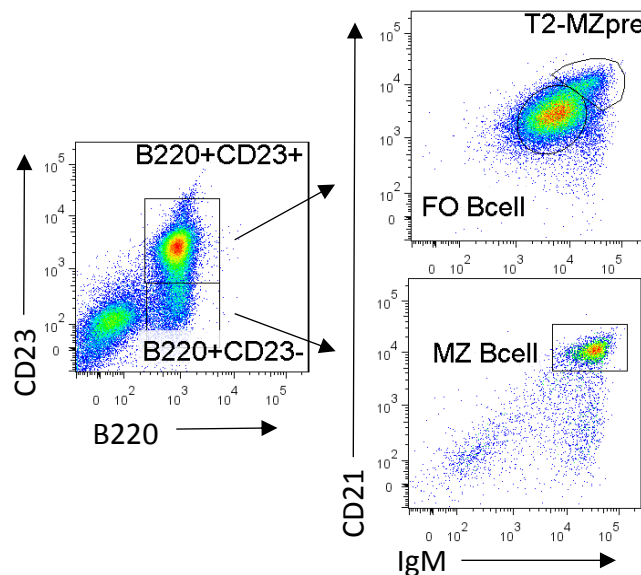
Az áramlási citometria egy speciális felhasználási lehetősége a sejtszeparálás (fluorescent activated cell sorting - FACS). A műszerhez kapcsolt flow sorter, az úgynevezett válogató egység képes szétválogatni a sejteket méretük és a fluoreszcens jel alapján.

Az egerek lépéből készített sejtuszpenzióban (10^8 sejt/ lép) jelöltük a sejteket fluoreszcensen jelölt anti-IgM, anti-CD21, anti-CD23 és anti-B220 ellenanyagokkal (2% FCS-PBS; 20'; 4°C). Mosási lépést követően a sejteket Hank's pufferben vettük fel és a fluoreszcens sejtszeparátor (FACS Aria III cell sorter) segítségével, sejt felszíni receptoraik és irodalmi adatok alapján izoláltuk a sejt populációkat. Két lépéses kapuzási stratégiánk Claudia Mauri és mtsai. publikációján alapult (12. ábra) [67].

MZ B-sejtek jellemzői: B220⁺ CD23⁻ IgM^{magas} CD21^{magas}

FO B-sejtek jellemzői: B220⁺ CD23^{közepes} IgM^{alacsony} CD21^{közepes}

T2-MZpre sejtek jellemzői: B220⁺ CD23^{magas} IgM^{magas} CD21^{magas}



12. ábra: A B-sejt populációk izolálásához használt kapuzási stratégia – Claudia Mauri és mtsai alapján módosítva [67] – A sejteket először elkülönítettük a B220 és a CD23 expresszió alapján, majd pedig a két populációból kiválasztottuk az IgM és a CD21 expresszió alapján a vizsgálni kívánt három B-sejt populációt, a MZ B (MZ Bcell), a FO B (FO Bcell) és a T2-MZpre sejteket.

5.8 Izolált lép B-sejtek in vitro vizsgálata

Az izolált lép B-sejt populációk szuszpenziójában beállítottuk a sejtszámot 2×10^5 sejt/100ul-re, majd aktiváltuk a sejteket a következőkkel: anti-IgM (10 μ g/ml), CpG-ODN (1 μ M), IFN γ (50 ng/ml), anti-CD40 (10 μ g/ml) és a karragén-indukált zsákból izolált folyadék feles hígításával („air-pouch” fluid). A mintákat különböző ideig inkubáltuk (6-48h), majd a sejtek ülepítését követően a sejt kultúra felülúszót leszívtuk és feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A sejtekkel a kísérlettől függően tovább dolgoztunk, vagy génexpressziós vizsgálatokhoz RNS-t izoláltunk, vagy mértük a felszíni receptorok és az intracelluláris molekulák jelenlétét áramlási citometria segítségével.

5.9 ELISA vizsgálatok

5.9.1 RA betegek szérummintáiból citrullin tartalmú peptidekre specifikus ellenanyagok kimutatása indirekt ELISA módszerrel

Előzőleg neutravidinnel telített (5 μ g/ml; PBS; 4°C , ON) 96 lyukú ELISA „microtiter” lemezeket fedtünk arginin és citrullin tartalmú peptidekkel (1 μ g/ml; PBS; 37°C , 1 óra). Fél óra blokkolás (2 % BSA-150 mM NaCl-PBS; 37°C) után a szérumokat 1:100 hígításban kötő pufferben (2% BSA-2 M NaCl-PBS) 4°C -on, egy éjszakán át inkubáltuk a lemezeken. 0,05 % Tween-PBS mosás után, a jelen levő ellenanyagok detektálásának érdekében, fedtük a lemezeket 1 óráig, 37°C -on nyúl anti-humán IgG-HRPO (Dako) másodlagos ellenanyaggal 1:2000-szeres hígításban (2 % BSA-150 mM NaCl-PBS). A színreakciót TMB (3'3'5'-5'-Tetrametil-benzidine) enzim szubsztrát hozzáadása után detektáltuk ELISA Reader segítségével (450 nm). Az enzimreakciót 2 N kénsavval állítottuk le.

5.9.1.1 Szérumok citrullinált peptid-specifikus IgG koncentrációjának meghatározása

A szérum mintákban lévő citrullinált peptideket felismerő IgG izotípusú ellenanyagok (ACPA) koncentrációjának meghatározásához a 5.3 fejezetben említett affinitás tisztított ellenanyagokat használtuk ismert koncentrációjú standard-ként. A protokoll megegyezett a 5.9.1 fejezetben leírt indirekt ELISA protokollal, azzal a különbséggel, hogy a lemez aljára a peptidek 2,5 μ g/ml koncentrációban kerültek fedésre. Az ismert koncentrációjú ACPA-kat 50 μ g/ml

koncentrációból kiindulva 8 pontos felező hígításban használtuk standard-ként, a szérum mintákat 100x hígításban alkalmaztuk. A kapott standard OD (optikai denzitás) értékekre illesztett görbe egyenesét használva határoztuk meg a szérumok citrullinált peptid specifikus IgG koncentrációját.

5.9.2 Egér kollagén specifikus IgG2a izotípusú ellenanyagok kimutatása indirekt ELISA módszerrel

Az immunizált és a kontroll állatok szérum mintáiból az egér kollagén specifikus IgG2a titert indirekt ELISA módszerrel határoztuk meg. A specifikus ellenanyag detektálásához a lemezeket fedtük 5 ug/ml egér II-es típusú kollagénnel (Chondrex) a gyártó által mellékelt pufferben (egy éjszakán át, 4°C). A blokkolás 1% BSA-PBS pufferben (1 óra), a szérum minták és a detektáló ellenanyagok hígítása szűrt PBS-ben történt. A felvitt szérumokat 1:200 kiinduló hígításban, majd négyszeres hígítási sorban alkalmaztuk (2 óra). Mosást (0,05% Tween-PBS) követően a lemezeket HRP konjugált IgG2a ellenanyagokkal (4000x, 1 óra) hívtuk elő, majd mosási lépéseket követően a lemezre szobahőmérsékletű TMB-t (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin) mértünk rá. A reakciót 2N kénsavval állítottuk le, majd az abszorbanciát 450 nm-en olvastuk le ELISA Reader segítségével. Az egyes hígítási pontokból végpont-titert számoltunk GraphPad5 (Prism) program segítségével.

5.9.3 Egér lép B-sejtkultúrák felülszájából IL-10 citokin detektálása szendvics ELISA módszerrel

Az aktivált sejtek által termelt IL-10 mennyiségét OptEIA IL-10 ELISA Kit (BD) segítségével határoztuk meg a gyártó leírását követve. A 96 lyukú mikrotiter lemezek felületét fedtük egy éjszakán át (4°C) anti-IL-10 specifikus ellenanyagot („capture antibody”) tartalmazó pufferrel (kötő puffer – 0,2M sodium phosphate, pH 6,5). Mosás (0,05% Tween-PBS) után a lemezeket blokkoltuk a minta pufferrel (10 % FCS-PBS) szobahőmérsékleten 1 óráig. A lemezek mosása után felvittük a minta pufferben kétszeresre hígított felülszó mintákat és az ismert koncentrációjú (legtöményebb 2000 pg/ml, felező hígítás) rekombináns IL-10-ből hígított standard sort. 2 óra, szobahőmérsékleten történő inkubálás és mosás után a lemezeket fedtük a hígított detektáló ellenanyag koktéllal (1:250). Mosást követően a lemezekre

szobahőmérsékletű TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin) szubsztrátot mértünk rá és a reakciót 2N kénsavval állítottuk le. Az abszorbanciát ELISA Reader segítségével 450 nm-en detektáltuk. A szekretált IL-10 mennyiségét GraphPad5 (Prism) szoftver segítségével számoltuk ki és ábráztuk.

5.10 Sejtfelszíni és intracelluláris molekulák detektálása áramlási citometriával

A sejtek feltárását és az intracelluláris molekulák detektálását a Beckton Dickinson Cytotfix/Cytoperm kit segítségével végeztük.

A 5.8 fejezetben leírtak alapján aktivált sejteket a megfelelő időinkubációt követően lecentrifugáltuk (1500 rpm, 4°C, 7 perc), a sejt kultúra felülúszóját eltávolítottuk. A sejteket még további 6 óráig inkubáltuk médiumban oldott PIM koktélnak (50 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin, 2 µM Monensin/GolgiStop). Mosást követően (1500 rpm, 4°C, 7 perc) a sejteket fluoreszcensen jelölt - a sejtfelszíni molekulákra specifikus - ellenanyagokkal jelöltük pl. anti-CD19-FITC vagy anti-CXCR3-APC vagy anti-B220-PerCpCy5.5 (20 perc, sötétben, 4°C). Cytotfix oldattal való fixálás (20 perc, sötét, 4°C) után mostuk a mintákat Perm/Wash pufferrel, majd intracellulárisan jelöltük a sejteket fluoreszcensen jelölt anti-IL-10-APC és anti-T-bet-PE ellenanyagokkal (30 perc, sötét, 4°C). A mérést FACS Calibur készülék segítségével végeztük, az adatok kiértékelését FlowJo (FLOWJO LLC) szoftverrel hajtottuk végre. A pozitív sejteket az FSC/SSC alapján megállapított limfocita kapuból detektáltuk.

5.11 Génexpressziós vizsgálatok valós idejű PCR segítségével

Az aktivált és a nem aktivált sejteket TRIzol (Life Technologies – Ambion) reagensben vettük fel és felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az RNS-t izopropanol-etanol kicsapással nyertük ki, amelynek első lépéseként a mintákhoz 200 µl kloroformot mértünk, majd az elegyet fázisválasztó gyantát tartalmazó csövekben lecentrifugáltuk (11000g, 4°C, 15 perc). A vizes fázisban glikogén, valamint izopropanol jelenlétében szobahőmérsékleten precipitáltattuk a nukleinsav állományt (10 perc), majd lecentrifugáltuk a mintákat (11000g, 4°C, 15 perc). A felülúszó eltávolítása után a precipitátumot kétszer mostuk 70%-os etanollal (5200g, 4°C, 15 perc), majd a csöveket hagytuk szobahőmérsékleten száradni 20 percig. A mintákat

DNáz/RNáz mentes vízben oldottuk fel (3 perc, 65°C). NanoDrop készülékkel ellenőriztük az RNS minőségét (NanoDrop3300). A mintákat -20°C-on tároltuk a felhasználásig.

A reverz transzkripcióhoz elsőként eltávolítottuk az esetleges genomiális DNS szennyeződések DNáz enzim jelenlétében (30 perces 25°C), amelynek aktivációját 10 perces 70°C-on való inkubációval állítottuk le. Ezt követően elvégeztük a cDNS szintézist random hexamerek, dNTP, valamint Superscript II enzim hozzáadásával (InvitroGen - ThermoFisher Scientific). Az átíráshoz a Thermo Electron Corporation – PCR Express készülékét használtuk és minden esetben a gyártó protokolljának megfelelően jártunk el. A mintákat RNáz és DNáz mentes vízben vettük fel és -20°C-on tároltuk.

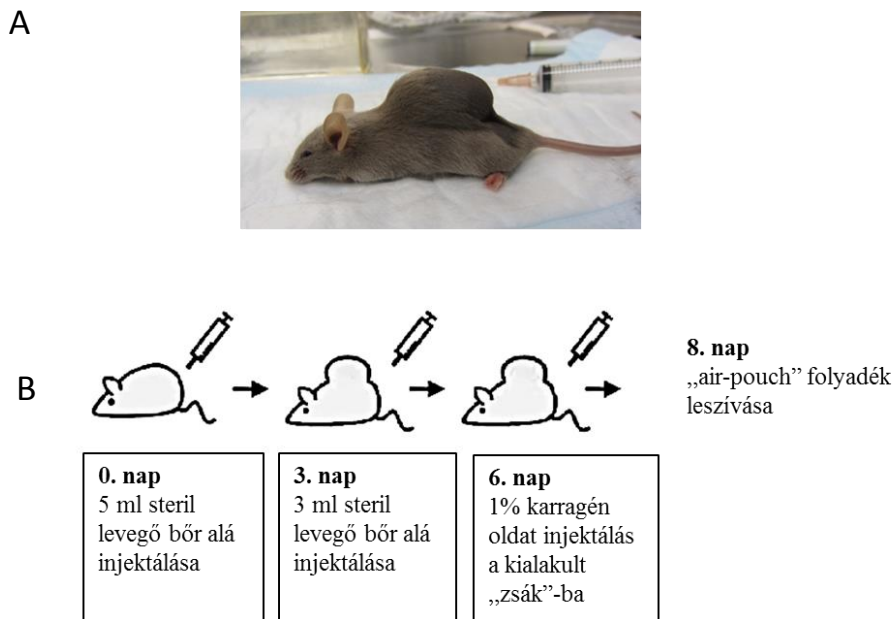
A real-time PCR-hez a ThermoFisher Scientific TaqMan Assay On Demand termékeit használtuk a gyártó által megadott protokollt követve. Az IL-10, a T-bet és a CXCR3 mRNS mennyiségének mérését 20 µl végtérfogatban TaqMan Gene Expression Assay (20X) (ThermoFisher Scientific) és TaqMan Universal PCR MasterMix (2X) (ThermoFisher Scientific) felhasználásával végeztük ThermoFisher Scientific StepOnePlus™ real-time PCR System készülék segítségével (ThermoFisher Scientific). A génexpresszió relatív értékének normalizálásához a β2 mikroglobulin (ThermoFisher Scientific) gént használtuk belső kontrollként. A génexpressziós szintek relatív változását a stimulálatlan mintákhoz képest komparatív C_T módszerrel (comparative C_T 2^{-ΔΔCT} method) számoltuk ki [130].

5.12 Karragén-indukált gyulladási modell

Az akut ízületi gyulladás modellezésére a nemzetközileg elfogadott, karragénnel kiváltott gyulladási modellt, az ún. „air-pouch” modellt, alkalmaztuk, ami azon alapul, hogy az állat bőre alá injektált steril levegő által kialakított üregben egy fibroblasztokból és makrofág-szerű sejtekből álló vékony réteg alakul ki, ami nagyon hasonlít a szinoviális membránra. Immunogén anyag, mint jelen esetünkben a karragén (carrageenan) - egy tengeri hínárból (vörös moszat) előállított lineáris poliszacharid - beadása az üregbe, az ízületi gyulladásra nagyon hasonlító reakciót idéz elő. A kialakult zsákban („pouch-ban”) megnövekedett sejtinfiltráció és citokin koncentráció emelkedés detektálható [131, 132].

A 0. napon felnőtt, egészséges DBA/1 egerek hátán steril 5ml levegő a bőr alá injektálásával kialakítottuk a zsákokat (13. ábra). A 3. napon a zsákokat feltöltöttük újabb 3ml steril levegővel, amelyekbe a 6. napon 1 ml fizsóban oldott 1% λ-karragén (Sigma-Aldrich) szuszpenziót

injektáltunk. Két nap múlva az állatok túlaltatása után a zsákokat átmostuk 1ml steril PBS-sel, majd ezt a zsákból leszívott folyadékot („air-pouch fluid”) lecentrigáltuk (5000rpm, 10 perc, 4°C), a felülúszót összegyűjtöttük és felhasználásig -80°C-on tároltuk (13. ábra). A leszívott folyadékot kísérleteink során a „gyulladásos környezet” modellezésére használtuk fel a 5.8 fejezetben leírtak alapján.



13. ábra: *Karragén-indukált „air-pouch” modell kivitelezésének sematikus ábrázolása* – Egy indukció során készült reprezentatív kép – forrás: Jonathan D. Finn; Academic Medical Center Amsterdam (A); a kísérlet menete (B).

5.13 A sejtek migrációs képességének vizsgálata

A MZ B-sejtek migrációs képességének vizsgálatára egy ún. „transwell-migration assay”-t alkalmaztuk.

Az izolált MZ B-sejt populáció szuszpenziójában beállítottuk a sejtszámot 2×10^6 /ml-re sejtenyészítő médiumban (RPMI-1640), majd aktiváltuk a sejteket a következőkkel: anti-IgM (10 μ g/ml), CpG-ODN1826 (1 μ M), IFN γ (50 ng/ml). A kísérlet során kontrollként nem stimulált MZ B-sejteket használtunk. 48 óra elteltével a sejteket mostuk háromszor médiummal, majd beállítottuk a sejtszámot 6×10^5 sejt/100ul 1% BSA-t tartalmazó médiumban. 100 ul sejtsuszpenziót vittünk a 6,5-mm átmérőjű, 5 μ m pórusú polikarbonát TransWell culture betét (Corning Sigma-Aldrich) felső kamrájába. Az alsó kamrába 600 ul médiumban oldott 100nM

CXCL9 kemokin került. Kontrollként csak médiumot használtunk az alsó kamrában. 2 óra inkubációt (37°C, 5% CO₂) követően a felső és alsó kamrából a sejteket összegyűjtöttük és megszámláltuk a sejteket áramlási citometria segítségével. Minden mintából a sejteket azonos térfogatban vettük fel, azonos ideig és azonos sebességgel mértük le. A migrációs indexet az alsó kamrába migrált sejtek számának és a bevitt („input”) sejtszám hányadosából számoltuk. A kapott eredményeket normalizáltuk a kontroll mintában kapott értékkel, ahol a sejtek nem specifikusan, kerültek át az alsó, kemokin mentes médiumot tartalmazó, kamrába [133].

5.14 Statisztikai analízisek

A különböző peptidekre kapott OD (optikai denzitás) értékek hányadosát, az úgynevezett OD index-et ábrázoltuk (citrullin tartalmú peptid OD/arginin tartalmú peptid OD) grafikonban. A szérumszorongatok peptid felismerésének eltérését és az in-vitro kísérletekben a különböző stimulusok hatásának összehasonlítását egyváltozós ANOVA analízissel és Kruskal-Wallis teszttel vagy *t* teszttel vizsgáltuk. A peptidek diagnosztikai hatékonyságát ROC (Receiver Operator Characteristic) görbe analízis segítségével analizáltuk [37]. A peptidek szenzitivitás és specificitás értékeinek meghatározásához, először meghatároztuk a határértéket („cut-off”), amely az egészséges kontroll csoport értékeiből számolandó, miszerint vesszük a csoport átlagát és a szórás (SD) kétszeresét. A szenzitivitás érték a határérték feletti RA betegek száma százalékosan az összes RA beteghez képest. A specificitás a határérték alatti, illetve az összes kontroll minta aránya százalékosan kifejezve. Mi azt a megközelítést választottuk, hogy a ROC görbe analízis eredményeinek alapján az egyes tesztek specificitás értékeit egységesítettük, miáltal szenzitivitás értékeik egyértelműen összemérhetővé váltak. Auto-ellenanyagok esetében a 90 %-os specificitás általánosan elfogadott diagnosztikailag optimalizált érték. A betegség (CIA) különböző szakaszaiból izolált minták génexpressziós eredményeinek és az auto-antitestek disszociációs konstansainak és a betegség súlyosságát jelző DAS28 indexek kapcsolatát Pearson-féle korreláció analízissel vizsgáltuk.

Minden statisztikai analízis elvégzéséhez a GraphPad5 (Prism) programot használtuk.

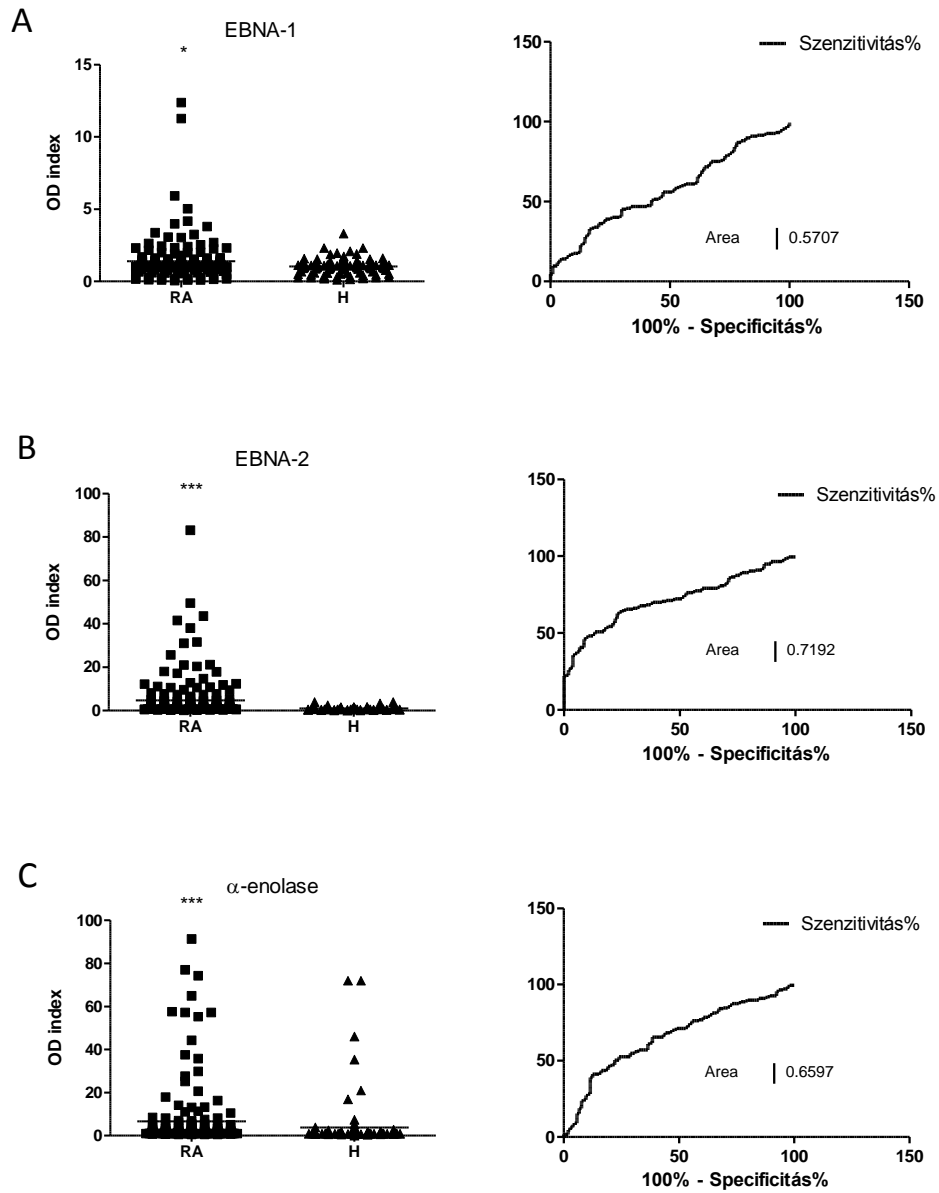
6 Eredmények

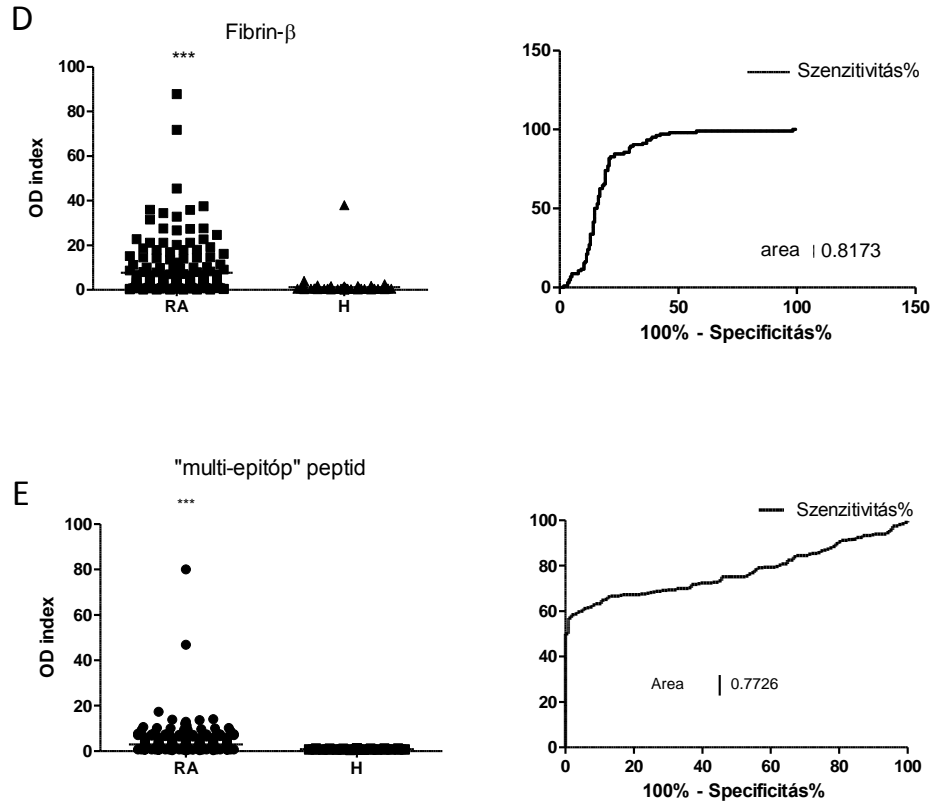
6.1 RA szérum minták szűrése citrullinált peptid epitópokkal

A citrullin tartalmú epitópok ACPA által való felismerését indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. A vad típusú (arginint tartalmazó) és a citrullinált peptideket mikrotiter lemezre kötöttük ki. A szérum mintákat (1:100) 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk a lemezeken, majd a kötődött ellenanyagokat enzim kapcsolt IgG-HRP ellenanyaggal és az enzim szubsztrátjának hozzáadásával detektáltuk. A különböző peptidekre kapott OD (optikai denzitás) értékek hányadosát, OD index-ét (OD citrullinált peptid/OD arginin tartalmú peptid) diagramban ábrázoltuk. Az RA-s betegek szérumainak peptid-felismerése minden peptid esetében szignifikánsan magasabbnak adódott az egészséges kontroll (H) csoporthoz képest (14. ábra bal oldala).

