

PhD Tézisek

Fiziológiás és pathológiás autoimmun modellek összehasonlító vizsgálata

Olasz Katalin

PTE-KK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

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

Programvezető: Prof. Dr. Németh Péter egyetemi tanár

Pécs

2012

ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

BEVEZETÉS

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

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

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

Mivel a konzervált antigének immunológiai felismerése - a *természetes*

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

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

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

CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

Mitokondriális enzim-specifikus antitestek epitóptérképezése

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

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

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

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

3. In silico predikció

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

4. Szintetikus átfedő dekapeptidekkel végzett soktűs ELISA vizsgálatok

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

5. Szérumok affinitás tisztítása emlős CS-on

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

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

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

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

7. A CS antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója

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

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

8. Humán CS-on affinitás tisztított szérumok keresztreaktivitásának vizsgálata

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

rhG1-INDUKÁLT ARTHRITIS MODELL

1. Kísérleti állatok

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

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

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

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

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

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

4. Áramlási citometriás mérések

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

5. Sejtek szeparálása, tenyésztése és in vitro stimulálása

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

6. Szaturációs kötési teszt

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

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

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

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

8. Apoptózis detektálása annexinV/7-AAD kettős festéssel

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

9. TCR-hoz kapcsolódó jelátviteli molekulák foszforilációjának mérése

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

10. Statisztikai analízis

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

EREDMÉNYEK

Mitokondriális enzim-specifikus antitestek epitóptérképezése

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

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

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

A szívtranszplantált betegek szérumában magasabb titerben található IgG

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

2. Humán CS specifikus antitestek epitóptérképezése szintetikus átfedő peptidrendszerrel

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

3. Bakteriális CS specifikus antitestek epitóptérképezése szintetikus átfedő decapeptidekkel

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

4. CS reaktív szérumok affinitás tisztítása

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

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

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

6. Affinitás tisztított CS reaktív szérumok keresztreaktivitásának vizsgálata

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

A rhG1-indukált arthritis modell

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MEGBESZÉLÉS

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

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

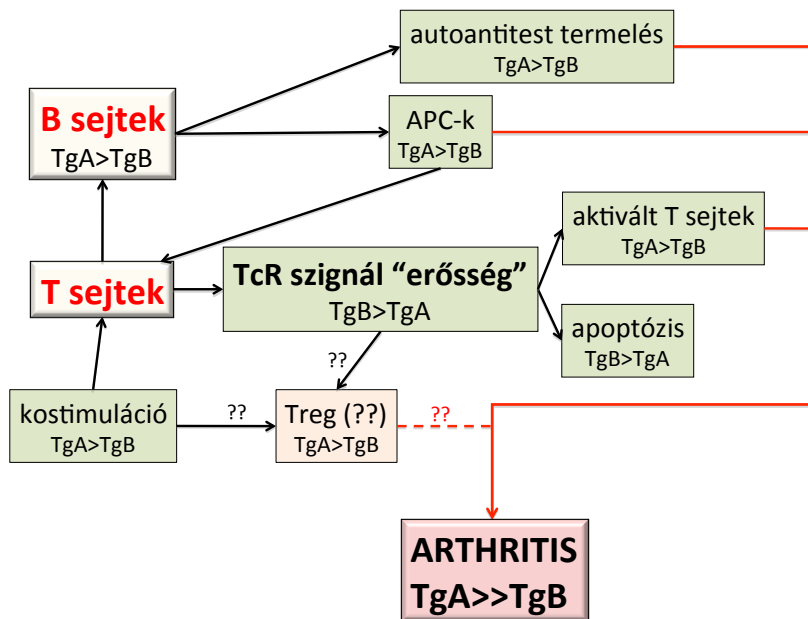
immunszerológiai tesztrendszert is alkalmaztunk. Eredményeink szerint - miközben nincs a hCS molekulának kizárólag az egészséges egyének vagy az autoimmun betegek által felismert kitüntetett része - az epitópok finom mintázata eltérő a vizsgált csoportokban. Megvizsgáltuk a keresztreaktív epitópokat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