A citrullin tartalmú peptidek (EBNA-1 és 2; α -enoláz; fibrin- β ; „multi-epitóp”) diagnosztikai hatékonyságának összehasonlítása céljából ROC görbe analízist végeztünk GraphPad5 program segítségével. A ROC görbe az 1-diagnosztikai specificitás függvényében az egyes határértékek alapján fejezi ki a diagnosztikai szenzitivitást. A határértéket („cut-off”) az egészséges kontroll csoport OD index értékeiből számoljuk (csoport átlag + kétszeres szórás). A diagnosztikai hatékonyság annál a tesztnél a legjobb, amelynek a diagnosztikai szenzitivitás és specificitás értéke is a legmagasabb, ekkor a ROC görbe a négyzet bal felső sarkán keresztül a jobb felsőbe tart. Ha a görbe alatti terület (area under curve = AUC) maximális (=1), akkor a betegek és az egészségesek teljesen elkülönülnek, a teszt hatékonyan használható dignosztizálásra. Abban az esetben, ha a görbe alatti terület pl. 0,5 vagy annál kevesebb, akkor a két csoport között egyáltalán nincs különbség, a teszt alkalmatlan a beteg és egészséges csoport elkülönítésére. Az 14. ábra jobb oldalán láthatóak az általunk vizsgált peptidek ROC görbe analízisének eredményei és a program által számolt ROC görbe alatti területek. A legnagyobb értéket a fibrin- β (0,8173) és a „multi-epitóp” (0,7726) peptid esetében kaptuk, míg a többi peptidnél a ROC görbe alatti területek alacsonyabbnak adódtak (EBNA-1 – 0,5707; EBNA-2 - 0,7192; α -enoláz – 0,6597). A ROC analízis eredményeinek alapján, az egyes peptidek specificitás értékeinek egységesítésével a peptidek szenzitivitási értékei egyértelműen összehasonlíthatóvá váltak. Auto-antitestek esetében a 90 %-os specificitás általánosan elfogadott diagnosztikailag optimalizált érték. A ROC görbe alatti területhez hasonlóan, a fibrin- β és a „multi-epitóp” peptid esetében kaptuk a legmagasabb, 69 és 64 %-os szenzitivitást

értékeket, ami annak a valószínűsége, hogy a teszt egy beteg mintát pozitívnak (betegnek) talál. A többi vizsgált peptid esetében a szenzitivitás értékek 10-50 % között mozogtak (EBNA-1 – 18 %; EBNA-2 – 48 %; α -enoláz – 27 %).





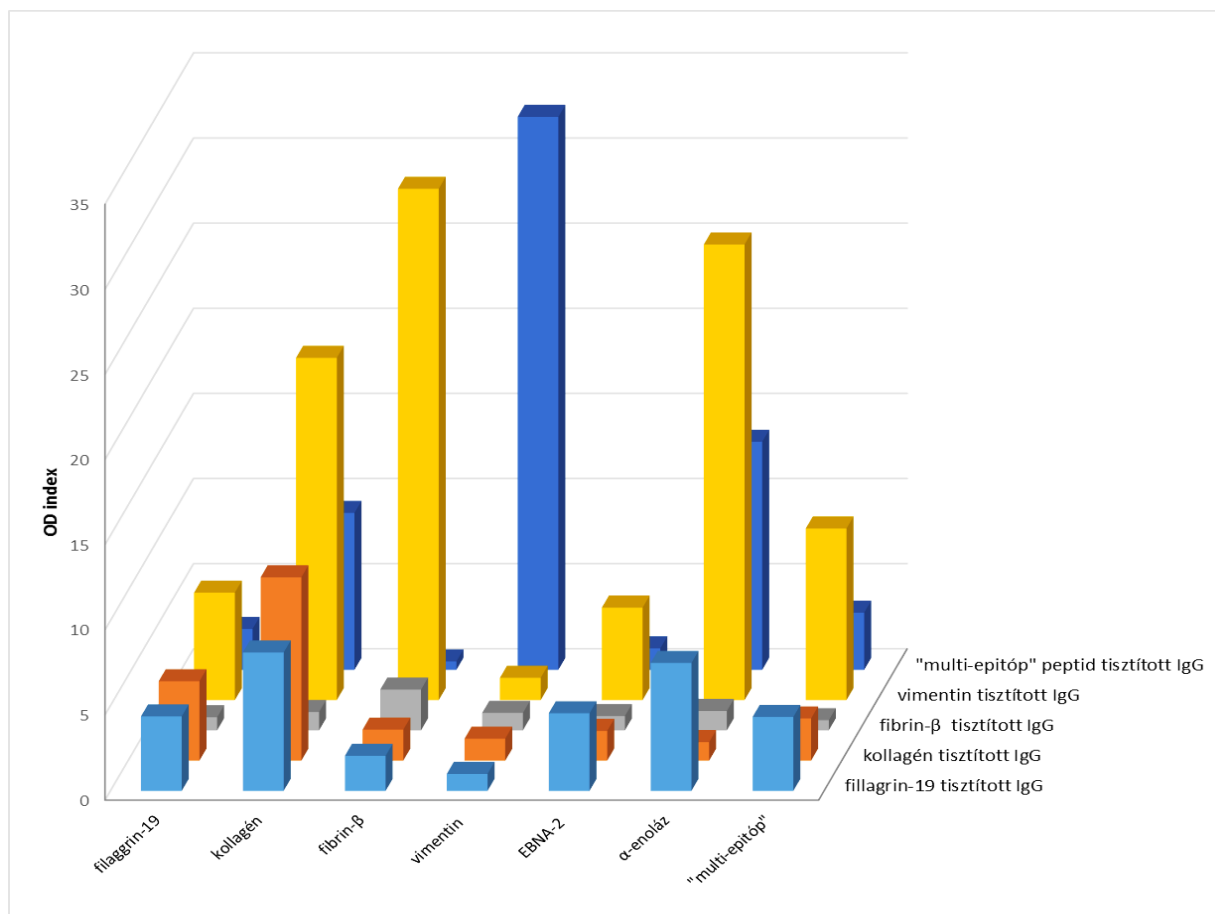
14. ábra: *Citrullin tartalmú peptidek összehasonlítása a dianosztikai teszt szenzitivitása alapján* – bal oldalon a peptidekre kapott OD indexek láthatóak összehasonlítva a beteg (RA) és az egészséges (H) csoport között - EBNA-1 $p=0,0478$ (A); EBNA-2 $p<0,0001$ (B); α -enoláz $p<0,0001$ (C); Fibrin- β $p<0,0001$ (D); „multi-epitóp” $p<0,0001$ (E); az ábra jobb oldalán a ROC görbe analízis eredményei láthatóak, minden peptid esetében feltüntetésre került a görbe alatti terület értéke (area= area under curve = AUC).

Az általunk vizsgált 5 peptid közül az EBNA-1 peptid bizonyult a leggyengébbnek, a többi négy peptidet (EBNA-2, α -enoláz, fibrin- β , „multi-epitóp”) közepesen erős diagnosztikai hatékonyság, 0,65-0,85 közötti ROC görbe alatti terület érték (AUC) jellemezte. Két peptid esetében közepesen magas szenzitivitás értéket kaptunk (fibrin- β – 69 %, „multi-epitóp” – 64 %). Összességében elmondhatjuk, hogy a négy új peptid-epitóp (EBNA-2, α -enoláz, fibrin- β , „multi-epitóp”) a munkacsoport által korábban kifejlesztett „4-peptid-panel”-ben [6] (3.1.4 fejezet) vizsgált peptidekkel együtt alkalmazva hozzájárulhat egy érzékenyebb diagnosztikai teszt fejlesztéséhez.

Ha a szérumonkénti peptid pozitivást jelző OD indexeket összesítettük a „4-peptid panel” értékeivel azt kaptuk, hogy a 4 peptiddel bővült, immár 8 citrullinált peptidet tartalmazó panel (filaggrin 5- és 19-mer, vimentin, kollagén, EBNA-2, α -enoláz, fibrin- β , „multi-epitóp”)

összesített szenzitivitás értéke javult, 85 % lett, vagyis a betegek 15 %-a nem ismert fel egy általunk a tesztben vizsgált peptidet sem, míg a betegek maradék 85 %-a pozitívnak adódott a teszt valamelyik peptidjére nézve.

Már több munkacsoport vizsgálta a citrullinált peptideket felismerő ellenanyagok (ACPA) diverzitását, miszerint az ACPA-k képesek keresztreakálni különböző citrullinált epitópokkal [23, 134]. Ezért a vizsgálatunkba bevont peptideket felismerő ellenanyagok keresztreakciójának mértékét megvizsgáltuk ELISA módszerrel. Kíváncsiak voltunk, hogy az egyes peptidekre specifikus tisztított IgG izotípusú ellenanyagok csak a cél peptidet ismerik fel, vagy képesek keresztreakálni a többi citrullinált peptid szekvenciával. A peptidekkel (1 és 2,5 ug/ml) fedett mikrotiter lemezeket azonos koncentrációjú (0,1 mg/ml) affinitás tisztított IgG ellenanyaggal inkubáltuk, majd anti-IgG-HRP-vel és az enzim szubsztrátjával detektáltuk a reakciót. Az arginin és a citrullin tartalmú peptidekre kapott OD értékek hányadosát ábrázoltuk. Az 15. ábrán látható, hogy az immobilizált peptideken tisztított IgG ellenanyagok nem csak az adott peptidre voltak specifikusak, hanem igen magas keresztreakciót mutattak a többi vizsgált peptiddel is. Nagyfokú heterogenitást tapasztaltunk, például a kollagén peptiddel affinitás tisztított IgG ellenanyag reagált mindegyik peptiddel, de legnagyobb mértékben a tisztításnak megfelelően a kollagén peptidet ismerte fel. Ezzel ellentétben a vimentin peptiddel tisztított IgG nagy mértékben reagált az összes peptiddel, de a vimentinnel csak kis mértékben. A fibrin- β specifikus ellenanyagok ismerték fel a többi peptidet a legkisebb mértékben. Nem meglepő módon a több immunogén epitópot tartalmazó „multi-epitóp” peptiddel affinitás tisztított IgG ellenanyagok esetében kaptuk a legnagyobb OD index értékeket és a legnagyobb heterogenitást a peptidekkel való keresztreakció tekintetében.



15. ábra: Az affinitás tisztított, citrullinált peptidekre specifikus, IgG ellenanyagok keresztreakciójának vizsgálata ELISA módszerrel – a filaggrin, a kollagén, a fibrin-β, a vimentin, az EBNA-2, az α-enoláz és a „multi-epitóp” peptidekkel fedett lemezeket a citrullinált peptidekre (filaggrin, kollagén, fibrin-β, vimentin, „multi-epitóp”) specifikus IgG ellenanyagokkal inkubáltuk és analizáltuk keresztreakáló képességüket.

6.2 Affinitás vizsgálat felszíni plazmon rezonancia készülék segítségével

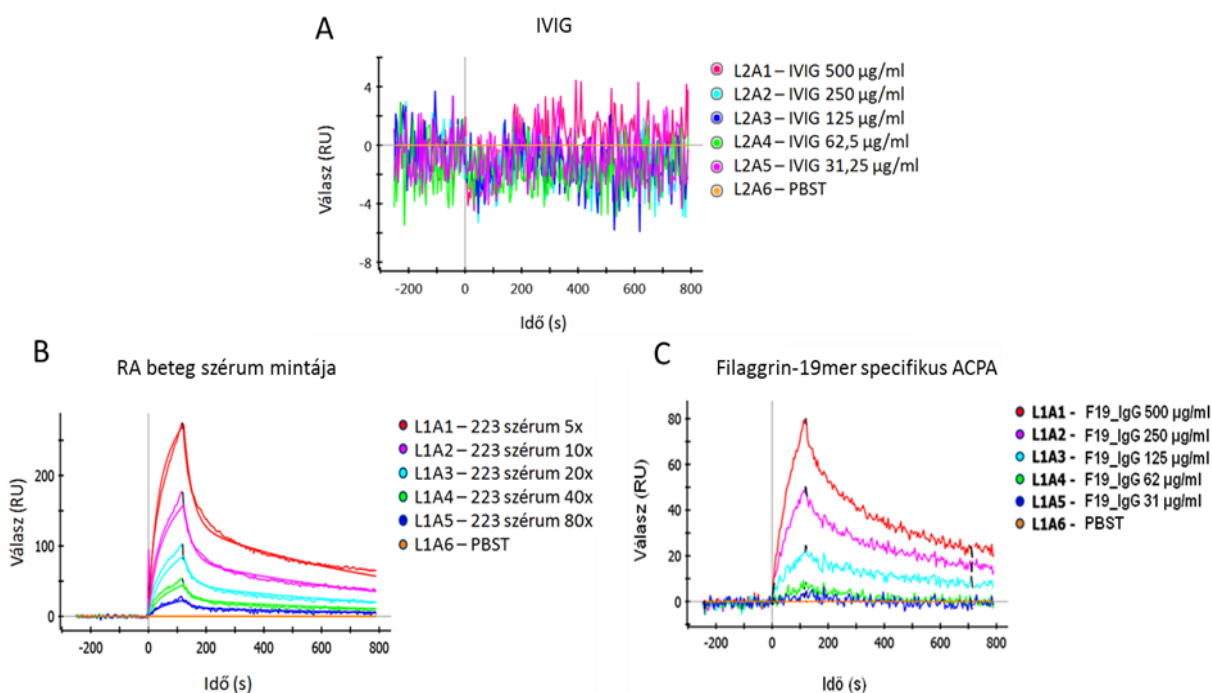
Kevés adat áll rendelkezésre az auto-antitestek, kiváltképpen az anti-citrullinált protein/peptid ellenanyagok (ACPA) affinitásáról. Egy ellenanyag egy kötőhelye és az antigén egy epitópja között létrejövő kapcsolat erősségét az ellenanyag affinitásának nevezzük, amely a disszociációs konstanssal (K_D) jellemezhető. Értéke annak az antigén koncentrációnak (mólban) felel meg, ahol az oldatban lévő ellenanyagok fele van telítve az antigénnel. A kisebb K_D érték nagyobb kötési erősséget jelent, mivel kevesebb antigén kell az interakcióban lévő ellenanyag kötőhelyeinek telítéséhez. Az ellenanyagokra átlagosan 10^{-7} - 10^{-11} M között affinitás érték jellemző de auto-antitestek esetében ez az érték kisebb lehet. Egy ellenanyag és az antigén több epitópja között kialakuló kötések erősségét aviditásnak nevezzük [135].

Az ACPA-k sajátosságainak jobb megértése céljából megvizsgáltuk, hogy a betegek (RA) szérumban lévő citrullinált peptid epitópokat felismerő ellenanyagok (ACPA) milyen affinitással képesek kötődni a citrullinált vimentin, a filaggrin (19-mer) és az általunk tervezett „multi-epitóp” peptidekhez. Az ELISA vizsgálatokban szereplő összes peptid kötődési erősségét szeretnénk volna megvizsgálni, de a kovalens szenzor chip (GLH) felszínére csak 3 peptidet tudunk kikötni az általunk vizsgált körülmények között (4. táblázat).

peptid	szekvencia	hivatkozás
vimentin	Ac-SAVRAXSSVPGVRK-NH ₂	Bang 2007
filaggrin	Ac-SHQESTXGXSXGXSGXSGSK-NH ₂	Schellekens 1998
"multi-epitóp"	H- Ttds-AXAXGSGSGXGXG-NH ₂	

4. táblázat: *Felszíni plazmon rezonancia bioszenzor (SPR) vizsgálatainkban sikerrel a chip felszínére kötött és vizsgált peptidek szekvenciái* – vimentin [136]; filaggrin [137].

Vizsgálatainkba olyan szérumb mintákat (n=60) vontunk be, amelyeket már előtte leellenőriztünk ELISA teszttel, mindegyik szérumb minta pozitív volt a vizsgált peptidekre. Negatív kontrollként egészséges emberek véréből tisztított IgG ellenanyagok keverékét (humán intravénás immunoglobulin – IVIg) alkalmaztuk. A filaggrin 19-mer peptiddel fedett kovalens chip vizsgálataink során kapott reprezentatív szenzogramokon látható (16. ábra), hogy a negatív kontrollként alkalmazott IVIg esetében, nem kaptunk kötődést, a kötődési görbék egyáltalán nem tértek el a 6-os csatornában (pl. L2A6 – sárga) áramoltatott PBS-Tween-hez képest (16. ábra A). A beteg (RA) szérumb minta (16. ábra B) és a filaggrin-19-mer peptid specifikus affinitás tisztított IgG (16. ábra C) áramoltatása esetén láthatjuk a koncentrációtól függő kötődés változását, elkülönül az asszociáció (100. másodpercig) és a disszociáció (100. másodperctől) fázisa egyaránt.



16. ábra: *Filaggrin (19-mer) peptiddel fedett GLH szenzor-chip vizsgálati során kapott reprezentatív szenzogrammok* – IVIG esetében 500ug/ml-ből kiindulva (A); szérum minta esetében 5xből kiindulva (B); ACPA esetében 500ug/ml-ből kiindulva (C) 5 pontos felező hígításbn áramoltattuk a chip felszíne felett – PBST=PBS-0,005%Tween20.

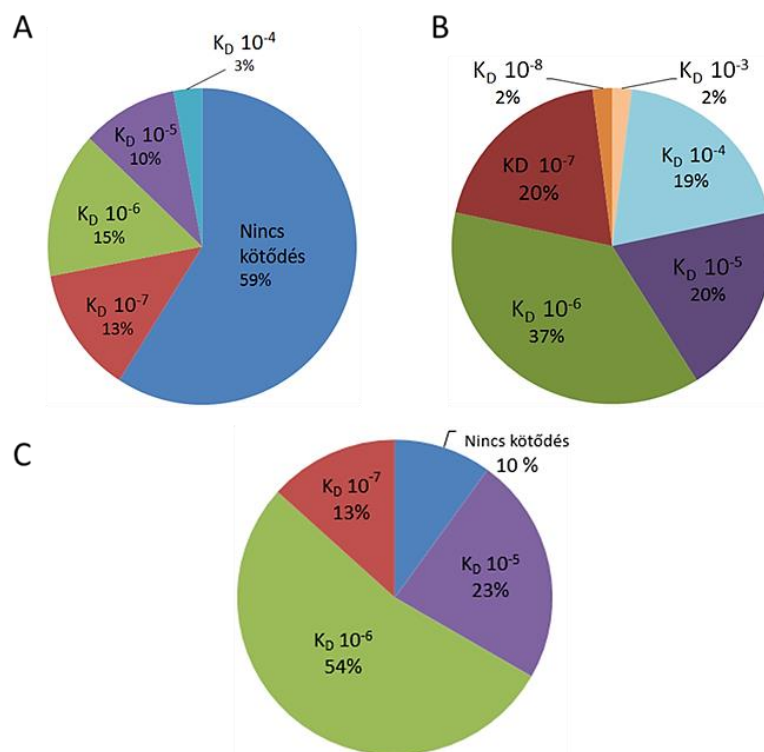
Az affinitás erősségének jellemzéséhez, a K_D meghatározásához szükséges ismernünk a résztvevő partnerek koncentrációját, ezért hogy a kiértékelést el tudjuk végezni, meghatároztuk az adott szérumok citrullinált peptidekre (vimentin; filaggrin; „multi-epitóp”) specifikus IgG koncentrációját, amelyeket a peptid-specifikus affinitás tisztított ACPA-ból készített kalibrációs görbe alapján, ELISA módszerrel határoztunk meg. A kapott kötődési görbéket a készülék (BioRad ProteOn) saját programjával (ProteOn Manager) és a Langmuir-modell segítségével értékeltük ki.

A filaggrin-19-mer peptiddel fedett szenzor chip esetében a vizsgált szérum minták 59 százalékában nem tapasztaltunk kötődést, míg a maradék szérum minták vizsgálatánál a disszociációs konstans (K_D) értékek körülbelül egyenlő arányban, 10^{-7} és 10^{-5} M között, oszlottak el. Egy minta esetében tapasztaltunk nagyon gyenge kötődést ($K_D=10^{-4}$ M) (17. ábra A).

A chip felszínére kötött vimentin peptid és az ellenanyagok interakciójának vizsgálatánál az összes szérum minta esetében detektáltunk kötődést, amelynek legnagyobb hányadában, 37 %-ban, 10^{-6} M-os K_D értékeket tapasztaltunk. A 10^{-7} M (20 %), 10^{-5} M (20 %), 10^{-4} M (19 %)

disszociációs konstanssal rendelkező szérumbelül egyenlő arányban oszlottak el, néhány kiugró érték volt tapasztalható (2 % $K_D=10^{-8}$ M, 2 % $K_D=10^{-3}$ M) (17. ábra B).