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

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

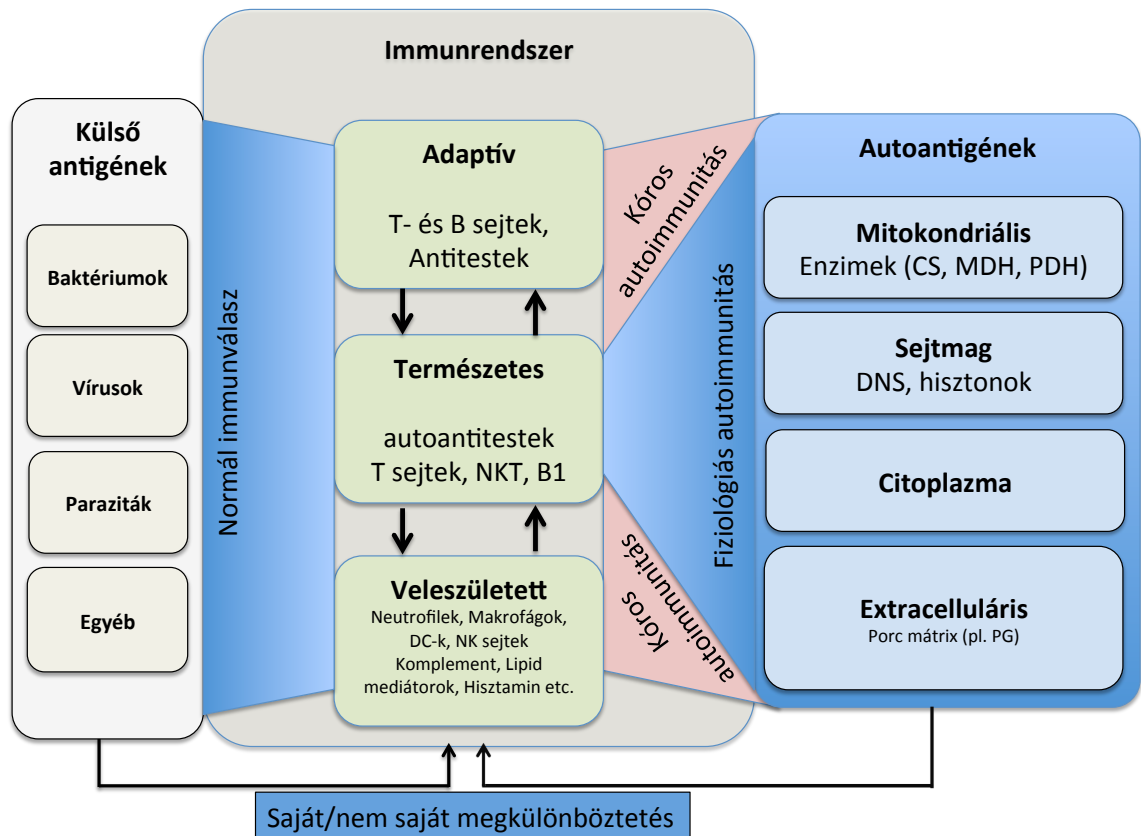
TCR-TgB egerek T sejtjei nem aktiválódtak olyan mértékben, mint a TCR-TgA egerek T sejtjei, ezért a betegség is később, és csak enyhébb formában fejlődött ki. A különbség a két törzs között a kostimulációs molekulák szintjén is jelentkezett, ugyanis a TCR-

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



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

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



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

A LEGFONTOSABB SAJÁT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

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

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

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

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

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

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

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Összesített impakt faktor: 52.069

A Tézisek alapját képező cikkek [IF: 21.708]:

1. **Olasz, Katalin**; Boldizsar, Ferenc; Kis-Toth, Katalin; Tarjanyi, Oktavia; Hegyi, Akos; van Eden, Willem; Rauch, Tibor; Mikecz, Katalin; Glant, Tibor: *T cell receptor (TCR) Signal Strength Controls Arthritis Severity in Proteoglycan-Specific TCR Transgenic Mice*. Clin. Exp. Immunol. 67(2): 346-55., 2012.
IF: 3.134*
2. Glant TT, Radacs M, Nagyeri G, **Olasz K**, Laszlo A, Boldizsar F, Hegyi A, Finnegan A, Mikecz K.: *Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 63(5): 1312-21., 2011.
IF: 8.435*
3. Czömpöly T, **Olasz K**, Nyárády Z, Simon D, Bovári J, Németh P.: *Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies*. Autoimmun Rev. 7(6):463-7., 2008.
IF: 5.371
4. Czömpöly T, **Olasz K**, Simon D, Nyárády Z, Pálinkás L, Czirják L, Berki T, Németh P.: *A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network?* Mol Immunol. 43(11):1761-8., 2006.
IF: 4.768

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

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

9. Angyal A, Egelston C, Kobezda T, **Olasz K**, László A, Glant TT, Mikecz K.: *Development of proteoglycan-induced arthritis depends on T cell-supported autoantibody production, but does not involve significant influx of T cells into the joints.*

Arthritis Res Ther. 12(2): R44., 2010.

IF: 4.357

10. Bovári J, Czömpöly T, **Olasz K**, Arnold HH, Balogh P.: *Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency.*

Pathol Oncol Res. 2007;13(3):227-35.

IF: 1.272

*Utolsó elérhető (2010.) impakt faktor adat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

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

PhD thesis

**Comparative study of physiological and pathological
autoimmune models**

Katalin Olasz

Department of Immunology and Biotechnology

University of Pécs, Faculty of Medicine

Project leader: Dr. Ferenc Boldizsár, Prof. Dr. Péter Németh

PhD program leader: Prof. Dr. Péter Németh

Pécs

2012

SUMMARY

The aim of our work was the comparison of physiological and pathological autoimmunity by using two different experimental systems: i) detailed analysis of human serum samples searching for natural autoantibodies (nAAb), ii) investigation of possible pathological mechanisms of autoimmunity in a mouse model of rheumatoid arthritis.

We used citrate-synthase (genetically conserved inner membrane enzyme of the mitochondria) as a model antigen for epitope mapping of natural autoantibodies (nAAb). With two different technologies (overlapping decapeptide system and phage-display) we successfully demonstrated the presence of CS reactive nAABs in the serum samples taken from three populations 1.) healthy individuals, 2.) autoimmune patients and 3.) patients who underwent heart transplanted procedures. These nAABs were present in elevated concentration in autoimmune patients, and belonged to the IgM isotype, while in the serum samples of heart transplanted patients the antibodies against CS belonged to the IgG isotype. Our results show that while there is no favored region of the CS molecule recognized exclusively either by healthy individuals, autoimmune or heart transplanted patients, the fine epitope pattern is different in the groups examined. We analyzed cross-reactive epitopes on human, bacterial CS and other mitochondrial enzymes. We have found three cross-reactive epitopes between human and bacterial CS, but there was no cross reactivity with other inner membrane enzymes (malate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase).

The anti-CS nAABs by participating in the nAAB network, could function in innate defense mechanisms and at the same time recognize a target antigen in a systemic autoimmune disease. Thus, at the level of recognized epitopes there is a possible new link between the innate like component and the adaptive-autoimmune arm of the humoral immune system. nAABs that are present in the serum of both healthy humans and patients suffering from systemic autoimmune diseases recognize a set of evolutionarily conserved self-structures. Because of their endosymbiotic evolutionary origin, proteins compartmentalized into mitochondria represent an interesting transition from prokaryotic foreign (non-self) to essential (self) molecules.

The investigation of pathological autoimmunity was performed in the experimental mouse model of the rheumatoid arthritis (rhG1-induced-arthritis (GIA)) by using two T cell transgenic mouse strain wherein the 90% of CD4⁺ T cells recognize the arthritogen epitope of cartilage proteoglycan-aggrecan. Thus we were able to examine the role of T cell signaling in the pathomechanism of arthritis in GIA.

We demonstrated that cell signaling through the TCR plays critical role in the induction of arthritis by the influence of balance between T cell activation and apoptosis. The „optimal” strength of T cell signaling leads to clonal expansion of autoreactive T cells and deterioration of the clinical phenotype. On the contrary, the „supraoptimal” cell signal causes the activation induced cell death of T cells, and a milder form of arthritis develops.

In conclusion, nAAB network as a key component of physiological autoimmunity plays an important role in the maintenance of the active tolerance. Any dysfunction in the cell function affecting the deletion or expansion of autoreactive lymphocytes leads to pathological autoimmunity. The defective regulation of the network formed by the three levels of the immune system (innate, natural and adaptive) results in pathological autoimmunity.

INTRODUCTION

A key feature of the immune system is the ability to distinguish the normal self from the foreign/non-self or modified-self antigens. While against external antigens the immune system step up with targeting immune reactions, till then self antigens are strictly tolerated. In the development of tolerance two mechanisms play important role: i) *central tolerance* ensures that no potential autoreactive lymphocytes can leave the primary lymphoid organs ii) *peripheral tolerance* controls the possible autoimmune reactions on the periphery.

In the past few decades in several studies low affinity antibodies (of IgM isotype) against genetically conserved self antigens were successfully demonstrated in the serum of both healthy and patients with systemic autoimmune diseases. These observations supported the concept of the *immunological homunculus* (Cohen), which presumes the exist of a network formed by low affinity autoantibodies (mainly IgM) and γ/δ T cells. This network reacts with genetically conserved autoantigens, and provides the defense of these self antigens from the targeting reactions of the immune system. CD5⁺ B cells play crucial role in the development and maintenance of this network by the production of low affinity „natural autoantibodies” (nAAb) mostly of IgM isotype. Several functions have been suggested for nAAb: they may participate in the selection of immune repertoires, play a role in the acceleration of primary immune responses, aid the clearance of apoptotic cells, possess anti-inflammatory effects and contribute to the maintenance of immune homeostasis. These subsets of cells exhibit common phenotypic characteristics and possess both innate and adaptive features, suggesting a transitional stage in the immune system’s evolution.

On the basis of these findings „*physiological autoimmunity*” is a substantive and inseparable part of the biological phenomenon called „*immunological steady-state*” (Radbruch). From this aspect we can say, when the „*immunological steady-state*” splits in patients with autoimmune diseases, „*pathological autoimmunity*” appears and causes serious destruction of self tissues and cells by the production of autoaggressive T cells and/or antibodies. In general we can say that in the development of an autoimmune disease we should assume a change in the dynamics/homeostasis of the whole network of the immune system, rather than blaming a single factor for the appearance of the abnormal phenomena. The split of the balance after a dysfunction in the immune regulation (such as infection) can stabilize the immune homeostasis in a new equilibrium position. Since when we can speak about autoimmune disease, is determined by the fact how dominant is the autoreactive tissue destruction in that new balanced position. New environmental effects (such as another infection) can disturb this balance and result in the further changes of the *immunological steady-state* and the progression of the disease.

Since the immunological recognition of conserved antigens –by the network of nAAb- play a crucial role in both pathological and physiological autoimmunity, in the first part of our work we performed detailed epitope mapping of mitochondrial inner membrane enzyme (citrate-synthase, malate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase) specific autoantibodies by using a synthetic overlapping peptide system and phage-display technology. We successfully demonstrated CS-specific nAAb in the serum samples of healthy individuals, autoimmune and heart transplanted patients. We examined the possible homologies between the epitopes recognised by nAAb on human and bacterial CS, and the changes of physiological autoimmunity under pathological and autoimmune conditions.

Approximately 5% to 7% of the European and North American population is affected by autoimmune diseases. There are several experimental animal models for

the better understanding of the pathomechanisms of these autoimmune diseases. In the second part of our work we performed researches in the animal model of rheumatoid arthritis (RA) (proteoglycan/rhG1-induced arthritis in BLAB/c mice). PGIA and GIA have all the important characteristics, and clinical parameters of human RA.

RA, a systemic autoimmune disease affecting 1% of the human population, progresses from severe inflammation to deformities and loss of function of peripheral joints. Several animal models have been developed to mimic one or more characteristics of this human disease. Cartilage proteoglycan (PG)-induced arthritis (PGIA) in BALB/c mice is a T cell-dependent and B cell/antibody-mediated autoimmune disease. Several lines of evidence indicate the role of T cell involvement in the pathogenesis of PGIA.