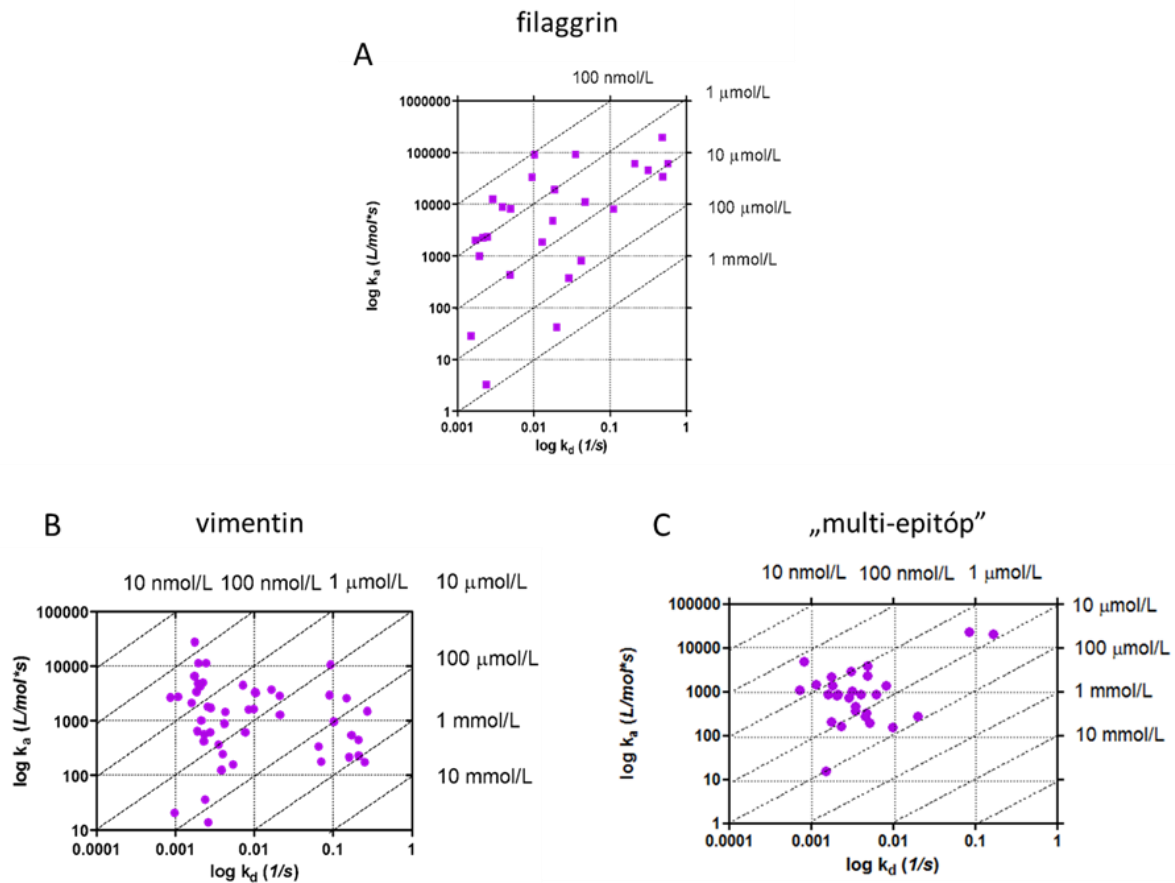
A „multi-epitóp” peptiddel fedett chipen végzett vizsgálatoknál rögtön látszik, hogy a minták csak 10 százalékában nem volt kötődés kimutatható és hogy a „multi-epitóp” peptidet felismerő ellenanyagok affinitása kisebb tartományban (10^{-7} - 10^{-5} M) mozog a másik két peptiddel összevetve, de ezzel ellentétben a szérumbelül több mint felében a specifikus ellenanyagok kötődési erőssége 10^{-6} M-os affinitás értéket adott. A maradék szérumbelül esetében 10^{-7} M-os (13 %) és 10^{-5} M-os (23 %) disszociációs konstans értékeket kaptunk (17. ábra C).



17. ábra: Az SPR bio-szenzor analízis segítségével mért ACPA affinitásának eloszlása filaggrin-19-mer (A), vimentin (B) és „multi-epitóp” peptiddel (C) fedett kovalens GLH chipen.

A jobb szemléltetés céljából, a szérumbelül lévő citrullinált peptideket (filaggrin, vimentin, „multi-epitóp”) felismerő ellenanyagok disszociációs konstans értékeit egyesével is ábrázoltuk egy úgynevezett izo-affinitás diagramban, amellyel jól láthatóvá vált, hogy az egyes vizsgált szérumbelül milyen K_D tartományba esnek (18. ábra). A peptid specifikus ACPA affinitás értékeinek eloszlása a filaggrin esetében 100 nmol/L-100 μ mol/L (18. ábra A), a vimentin

esetében 100 nmol/L-100 $\mu\text{mol/L}$ (18. ábra B) és a „multi-epitóp” peptid esetében 1 $\mu\text{mol/L}$ -10 $\mu\text{mol/L}$ (18. ábra C) között volt detektálható.

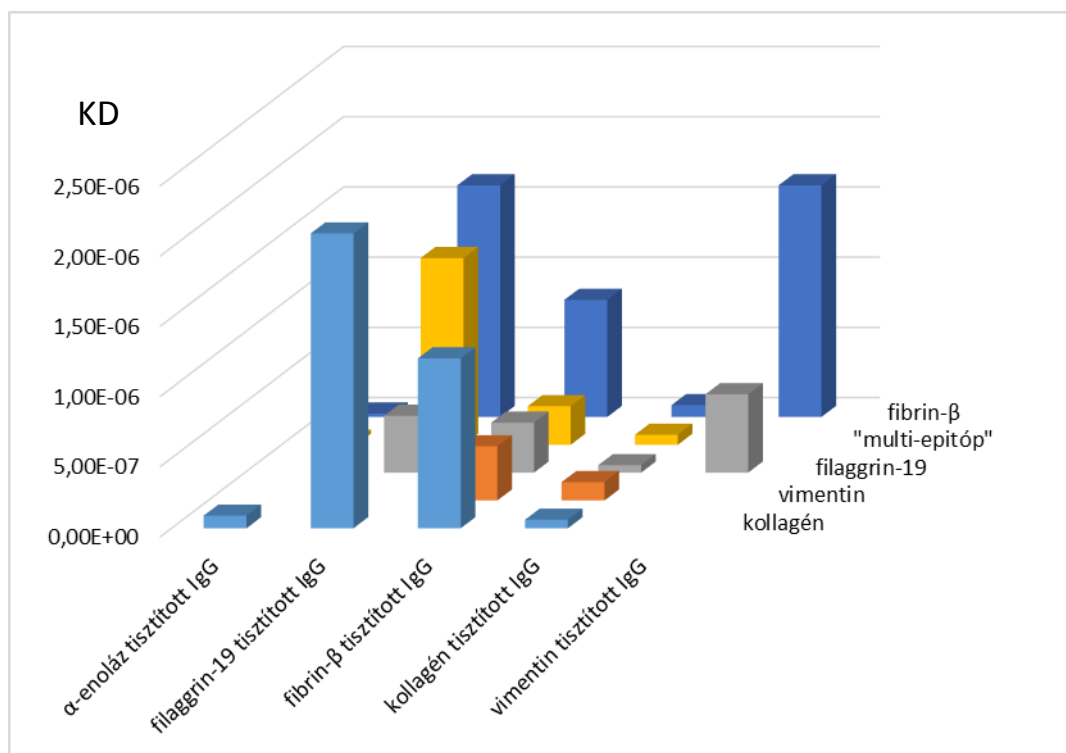


18. ábra: A felszíni plazmon rezonancia vizsgálat során detektált affinitás értékek k_a/k_d eloszlása izo-affinitás diagramban ábrázolva. – A filaggrin 19-mer (A), a vimentin (B) és a „multi-epitóp” (C) peptidre specifikus ACPA affinitás értékeinek eloszlása.

Az egyes minták eloszlásából jól látszik, hogy a citrullinált filaggrin-19-mer és a vimentin peptideket felismerő ellenanyagok affinitás értékei heterogénebb eloszlást mutatnak az általunk tervezett „multi-epitóp” peptiddel ellentétben, amelynek K_D értékei egy szűkebb tartományban helyezkednek el.

A citrullinált peptidekkel affinitás tisztított IgG ellenanyagok keresztreakáló képességét megvizsgáltuk az ELISA módszer után felszíni plazmon rezonancia bio-szenzor készülékkel is. A chip felszínére kötött citrullinált peptidek felett az affinitás tisztított ellenanyagokat áramoltattuk és a kapott disszociációs konstansokat ábrázoltuk diagramban (19. ábra). Az

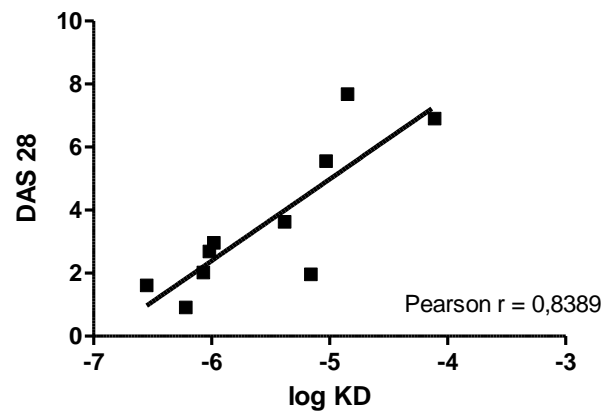
ELISA módszerrel kapott eredményekhez hasonlóan, nagyfokú heterogenitást tapasztaltunk, habár bizonyos esetben az ELISA tesztben pozitív eredményt adott szérumból tisztított peptid specifikus ellenanyagok nem mutattak kötődést az SPR mérés során a chip felszínére kötött peptid ellen. Például a vimentin peptiddel tisztított IgG ellenanyag ELISA-ban felismerte a vimentin, a kollagén és a „multi-epitóp” peptidet (15. ábra), de a felszíni plazmon rezonancia (SPR) vizsgálatokban az ellenanyagok egyáltalán nem mutattak kötődést. Ez esetleg betudható annak, hogy míg egy ELISA mérés során hosszabb ideig inkubáljuk együtt a két kötőpartnert, addig az SPR vizsgálatokban a kikötött egyik partner felett a másik partnert rövid ideig áramoltatjuk, amely során a kötődés nem képes kialakulni.



19. ábra: Az affinitás tisztított, citrullinált peptidekre specifikus IgG ellenanyagok keresztreakciójának vizsgálata felszíni plazmon rezonancia bio-szenzor készüléssel.

Annak tisztázására, hogy lehet-e összefüggés a citrullinált epitópot felismerő ellenanyagok affinitásának mértéke és a betegség súlyossága között korreláció analízist végeztünk, amely során megvizsgáltuk a K_D értékek és a 28 ízület vizsgálatából nyert DAS28 index (disease activating score) összefüggését (20. ábra). Ez az index arról ad nekünk információt, hogy milyen aktív éppen a betegség állapota. 3,2 alatt mérsékelt, 3,2 és 5,1 között közepes, míg 5,1

felett kifejezett gyulladási aktivitásról beszélhetünk. A korreláció analíz során a filaggrin-19-mer peptid esetében fordított korrelációt kaptunk, miszerint annak a betegnek, akinek nagyobb volt a betegség súlyosságát jelző DAS indexe, alacsonyabb volt a szérumában lévő filaggrin 19-mer peptidet felismerő ellenanyagának kötődési erőssége (affinitása).

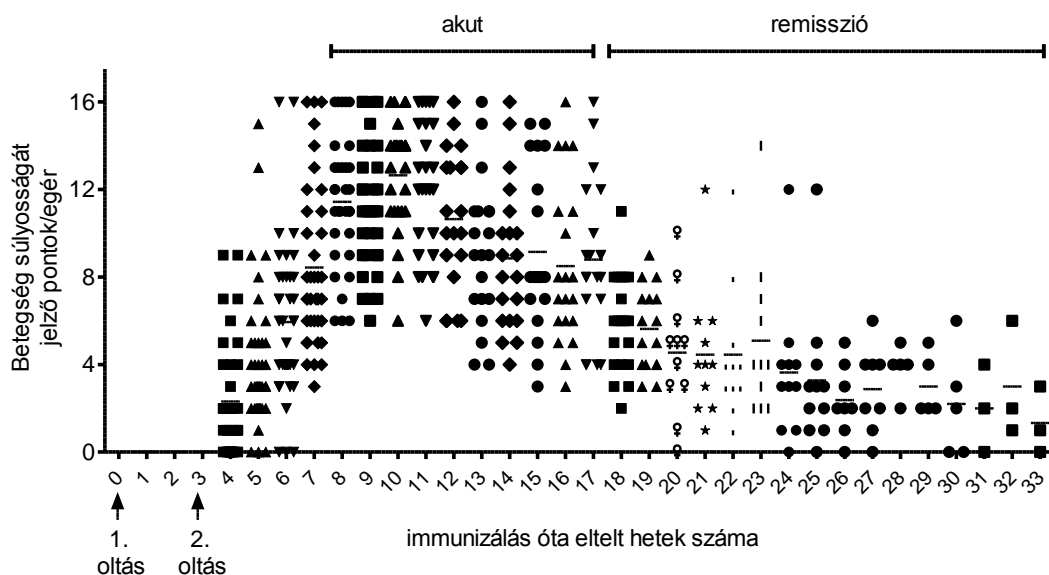


20. ábra: Filaggrin-19-mer peptidet felismerő ellenanyagok K_D és a betegség súlyosságát jelző DAS28 indexek értékeinek összefüggése.

6.3 A kollagén-indukált arthritisz nyomon követése

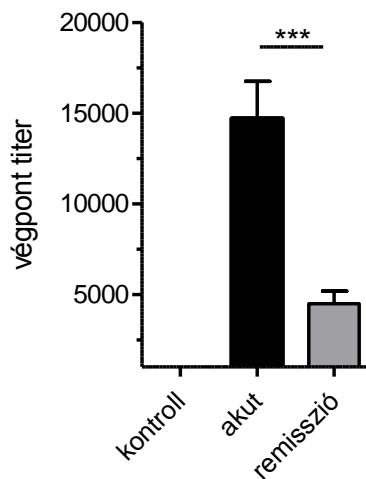
A rheumatoid arthritisz in vivo modellezésére az egyik legelterjedtebb módszert, a kollagén-indukált arthritisz (CIA) egérmodellt alkalmaztuk.

A betegség kialakításához DBA/1 [5] egértörzset használtunk. Az állatok heterológ (szarvasmarha) II-es típusú kollagénnel és Freund adjuvánszal történő oltást követően kb. a 35-42. napon az arthritiszes fenotípus külsőleg is azonosítható tüneteit mutatják. Emlékeztető oltást követően (21. nap) az egerekben kb. 80-100 % hatékonysággal kialakul a betegség. A 21. ábrán a betegség súlyosságát jelző pontok láthatók az idő függvényében (több indukció összesített eredménye). Hetente pontoztuk az állatokat a 5.6 fejezetben leírt skála alapján [5], végtagonként a maximális pontok száma 4, tehát egy állat maximálisan 16 pontot kaphatott a 4 végtagjára összesen. Nyomon követhető a betegség kinetikája, látható a betegség felszálló ága a 7-8. hétig, onnantól pedig a betegség eléri maximumát, állandósul. Ezt a szakaszt hívjuk akut szakasznak, ami kb. a 7-17. hétig tart és az állatok pontja 7 és 16 pont között mozog. Kb. a 18. héten elindul a betegség remisszió fázisa, a teljes „gyógyulás” (tünetmentesség) kb. a 24-33. héten valósul meg. Vizsgálatainkhoz izoláltunk MZ B-sejteket a betegség akut (8-16 pont) és remisszió (≤ 6 pont) szakaszából.



21. ábra: A betegség súlyosságát jelző pontok az idő függvényében – több indukció összesített eredménye.

Az akut és remisszió fázisából kiválasztott állatokból kísérletenként szérumból mintát gyűjtöttünk, amiből megmértük a CIA domináns ellenanyag izotípusát, az egér kollagén specifikus IgG2a szintet indirekt ELISA módszer segítségével. A szérumból mintákban lévő ellenanyagok végpont titerét GraphPad5 (Prism) program segítségével határoztuk meg. A remisszió fázisából vizsgált állatok szérumból mintáiban jelentősen csökkent az autoantitest (IgG2a) koncentráció, amely bizonyítja, hogy az állatokat ténylegesen a remisszió fázisából választottuk, a két csoportot (akut és remisszió) jól különítettük el (22. ábra).



22. ábra: Egér kollagén specifikus IgG2a végpont titere CIA és kontroll állatokból - n=7,8,20 (kontroll, akut, remisszió); t-teszt - *** p<0,0001.

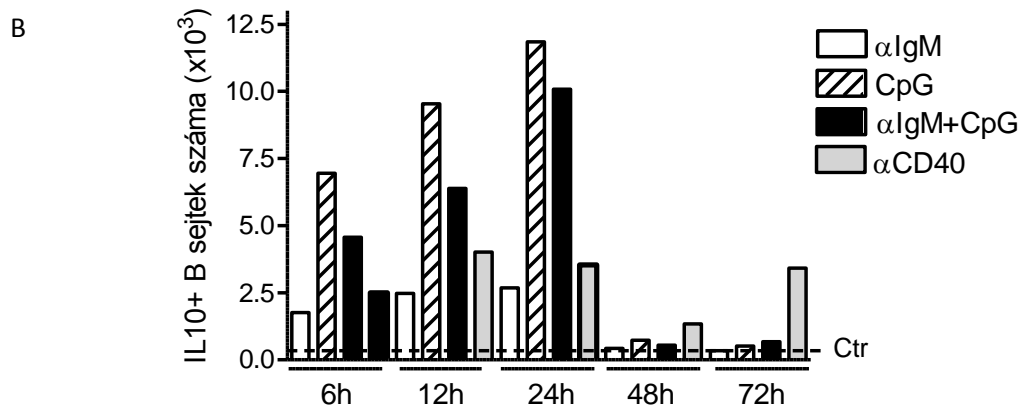
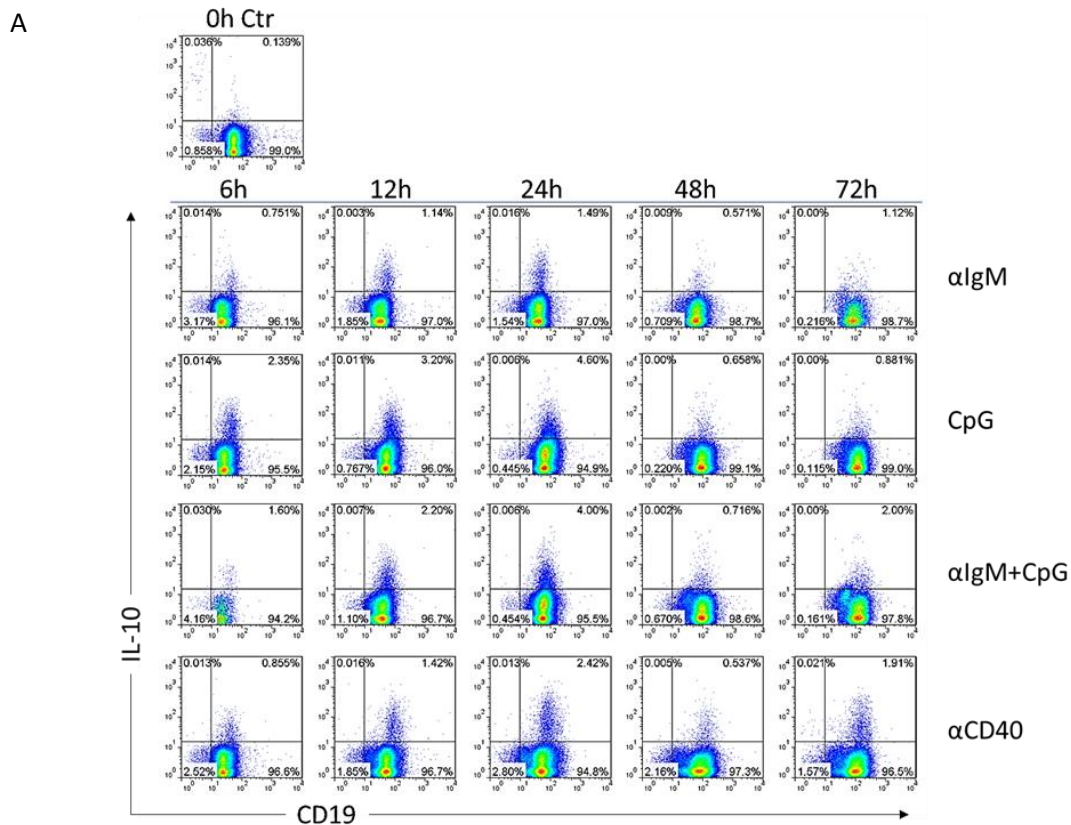
6.4 B-sejt populációk in vitro IL-10 termelésének karakterizálása

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a BCR és a TLR9 receptorokon keresztüli jelpályák közötti együttműködés jelentőségét vizsgáljuk a regulátor B-sejtek, legfőképpen a MZ B-sejtek IL-10 termelő funkciójára fókuszálva. Szerettük volna megvizsgálni, hogy a BCR/TLR9 receptoron keresztüli stimulusra aktiválódó T-bet transzkripciós faktornak van-e szerepe a sejtek IL-10 termelésében.

A kísérletek beállításához, először az egerek lépéből izolált B220⁺ B-sejteket stimuláltunk BCR, TLR9 és CD40 receptorokon keresztül különböző ideig. Szerettük volna megtalálni azt az időpillanatot, amelynél a legnagyobb mértékben képződnek IL-10 termelő sejtek. Az alkalmazott stimulusok (anti-IgM, CpG) koncentrációit előzetes eredményeink alapján választottuk meg [122].

DBA/1 egerek lépéből anti-B220 mágneses gyöngyök (Miltenyi Biotec GmbH, MACS) segítségével B-sejteket izoláltunk és 6-72 óráig stimuláltuk őket BCR (anti-IgM; 10 μ g/ml), TLR9 (CpG-ODN1826; 1 μ M) és CD40 (anti-CD40; 10 μ g/ml) receptorokon keresztül, majd megmértük az intracelluláris IL-10 citokin expresszióját a sejtekben áramlási citometria segítségével. Bár célunk a BCR és a TLR9 szignálok hatásának vizsgálata volt, figyelmet fordítottunk egy másik fontos indukáló faktorra, a CD40 receptorokon keresztüli jelátvitelre is. Ahogy már említettem, Claudia Mauri és munkacsoportja úgy véli, a T2-MZpre sejtek a legpotenciálisabb Breg sejt populáció a lépben, és esetükben a CD40 receptoron keresztüli jelátvitelnek fontos jelentősége van a regulátor funkció kialakulásánál [67]. Munkacsoportunk humán regulátor B-sejtek vizsgálatának eredményei szerint a TLR9 (CpG) és a CD40 receptorokon (CD40L) keresztüli együttes aktiváció fokozta leginkább a CD19⁺CD27⁺ memória B-sejtek IL-10 termelését [84].

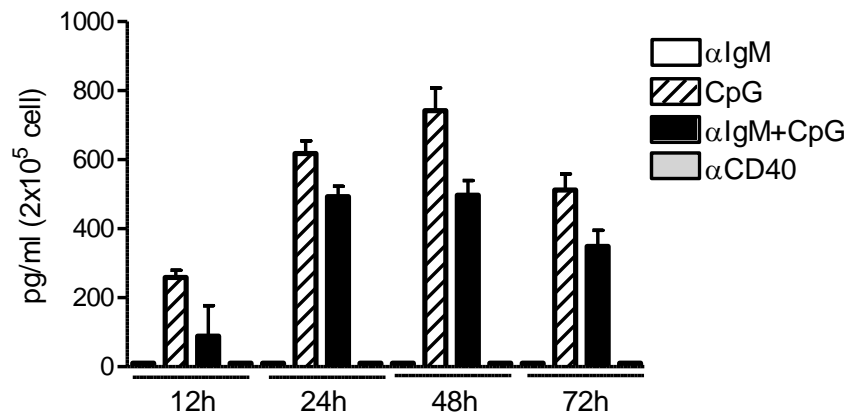
A 23. ábra A paneljén látható a sejtek felszíni CD19 jelölése melletti intracelluláris IL-10 expressziójának változása a különböző stimulusokra. A 23. ábra B paneljén az IL-10⁺ sejtek számának változását tudjuk nyomon követni az idő függvényében. Láthatjuk, hogy mindhárom általunk alkalmazott stimulus maximális hatását 24 óránál érte el. A TLR9 (CpG) receptoron keresztüli szignál volt a leghatásosabb, amelynek mértéket már a hozzáadott anti-IgM (BCR) stimulus nem volt képes tovább növelni (23. ábra).