The cartilage PG (aggrecan) molecule consists of a large core protein (>200 kDa) to which hundreds of glycosaminoglycan side chains are attached. The G1 globular domain of cartilage PG contains several dominant/ arthritogenic epitopes, whereas a few cryptic or subdominant epitopes are located in the other regions of the PG molecule. In a recent study, we replaced the fulllength PG molecule (the PGIA model) with a recombinant human G1 (rhG1) domain to immunize BALB/c mice, resulting in G1 domain-induced arthritis (the GIA model). The clinical phenotype, histopathological abnormalities and laboratory test results in the GIA model were very similar to those described in 'parental' PGIA. Because the dominant and possibly most arthritogenic '5/4E8' T cell epitope (⁷⁰ATEGRVVRVNSAYQDK⁸⁴; the core sequence is underlined) is located in the G1 domain, we generated T cell receptor (TCR) transgenic (TCR-Tg) mice, in which more than 90% of the CD4⁺ T cells expressed the V α 1.1 and V β 4 chains recognizing the 5/4E8 epitope within the G1 domain of human PG. The first 5/4E8 epitope (PG)-specific TCR-Tg line (henceforth TCR-TgA) had been used for a number of immunological studies and adoptive transfer experiments, whereas the second transgenic line (henceforth TCR-TgB) had not yet been characterized. As both TgA and TgB strains express the same epitope (5/4E8)-specific TCR, we expected that these mice would develop arthritis similarly upon rhG1 immunization. Contrary to this, TCR-TgB mice exhibited delayed onset and less severe arthritis than TCR-TgA mice in response to either PG or rhG1 immunization, and they failed to develop spontaneous arthritis at an advanced age, whereas it is a characteristic phenotype of TCR-TgA mice. In the present study, we investigated the possible underlying mechanisms of these profound differences. Contrary to the clinical phenotype the CD4⁺ T cells of TCR-TgB mice expressed twice as much TCR on their surface when compared to the TCR-TgA line. Our results confirm that the TCR signal in TCR-TgB mice was significantly stronger than in TCR-TgA mice, which led to extensive activation-induced cell death (AICD) of CD4⁺ T cells attenuating the arthritic phenotype. We conclude that TCR signal strength controls the onset and severity of arthritis by regulating AICD of T cells.

OUR AIMS

Epitope mapping of mitochondrial inner membrane enzyme-specific autoantibodies- the role of natural autoantibodies in autoimmunity

1. Detection and quantification of genetically conserved mitochondrial inner membrane enzyme-specific (malate dehydrogenase (MDH), pyruvate dehydrogenase (PDH) and citrate synthase (CS)) nAAbs in the sera of healthy individuals, autoimmune and heart transplanted patients.
2. *In silico* prediction of the possible epitopes, and the synthesis of the overlapping decapeptide system for epitope mapping of human CS specific autoantibodies.
3. Affinity purification of anti-mammalian CS nAAbs, and the determination of the isotype of the affinity purified serum samples.
4. Construction of a human CS antigen fragment library displayed on phage lambda, and the epitope mapping of affinity purified nAAb with phage-display technology.
5. Cross reactivity testing of affinity purified nAAb with other mitochondrial inner membrane enzymes, and bacterial CS.

Investigation of pathologic autoimmunity in the rhG1-induced arthritis (GIA) model

1. Comparison of the clinical phenotype (incidence and severity) of arthritis in the two TCR-Tg line.
2. Measurement of the most important serum parameters (antigen-(rhG1)-specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and serum cytokines by cytokine bead array (CBA)). Comparison of the result in the two strains.
3. Identification and characterization of lymphocytes participating in the induction and maintenance of arthritis based on the measurement of cell surface markers by flow cytometry.
4. Measurement of the phosphorylation of TCR signaling proteins after *in vitro* antigen stimulation with phospho-flow technique and flow cytometry.
5. Detection of antigen induced cell death (AICD) upon antigen stimulation in the T cell cultures of the two TCR-Tg line.

METHODS

Epitope mapping of mitochondrial inner membrane-specific antibodies

1. Patients and collection of control sera

Serum samples from healthy individuals: 63 Hungarian blood donors from the Blood Transfusion Service of Baranya county, Pécs; a standardized panel from 51 British blood donors and 176 Finnish blood donors (by the courtesy of professor G. Füst and Z. Prohaszka, 3rd Department of Internal Medicine at the Semmelweis University, Budapest); 44 serum samples from healthy infants from the Pediatrics Clinic, University of Pécs, and samples of patients with systemic autoimmune diseases: 326 clinically well-documented cases of systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, undifferentiated connective tissue disease, polymyositis/dermatomyositis, systemic sclerosis, Raynaud syndrome and Sjörgen syndrome from the Immunology and Rheumatology Clinic, University of Pécs were used in this work with the permit of the Ethical Committee of the Medical Center of the University of Pécs.

2. Detection of mitochondrial enzyme specific autoantibodies by ELISA

96-well polystyrene plates (NUNC) were coated with CS, malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) and pyruvate dehydrogenase (PDH; EC 1.2.4.1) from porcine heart (Sigma) in 0.1M bicarbonate buffer, pH 9.6. Following the saturation of non-specific binding sites with 0.5% gelatin (Sigma) in PBS (pH 7.3), serum samples were incubated in triplicates at 1:100 dilutions in washing buffer (PBS, 0.05% Tween 20) for 60 min. Finally, the plate was incubated with HRPO conjugated anti-human-IgA, or -IgG or -IgM specific secondary antibody (Dako) for 60 min. The reaction was developed with o-phenylenediamine (Sigma), and measured on an iEMS MF microphotometer (ThermoLabsystem) at 492 nm. Cut off values of each groups examined were calculated from the average of measured OD₄₉₂ data. Sera having higher OD value than average + 2SD were considered positive. All measurements were standardized with a monoclonal anti-citrate synthase antibody (Clone 4H3-E5) we produced. We used the positive serum samples for further epitope mapping of CS enzyme.