23. ábra: B220⁺ B-sejtek intracelluláris IL-10 expressziója BCR (anti-IgM-10 μ g/ml), TLR9 (CpG-1 μ M) és CD40 (anti-CD40-10 μ g/ml) receptorokon keresztüli stimulálást követően - Reprezentatív áramlási citometrai ábra (A); IL-10⁺ sejtek száma – egy reprezentatív kísérlet eredménye (B).

A sejtekben intracellulárisan detektálható és a szekretált IL-10 összehasonlításának érdekében, megmértük a sejt kultúrák felülúszójában az IL-10 citokin koncentrációját BD OptEIA IL-10 ELISA kit segítségével (24. ábra). A sejt kultúrák felülúszóját az intracelluláris jelölést megelőző 6 órás PMA, Ionomycin és Monensin/GolgiStop, röviden „PIM koktél” hozzáadása

előtt vettük le és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tároltuk felhasználásig. A 24. ábrán látható, hogy a szekretált IL-10 mennyisége 12 és 24 óra között emelkedik a legnagyobb mértékben, ami még plusz 24 óra alatt kis mértékben emelkedik ugyan, de nem számottevően. Ha viszont az IL-10⁺ sejtek számát vesszük figyelembe az előző ábrán (23. ábra B), akkor ott 24-48 óra között egy nagyon nagy sejtszám csökkenést tapasztalhatunk. A CD40 stimulus esetében azt tapasztaltuk, hogy megnövelte ugyan az IL-10⁺ sejtek számát valamennyire, de a sejt kultúra felülúszójában nem volt detektálható mennyiségű IL-10 citokin. Ez arra enged következtetni, hogy mivel a „PIM koktél” plusz 6 órára való hozzáadása előtt a sejtek nem szekretáltak IL-10 citokint (negatív ELISA eredmény, 24. ábra), az anti-CD40 kezelésre kapott intracelluláris IL-10 pozitívitás aspecifikus, vagyis a PMA/Ionomycin stimulus eredménye.

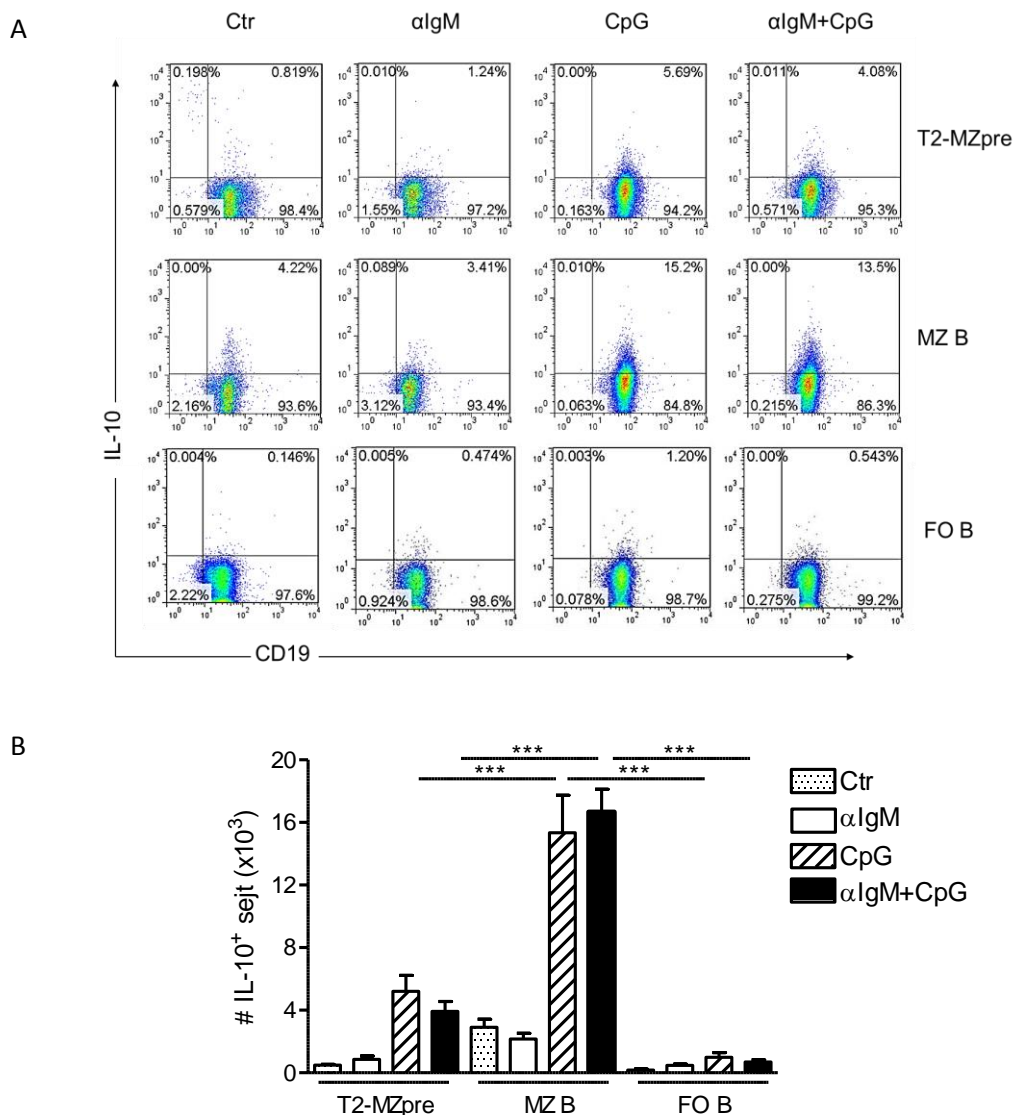


24. ábra: B220⁺ B-sejtek IL-10 termelése – B220⁺ sejtek által szekretált IL-10 citokin kimutatása ELISA módszerrel - anti-IgM-10 μ g/ml, CpG-1 μ M, anti-CD40-10 μ g/ml, n=2.

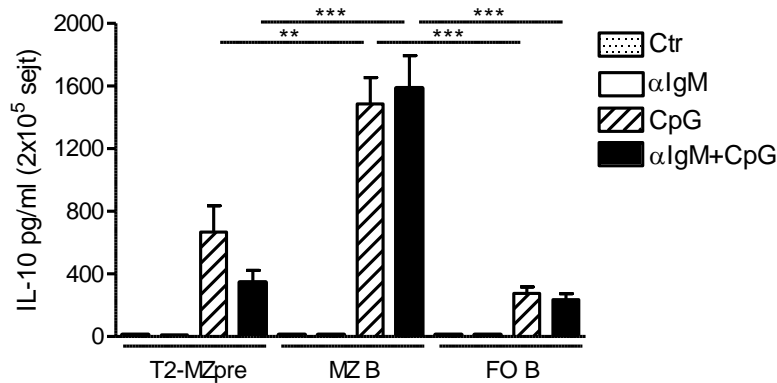
A teljes lép B-sejtes kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a sejtek 24 óra CpG (1 μ M); CpG (1 μ M) és anti-IgM (10 μ g/ml) stimulusra termeltek a legnagyobb mennyiségben IL-10 citokint, tehát további kísérleteinkben ezeket a körülményeket alkalmaztuk és az anti-CD40 kezelést elhagytuk.

Habár vizsgálataink középpontjában a MZ B-sejtek regulátor funkciójának jobb feltárása áll, fontosnak találtuk a lépben fellelhető - potenciális Breg populációként jellemzett - B-sejt csoportok vizsgálatát is. Szerettük volna alátámasztani, hogy a vizsgálatainkhoz választott MZ B-sejtek a mi vizsgálati rendszerünkben a leginkább regulátor transzformációra képes B-sejt populáció a lépben. Egerek lépéből BD FACS ARIAIII sejt-szortírozó áramlási citométer segítségével három, az egér B sejtfejlődés különböző szakaszait reprezentáló B-sejt populációt

izoláltunk, amelyek az irodalmi adatok alapján potenciális forrásai lehetnek a regulátor B-sejteknek [67, 73, 85]. Izoláltuk, a 5.7.2 fejezetben leírt kapuzási stratégiát követve, a lépben fellelhető két érett B-sejt populációt, a MZ B-sejteket és a FO B-sejteket és a lépben jelen lévő éretlen, a MZ B-sejtek előalakjainak számító, T2-MZpre sejteket [67]. A sejteket az általunk beállított körülmények között stimuláltuk 24 óráig (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M). Megmértük a sejtek intracelluláris IL-10 expresszióját (25. ábra) és a sejtek által szekretált IL-10 citokin koncentrációját a sejt kultúra felülúszójából (26. ábra).



25. ábra: Lép B-sejt populációk intracelluláris IL-10 expressziója BCR (anti-IgM-10 μ g/ml) és TLR9 (CpG-1 μ M) receptorokon keresztüli stimulálást követően - Reprezentatív áramlási citometriai ábra (A); IL-10⁺ sejtek száma (B) (n=6; *** p < 0,0001).



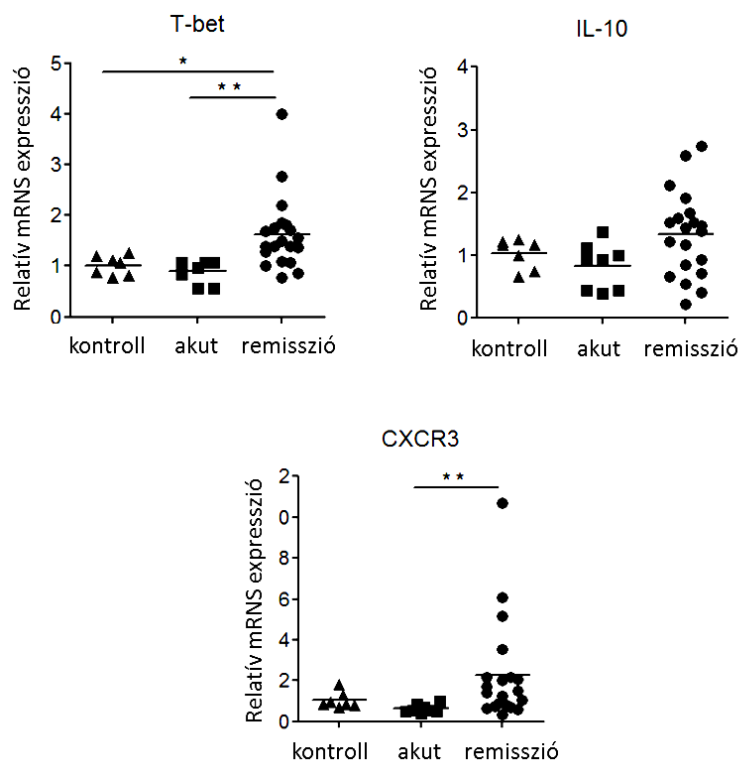
26. ábra: Lép B-sejt populációk IL-10 termelése (ELISA) – anti-IgM (10 μ g/ml), CpG (1 μ M) (n=6; *** p < 0,0001; ** p < 0,01).

Fontos eredményként elmondható, hogy a vizsgálataink középpontjában álló MZ B-sejtek a lépben jelenlévő másik érett B-sejt populációval, a FO B-sejtekkel összehasonlítva, sokkal robosztusabb IL-10 termeléssel válaszoltak a CpG és az anti-IgM+CpG stimulusra. Míg a FO B-sejtek kb. 1 %-a adódott IL-10 pozitívnak, addig a MZ B-sejtek kb. 15 %-ában volt intracelluláris citokin expresszió kimutatható CpG stimulálást követően. Az anti-IgM kezelés önmagában nem fokozta jelentősen az IL-10 expressziót, vagyis szinergia, a két stimulus együttes alkalmazásával, sem az IL-10⁺ sejtek számában, sem a szekretált citokin mennyiségében nem volt tapasztalható. A T2-MZpre sejtek termeltek ugyan IL-10 citokint, de a MZ B-sejtekkel összehasonlítva sokkal kisebb mértékben. Habár ennek a kis éretlen, kevert T2-MZpre populációnak a vizsgálata is érdekes lenne, célunk továbbra is a MZ B-sejtek IL-10 termelésének jellemzése volt, ezért a további kísérleteinkben a MZ B-sejtekre fókuszáltunk.

6.5 MZ B-sejtek IL-10 és T-bet expresszójának in vivo vizsgálata kollagén-indukált arthritisz indukciója során

Hogy az IL-10 citokin és a figyelmünk középpontjában álló másik molekula, a T-bet transzkripciós faktor biológiai jelentőségét vizsgáljuk MZ B-sejtekben, kollagén-indukált arthritiszt indukáltunk egerekben majd izoláltuk a MZ B-sejt populációt (B220⁺CD23⁻IgM^{magas}CD21^{magas}) BD FACS ARIAIII sejt-szortírozó készülék segítségével, a betegség akut és remisszió fázisából. A sejtekből RNS-t izoláltunk és real-time (valós idejű) PCR segítségével elvégeztük a génexpressziós vizsgálatokat (27. ábra). Az IL-10 mRNS szintje ugyan nem szignifikánsan, de megnövekedett a remisszió fázisában. Ezzel ellentétben újszerű

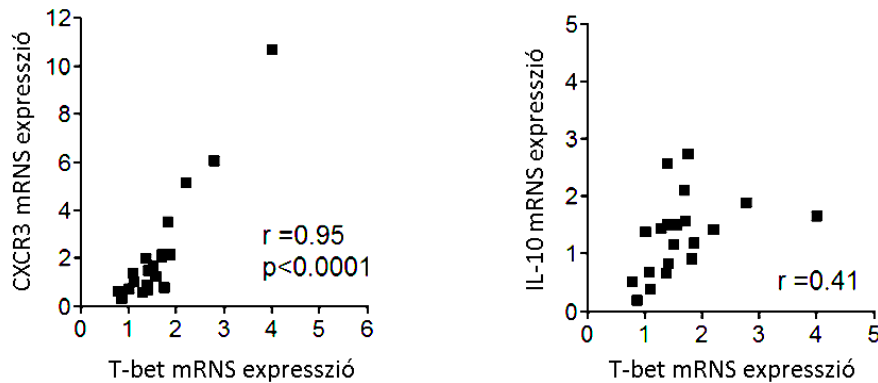
eredményként azt tapasztaltuk, hogy a T-bet mRNS expressziója mind a kontroll, mind pedig az akut csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett szintet mutatott a remisszióban. Hogy mintáink minőségét ellenőrizzük és annak analógiájára, hogy a CD4⁺ regulátor T-sejtek migrációjának szabályozásában fontos szerepét tárták fel a T-bet szabályozása alatt álló CXCR3 kemokin receptornak [105, 111, 118], megmértük a molekula mRNS változását a betegség különböző fázisaiban. Azt tapasztaltuk, hogy a T-bet-hez hasonlóan, a CXCR3 mRNS expressziója szintén szignifikáns emelkedést mutatott a remisszióban mind a kontroll, mind pedig az akut csoporthoz képest (27. ábra).



27. ábra: A T-bet, az IL-10 és a CXCR3 mRNS expresszió változása *in vivo* MZ B-sejtekben a CIA indukciója során – n=7,8,20 - kontroll, akut, remisszió; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Hogy az *in vivo* - a betegség remisszió fázisában - emelkedett szintet mutató molekulák közötti összefüggéseket vizsgáljuk, elvégeztük a T-bet - CXCR3, és a T-bet - IL-10 mRNS expressziójának Pearson féle korreláció analízisét (28. ábra). Elvárásainknak megfelelően, a T-bet és a szabályozása alatt álló receptor, a CXCR3 esetében rendkívül erős korreláció értéket kaptunk ($r=0,95$; $p<0,0001$). Ezzel ellentétben a T-bet és az IL-10 korreláció analízisének

eredménye gyengének adódott ($r=0,41$), habár a 28. ábra jobb oldali grafikonján egy pár kiugró értéken kívül felismerhető a kapcsolat a két molekula között.

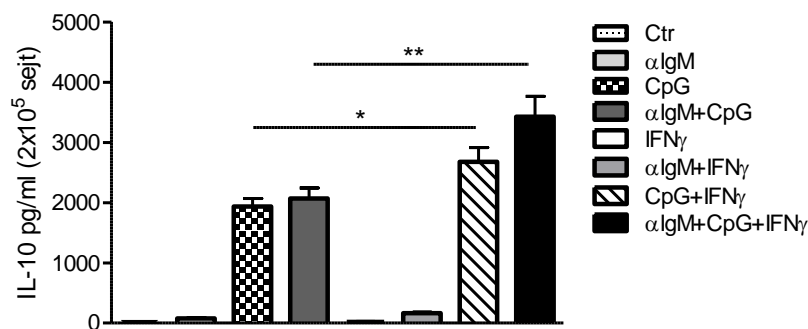


28. ábra: A *T-bet-CXCR3* és *T-bet-IL-10* mRNA expressziójának Pearson féle korreláció analízise MZ B-sejtekben.

6.6 Marginális Zóna B-sejtek IL-10 és T-bet expressziójának in vitro vizsgálata

Szerettük volna az általunk kapott újszerű eredményt, hogy MZ B-sejtekben a T-bet és az IL-10 mRNA expressziója emelkedett szintet mutatott a CIA remisszió fázisában, in vitro tovább vizsgálni, kíváncsiak voltunk, van-e kapcsolat MZ B-sejtekben a T-bet transzkripciós faktor expressziója és az IL-10 termelés között. Érett B-sejtekben a T-bet transzkripciós faktort elsősorban az $IFN\gamma$ aktiválja, de mint ahogy mi is kimutattuk, a BCR és a TLR9 ligandok szintén növelik expresszióját [117, 122, 138]. Lupusra hajlamos egerek $IFN\gamma$ kezelése és DBA/1 egerekből származó B-sejtek TLR9 és $IFN\gamma$ receptorokon (CpG+ $IFN\gamma$) való aktiválása fokozta az IL-10 expresszióját, míg a csak B-sejt receptoron keresztüli szignál nem volt hatással a citokin termelésre [139]. Hogy a betegség során végbemenő gyulladási miliót megfelelően modellezzük, és hogy a vizsgálni kívánt molekulák aktivációját vizsgálni tudjuk, az eddig in vitro alkalmazott stimulusok (anti-IgM, CpG) mellé bevontuk vizsgálatainkba az $IFN\gamma$ citokint, amely a T-bet szabályozásának elsődleges faktora [105] és a gyulladási folyamatok elengedhetetlen komponense [140]. Számos gyulladási és autoimmun betegség modell rendszerében leírták jelentőségét az $IFN\gamma$ citokinnek, többek között inzulin-függő diabéteszben [141], myasthenia gravis-ben [142] és vesegyulladásban [143] mutatták ki jelentőségét.

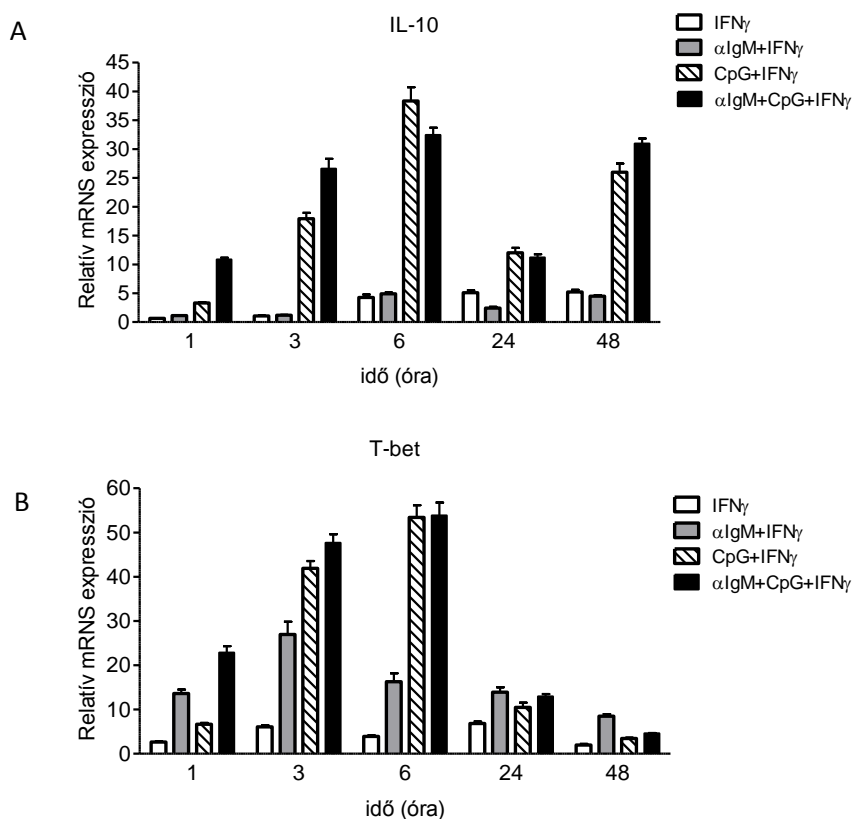
Izolált MZ B-sejtek 24 órás BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon való aktiválását (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml) követően megmértük az újonnan bevezetett IFN γ hatását az IL-10 termelésre, a sejt kultúrák felülúszójából megmértük a szekretált IL-10 citokin mennyiségét ELISA módszer segítségével. A hozzáadott IFN γ (50 ng/ml) stimulus szignifikánsan megnövelte a MZ B-sejtek által termelt IL-10 citokin mennyiségét mind az egyes, CpG stimulushoz, mind pedig a dupla, anti-IgM+CpG stimulushoz képest (29. ábra).



29. ábra: MZ B-sejtek által szekretált IL-10 mennyisége „gyulladásos szignálokra” 24 óra aktivációt követően (anti-IgM - 10 μ g/ml, CpG - 1 μ M, IFN γ - 50ng/ml) (n=7; ** p <0,01; * p <0,05).

6.6.1 Az IL-10 és T-bet génexpresszójának változása az idő függvényében

In vivo vizsgálatainkat követően, hogy lássuk milyen kinetikát követ az IL-10 és a T-bet molekulák génexpresszálódásának mértéke a „gyulladásos szignálokra” (anti-IgM, CpG, IFN γ), megvizsgáltuk in vitro mindkét molekula mRNS expressziójának változását különböző időpillanatokban. Aktiváltuk az izolált MZ B-sejteket BCR-TLR9-IFN γ R (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml) receptoron keresztül, majd az IL-10 és a T-bet gének expresszió változását analizáltuk Real-Time PCR segítségével (30. ábra).