3. In silico prediction

With professional computer techniques we could predict the possible epitopes based on special molecular databases, which able to calculate (based on the structure of protein, hydrophobicity, hydrophilicity, antigenity index...) the peptide sequences that are most probably recognised by antibodies. We performed in silico prediction tests for the CS enzyme. According to the results the Peptide Chemistry Institute (MTA, Budapest) synthesised the pin-bound decapeptide system for multi-pin ELISA tests. The 10 amino acid long synthesised fragments contained all the predicted epitopes, and followed each other with 5 amino acid overlap. Using these pin-bound decapeptides we could identified the real epitope patterns in the investigated groups.

4. Multi-pin ELISA tests performed with synthetic pin-bound decapeptides

After the blocking of non-specific binding sites (with PBS containing 0,1 % sodium-azyde, 0,1 % Tween20 and 0,5 % gelatin, for 30 minutes), we washed 3 times the 96 well NUNC ELISA plates containing the pins. The serum samples were diluted in 1:100, and transferred on the plates in duplicates. The pins were immersed and incubated for 1 hour in the wells containing the serum samples. After washing, the diluted HRPO-conjugated secondary antibodies (IgG-1:6000 / IgM-1:1000) were pipetted on the

plates. The pins were immersed and incubated in the secondary antibodies for 1 hour. After washing we developed the reaction with ortho-phenyl-diamin (OPD), and analysed with spectrophotometry.

5. Affinity purification of sera on CS

CS from porcine heart was coupled to cyanogen-bromide activated sepharose 4B (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Fifteen ml sera of 30 healthy blood donors and 14 patients with autoimmune disease were passed three times through the CS-sepharose resin. After washing antibodies were eluted in glycine-HCL pH 2.5, fractions were neutralized with 1 M TRIS and were tested for CS reactivity with indirect ELISA using HRPO conjugated anti-human-IgA, or -IgG or -IgM specific secondary antibody (Dako)

6. Construction of a CS antigen fragment library

Total RNA was isolated using TriReagent (Sigma) from 3x10⁶ mononuclear cells obtained by Ficoll Paque (AmershamPharmacia) gradient centrifugation from peripheral blood of a healthy blood donor. 5 µg total RNA was reverse transcribed with Superscript II RT (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA encoding for the full length human mitochondrial citrate synthase was amplified with the following primers: 5'-ATGGCTTACTTACTGCGGC-3' and 5'-TTACCCTGACTTAGAGTCCAC-3'. The PCR reaction contained 300mM of each dNTP, 1.5 mM MgSO₄, 1 µM of each primer, 5 µl cDNA and 5 units of ProofStart DNA polymerase (Qiagen) in a 100 µl final volume, cycling was done with the following profile: 95 C 5min, 35 cycles of 95 C 1min, 51 C 30s, 72 C 2min, final extension at 72 C for 10 min. The PCR product was separated on a 1.5% agarose gel and purified using the Quiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Following A-addition it was cloned into a T/A vector using the InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas). The identity of insert was verified by sequencing on an ABI3100 Avant genetic analyzer.

Library construction was done using the lambdaD-bio phage display vector (a kind gift from Dr. Alessandra Luzzago; Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare, Italy) as described. In brief, inserts were produced by tagged random primed elongation and amplification using SpeI and NotI tagged random primers and CS cDNA as template excised with BamHI and EcoRI (Promega) digestion from the plasmid mentioned above. Following purification with the Quiaquick PCR purification kit (Qiagen) and size selection on Wizard columns (Promega) inserts were digested with SpeI and NotI (Promega). Twenty ligations were set up containing 1 µg of SpeI/NotI digested lambdaD-bio DNA, 25 ng of SpeI/NotI digested insert, 30U of T4 DNA ligase (Fermentas) in a final volume of 5µl and incubated 48 hours at 4C . The ligation mixture was phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated and packaged with the Ready To Go Lambda Packaging Kit (AmershamPharmacia). Phage were amplified by infecting log phase E.coli BB4 cells and plating them on LB agar plates. After plaque formation phage were eluted by an overnight incubation in SM buffer (100mM NaCl, 8.1 mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl pH 7.5), concentrated with polyethylene glycol precipitation and resuspended in SM buffer supplemented with Complete EDTA Free Proteasae Inhibitor Cocktail (Roche).

7. Affinity selection of CS antigen fragment library

Affinity selection of CS antigen fragment library with CS affinity purified sera was performed essentially as described. Briefly, microtiter plates were coated with affinity

purified anti-CS sera or anti-CS mAb 4H3E5 (developed in our lab) at 10 µg/ml in coating buffer. After blocking 10^{10} phage were incubated for 2 h at room temperature. Wells were washed five times and bound phages were recovered by in well infection of E.coli BB4 cells. The infected bacteria were plated on LB agar plates and phage were eluted then concentrated as described above. The affinity selection was repeated one more time and individual clones were picked up for DNA sequencing.

8. Cross reactivity testing of CS affinity purified sera

Cross reactivity with additional mitochondrial inner membrane enzymes was tested with indirect ELISA using MDH and PDH from porcine heart (Sigma) as antigens. Reactivity with E.coli CS was tested with pin-bound overlapping decapeptides as described previously.