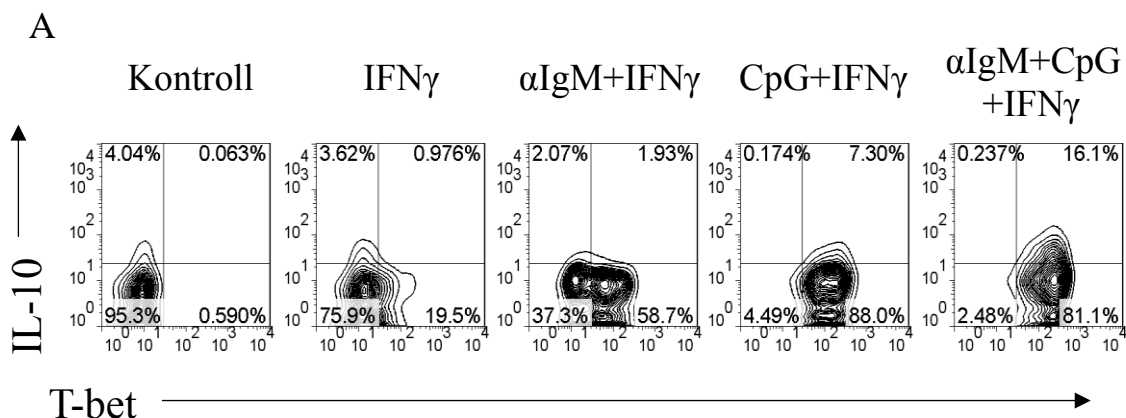
30. ábra: *In vitro* aktivált MZ B-sejtek génexpresszió (IL-10, T-bet) változásának vizsgálata - anti-IgM (10 μ g/ml), CpG (1 μ M) és IFN γ (50ng/ml) stimulációt követően az idő függvényében - n=2 (négy párhuzamos érték két független kísérletből).

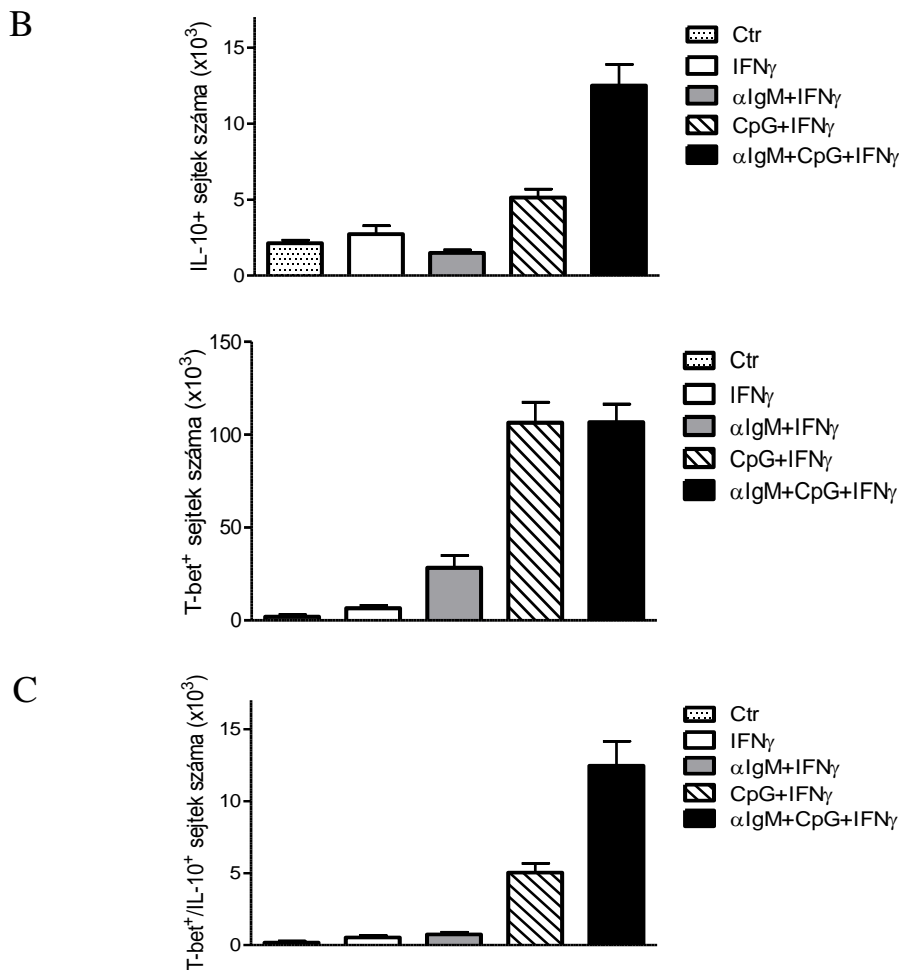
Kissé eltérő mintázatot kaptunk az egyes (IFN γ) és a dupla stimulusok esetében, de a T-bet és az IL-10 gének expressziója hasonló kinetikát mutatott a hármas stimulusra (anti-IgM, CpG és IFN γ), a maximumot kb. 3-6 óránál érte el mindkét esetben, majd pedig 24 óránál az expresszió lecsengése figyelhető meg (30. ábra). Az IL-10 citokin mRNS expressziójában megfigyelhető, hogy 48 óránál újra felerősödik a gén expressziója, ami akár lehet annak a következménye, hogy a sejtek olyan faktorokat szekretálnak, amelyek autokrin módon visszahatva újra felszabályozzák a gén expresszióját. Ennek tisztázására mi nem folytattunk vizsgálatokat, de az a feltételezés fogalmazódott meg bennünk, hogy akár a sejtek által termelt IL-10 citokin, akár a sejtek által szekretált más citokinek visszahathatnak a sejtekre és befolyásolhatja a génexpressziót.

6.6.2 IL-10 és T-bet kettősen pozitív MZ B-sejtek detektálása

Az IL-10 és a T-bet molekulák lehetséges kapcsolatának vizsgálatára aktiváltunk izolált MZ B-sejteket in vitro BCR-TLR9-IFN γ R (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml) receptoron keresztül (24h), majd megmértük az intracelluláris expresszióját a két molekulának áramlási citometriával. Látható a 31. ábra reprezentatív ábráján (A panel), hogy habár különböző mértékben, de az összes stimulus megnövelte a T-bet expresszióját, ami maximumát a hármas stimulus hatására érte el. Ezen kívül a MZ B-sejtek kb. 16 %-a dupla pozitívnak adódott a hármas stimulus (anti-IgM+CpG+IFN γ) hatására, vagyis képződött egy kis alpopuláció a T-bet⁺ MZ B-sejtek között, aki expresszálta az IL-10 citokint. Az ábra B és C paneljén több kísérlet összesített sejt szám adatait ábráztuk (egyszeresen és dupla pozitív sejtek száma), ahol szintén látható, hogy a hármas stimulus, az anti-IgM+CpG+IFN γ stimulus hatására képződött a legtöbb IL-10⁺, T-bet⁺ és a két molekulát együttesen expresszáló, IL-10⁺/T-bet⁺ MZ B-sejt.

Az adatok egyértelműen mutatják (31. ábra B és C), hogy a hármas stimulus (anti-IgM+CpG+IFN γ) hatására a T-bet⁺/IL-10⁺ sejtek száma (31. ábra C) nem különbözött szignifikánsan az egyszeresen IL-10⁺ sejtek számától (31. ábra B panel felső diagram), vagyis az összes IL-10 pozitív sejt T-bet pozitív is adódott, és nem volt kimutatható olyan IL-10⁺ sejt, aki T-bet negatív lett volna. Azt hogy a T-bet és az IL-10 között van-e direkt szabályozás, nem tudjuk megmondani, de adataink arra engednek következtetni, hogy az általunk vizsgált receptorokon keresztüli szignálok hatására, amelyek in vivo a CIA progressziójában is fontosak, a T-bet kifejezése valamilyen előnyt biztosíthat az IL-10⁺ MZ B-sejtek számára.



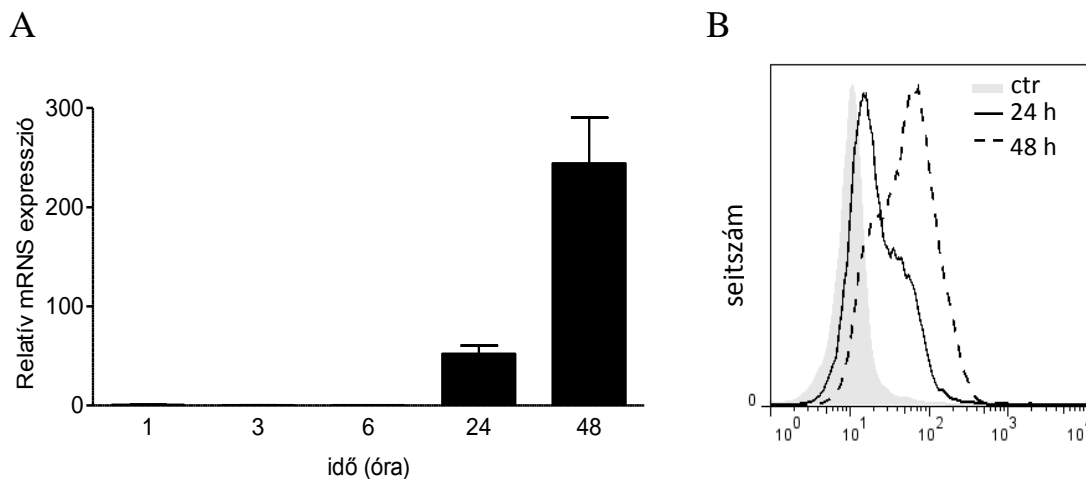


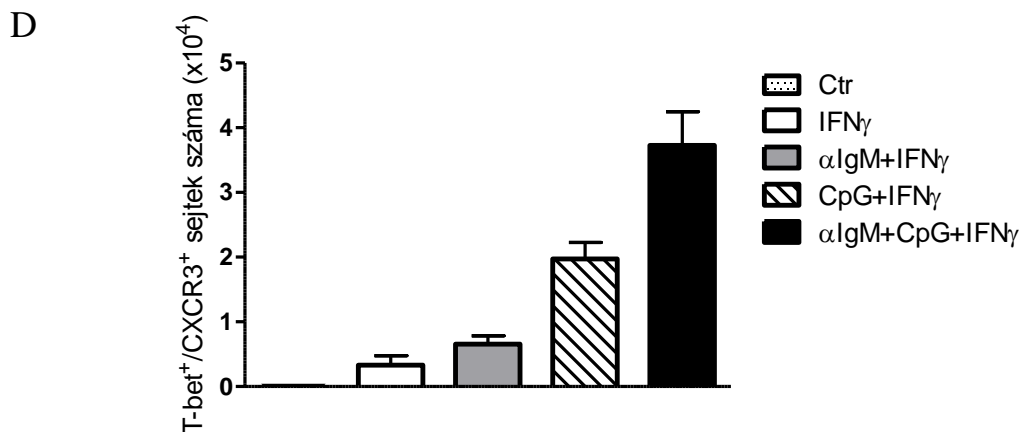
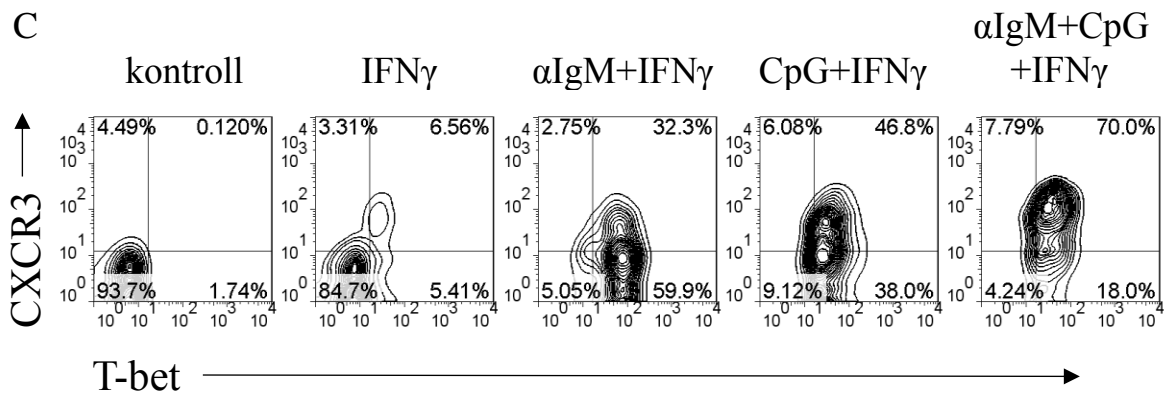
31. ábra: IL-10⁺ és a T-bet⁺ MZ B-sejtek intracelluláris jelölést követő detektálása áramlási citometria segítségével – reprezentatív FACS ábra (A); IL-10 és T-bet pozitív sejtek száma (B); T-bet⁺/IL-10⁺ sejtek száma (C) - anti-IgM (10μg/ml), CpG (1μM) és IFN_γ (50ng/ml) (n=7).

6.7 A Tbet⁺/CXCR3⁺ Marginális Zóna B-sejtek migrációjának vizsgálata in vitro

A T-bet, a T-box transzkripciósi faktor család tagjaként, szabályozza a CXCR3 kemokin receptor megjelenését az IL-10 termelő regulátor T-sejteknél, sőt elősegíti migrációjukat a gyulladásos területekre [111]. Továbbá a CXCR3 expresszáló ellenanyag-termelő plazmasejtek gyulladásos területekre való vándorlásában szintén fontos szerepet tölt be a T-bet [123]. Annak tisztázására, hogy mi lehet funkcionális relevanciája a MZ B-sejtek életében, hogy in vivo a

CIA remisszió fázisában megnövekszik a CXCR3 kemokin receptor expressziója, elvégeztünk egy migráció analízist, amelynek első lépéseként megmértük a T-bet és a CXCR3 receptor expressziójának mértékét MZ B-sejtekben a vizsgált három stimulus hatására. Aktiváltuk a sejteket in vitro BCR/TLR9/IFN γ R receptoron keresztül 48 óráig (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml), majd megmértük az intracelluláris expresszióját a T-bet transzkripciós faktornak és a felszíni expresszióját a CXCR3 receptornak áramlási citometriával (32. ábra C). A 48 órás inkubálási időt előkísérleteink alapján választottuk meg, megmértük a sejtek CXCR3 expresszióját mRNS és fehérje szinten. A 32. ábra A paneljén a CXCR3 mRNS expressziójának változása követhető nyomon 1-48 órán keresztül, míg a B panelen a sejtek felszíni receptor expressziója látható 24 és 48 óra BCR/TLR9/IFN γ receptorokon való stimulációt követően. Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a sejteken 24 óra aktiválás (anti-IgM, CpG, IFN γ) után kis mértékben megnövekszik a receptor expressziója, de maximumát – az adott kísérletben - 48 óránál éri el. Ezt követően megvizsgáltuk a két vizsgált molekula, a T-bet és a CXCR3 együttes expresszálódásának mértékét 48 óra, anti-IgM, CpG és IFN γ kezelést követően és azt tapasztaltuk, hogy a sejtek kb. 70 %-a kettősen pozitív (T-bet⁺/CXCR3⁺) lett a három stimulus együttes alkalmazása során (32. ábra C és D panel).

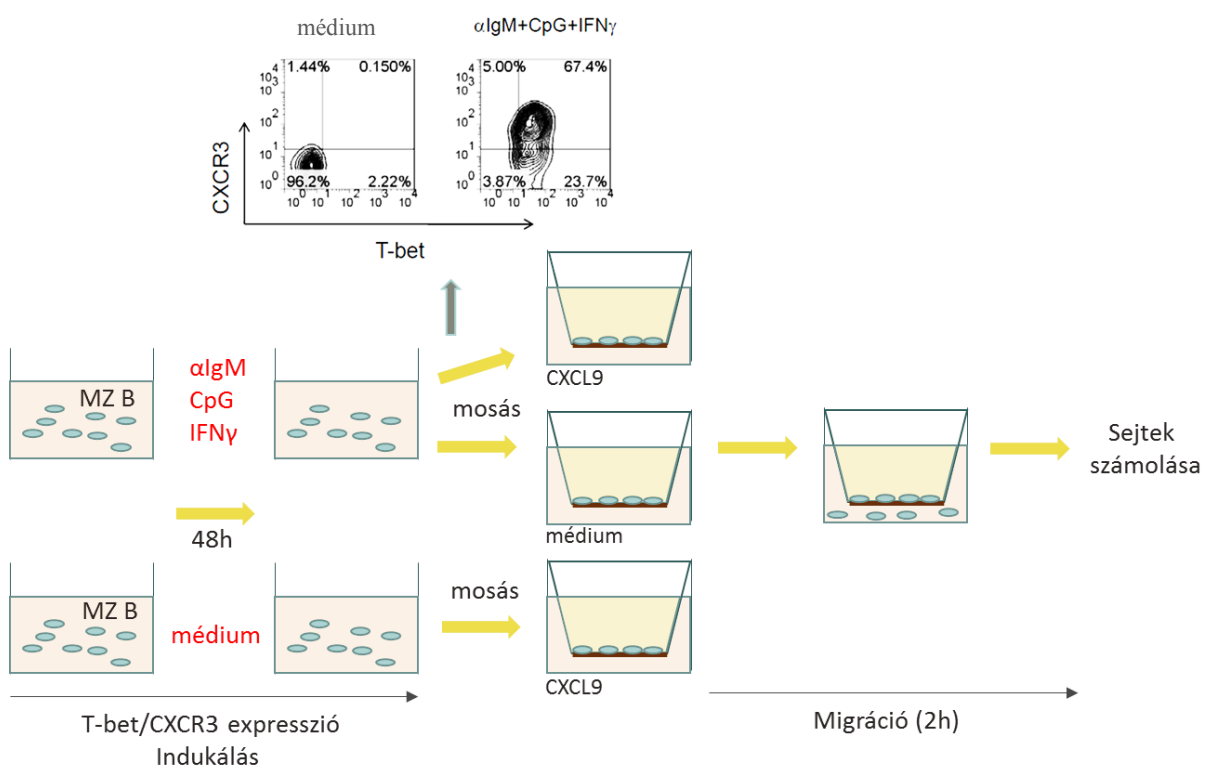




32. ábra: MZ B-sejtek T-bet és CXCR3 expressziójának változása anti-IgM/CpG/IFN γ stimuláció hatására – CXCR3 mRNS expressziójának változása 1-48 óra inkubációt követően (A); CXCR3 felszíni expressziójának áramlási citometria vizsgálata 24 és 48h után (B); MZ B-sejtek felszíni CXCR3 expressziójának változását bemutató reprezentatív FACS ábra 48 óra aktivációt követően (C); T-bet⁺/CXCR3⁺ MZ B-sejtek számának változása (D) - anti-IgM (10 μ g/ml), CpG (1 μ M) és IFN γ (50ng/ml) n=6.

Annak tisztázására, hogy vajon mi a funkcionális relevanciája, hogy in vitro az általunk vizsgált stimulusokra (anti-IgM, CpG, IFN γ) nagymértékben képződnek T-bet és CXCR3 kettősen pozitív MZ B-sejtek, összeállítottunk a sejtek migrációs képességének vizsgálatára egy kísérletet (33. ábra). Szerettük volna ténylegesen bizonyítani, hogy a sejtek képesek a CXCR3 liganduma felé (CXCL9) vándorolni. Először egészséges egerekből izolált MZ B-sejtekben indukáltuk a T-bet és a CXCR3 receptor egyidejű expresszióját, stimuláltuk a sejteket a BCR/TLR9/IFN γ R receptoron keresztül 48 óráig (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml). Az indukció hatására a sejtek kb. 70 %-a T-bet és CXCR3 pozitív lett, az intracelluláris T-bet és a sejt felszíni CXCR3 jelölés eredménye látható a kísérlet menetét vázoló ábrán (33. ábra). Ezt követően az indukált és – kontrollként - a nem indukált sejteket az

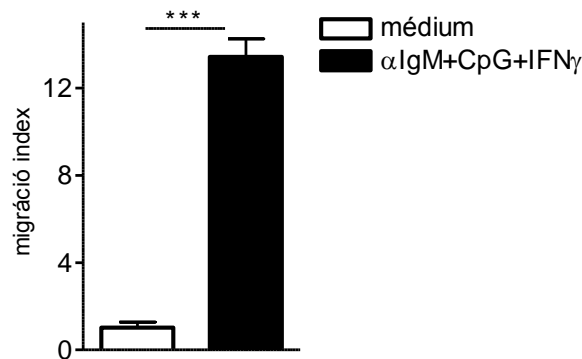
ún. „trans-well” kamra felső rekeszébe helyeztük, melynek alsó rekeszébe a receptor liganduma került médiumban oldott formában (CXCL9 kemokin) [144]. 2 óra inkubációt (37°C, 5% CO₂) követően a felső és alsó kamrából a sejteket összegyűjtöttük, majd megszámláltuk a sejteket áramlási citometria segítségével. A migrációs indexet az alsó kamrába migrált sejtek számának és a bevitt („input”) sejtszám hányadosából számoltuk. A kapott eredményeket normalizáltuk a kontroll mintában kapott értékkel, ahol a sejtek nem specifikusan kerültek át az alsó, kemokin mentes médiumot tartalmazó kamrába [133].



33. ábra: „Transwell Migration assay” – A $T\text{-bet}^+/CXCR3^+$ MZ B-sejtek migrációs képességének vizsgálatára összeállított kísérlet menete – Az indukált, $T\text{-bet}^+/CXCR3^+$ MZ B-sejteket kemokin (CXCL9) vagy médiumot tartalmazó migrációs kamrába helyeztük, majd 2 óra inkubációt követően megszámláltuk a membránon aktívan átvándorolt sejtek számát áramlási citometria segítségével.

Kísérletünk során bizonyítottuk funkcionális jelentőségét a MZ B-sejtek felszínén a három gyulladásos stimulus hatására megjelenő - a T-bet szabályozása alatt álló – kemokin receptornak. Azt tapasztaltuk, hogy azok a $T\text{-bet}^+$ MZ B-sejtek, akik kifejezték felszínükön a CXCR3 receptort kb. tízszer nagyobb mértékben voltak képesek vándorolni a receptor kötőpartnerre (CXCL9 kemokin) felé, mint a kontrollként vizsgált nem indukált sejtek (34. ábra). Ez az

eredmény bizonyítja, hogy a T-bet transzkripciós faktort és a célgénjét, a CXCR3 receptort expresszáló MZ B-sejtek képesek in vitro kemokinek által irányított módon migrálni.



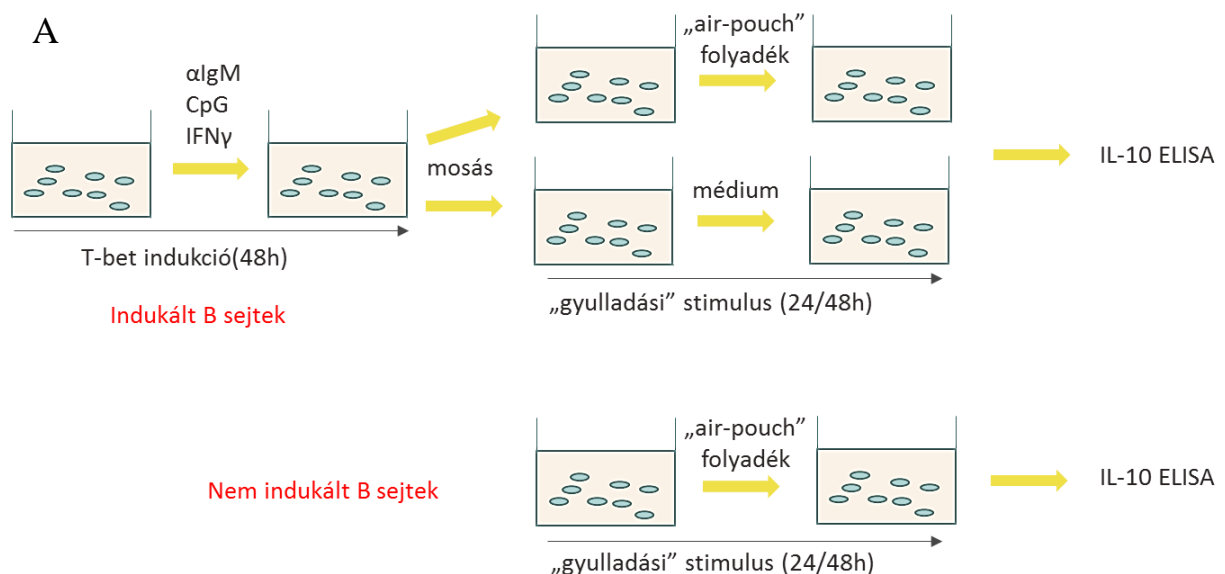
34. ábra: MZ B-sejtek CXCL9 kemokin felé való vándorlási képességét bemutató migrációs index – Indukált, T-bet⁺/CXCR3⁺ MZ B-sejtek (anti-IgM+CpG+IFN γ) és kontrollként nem indukált (médium) MZ B-sejtek migráló képességét vizsgáltuk CXCL9 kemokin irányában - anti-IgM (10 μ g/ml), CpG (1 μ M) és IFN γ (50ng/ml) (n=3; *** p<0,0001).