The rhG1-INDUCED ARTHRITIS MODEL

1. Animals

We used two lines (Tg 'A' and Tg 'B') of the TCR-Tg mice, both expressing the TCR Va1.1 and Vb4 chains specific for the major dominant arthritogenic '5/4E8' epitope (ATEGRVVRVNSAYQDK) of the G1 domain of human cartilage PG. The two transgenic (TCR-TgA and TCR-TgB) lines were generated from different pronuclear injections using the same construct. Transgene-positive founders were backcrossed 12 times into the BALB/c (Charles River Laboratory, Kingston Colony, NY, USA) background. All animal procedures were conducted according to the protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Rush University Medical Center (Chicago, IL, USA).

2. Antigens, immunization, clinical assessment of arthritis and sample collection

Recombinant human G1-domain (rhG1) was purified as described. Wild-type (WT) BALB/c mice (Charles River) and age-matched 3-month-old female transgenic (TCR-TgA and TCR-TgB) mice were immunized intraperitoneally with 20 mg rhG1 in an emulsion of 2mg dimethyldioctadecylammonium bromide adjuvant (in 100 ml of PBS) on days 0, 21 and 42. The mice were examined three to four times a week after the second immunization for the clinical assessment of arthritis. The onset time and incidence of arthritis were recorded, and disease severity was scored visually based on the degree of swelling and redness of each paw, ranging from 0 to 4, yielding a maximum severity score of 16 per mouse. From each transgenic line and WT BALB/c mice, four animals were killed at different time-points: before immunization (naive mice), 10 days after the first immunization, 4 days before the second and third immunizations and 5 days after the second and third immunizations. These six timepoints were determined in preliminary experiments. Blood samples, joint-draining lymph nodes [brachial, axillary, inguinal and popliteal lymph nodes (LNs)] and spleens were collected for flow cytometry analysis and cell culture. Serum samples were collected for measurements of antibody and cytokine concentrations.

3. Measurement of antigen (rhG1)-specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and serum cytokines by cytokine bead array (CBA)

Serum anti-rhG1 IgG1 and IgG2a antibodies quantified by ELISA using serially diluted serum samples. Purified recombinant human G1 without the Fc tail, was immobilized in Maxisorp 96-well plates (Nunc International) at a concentration of 0.1 µg/well each. For rhG1-specific IgG isotype assays, peroxidase-labeled goat antimouse IgG1 antibody

(Zymed) or IgG2a (BD Biosciences) was used after incubation with serum. Serum PG-specific antibody levels were calculated using serial dilutions of pooled sera of mice with PGIA and known antibody titers. Serum interleukin (IL)-1b, IL-4, IL-6, tumour necrosis factor (TNF)-a, IL-17A, IL-12p70 and interferon (IFN)-g were measured using the CBA mouse/rat soluble protein flex set assay (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The samples were measured using a BD fluorescence activated cell sorter (FACS)Canto II flow cytometer equipped with a High Throughput Sampler (HTS) module (BD Biosciences); 500 events (measured twice) per analysis were recorded. Data were analysed using FCAPArray software (Soft Flow Hungary Ltd, Pécs, Hungary).

4. Flow cytometry

Cell surface markers of peripheral blood, LN and spleen leukocytes were analysed by multi-colour flow cytometry. Data acquisition and analysis was performed using a FACS Canto II flow cytometer with an HTS module and FACS DIVA software (BD Biosciences). Initial gating was performed on lymphoid cells based on the forward-/sidescatter (FSC/SSC) parameters. The following cell populations were defined based on the cell surfacemarkers: B220+: total B cells; CD3+: total T cells; CD3+/CD4+: CD4+ T cells; CD3+/ CD8+: CD8+ T cells; CD3+/CD4+/CD25high: activated T cells; CD3+/CD4+/CD44high: activated (memory) T cells.

5. Cell separation, culture condition and in vitro antigen stimulation

T cells were purified from the spleens of TCR-Tg mice using an EasySep magnetic T cell enrichment kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). The purified T cells (8×10^5) were seeded onto irradiated A20 (BALB/c B cell lymphoma) antigen presenting cells (ATCC, Rockville, MD, USA) that can present the 5/4E8 peptide. A20 cells (1×10^5 cells/well) were plated in 48-well plates, precultured with or without the synthetic 5/4E8 peptide (5 $\mu\text{g/ml}$) for 12 h and then washed with serum-free DMEM. For apoptosis studies, purified T cells from spleen were co-cultured with these pretreated and washed A20 cells in 600 μl of DMEM containing 10% fetal bovine serum for 3 days. For signaling studies, 3×10^5 purified T cells from spleen were spun onto a layer of pretreated A20 cells by short centrifugation (900xg, 3 min) and harvested after 1 h of co-culture.

6. Saturation binding test

CD4+ T cells were separated from the spleens of TCR-TgA and TCR-TgB mice by magnetic enrichment. Exactly the same number of cells from each line was stained with increasing concentrations of fluorescently labelled anti-TCR V β 4, anti-CD3 or anti-CD4 mAbs, and binding was analysed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) values were corrected by subtracting the MFI values of isotype controls, and the binding curves were fitted to the titration data points using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

7. Detection of TCR Va1•1 and Vb4 chain genomic copy numbers by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Tail genomic DNA was isolated from homozygous TCR-TgA and TCR-TgB animals by proteinase K digestion followed by phenol–chloroform extraction. Extracted genomic DNA samples were ethanol-precipitated and resuspended in Trisethylenediamine tetraacetic Acid (EDTA) buffer. The DNA samples were fragmented by restriction

endonuclease digestion with enzymes cutting outside the PCR-investigated regions. Digested DNA was purified using a Qiaquick kit (Qiagen, Carlsbad, CA, USA), and DNA concentration was determined photometrically; qPCR was performed in triplicate with 10, 5, 2.5 and 1.25 ng of input DNA using SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad). PrimeTime™ qPCR primers and dual-labelled probes (IDT, Coralville, IA, USA) were applied to determine the copy numbers of TCR alpha and beta chains (sequences of PCR primers and dual-labelled probes are available upon request); qPCR was performed using an iQ5 instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For normalization, we used the promoter region of the TATA-box binding protein (TBP) gene as a single-copy control.

8. Apoptosis detection by annexin V/7-AAD staining

Annexin V/7-AAD staining was used to distinguish between early and late apoptotic T cells. Labelling was performed according to the manufacturer's (BD Biosciences) instructions. The cells were analysed by flow cytometry immediately. Annexin V-/7-AAD- cells were considered nonapoptotic. Annexin V+/7-AAD- cells were considered early apoptotic, and annexin V+/7-AAD+ cells were considered late apoptotic.

9. Determination of phosphorylation of TCR signaling

Phosphorylation of zeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP-70), extracellular regulated kinase1/2 (ERK) and p38 was detected using the phospho-flow technique according to the manufacturer's instructions using phosphorylated protein-specific mAbs (BD Biosciences). After *in vitro* TCR stimulation, cells were labelled with anti-CD4-PerCPCy5.5 and phospho-specific antibodies: PE-conjugated anti-mouse pZAP-70 (clone 17A/P-ZAP-70) recognizing pY319 of ZAP-70, PE-conjugated anti-mouse pERK1/2 (clone 20A) recognizing pT203/pY205 in ERK1 and pT183/ pY185 in ERK2, and PE-conjugated anti-mouse (clone 36/p38 (pT180/pY182) recognizing pT180/pY182 in p38.

10. Statistical analysis

Descriptive statistics was used to determine group means and the standard errors of the means (the mean \pm s.e.m.). Differences between two groups were tested for statistical significance using Student's t-test and differences among three or more groups were tested by analysis of variance (anova) with Dunnett's post-hoc t-test. A value of $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Epitope mapping of mitochondrial enzyme-specific antibodies

1. Anti-mitochondrial enzyme specific antibodies in healthy individuals, systemic autoimmune and heart transplanted patients

Using simple binding ELISA we demonstrated the presence of antibodies recognizing CS, MDH, and PDC in the sera of each groups. Isotype-specific ELISA showed that enzyme-specific antibodies with IgM isotype are more frequently present in all investigated groups than those of IgG or IgA isotypes. No differences were found among the subgroups of healthy individuals; however, the incidence of anti-CS and anti-MDH autoantibodies with IgM isotype was significantly higher in autoimmune patients compared to the healthy controls.

We continued our investigations with CS specific IgM autoantibodies, as this group showed the most characteristic pattern of distribution. We followed the titer of anti-CS IgM antibodies, with repeated sample collection minimum 3 times over a 5 years period. We found that the CS reactivity of individual sera remained permanently constant over this period. Our findings that the majority of these antibodies have IgM isotype, are already present in infants, and the long term stability of their serum titers in adults indicate that these specificities belong to the nAAb repertoire established early in postnatal life.

We screened sera of heart transplant patients for anti-CS antibodies. The appearance of anti-CS IgG could be the result of adaptive immune response triggered by either foreign antigens or release of CS into the circulation from internal organs as heart and liver during pathological conditions. We sought that CS is released during post-transplantation vasculopathy, and this could elicit an adaptive type immune response. Indeed we have found that the frequency of high titer anti-CS IgG in sera of heart transplant patients is significantly higher than in healthy individuals (20% vs. 4%). The presence of induced anti-CS IgG in heart transplant patients raise the question whether these antibodies are produced as a result of isotype switch from nAbs with IgM isotype or produced against different epitopes originally not recognized by nAbs. Epitope mapping of anti-CS IgGs suggested an altered epitope pattern compared to healthy individuals.

2. Epitope mapping of antibodies against human citrate synthase with the use of overlapping synthetic decapeptides

We performed detailed epitope mapping analysis of anti-CS antibodies with the use of overlapping synthetic decapeptides. We have shown that, while there is no favored region of the hCS molecule recognized exclusively either by healthy individuals or patients with autoimmune disease, or heart transplanted patients, the fine epitope pattern is different in the three groups examined.

3. Epitope mapping of antibodies against bacterial citrate synthase with the use of overlapping synthetic decapeptides

Since a number of studies demonstrated that nAAbs play an important role in first line defense mechanisms of the humoral immune response, we analyzed the possible overlap in epitopes recognized on hCS and bCS. On the basis of comparative epitope mapping with sera from healthy individuals, patients with systemic autoimmune diseases and heart transplant patients epitopes recognized on bCS could be grouped into the following categories: epitopes recognized by sera of all individuals, epitopes recognized only by sera of healthy individuals, and epitopes recognized only by sera of patients with systemic autoimmune diseases and heart transplant patients. There were no differences in the epitope pattern among autoimmune patients and heart transplant patients.

4. Affinity purification of CS reactive sera

To exclude the masking effects of nonspecific bindings we purified anti-CS antibodies from 44 human sera (30 healthy and 14 autoimmune patients: 9 with SLE, 3 with systemic sclerosis and 2 with rheumatoid arthritis) by affinity chromatography for further experiments. Affinity purification was successful only in those cases (2 healthy and 2 SLE patients) where the actual serum had extraordinary high (OD₄₉₂ >1.5) anti-CS reactivity. The eluted anti-CS antibodies from such sera were exclusively with IgM isotypes.