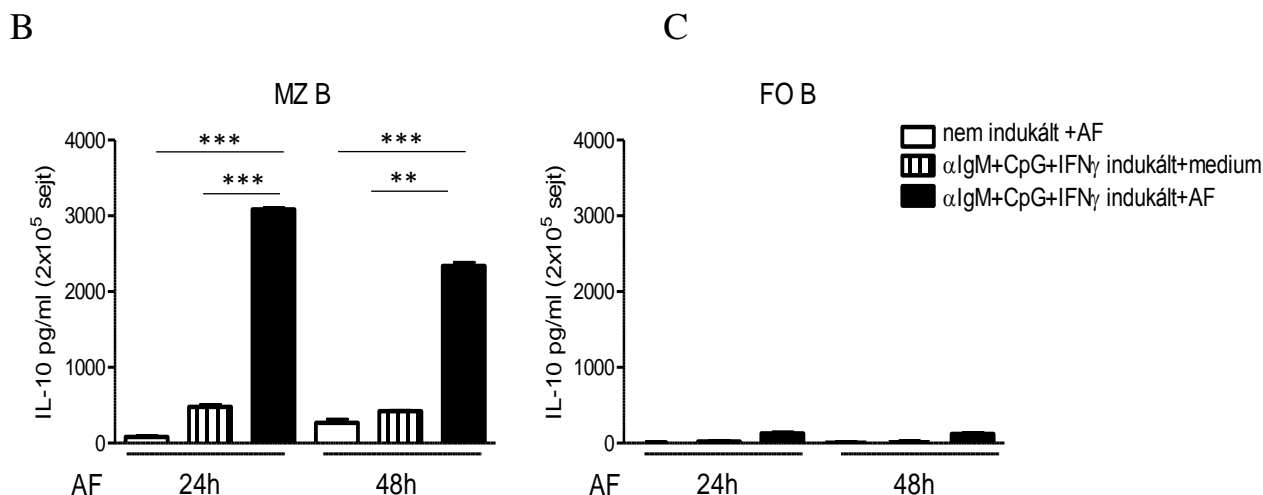
6.8 A Tbet⁺/CXCR3⁺ MZ B-sejtek IL-10 termelésének vizsgálata "gyulladásí környezet" modellezését követően

Eddigi eredményeinkből kiderül, hogy a MZ B-sejtek a BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztüli aktivációt követően fokozott IL-10 termeléssel válaszolnak, in vivo a CIA remisszió fázisában megemelkedik a T-bet, az IL-10 és a T-bet szabályozása alatt álló CXCR3 receptor mRNS expressziója. A hármas gyulladásí stimulus kombinációra (24h) képződik egy kis alpopuláció a T-bet pozitív sejteken belül, akik IL-10 pozitívak (kb. 16%). Ugyanezen stimulusokra 48 óra elteltével kialakul egy T-bet és CXCR3 pozitív alpopuláció (kb. 70%), amelyek kemokin gradiens vezérelt módon képesek vándorolni. Hogy mi lehet ennek a jelentősége a MZ B-sejtek életében, még nem tisztázott. Feltételezéseink szerint ezek a hármas „gyulladásí koktéllal” pre-aktivált sejtek, amelyekben nem mellesleg meg van a potenciál, hogy migráljanak gyulladásí kemokinek irányába, ha újra aktiválódnak - akár ha gyulladásí területre érve újra találkoznak a „gyulladásí stimulusokkal” – képesek még hatékonyabban kifejteni szuppresszív funkciójukat és robusztusabb IL-10 termeléssel válaszolnak. Hogy modellezzük a gyulladásí környezetet az akut ízületi gyulladás modellezésére használt, nemzetközileg elfogadott, karragénnel kiváltott gyulladásí modellt, az ún. „air-pouch” modellt alkalmaztuk. A módszer azon alapul, hogy az állat bőre alá injektált levegő által kialakult

üregbe juttatott immunogén anyag (karragén) az ízületi gyulladásra nagyon hasonlító reakciót idéz elő. Megnövekedett sejtinfiltráció és számos citokin koncentrációjának emelkedése mutatható ki a zsákban („pouch”) [131, 132]. A karragán indukálta zsákból izolált folyadékot („air-pouch” folyadék) használtuk a gyulladási környezet modellezésére. Habár vizsgálatink során a MZ B-sejtekre fókuszáltunk, kísérleteinkből tudjuk, hogy a lép másik érett B-sejt populációjában, a FO B-sejtekben a vizsgált stimulusokra (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml) szintén megemelkedik a T-bet és a CXCR3 expressziója, de a sejtek nem válaszolnak IL-10 termeléssel (nem bemutatott eredmény). A kemokin receptor funkcionális jelentőségét esetükben - hogy képesek-e a receptor liganduma felé vándorolni nem vizsgáltuk - de feltételezzük, hogy ha már megjelenik felszínükön a receptor, akkor funkcionálisan aktív. Mivel a két B-sejt populáció az IL-10 termelés képességén kívül hasonlóan reagált az általunk vizsgált stimulusokra (anti-IgM, CpG, IFN γ), fontosnak találtuk a FO B-sejtek vizsgálatba vonását a következő kísérletben.

Stimuláltunk MZ B- és FO B-sejteket a BCR/TLR9/IFN γ R receptoron keresztül 48 óráig (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml). Az indukció hatására a MZ B-sejtek kb. 70 %-a, míg a FO B-sejtek kb. 60 %-a T-bet és CXCR3 pozitív lett. Kísérleteinkből tudjuk, hogy 48 után már lecseng az IL-10 pozitív sejtek képződése (23. ábra), ezért az újristimulált sejtek IL-10 termelése már biztosan csak a gyulladási környezet („air-pouch” folyadék) következménye. Az indukált sejteket egy mosási lépés után áthelyeztük további 24 és 48 órára a médiummal felére hígított „air-pouch” zsákból izolált, ízületi folyadékot modellező milióbe, majd pedig detektáltuk a sejtek által szekretált IL-10 mennyiségét ELISA módszerrel (35. ábra A panel).





35. ábra: „Gyulladásos környezet” modellezésének hatása a sejtek IL-10 termelésére - T-bet⁺/CXCR3⁺ B sejtek IL-10 termelésének vizsgálata „gyulladásos stimulus” hatására – a kísérlet menete (air-pouch folyadék = „izületi folyadék” modellezése) (A); Az indukált és nem indukált MZ B (B) és FO B-sejtek (C) IL-10 citokin termelése „air-pouch” zsákokból izolált folyadékkal való stimulálást követően (AF=„Air-pouch” Folyadék) - *** p<0,0001; ** p<0,01.

Feltételezésünk, miszerint ha a pre-aktivált T-bet⁺/CXCR3⁺ sejtek „gyulladásos környezetet” modellező közegbe kerülnek, robosztus IL-10 citokin termeléssel válaszolnak, a MZ B-sejtek esetében bebizonyosodni látszik (35. ábra B). Azt tapasztaltuk, hogy az indukált, három receptoron – BCR/TLR9/IFN γ R – keresztül elő-stimulált (anti-IgM-10 μ g/ml; CpG-1 μ M; IFN γ -50ng/ml), T-bet és CXCR3 pozitív MZ B-sejtek nagymértékben termeltek IL-10 citokint, miután áthelyeztük őket a gyulladásos környezetet imitáló közegbe („air-pouch” folyadék=AF). Fontos eredmény, hogy habár a FO B sejtekben ezen stimulusokra ugyanúgy megnő a T-bet és a CXCR3 expressziója, a sejtek IL-10 termelését nem volt képes megnövelni az „air-pouch” folyadékkal való kezelés (35. ábra C).

7 Diszkusszió

A rheumatoid arthritisz (RA) az egyik leggyakoribb elsősorban a kéz és láb ízületeit érintő autoimmun betegség. A szervezet saját fehérjéinek bizonyos poszt-transzlációs módosulásai (pl. citrullináció) áttörhetik az immuntoleranciát, a megváltozott saját motívumok ellen immunválasz alakul ki, amelynek következtében auto-antitestek termelődnek. Rheumatoid arthritiszben a citrullinált fehérjék/peptidek ellen képződő ellenanyagok (ACPA) kimutatása a legfontosabb szerológiai diagnosztikai eszközök közé tartozik, továbbá fontos szerepüket írták le a betegség patomechanizmusában [2]. Manapság ciklikus citrullinált peptid szekvenciákból összeállított CCP2 és CCP3 (cyclic citrullinated peptide – CCP) tesztek használata a legelfogadottabb eszköz a betegség szerológiai diagnosztizálására [34, 35]. Mivel azonban a betegek kb. 30 %-át ezek a tesztek negatívnak találják, fontos további epitópok keresése a diagnosztizálásra alkalmas tesztek tovább fejlesztése érdekében, továbbá az ellenanyagok részletesebb megismerése a betegség patomechanizmusának jobb feltárása céljából.

A munkacsoportunk korábban kidolgozott egy ismert fehérjékből származó, szintetizált citrullin tartalmú peptid szekvenciák felhasználásával (filaggrin 5- és 19-mer, kollagén, vimentin) összeállított ELISA tesztet („4-peptid-panel”) [6]. Az egyes peptidek egyedi szenzitivitás értékei, rögzített 90 %-os diagnosztikai specificitás érték mellett 40-60 % között mozogtak. Ha azonban eredményeinket az összes peptidre vetítve analizáltuk a „4-peptid-panel” szenzitivitás értéke kb. 80 %-nak adódott, ami azt jelentette, hogy a betegek kb. 20 %-a nem ismert fel egyetlen vizsgált peptidet sem, tehát a betegek maradék kb. 80%-a pozitívnak adódott. A teszt továbbfejlesztése érdekében bevontunk a vizsgálatokba többek között olyan virális és bakteriális eredetű peptideket, amelyek bizonyos fertőzések során szerepet játszhatnak az immuntolerancia áttörésében. Az RA kialakulásában - a hajlamosító genetikai háttér mellett - a környezeti faktorok közül talán a legfontosabb a különféle vírusos vagy bakteriális fertőzések hatása. A kórokozókból származó antigén epitópok ellen képződő ellenanyagok felismerhetik a gazda szervezet egyes saját fehérjéit is, vagyis a keresztreakció következtében fokozzák a gyulladásos folyamatokat [31]. Az Epstein-Bar vírus nukleáris antigénje (EBNA-1, 2) [124] és a bakteriális eredetű α -enoláz enzim [125] immunológiailag domináns citrullinált epitópja mellett vizsgálatainkba vontuk a fibrin fehérje β láncának legfontosabb szekvenciáját is [126]. Az általunk eddig vizsgált peptid szekvenciák összehasonlítása és Trier munkacsoportjának [41] megfigyelései alapján, miszerint a citrullin-glicin motívumok elengedhetetlenek az antigén auto-antitest általi felismeréséhez, munkacsoportunk az MTA-

ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársaival együtt tervezett egy olyan citrullin tartalmú peptid szekvenciát („multi-epitóp” peptid), amelyben a citrullin-glicin (cit-gly) és a szintén több peptidben előforduló alanin–citrullin (ala-cit) motívumok 2-2 kópiában vannak jelen semleges aminosavakat tartalmazó távtartóval elválasztva. Eddigi kísérleteink alapján ez a peptid szekvencia nagyon ígéretesnek bizonyult, az RA szérumminták legnagyobb része (ELISA 60 %, SPR 90 %) felismerte, míg egyetlen egészséges szérumot sem detektált pozitívnak, így a teszt specificitása felülmúlja a korábbi tesztekét. Az általunk vizsgált 5 peptid közül az EBNA-1 bizonyult a leggyengébbnek, szenzitivitás értéke (18 %) és a ROC analízis során kapott görbe alatti terület érték egyértelműen bizonyítja, hogy nem használható diagnosztikai célra. Habár a fibrin- β és a „multi-epitóp” peptidek közepesen magas szenzitivitás (69% és 64%) és ROC görbe alatti terület (0,8173 és 0,7726) értékeihez képest az EBNA-2 és az α -enoláz peptidek mindkét paraméter tekintetében gyengébbnek adódtak, úgy véljük alkalmasak az általunk kidolgozott „4-peptid-panel” teszt bővítéséhez. A bővült, citrullin tartalmú peptideket tartalmazó panelben lévő 8 peptidet (filaggrin 5- és 19-mer, vimentin, kollagén, EBNA-2, α -enoláz, fibrin- β , „multi-epitóp”) így együtt, ilyen kombinációban még nem vizsgálták. Az új teszt összesített érzékenysége javult az új peptidek bevonásával, 85 %-os szenzitivitás értéke a kereskedelmi forgalomban kapható, elfogadott diagnosztikai tesztek szenzitivitását kissé meghaladta, tehát növelni tudtuk a teszt diagnosztikai hatékonyságát. Mivel az egyes betegek anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyagai eltérő epitóp kombinációkat ismernek fel, egy heterogén peptid szekvenciákból összeállított teszt segítségével pontosabbá tehető az RA szerológiai diagnosztizálása. Miután az ACPA jelenléte évekkal a betegség kialakulása előtt kimutatható, ennek prognosztikai jelentősége lehet a pre-klinikai RA vagy a rizikó csoportban levő betegek esetében, ahol a korai terápia elkezdése lényeges szempont.

Számos munkacsoport felfigyelt már a citrullinált fehérje/peptid ellenanyagok (ACPA) azon sajátosságára, hogy nem csak egy bizonyos epitópot képesek felismerni, hanem több citrullinált szekvenciával képesek keresztreakálni [23, 134]. Az általunk vizsgált peptidek közül - amellyek között eddig még nem vizsgálták a keresztreakció mértékét - 5 peptiddel (filaggrin 19-mer, kollagén, fibrin- β , vimentin, „multi-epitóp”) affinitás tisztított IgG ellenanyagok (ACPA) esetében mi is nagyfokú keresztreaktivitást tapasztaltunk. A fibrin- β peptidet felismerő ellenanyagok bizonyultak a legspecifikusabbnak, esetükben volt a legkisebb a keresztreakció, legnagyobb mértékben a tisztításnak megfelelően a fibrin- β peptiddel reagáltak. Ezzel ellentétben nem meglepő módon - a több immunogén epitópot tartalmazó - a „multi-epitóp” peptiddel affinitás tisztított ellenanyagok esetében volt kimutatható a legnagyobb mértékű

keresztreakció más citrullin tartalmú peptidekkel. A „multi-epitóp” peptid ilyen magas fokú keresztreakáló képessége bizonyítja a tervezés sikerességét, sikerült heterogén ACPA populációval reagáló peptid szekvenciát előállítani.

Az évek során néhány beteg esetében lehetőségünk volt többszöri vérvételből származó szérum mintákat ismételtén megvizsgálni, vagyis nyomon tudtuk követni a betegek ACPA válaszában változását. Azt tapasztaltuk, hogy néhány beteg esetében a különböző időpontokban vizsgált szérum minták egyre több peptidet ismertek fel, vagyis megfigyelhető volt az „epitope spreading”, a kezdeti egy vagy néhány epitóp felismerésének kibővülése több epitópra az idő előrehaladtával [40].

Az anti-citrullinált protein/peptid ellenanyagok (ACPA) jelenléte a legjobb prediktív faktor rheumatoid arthritisben, a betegség tüneteinek kialakulása előtt évekkel kimutathatóak. Az ACPA-k célpontjai viszonylag jól feltártak, számos auto-antigént jellemeztek már, továbbá kimutatták, hogy ezen ellenanyagok - összehasonlítva a „nem auto-antigén” specifikus ellenanyagokkal - alacsonyabb aviditással rendelkeznek [135, 145]. A szerzők CCP2 ELISA lemezről NaSCN-nel történő elúciót követően kalkulálták az „aviditás indexet” a maradék kötődött ACPA és az elúció nélkül kötődött ACPA mennyiségi arányából. Az ACPA affinitása és az RA súlyossági stádiuma közötti összefüggés jelenleg kevésbé feltárt. Ezért célul tűztük ki az ACPA-k affinitásának felszíni plazmonrezonancia mérésen alapuló összehasonlítását. Az általunk vizsgált három peptidet, a filaggrin-19-mer, a vimentin és a „multi-epitóp” peptidet felismerő ellenanyagok az auto-antitestekre jellemző alacsony affinitás értéket (K_D) mutatták. A citrullinált filaggrin és vimentin peptideket felismerő ellenanyagok (ACPA) disszociációs konstans értékei, néhány kiugró értéktől eltekintve 10^{-4} - 10^{-7} M között oszlottak el. Habár az értékek a „multi-epitóp” peptiddel reagáló ellenanyagok esetében kicsit szűkebb tartományban mozogtak, a szérumok ugyanúgy az auto-antitestekre jellemző alacsonyabb affinitás értéket mutatták (10^{-5} - 10^{-7} M). A filaggrin-19-mer peptid esetében a lemért szérumok ($n=60$) 59 %-ánál a felszíni bioszenzor készülékkel nem volt detektálható kötődés, habár a vizsgált szérumokat előzőleg teszteltük ELISA módszerrel és mind pozitív eredményt adtak. Ennek talán az lehet az oka, hogy a felszíni bioszenzor vizsgálatnál folyamatosan áramoltatjuk meghatározott ideig az interakció partnereket, kevesebb idő van a kölcsönhatás kialakulására, így a nagyon alacsony affinitással rendelkező ellenanyagok nem képesek kikötödni és ezért azokat nem tudjuk detektálni. Egy másik megközelítésként az is magyarázatként szolgálhat, hogy ezekben a szérum mintákban alacsonyabb koncentrációban volt jelen a filaggrin-19-mer

specifikus ellenanyag, amit már az SPR rendszer a mi körülményeink között nem volt képes jelerősítés hiányában detektálni.

Suwannalai és munkatársai összefüggést találtak az alacsony aviditású auto-antitestek és a betegség súlyossága között. Úgy találták, hogy az ellenanyagok alacsony aviditása befolyásolhatja az ACPA-k biológia aktivitását és ezáltal súlyosabb betegség kialakulásához vezethetnek. Kimutatták, hogy alacsonyabb aviditás értékkel jellemezhető ACPA-k jelenléte fokozott csont erózióval járt együtt [135]. Annak tisztázására, hogy az általunk vizsgált peptidekre (filaggrin, vimentin, „multi-epitóp”) specifikus ellenanyagok alacsony affinitás értékei összefüggésbe hozhatók a betegség súlyosságát jelző DAS 28 index-szel, korreláció analízist végeztünk, amely során megvizsgáltuk a K_D értékek és a DAS28 index összefüggését. A betegség aktivitásának megállapítására az Amerikai Reumatológus Társaság által is elfogadott több tényezőből összeálló DAS (disease activating score) indexet használják [146]. 3,2 alatt mérsékelt, 3,2 és 5,1 között közepes, míg 5,1 felett kifejezett gyulladási aktivitásról beszélhetünk. A vizsgált három peptid közül, a filaggrin 19-mer peptid esetében fordított korreláció állt fenn, vagyis annál a betegnél, akinél nagyobb volt a betegség súlyosságát jelző DAS index, alacsonyabb volt a szérumban jelen lévő citrullinált filaggrin specifikus ellenanyagok affinitásának mértéke. Hogy mi lehet az összefüggés oka, arra Suwannalai és munkacsoportja állított fel egy hipotézist, miszerint a nagyobb aviditású ellenanyagok gyorsan és erősen hozzákötnek a célpontjukhoz, úgymond „csapdázódnak”, míg a kisebb aviditású ellenanyagok, mélyebbre képesek hatolni a szövetekben miközben gyenge kötési képességükkel „pásztázzák” a szöveti környezetet. Ugyanez a munkacsoport azt is alátámasztotta, amire sokan mások is felfigyeltek már, hogy az anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyagok több citrullinált peptid epitóp felismerésére is képesek [135]. Ezt az eredményt mi is alá tudtuk támasztani, az általunk vizsgált peptideket felismerő ellenanyagok nagyfokú és heterogén keresztreakciót mutattak mind az ELISA vizsgálatokban, mind pedig a felszíni plazmon bio-szenzorral végzett vizsgálatok során. Vizsgálataink során alkalmunk adódott több betegből származó peptid specifikus ellenanyag keresztreakáló képességének mértékét analizálni, amely során azt tapasztaltuk, hogy egyénenként eltért a keresztreaktivitás mértéke, vagyis az egyedek ellenanyagai eltérő epitóp kombinációkat ismerhetnek fel.

Ezeket az adatokat összegezve elmondhatjuk, hogy sikerült növelnünk a munkacsoport által korábban kidolgozott ELISA teszt („4-peptid-panel” - [6]) diagnosztikai hatékonyságát a teszt tovább fejlesztésével, további auto-epitópok (EBNA-2, α -enoláz, fibrin- β , „multi-epitóp”) vizsgálatokba vonásával. Az immár 8 peptidből álló teszt összesített szenzitivitás értéke – a „4-

peptid-panel” értékéhez képest – javult, 85 %-nak adódott, ami mutatja magas érzékenységét. Fontos kiemelni, hogy munkacsoport által tervezett „multi-epitóp” peptid felimerése önmagában is magas szenzitivitást és igen magas specificitást mutatott és ezáltal nagyban hozzájárult a bővült panel érzékenységének javulásához. Mindemellett bizonyítottuk, hogy az egyedek citrullinált epitópokat felismerő ellenanyagainak affinitása alacsony, eltérő epitóp-kombinációkat ismernek fel, képesek keresztreagálni. Úgy véljük egy heterogén peptid szekvencia keveréket, sőt meghatározott epitópokat tartalmazó tervezett szekvenciákat tartalmazó diagnosztikai teszttel hatékonyabban lehet diagnosztizálni a különböző ACPA-profillal rendelkező beteg csoportokat.

Hogy a B-sejtek az antigén prezentáció és az antitest termelés mellett másképpen is részt vesznek az immunrendszer szabályozásában, az elmúlt két évtizedben vált világossá. Számtalan kutatást folytattak a B-sejtek szuppresszív funkciójának jobb feltárása céljából. Habár a B-sejtek által termelt IL-10 citokin kapta a legnagyobb figyelmet, a B-sejtek számos IL-10-független módon képesek szabályozni a gyulladási folyamatokat [78]. Leírták szerepüket számos autoimmun és gyulladási betegségben, például EAE-ben, I-es típusú diabéteszben és rheumatoid arthritisben [61, 64]. Habár a B-sejtek szabályozó szerepe jól feltárt, még sok nyitott kérdés van funkciójukkal, fenotípusukkal és eredetükkel kapcsolatban. A különféle fenotípussal és különböző szabályozó mechanizmussal rendelkező, eltérő elhelyezkedésű szuppresszív képességű B-sejtek léte azt sugallja, hogy a regulátor T-sejtektől eltérően a Breg sejtek nem köthetőek egy bizonyos progenitor sejt populációhoz. Attól függően, hogy milyen stimulusok, környezeti hatások érik, bármelyik B-sejt populáció képes átmenetileg vagy tartósan szuppresszív funkciót betölteni az immunrendszerben [52, 85, 147, 148]. Bár differenciációjukat irányító számos tényezőt azonosítottak már, nagyon fontos a kialakulásukban és a funkciójukban fontos IL-10 citokin termelődésében szerepet játszó molekulák további kutatása annak érdekében, hogy megkönnyítsük e sejt populáció direkt aktiválását célzó terápiák fejlesztését.