5. Epitope mapping of affinity purified antibodies against hCS with the use of hCS antigen fragment library displayed on phage lambda

We proceeded to the epitope mapping of affinity-purified anti-CS sera. Following two rounds of affinity selection 20 clones selected with each serum were picked up for DNA sequencing. In contrast to the selection with our anti-CS mAb, these clones carry short peptide sequences which could also be aligned to human CS. These short sequences are scattered throughout the human CS sequence and it seems that practically the same regions of the molecule are recognized by the two groups of sera. According to our results obtained with phage displayed antigen fragments, while there is no favored region of the CS molecule recognized exclusively either by healthy individuals or patients with SLE, the fine epitope pattern is different in the two groups examined.

6. Cross reactivity testing of CS reactive sera

Cross-reactivity of the affinity purified anti-CS antibodies with other mitochondrial inner membrane enzymes (MDH and PDC) was tested by indirect ELISA. The affinity-purified anti-CS antibodies did not recognize any of these antigens.

We investigated the possible overlap in nAAb recognized epitopes on mammalian and bacterial CS. Due to the prokaryotic origin of mitochondria, CS represents an attractive target molecule to examine the self-reactive nAAbs' capability to recognize epitopes on the foreign counterpart of the same molecule. To achieve this, we used sera affinity purified on mammalian CS for epitope mapping on CS from E.coli, using the overlapping synthetic peptide method. Only three cross reacting sequences were found: amino acids 124-133: FRRDShpMAV (identity with human CS: 40%, similarity: 60%); amino acids 174-183: MCYKYSIGQP (identity with human CS: 30%, similarity: 40%) and amino acids 351-360: YFIEKKLYPN (identity with human CS: 40%, similarity: 60%), respectively. The three recognized sequences show only a limited homology with human CS, even though identical amino acids with a possible anchor function are present at corresponding positions. These amino acids contain either polar or charged side chains, which is in agreement with previous reports about the preferential amino acid composition of nAAb epitopes. The three peptides, according to the three dimensional model, are located on the surface of the molecule. Moreover, two of the peptides (124-133 and 174-183), though separated by 50 amino acids in the primary sequence, are in close proximity on the structural model of folded protein, indicating that they represent the same antigenic region.

The rhG1-induced arthritis model

1. Onset and severity of arthritis differ in the two PG-specific TCR-Tg lines

Previous studies have shown that mice of the original (first) 5/4E8 PG epitope-specific TCR-Tg (TCR-TgA) mice are highly susceptible to PGIA. After finishing the backcross of the second 5/4E8 PG epitope-specific TCR-Tg strain (TCR-TgB) into BALB/c background we immunized the two TCR-Tg strains side by side with rhG1. The TCR-TgA line responded to rhG1 immunizations as expected: arthritis had already developed a few days after the second immunization, and reached maximal severity scores with 100% incidence within 2 weeks after the second immunization. Surprisingly, the clinical phenotype and disease characteristics TCR-TgB were more similar to those found in WT BALB/c mice: the onset was delayed and the arthritis was less severe when compared to TCR-TgA mice. These results were surprising, because approximately the same proportion (~90 to 94%) of CD4⁺ T cells in both lines expressed the TCR Vb4 chain.

2. Immune responses against rhG1 in the two TCR-Tg strains

To determine whether the differences in clinical phenotype were associated with differences in serum parameters, we assessed the serum levels of antibodies and cytokines using antigen-specific ELISA and CBA, respectively. Anti-G1 domain-specific antibodies were hardly detectable before the second immunization in either transgenic line. The second immunization (day 21) induced significant anti-G1 IgG1 antibody secretion in TCR-TgA mice, whereas the level of this antibody isotype remained almost undetectable in TCR-TgB mice. TCR-TgA mice also exhibited higher serum levels of anti-G1 IgG2a antibodies compared to TCR-TgB mice. While the relatively high deviations and relatively low animal number did not allow us to perform a correct statistical analysis during the entire immunization period, we had a sufficient number of animals in all three genotypes at the end of the experiment, showing significant differences in anti-G1 antibodies between TCR-TgA and TCR-TgB mice. This significantly higher antibody secretion observed in TCR-TgA mice was associated with a significantly higher B cell percentage compared to that in TCR-TgB mice during the whole immunization period. No significant differences were observed in the serum levels of IL-1b, IL-12p70 or IL-17 between the two TCR-Tg lines. Serum IL-6 concentration was elevated in TCR-TgA mice throughout the entire experiment. TCR-TgA mice also showed higher serum levels of IFN- γ and TNF- α , when the first symptoms (acute phase) of arthritis appeared, and compared to serum levels of these two cytokines in the TCR-TgB line.

3. Comparison of T cell activation markers, co-stimulatory molecules and the proportion of regulatory T cells in TCR-TgA and TCR-TgB mice during the course of immunization

We compared the expression of activation markers on the cell surface of CD4⁺ T cells in the peripheral LNs and spleen to clarify whether there was any difference in the activation level of T cells in the two TCR-Tg lines. We detected a rapidly accumulating CD25^{high}CD4⁺ T cell population after the first rhG1 injection, and the size of this cell population remained large in the peripheral LNs and spleens of TCR-TgA mice. In contrast, the ratio of CD25^{high}CD4⁺ T cell population in TCR-TgB mice immunized with rhG1 remained as small as in naive