Humán autoimmun betegségek patogenezisének in vivo tanulmányozására régóta használnak egér modelleket [4]. Munkánk során elsődleges célként tűztük ki humán rheumatoid arthritisz egér modellejében, kollagén-indukált arthritiszben (CIA) - az irodalmi adatok alapján potenciális Breg populációnak számító – MZ B-sejtek [70, 71] regulátor funkciójának jellemzését, szabályozásukban fontos molekulák azonosítását. Az IL-10 citokin expresszációja mellett vizsgálatainkba vontuk a Th-sejtek differenciálódásában kulcsfontosságú T-bet transzkripciós faktort [103], amelynek a másik regulátor limfocita

populáció, a regulátor T-sejtek életében már leírták fontos szerepét [111, 113, 114]. T-sejtekben betöltött szerepe jól feltárt, de hogy B-sejtekben milyen molekulákat szabályoz jelenleg kevésbé ismert. Munkacsoportunk a BCR és a TLR9 jelpályák kapcsolódási pontjaként újonnan azonosította a T-bet transzkripciós faktor jelentőségét B-sejtekben. A két jelpályának szimultán aktiválása szinergisztikusan módon volt képes növelni mind a T-bet, mind pedig a T-bet szabályozása alatt álló RAD51 kifejeződését [118, 122]. És mivel tudjuk, hogy ezen szignálok (BCR/TLR9) a regulátor B-sejtek differenciálódásának fontos indukáló faktorai [71, 88] - és annak analógiájára, hogy a T-bet a CD4⁺ regulátor T-sejtek egy kis populációjának szuppresszív funkciójának szabályozásában fontos szerepet tölt be [113] - kíváncsiak voltunk, hogy ezeken a receptorokon keresztüli jelek hatására aktiválódó T-bet-nek van-e szerepe a Breg sejtek, legfőképpen a MZ B-sejtek IL-10 termelésében. Mindemellett hogy tudjuk, érett B-sejtekben – a BCR és TLR9 szignálok mellett – a T-bet transzkripciós faktort elsősorban az IFN γ aktiválja [105, 138], és a CIA során végbementő gyulladási folyamatok fő komponense [140], az általunk vizsgált stimulusok mellett megvizsgáltuk a pro-inflammatorikus IFN γ citokin hatását is a MZ B-sejtek regulátor funkciójának jellemzése során.

Figyelmünket azért fordítottuk a MZ B-sejtek felé, mert a lépben elhelyezkedő IL-10 termelésre képes B-sejt populációk közül, a MZ B-sejtek fontos szerepét írták le a kollagén-indukált arthritisz iniciációjában [102], nagymértékben expresszálnak Toll-szerű receptorokat (TLR), beleértve a TLR9 receptort [98]. A BCR/TLR9 szignálokra, a gyors adaptív immunválasz résztvevőjeként, érzékenyen reagálnak, nagy mennyiségű antitest és IL-10 termeléssel válaszolnak [71, 98] és nem melleleg viszonylag nagyobb mennyiségben nyerhetők ki a lépből in vitro vizsgálatokhoz, a lép B-sejt populáció kb. 15 %-t teszik ki, míg a B1-a és a B10 sejtek alig kb. 1 %-ban vannak jelen [149].

Hogy megtámogassuk a MZ B-sejtek választását, összehasonlítottuk a lépben lévő három – irodalmi adatok szerint potenciális regulátor B-sejt populációt – a normális B-sejt fejlődés különböző szakaszait reprezentáló MZ és FO B-sejteket és az éretlen kevert T2-MZ prekursor populációt [52, 73, 85, 88]. BCR és TLR9 receptorokon való aktiválást követően mértük a B-sejt populációk intracelluláris IL-10 expresszióját és a szekretált citokin mennyiségét ELISA módszerrel. Eredményeink alátámasztották elvárásainkat, 24 órás CpG (TLR9) stimulusra a MZ B-sejtek válaszoltak a leginkább, ez a sejtcsoport termelt a legnagyobb mennyiségben IL-10 citokint. A 24 órás időintervallumot előzetes kísérleteink alapján határoztuk meg, amelyet teljes lép B-sejt (B220⁺ B-sejtek) populáción végeztünk. A BCR/TLR9 szignálok hatását vizsgáltuk az IL-10 termelésre az idő függvényében, amelynek során megállapítottuk, hogy

habár a szekretált citokin mennyisége 24 óra után kis mértékben emelkedett ugyan, de az IL-10⁺ sejtek száma 48 óra után olyan drasztikus mértékben lecsökkent, hogy kísérleteinkhez a 24 órás inkubációs időt találtuk a legmegfelelőbbnek. Fontos eredményként azt tapasztaltuk, hogy a MZ B-sejtek a lépben található másik érett B-sejt populációval összehasonlítva (FO B) sokkal robosztusabb IL-10 termeléssel válaszoltak, míg a FO B-sejtek csupán kb. 1 %-a adódott IL-10 pozitívnak, addig a MZ B-sejtek kb. 15 %-ában volt detektálható IL-10 citokin. Lampropoulou és mtsai. úgy vélik a naív FO B-sejtekből képződnek a regulátor funkcióval bíró B-sejtek az úgynevezett szekvenciális modellt követve, vagyis az iniciátor TLR szignál után a BCR/CD40 keresztkötés alakítja ki a szuppresszív fenotípust [88]. Ez egy nagyon érdekes modell, habár nagyon nehéz összeegyeztetni mások által kapott eredményekkel, ahol úgy tartják a FO B-sejtek a legkevésbé indukálható Breg populáció a lépben [55, 67]. Továbbá Gai2 deficiens egerekben, amelyekből hiányzik a T2-MZpre és a MZ B-sejt populáció, de a FO B-sejtek érintetlenek, spontán vastagbélgyulladás alakul ki, ami szintén arra utal, hogy a kevert T2-MZ prekurzor és a MZ B-sejt populációnak inkább tulajdonítható védelmi szerepkör, mint a FO B-sejteknek [150]. Mi is alá tudtuk támasztani ezeket az eredményeket, a három populációból, a mi általunk alkalmazott körülmények között, leginkább a MZ B-sejt – és kisebb mértékben a T2-MZpre - populáció mutatott regulátor transzformációt.

Hogy *in vivo* az IL-10 és T-bet molekulák biológiai jelentőségét analizáljuk MZ B-sejtekben, kollagén indukált arthritisz során, a betegség különböző szakaszaiban megvizsgáltuk a két molekula expresszáldásának mértékét. Újszerű eredményként azt kaptuk, hogy mind az IL-10, mind pedig a T-bet mRNS szintje emelkedést mutatott a betegség remissziójában a kontroll és az akut csoporthoz képest. Habár az IL-10 esetében az emelkedés statisztikailag nem lett szignifikáns, de eltekintve az egyedek közötti nagy szórástól, a tendencia határozottan látható a remisszió fázisában. *In vitro* eredményeinkből is látható, hogy direkt célzott szignálokra a MZ B-sejt populáció csak egy kis százaléka válaszol IL-10 termeléssel, egy igen heterogén populációról beszélhetünk, amelyben *in vivo* megtalálni azokat a sejteket, amelyek hajlandóságot mutatnak a regulátor transzformációra, nehéz feladat. Hogy mintáink minőségét ellenőrizzük és annak analógiájára, hogy a CD4⁺ regulátor T-sejtek migrációjának szabályozásában fontos szerepét tárták fel a T-bet szabályozó alatt álló CXCR3 kemokin receptornak [105, 111, 118], megmértük a molekula mRNS változását a betegség különböző fázisaiban. Elvárásainknak megfelelően a receptor expressziója – a T-bethez hasonlóan - szintén szignifikáns eltérést mutatott a remisszióban az akut csoporthoz képest. A T-bet transzkripciós faktor szerepét az IL-10 termelő regulátor T-sejtek migrációjának szabályozásában, már leírták

[111] de hogy vajon mi lehet a remisszióban a MZ B-sejtek esetében a jelentősége, arra később térnék vissza.

In vivo eredményeink után, miszerint az IL-10 és a T-bet génexpressziója emelkedett szintet mutatott a CIA remisszió fázisában, in vitro tovább vizsgáltuk a két molekula lehetséges kapcsolatát, célunk volt a két molekula együttes kifejeződésének kimutatása egy sejtben. Megvizsgáltuk a BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon (anti-IgM/CpG/IFN γ) keresztül aktivált MZ B-sejtek IL-10 és T-bet expresszió változását gén és fehérje szinten. A két gén expressziójának változása hasonló kinetikát követett, az expresszió 6 óránál érte el maximumát, amelyet 24 órára az expresszió lecsengése követett. Ugyanezen stimulusok hatását megmértük fehérje szinten is, a sejtekben 24 órás aktiválást követően detektáltuk az intracelluláris IL-10 és a T-bet jelenlétét. Habár különböző mértékben, de az összes alkalmazott stimulus aktiválta a T-bet expresszióját, ami maximumát a hármas stimulusra (anti-IgM/CpG/IFN γ) érte el. Továbbá ugyanezen stimulus kombinációra a T-bet⁺ MZ B-sejt populáción belül képződött egy kis alpopuláció, a sejtek kb. 16 %-a dupla pozitívnak (T-bet⁺/IL-10⁺) adódott. Nagyon fontos eredmény, hogy az IL-10⁺ sejtek mindegyike expresszálta a T-bet transzkripciós faktort is, tehát sikerült a T-bet⁺ MZ B-sejtek között egy kis IL-10 citokint expresszáló alpopulációt kimutatnunk. Hogy van-e közvetlen kapcsolat a T-bet és az IL-10 termelés között, nem tudjuk, de az az eredményünk, hogy a CIA progressziójában is fontos szignálok hatására képződő IL-10⁺ MZ B-sejtek T-bet pozitívak is, arra enged következtetni, hogy a T-bet faktornak fontos szerepe lehet a sejtek életében, a transzkripciós faktor kifejeződése valamilyen módon előnyt biztosíthat a sejtek számára. A T-bet és az IL-10 pozitivitás ilyen szintű kapcsolatát CD4⁺ FOXP3⁻/Tbet⁺ regulátor T-sejtek esetében Jankovic és munkatársai is kimutatták, intracelluláris protozoa fertőzést követően 7 nappal nagymértékben megnőtt az IFN γ és IL-10 termelő CD4⁺/Tbet⁺ sejtek száma mind a lépben, mind a peritoneumban, sőt az összes IL-10⁺ CD4⁺ T-sejt expresszálta a T-bet transzkripciós faktort is [113].

Annak tisztázására, hogy mi lehet a funkcionális jelentősége annak, hogy a T-bet, IL-10 molekulák expresszálódása mellett, a CXCR3 kemokin receptor mRNS expressziója szintén emelkedett szintet mutat a CIA remissziójában, megmértük indukált MZ B-sejtek migrációs képességét. A regulátor T-sejtek életében már leírták a T-bet szerepét, szabályozza a migrációt irányító kemokin receptor, a CXCR3 megjelenését a sejteken [111], de MZ B-sejtek esetében eddig nem vizsgálták. B-sejtek esetében kimutatták a CXCR3 asszociációját B-sejtes limfómákkal, beleértve a krónikus limfocita leukémiát (CLL), a kis limfocita limfómát (SLL) és a lép marginális zóna limfómát (SMZL), amelyekben feltételezik a CXCR3 receptor szerepét

a malignus migrációban [151]. Hogy in vitro modellezni tudjuk a sejteket - a betegség folyamán - érő hatásokat, indukáltuk izolált MZ B-sejtekben a T-bet és a CXCR3 expresszióját, amely során azt tapasztaltuk, hogy a hármas stimulus kombinációra (anti-IgM/CpG/IFN γ – 48h) a sejtek majd 70 %-a dupla pozitív lett, expresszálta mind a T-bet, mind a CXCR3 molekulát. Miután ezeket a dupla pozitív sejteket egy migráció vizsgálatokban használt úgynevezett „transwell” kamrába helyeztük és mértük a sejtek migrációs hajlandóságát a receptor egyik ligandjával (CXCL9) szemben [144] azt tapasztaltuk, hogy a sejtek, akik expresszálták a transzkripciós faktort és a kemokin receptort, sokkal nagyobb mértékben voltak képesek aktívan migrálni a kamrákat elválasztó membránon keresztül, mint azok a sejtek, amelyek T-bet és CXCR3 negatívak voltak. Eredményeink megfeleltek az elvárásainknak, a sejtek, amelyek maga szinten expresszálták a kemokin receptort, képesek voltak in vitro aktívan vándorolni a receptor liganduma felé. Bizonyítottuk újszerű eredményként, hogy a T-bet transzkripciós faktort és a célgénjét, a CXCR3 receptort expresszáló MZ B-sejtek képesek in vitro kimokinek (CXCL9) által irányított módon migrálni.

Doktori munkám során elsődleges célunk volt a T-bet és az IL-10 termelés lehetséges kapcsolatának tanulmányozása MZ B-sejtekben. Eredményeinkből kiindulva, miután in vivo a CIA remisszió fázisában a T-bet, az IL-10 és a CXCR3 receptor mRNS expressziója emelkedett szintet mutatott, in vitro sikerült kimutatnunk a BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztüli aktivációt követően a T-bet⁺ sejtek között egy kis IL-10⁺ alpopulációt (16 %) 24 óránál és egy nagy CXCR3⁺ sejtcsoportot (70 %) 48 óra után, szeretnénk volna ennek a biológiai jelentőségét jobban feltárni. Azt a hipotézist állítottuk fel, hogy ha ezek a hármas „gyulladásí koktéllal” pre-aktivált sejtek, amelyekben meg van a potenciál, hogy migráljanak gyulladásí kemokinek irányába, újra aktiválódnak - például ha gyulladásí területre érve újra találkoznak „gyulladásí stimulusokkal” – képesek még hatékonyabban kifejezni szuppresszív funkciójukat és robosztusabb IL-10 termeléssel válaszolnak. A gyulladásí környezet modellezésére az akut ízületi gyulladás modellezésére használt - nemzetközileg elfogadott - karragénnel kiváltott gyulladásí modellt, az ún. „air-pouch” modellt alkalmaztuk [132, 152], amely azon alapul, hogy miután az állat bőre alá injektált levegő által kialakított üregbe immunogén anyagot, karragént juttatunk, az ízületi gyulladásra nagyon hasonlító reakció alakul ki. Megnövekedett sejtinfiltráció (leukociták, neutrofilek) és számos citokin, pl. IL-6, IFN γ , TNF α koncentrációjának emelkedése mutatható ki a zsákban („pouch”) [131]. A karragén indukálta zsákokból izolált folyadékot használtuk a gyulladásí környezet modellezésére. Hipotézisünknek megfelelően, miután az elő-aktivált (anti-IgM/CpG/IFN γ – 48h) T-bet és

CXCR3 pozitív MZ B-sejteket – akikben, eredményeink alapján tudjuk, 48 óra után lecseng az IL-10 expresszió – újra aktiváltuk, vagyis az „air-pouch”-ból izolált folyadékba helyeztük, robosztus IL-10 termeléssel válaszoltak. Habár célunk a MZ B-sejtek IL-10 termelésének jellemzése volt, fontosnak láttuk megvizsgálni hogyan válaszolnak a FO B-sejtek ugyanezen körülmények között. Hiszen eredményeinkből tudjuk (nem bemutatott eredmény), bennük a hármas „gyulladásí” stimulusra ugyanúgy megemelkedik a T-bet és a CXCR3 expressziója, de ezekre a szignálokra nem válaszolnak IL-10 termeléssel. Habár funkcionális jelentőségét nem vizsgáltuk a kemokin receptor expressziójának, de feltételezzük a FO B-sejtek is képesek lennének a ligand felé vándorolni. Az aktivált T-bet⁺/CXCR3⁺ follikuláris B-sejtek esetében az újra aktiválás, a „gyulladásí környezet” modellezése sem volt képes a sejtek IL-10 termelésének nagymértékű fokozására, ami arra utal, hogy az az eredményünk, miszerint miután a BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztüli elő-aktivált MZ B-sejtek újra aktiválódnak - a „gyulladásí környezetet” modellező közegbe kerülnek - sokkal robosztusabb IL-10 citokin termeléssel válaszolnak, a MZ B-sejtek sajátja.

Összességében elmondhatjuk, hogy a T-bet transzkripciós faktor eddig ismert szerepe mellett, egy új funkcióját sikerült feltárnunk B-sejtekben. A regulátor T-sejtek analógiájára, amelyek funkciójában a T-bet transzkripciós faktor betöltött szerepe viszonylag jól feltárt [111, 113-115], jellemeztük T-bet jelentőségét a - regulátor B-sejtek egy fontos populációját adó - MZ B-sejtek IL-10 termelésében. In vivo és in vitro eredményeink alapján úgy véljük a T-bet szerepet játszhat a MZ B-sejtek regulátor funkcióinak szabályozásában. Eredményeink alapján, miután in vivo kollagén indukált arthritisz remissziójában, ahol a regulátor B-sejtek funkciójukat ellátják, a MZ B-sejtekben emelkedett szintjét tapasztaltuk a T-bet, az IL-10 és a CXCR3 receptornak; hogy in vitro BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztüli stimulusokra a nagymértékben kialakuló T-bet⁺ sejtek között képződött egy kis IL-10⁺ alpopuláció; hogy ugyanezen szignálokra képződő T-bet⁺/CXCR3⁺ sejtek hajlandóságot mutattak gyulladásí területeken megtalálható kemokinek [153] irányába való vándorlásra és hogy „gyulladásí környezetet” reprezentáló közegbe („air-pouch” folyadék) kerülést követően fokozott IL-10 termeléssel válaszoltak, úgy véljük a T-bet transzkripciós faktor hozzájárulhat a kollagén-indukált arthritisz súlyosságának csökkentéséhez, azáltal hogy támogatja a MZ B-sejtek migrációját és azon képességüket, hogy gyulladásí területre érve hatékonyabban fejtsék ki szuppresszív funkciójukat, fokozottabban termeljenek IL-10 citokint. Ezen eredményeink hozzájárulhatnak a regulátor B-sejtek kialakulását és funkciójukat irányító mechanizmusok jobb megértéséhez.

8 Új tudományos eredmények

- Továbbfejlesztettük a korábban általunk beállított, ACPA kimutatására alkalmas ELISA rendszert („4-citrullin-peptid-panel” [6]), további citrullin tartalmú peptid bevonásával. A bővített, nyolc peptides panelt (filaggrin 5- és 19-mer, vimentin, kollagén, EBNA-2, α -enoláz, fibrin- β , „multi-epitóp”) ebben a kombinációban korábban nem vizsgálták. Az új teszt összesített érzékenysége javult az újabb peptid bevonásával, igen magas szenzitivitás értékkel (85%) rendelkezik.
- Citrullinált peptidekkel affinitás tisztított ellenanyagokkal (ACPA) folytatott vizsgálataink megerősítették, hogy a citrullinált peptideket felismerő auto-antitestek nem egy epitóp felismerésére képesek, hanem nagymértékben keresztreakálnak több citrullin tartalmú epitóppal és SPR bioszenzor mérések alapján meghatározott affinitásuk az auto-antitestekre jellemzően alacsony.
- Fordított korrelációt figyeltünk meg a filaggrin -19-mer peptiden mért affinitás és a DAS28 index között.
- Elsőként mutattuk ki, hogy in vivo a kollagén-indukált arthritisz remisszió fázisában MZ B-sejtekben az IL-10, a T-bet és a CXCR3 mRNS szintje emelkedett szintet mutat.
- Detektáltunk a MZ B-sejtek között in vitro BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztüli szignálokra egy T-bet és IL-10 kettősen pozitív alpopulációt.
- Bizonyítottuk, hogy a T-bet transzkripciós faktort és a célgénjét, a CXCR3 receptort expresszáló MZ B-sejtek képesek in vitro kimokinek (CXCL9) által irányított módon migrálni.
- A BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztül elő-aktivált - migrációs képességgel is rendelkező - T-bet⁺/CXCR3⁺ MZ B-sejtek „gyulladásos környezetet” modellező közegbe kerülve robosztus IL-10 termeléssel válaszolnak.
- Eredményeink alapján a T-bet transzkripciós faktornak fontos szerepe lehet a MZ B-sejtek regulátor funkciójának segítésében.

9 Összefoglalás

Összességében elmondhatjuk, vizsgálatainkkal növelni tudtuk a rheumatoid arthritisz szerológiai diagnosztizálására kidolgozott teszt hatékonyságát és kollagén indukált arthritiszben, a MZ B-sejtek IL-10 termelésének jellemzésével közelebb kerültünk a regulátor B-sejtek kialakulását és funkciójukat irányító mechanizmusok jobb megértéséhez. Továbbfejlesztettük a munkacsoportunk által korábban beállított, citrullin tartalmú epitópokat felismerő ellenanyagok (ACPA) kimutatására alkalmas ELISA tesztet további - ilyen kombinációban még nem vizsgált – citrullin tartalmú peptidek vizsgálatokba való bevonásával. A bővített, nyolc citrullin-peptidet tartalmazó ELISA teszt (filaggrin 5 és 19 mer, vimentin, kollagén, EBNA-2, α -enoláz, fibrin- β , „multi-epitóp”) 85 %-os szenzitivitás értéke a kereskedelmi forgalomban kapható, elfogadott diagnosztikai tesztek szenzitivitását kissé meghaladta, tehát növelni tudtuk a korábban kidolgozott teszt diagnosztikai hatékonyságát. Mivel az egyes betegek anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyagai eltérő epitóp kombinációkat ismernek fel, egy heterogén peptid szekvenciákból összeállított teszt segítségével pontosabbá tehető az RA szerológiai diagnosztizálása. Mindemellett bizonyítottuk, hogy az egyedek citrullinált epitópokat felismerő ellenanyagainak affinitása az auto-antitestekre jellemzően alacsony (10^{-4} - 10^{-7} M/l), eltérő epitóp-kombinációkat ismernek fel, képesek keresztreakálni, úgy véljük egy heterogén peptid szekvencia keveréket, sőt meghatározott epitópokból álló tervezett szekvenciákat tartalmazó diagnosztikai teszttel hatékonyabban lehet diagnosztizálni a különböző ACPA-profillal rendelkező beteg csoportokat.

A patomechanizmus jobb megértése céljából vizsgálatokat folytattunk a betegség állatmodelljében, kollagén-indukált arthritiszben, jellemeztük a MZ B-sejtek regulátor funkcióját. In vivo és in vitro eredményeink alapján a T-bet transzkripciós faktor egy új szerepét sikerült feltárnunk az IL-10 termelő MZ B-sejtek életében. Hipotézisünk szerint, az hogy a remisszióban megemelkedik az IL-10, a T-bet és a CXCR3 receptor expressziója, hogy in vitro BCR/TLR9/IFN γ R receptorokon keresztüli szignálokra képződnek T-bet⁺/IL-10⁺ és T-bet⁺/CXCR3⁺ MZ B-sejtek, amelyek migrációs hajlandósággal is rendelkeznek, és hogy gyulladási környezetet modellező milióben robosztus IL-10 termeléssel válaszolnak arra enged következtetni, hogy a T-bet faktor hozzájárulhat a kollagén indukált arthritisz remissziójához azáltal, hogy támogatja a MZ B-sejtek migrációját és elősegíti hatékonyabb szuppresszív funkciójukat. Hisszük, hogy ezen eredményeink hozzájárulhatnak a regulátor B-sejtek funkcióját irányító mechanizmusok jobb megértéséhez és végső soron a reumatoid arthritisz gyógyítását segítő terápiák fejlesztéséhez.

10 Summary

On the whole, it can be stated that we were able to use our examinations to increase the efficiency of the test developed for the serological diagnosis of rheumatoid arthritis; and by characterizing the IL-10 production of MZ B cells in collagen-induced arthritis, we got closer to a better understanding of mechanisms controlling B cell development and functions. We further improved the ELISA test – set up earlier by our group and suitable for identifying antibodies recognizing epitopes with citrulline content (ACPA) – by involving peptides with citrulline content not yet examined in such combination. The extended ELISA test including eight peptides with citrulline content (filaggrin 5 and 19 mer, vimentin, collagen, EBNA-2, α -enolase, fibrin- β , “multi-epitope”) slightly exceeded the sensitivity of approved, commercially available diagnostic tests by its 85% sensitivity value, so we managed to increase the diagnostic efficiency of the test. As the anti-citrullinated protein/peptide antibodies of each patient recognize different epitope combinations, the immunological diagnostics of RA can be made more accurate by using a test compiled from heterogeneous peptide sequences. In addition, we proved that the affinity of individual’s antibodies recognizing citrullinated epitopes is low (10^{-4} - 10^{-7} M/l), they recognize different epitope combinations, they are capable of cross-reaction, and they can recognize more than one epitope; therefore, we believe that patient groups with different ACPA profiles can be diagnosed more effectively by a diagnostic test containing a mix of heterogeneous peptide sequences, even designed sequences consisting of specific epitopes. In order to better understand the mechanism of rheumatoid arthritis, we conducted investigations in the animal model of the disease – collagen-induced arthritis, and characterized the IL-10 production capability of MZ B cells. Based on our in vivo and in vitro results, we managed to reveal a new role of the T-bet transcription factor in the case of IL-10 producing MZ B cells. According to our hypothesis, the fact that the expression of IL-10, T-bet and the CXCR3 receptor increases in remission; that in vitro “inflammation” signals trigger the production of T-bet⁺/IL-10⁺ and T-bet⁺/CXCR3⁺ MZ B cells with a migration tendency; and that they respond to a milieu modelling an inflamed environment by robust IL-10 production, leads us to conclude that the T-bet transcription factor can contribute to the remission of collagen-induced arthritis by supporting the migration of MZ B cells and promoting their more efficient suppressive function. We believe that these results of ours can contribute to a better understanding of the mechanisms controlling the function of regulatory B cells, and finally, to the improvement of therapies to help cure rheumatoid arthritis.

11 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Sármay Gabriellának és Dr. Kövesdi Dorottyának hogy tanácsaikkal, bátorításukkal mindig támogattak a munkámban. Köszönöm, hogy bármikor számíthattam rájuk és hogy segítséget nyújtottak a kísérletek megtervezésében, kivitelezésében és az eredmények prezentálásában.

Köszönöm Prof. Dr. Erdei Annának, az ELTE Immunológia Tanszék vezetőjének, hogy a tanszéken végezhettem a kísérleteket, és Dr. Kacs Kovics Imrének, aki a későbbiekben átvette a tanszék vezetését.

Köszönöm Szarka Eszternek, aki bevezetett a kutató munkába, és hogy bármikor fordulhattam hozzá segítségért, tanácsért.

Köszönöm a B-sejt és Autoimmunitás/Jelátvitel labor valamennyi tagjának, Szarka Eszternek, Pozsgay Juditnak, Bankó Zsuzsannának, Szili Dánielnek, Barátki Baláznak és Aradi Petrának az alapvető jó hangulatot és hogy bármikor számíthattam rájuk. És ezúton szeretném megköszönni Aradi Petrának a munkában nyújtott nagyfokú segítségét.

Köszönettel tartozom a tanszék valamennyi dolgozójának, köztük Pásztor Mártának és Gősi Sándornénak a mindennapi teendőkben nyújtott segítségéért. És szeretném megköszönni Mikesey Árpádnak az állatokkal való munkában nyújtott technikai segítségét.

Köszönöm Dr. Nagy Györgynek, Dr. Rojkovich Bernadettnek és Dr. Gáti Tamásnak és a Budai Irgalmasrendi Kórház munkatársainak a beteg vérminták és a betegadatok biztosítását.

Köszönettel tartozom Dr. Magyar Annának és az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársainak a peptidek szintéziséért.

Nem utolsó sorban hálámat fejezem ki a barátomnak, a barátaimnak és a családomnak, hogy mindig támogattak és mellettem álltak doktori munkám során.

A doktori munkám alapjául szolgáló kísérleteket Prof. Dr. Sármay Gabriella által elnyert Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) 104846 számú pályázata támogatta. Köszönöm továbbá az Eötvös Loránd Tudományegyetemnek az ELTE pre-doktori ösztöndíj odaítélésével nyújtott támogatását.

12 Saját közlemények jegyzéke

12.1 Közlemények az értekezés témájával kapcsolatban

Huber K, Sarmay G, Kovesdi D

MZ B cells migrate in a T-bet dependent manner and might contribute to the remission of collagen-induced arthritis by the secretion of IL-10; **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 46:(9) pp. 2239-2246. (2016)

IF: 4.227

Kovesdi D, Angyal A, Huber K, Szili D, Sarmay G

T-bet is a new synergistic meeting point for the BCR and TLR9 signaling cascades; **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 44:(3) pp. 887-893. (2014)

IF: 4.034

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: 3.705

12.2 Egyéb közlemények

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

Synthetic Peptide-Based ELISA and ELISpot Assay for Identifying Autoantibody Epitopes; Peptide Microarrays: Methods and Protocols . Berlin; Heidelberg; New York: **Springer**, 2016. pp. 223-233. (ISBN:978-1-4939-3036-4)

Ayoglu B , Szarka E , Huber K, Orosz A , Babos F , Magyar A , Hudecz F , Rojkovich B , Gáti T , Nagy G , Schwenk JM , Sármay G , Prechl J , Nilsson P , Papp K

Bead arrays for antibody and complement profiling reveal joint contribution of antibody isotypes to C3 deposition; **PLOS ONE** 9:(5) Paper e96403. (2014)

IF: 3.234

12.3 Konferencia közlemények, absztraktok

K Huber, G Sarmay , D Kovesdi

Differences of the BCR and TLR9-induced IL-10 production in mouse splenic B cell populations; **ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES** 74: pp. A2-A3. (2015)

K Huber, G Sarmay , D Kovesdi

Population specific IL-10 production of mouse B cells induced by the BCR, TLR9 and CD40; **Abstracts of the 4th European Congress of Immunology** - ECI 2015 - Track A: Adaptive Immunity

Papp K , Ayoglu B , Szarka E , Huber K, Orosz A , Magyar A , Hudecz F , Nagy G , Schwenk J , Sarmay G , Prechl J , Nilsson P

Multiplex measurement of autoantibody levels and complement activation in rheumatoid arthritis; **MOLECULAR IMMUNOLOGY** 67:(1) p. 170. (2015)

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

Detection of ACPA producing B cells by a citrullin-peptide panel; **ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES** 72:(1) p. A34. (2013)

E Szarka, K Huber, J Pozsgay, F Babos, Zs Baka, A Magyar, F Hudecz, G Nagy, G Sármay

New, citrullin containing filaggrin peptide that could be adapted for diagnosis of RA and for characterization of RA B-cells; **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 41: p. 59. (2011)

13 Irodalomjegyzék

1. Scott, D.L., F. Wolfe, and T.W. Huizinga, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2010. **376**(9746): p. 1094-108.
2. Klareskog, L., A.I. Catrina, and S. Paget, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2009. **373**(9664): p. 659-72.
3. Bocian, K., et al., *Expanding Diversity and Common Goal of Regulatory T and B Cells. I: Origin, Phenotype, Mechanisms*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017.
4. Burkhardt, H. and J.R. Kalden, *Animal models of autoimmune diseases*. Rheumatol Int, 1997. **17**(3): p. 91-9.
5. Brand, D.D., K.A. Latham, and E.F. Rosloniec, *Collagen-induced arthritis*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1269-75.
6. Szarka, E., et al., *Recognition of new citrulline-containing peptide epitopes by autoantibodies produced in vivo and in vitro by B cells of rheumatoid arthritis patients*. Immunology, 2014. **141**(2): p. 181-91.
7. Smolen, J.S., D. Aletaha, and I.B. McInnes, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2016. **388**(10055): p. 2023-2038.
8. Stolt, P., et al., *Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 835-41.
9. Maya, R., M.E. Gershwin, and Y. Shoenfeld, *Hepatitis B virus (HBV) and autoimmune disease*. Clin Rev Allergy Immunol, 2008. **34**(1): p. 85-102.
10. Yazbek, M.A., et al., *Association analysis of anti-Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, the shared epitope and smoking status in Brazilian patients with rheumatoid arthritis*. Clinics (Sao Paulo), 2011. **66**(8): p. 1401-6.
11. Klareskog, L., et al., *Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 651-75.
12. Strand, V., R. Kimberly, and J.D. Isaacs, *Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(1): p. 75-92.
13. Mangat, P., et al., *Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis?* Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. 209.
14. Gyorgy, B., et al., *Citrullination: a posttranslational modification in health and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1662-77.
15. Suzuki, A., R. Yamada, and K. Yamamoto, *Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1108**: p. 323-39.
16. Kumar, L.D., et al., *Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis*. Biomed Pharmacother, 2016. **79**: p. 52-61.
17. Szekanecz, Z., et al., *Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets?* Clin Rev Allergy Immunol, 2008. **34**(1): p. 26-31.
18. Baka, Z., et al., *Citrullination under physiological and pathological conditions*. Joint Bone Spine, 2012. **79**(5): p. 431-6.
19. Vossenaar, E.R., et al., *Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(4): p. 373-81.
20. Koning, F., et al., *Coeliac disease and rheumatoid arthritis: similar mechanisms, different antigens*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(8): p. 450-61.

21. Dekkers, J., et al., *The role of anticitrullinated protein antibodies in the early stages of rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2016. **28**(3): p. 275-81.
22. Klareskog, L., et al., *Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Semin Immunol*, 2011. **23**(2): p. 92-8.
23. Kerkman, P.F., et al., *Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2016. **75**(6): p. 1170-6.
24. Dolati, S., et al., *Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment*. *Biomed Pharmacother*, 2016. **80**: p. 30-41.
25. Harre, U., et al., *Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(5): p. 1791-802.
26. Szekanecz, Z., et al., *Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2010. **22**(3): p. 299-306.
27. Pham, C.T., *Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2011. **3**(6): p. 607-19.
28. Feitsma, A.L., et al., *Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(1): p. 117-25.
29. Kallberg, H., et al., *Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis*. *Am J Hum Genet*, 2007. **80**(5): p. 867-75.
30. Baka, Z., E. Buzas, and G. Nagy, *Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(4): p. 238.
31. Colebatch, A.N. and C.J. Edwards, *The influence of early life factors on the risk of developing rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Immunol*, 2011. **163**(1): p. 11-6.
32. Pratesi, F., et al., *Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders*. *J Rheumatol*, 2000. **27**(1): p. 109-15.
33. Cornillet, M., et al., *In ACPA-positive RA patients, antibodies to EBNA35-58Cit, a citrullinated peptide from the Epstein-Barr nuclear antigen-1, strongly cross-react with the peptide beta60-74Cit which bears the immunodominant epitope of citrullinated fibrin*. *Immunol Res*, 2015. **61**(1-2): p. 117-25.
34. van Gaalen, F., et al., *The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis*. *J Immunol*, 2005. **175**(9): p. 5575-80.
35. Schellekens, G.A., et al., *The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(1): p. 155-63.
36. Conrad, K., et al., *Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies*. *Autoimmun Rev*, 2010. **9**(6): p. 431-5.
37. Sghiri, R., et al., *Value of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis*. *Rheumatol Int*, 2008. **29**(1): p. 59-62.
38. Masson-Bessiere, C., et al., *The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin*. *J Immunol*, 2001. **166**(6): p. 4177-84.
39. Ronnelid, J., et al., *Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response*. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(7): p. 1023-9.
40. Ioan-Facsinay, A., et al., *Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(10): p. 3000-8.

41. Trier, N.H., et al., *Contribution of Peptide Backbone to Anti-Citrullinated Peptide Antibody Reactivity*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144707.
42. Wekerle, H., et al., *Autoimmunity's next top models*. Nat Med, 2012. **18**(1): p. 66-70.
43. Morel, L., *Mouse models of human autoimmune diseases: essential tools that require the proper controls*. PLoS Biol, 2004. **2**(8): p. E241.
44. Brand, D.D., A.H. Kang, and E.F. Rosloniec, *Immunopathogenesis of collagen arthritis*. Springer Semin Immunopathol, 2003. **25**(1): p. 3-18.
45. Caplazi, P., et al., *Mouse Models of Rheumatoid Arthritis*. Vet Pathol, 2015. **52**(5): p. 819-26.
46. Schurgers, E., A. Billiau, and P. Matthys, *Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(12): p. 917-26.
47. Sarkar, S., et al., *Interleukin (IL)-17A, F and AF in inflammation: a study in collagen-induced arthritis and rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 2014. **177**(3): p. 652-61.
48. Park, M.J., et al., *IL-17-deficient allogeneic bone marrow transplantation prevents the induction of collagen-induced arthritis in DBA/1J mice*. Exp Mol Med, 2012. **44**(11): p. 694-705.
49. Nandakumar, K.S. and R. Holmdahl, *Collagen antibody induced arthritis*. Methods Mol Med, 2007. **136**: p. 215-23.
50. Nandakumar, K.S., L. Svensson, and R. Holmdahl, *Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 1827-37.
51. Nandakumar, K.S., et al., *Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(6): p. R544-50.
52. DiLillo, D.J., T. Matsushita, and T.F. Tedder, *B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 38-57.
53. Linton, P.J., J. Harbertson, and L.M. Bradley, *A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5558-65.
54. Harris, D.P., et al., *Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6781-90.
55. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune regulatory function of B cells*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 221-41.
56. Matthias, P. and A.G. Rolink, *Transcriptional networks in developing and mature B cells*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 497-508.
57. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 767-77.
58. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
59. Katz, S.I., D. Parker, and J.L. Turk, *B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions*. Nature, 1974. **251**(5475): p. 550-1.
60. Neta, R. and S.B. Salvin, *Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity*. J Immunol, 1974. **113**(6): p. 1716-25.
61. Wolf, S.D., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2271-8.

62. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
63. Mizoguchi, A., et al., *Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 219-30.
64. Mauri, C., et al., *Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 489-501.
65. Calame, K.L., *Plasma cells: finding new light at the end of B cell development*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1103-8.
66. Mauri, C. and M. Menon, *The expanding family of regulatory B cells*. Int Immunol, 2015. **27**(10): p. 479-86.
67. Evans, J.G., et al., *Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7868-78.
68. Amu, S., et al., *Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(5): p. 1114-1124.e8.
69. Sayi, A., et al., *TLR-2-activated B cells suppress Helicobacter-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 878-90.
70. Bankoti, R., et al., *Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3961-71.
71. Zhang, X., *Regulatory functions of innate-like B cells*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(2): p. 113-21.
72. Martin, F. and J.F. Kearney, *B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 70-9.
73. Gray, M., et al., *Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14080-5.
74. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 639-50.
75. Yanaba, K., et al., *The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7459-72.
76. Matsumoto, M., et al., *Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation*. Immunity, 2014. **41**(6): p. 1040-51.
77. Maseda, D., et al., *Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1036-48.
78. Shen, P., et al., *IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 366-370.
79. Duan, B. and L. Morel, *Role of B-1a cells in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(6): p. 403-8.
80. Margry, B., et al., *Activated peritoneal cavity B-1a cells possess regulatory B cell properties*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88869.
81. Lundy, S.K. and D.A. Fox, *Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5+ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(4): p. R128.
82. Flores-Borja, F., et al., *CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation*. Sci Transl Med, 2013. **5**(173): p. 173ra23.

83. Blair, P.A., et al., *CD19(+)**CD24(hi)**CD38(hi)* B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 129-40.
84. Banko, Z., J. Pozsgay, and D. Szili, *Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients*. 2017. **198**(4): p. 1512-1520.
85. Mizoguchi, A. and A.K. Bhan, *A case for regulatory B cells*. *J Immunol*, 2006. **176**(2): p. 705-10.
86. Rosser, E.C., et al., *Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production*. *Nat Med*, 2014. **20**(11): p. 1334-9.
87. Wang, R.X., et al., *Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease*. *Nat Med*, 2014. **20**(6): p. 633-41.
88. Lampropoulou, V., et al., *TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity*. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4763-73.
89. Matsushita, T., et al., *Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis*. *J Immunol*, 2010. **185**(4): p. 2240-52.
90. Wong, S.C., et al., *Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(8): p. 2296-307.
91. Tian, J., et al., *Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. *J Immunol*, 2001. **167**(2): p. 1081-9.
92. Ronet, C., et al., *Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with Leishmania major through IL-10 production*. *J Immunol*, 2010. **184**(2): p. 886-94.
93. Sharpe, A.H., et al., *The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(3): p. 239-45.
94. Lee, K.M., et al., *TGF-beta-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(6): p. 1728-36.
95. Mann, M.K., et al., *B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2007. **178**(6): p. 3447-56.
96. Mebius, R.E. and G. Kraal, *Structure and function of the spleen*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(8): p. 606-16.
97. Morse, H.C., 3rd, et al., *Cells of the marginal zone--origins, function and neoplasia*. *Leuk Res*, 2001. **25**(2): p. 169-78.
98. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, *Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(2): p. 118-32.
99. Martin, F. and J.F. Kearney, *Marginal-zone B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(5): p. 323-35.
100. Arnon, T.I., et al., *Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress*. *Nature*, 2013. **493**(7434): p. 684-8.
101. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, *Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens*. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 617-29.
102. Carnrot, C., et al., *Marginal zone B cells are naturally reactive to collagen type II and are involved in the initiation of the immune response in collagen-induced arthritis*. *Cell Mol Immunol*, 2011. **8**(4): p. 296-304.
103. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. *Cell*, 2000. **100**(6): p. 655-69.

104. Lazarevic, V., L.H. Glimcher, and G.M. Lord, *T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(11): p. 777-89.
105. Peng, S.L., *The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(2): p. 87-95.
106. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
107. Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell, *Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1499-505.
108. Chen, C.H., et al., *Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1689-99.
109. Oestreich, K.J. and A.S. Weinmann, *T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription*. Trends Immunol, 2012. **33**(2): p. 78-83.
110. O'Connor, R.A., et al., *T-bet is essential for Th1-mediated, but not Th17-mediated, CNS autoimmune disease*. Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2818-23.
111. Koch, M.A., et al., *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 595-602.
112. McPherson, R.C., et al., *T-bet Expression by Foxp3(+) T Regulatory Cells is Not Essential for Their Suppressive Function in CNS Autoimmune Disease or Colitis*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 69.
113. Jankovic, D., et al., *Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 273-83.
114. Hoerning, A., et al., *Subsets of human CD4(+) regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3*. Eur J Immunol, 2011. **41**(8): p. 2291-302.
115. Tan, T.G., D. Mathis, and C. Benoist, *Singular role for T-BET+CXCR3+ regulatory T cells in protection from autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(49): p. 14103-14108.
116. Kornete, M., et al., *Th1-Like ICOS+ Foxp3+ Treg Cells Preferentially Express CXCR3 and Home to beta-Islets during Pre-Diabetes in BDC2.5 NOD Mice*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126311.
117. Liu, N., et al., *CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 687-93.
118. Beima, K.M., et al., *T-bet binding to newly identified target gene promoters is cell type-independent but results in variable context-dependent functional effects*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11992-2000.
119. Peng, S.L., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher, *T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5545-50.
120. Xu, W. and J.J. Zhang, *Stat1-dependent synergistic activation of T-bet for IgG2a production during early stage of B cell activation*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7419-24.
121. Wang, N.S., et al., *Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and RORalpha*. Nat Immunol, 2012. **13**(6): p. 604-11.
122. Kovesdi, D., et al., *T-bet is a new synergistic meeting point for the BCR and TLR9 signaling cascades*. Eur J Immunol, 2014. **44**(3): p. 887-93.

123. Serre, K., et al., *CD8 T cells induce T-bet-dependent migration toward CXCR3 ligands by differentiated B cells produced during responses to alum-protein vaccines*. *Blood*, 2012. **120**(23): p. 4552-9.
124. Pratesi, F., et al., *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*, 2011. **164**(3): p. 337-45.
125. Lundberg, K., et al., *Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(10): p. 3009-19.
126. Sebbag, M., et al., *Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(8): p. 2250-63.
127. Cooper, M.A., *Optical biosensors in drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(7): p. 515-28.
128. Drescher, D.G., N.A. Ramakrishnan, and M.J. Drescher, *Surface plasmon resonance (SPR) analysis of binding interactions of proteins in inner-ear sensory epithelia*. *Methods Mol Biol*, 2009. **493**: p. 323-43.
129. Zhang, M., et al., *Expression and function of TNF family member B cell-activating factor in the development of autoimmune arthritis*. *Int Immunol*, 2005. **17**(8): p. 1081-92.
130. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
131. Mattei, R.A., E.M. Dalmarco, and T.S. Frode, *Etanercept administration prevents the inflammatory response induced by carrageenan in the murine air pouch model*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015. **388**(12): p. 1247-57.
132. Romano, M., et al., *Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor*. *Mediators Inflamm*, 1997. **6**(1): p. 32-8.
133. Moratz, C. and J.H. Kehrl, *In vitro and in vivo assays of B-lymphocyte migration*. *Methods Mol Biol*, 2004. **271**: p. 161-71.
134. van de Stadt, L.A., et al., *Monoclonal anti-citrullinated protein antibodies selected on citrullinated fibrinogen have distinct targets with different cross-reactivity patterns*. *Rheumatology (Oxford)*, 2013. **52**(4): p. 631-5.
135. Suwannalai, P., et al., *Low-avidity anticitrullinated protein antibodies (ACPA) are associated with a higher rate of joint destruction in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(1): p. 270-6.
136. Bang, H., et al., *Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(8): p. 2503-11.
137. Schellekens, G.A., et al., *Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(1): p. 273-81.
138. Peng, S.L., et al., *The role of T-bet in B cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(11): p. 1041; author reply 1041.
139. Lenert, P., et al., *TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production*. *J Clin Immunol*, 2005. **25**(1): p. 29-40.
140. Muhl, H. and J. Pfeilschifter, *Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma*. *Int Immunopharmacol*, 2003. **3**(9): p. 1247-55.
141. Nicoletti, F., et al., *The effects of a nonimmunogenic form of murine soluble interferon-gamma receptor on the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse*. *Endocrinology*, 1996. **137**(12): p. 5567-75.

142. Zhang, G.X., et al., *Mice with IFN-gamma receptor deficiency are less susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3775-81.
143. Schwarting, A., et al., *IFN-gamma receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Fas(lpr) mice*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 494-503.
144. Groom, J.R. and A.D. Luster, *CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 207-15.
145. Suwannalai, P., et al., *Anti-citrullinated protein antibodies have a low avidity compared with antibodies against recall antigens*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(2): p. 373-9.
146. van Riel, P.L. and L. Renskers, *The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2016. **34**(5 Suppl 101): p. S40-s44.
147. Ray, A. and B.N. Dittel, *Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10*. J Clin Med, 2017. **6**(1).
148. Gray, D. and M. Gray, *What are regulatory B cells?* Eur J Immunol, 2010. **40**(10): p. 2677-9.
149. Baumgarth, N., *The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(1): p. 34-46.
150. Dalwadi, H., et al., *B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1707-15.
151. Jones, D., et al., *The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2000. **95**(2): p. 627-32.
152. O'Boyle, G., et al., *Chemokine receptor CXCR3 agonist prevents human T-cell migration in a humanized model of arthritic inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(12): p. 4598-603.
153. Proost, P., et al., *Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon-gamma in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in septic arthritis synovial fluids*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(5): p. 777-84.

ADATLAP
a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Huber Krisztina

MTMT-azonosító: 10050482

A doktori értekezés címe és alcíme: „Az immunreguláció szintjei Rheumatoid Arthritisben és annak egér modelljében, kollagén-indukált arthritisben”

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2017.171

A doktori iskola neve: ELTE-TTK Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Immunológia Program

A témavezetők neve és tudományos fokozata:

1. Prof. Dr. Sármy Gabriella, egyetemi tanár
2. Dr. Kövesdi Dorottya, tudományos főmunkatárs

A témavezetők munkahelye:

1. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Immunológia Tanszék
2. Magyar Tudományos Akadémia, Támogatott Kutatócsoportok Irodája

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, 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: Budapest, 2017. november 22.



a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet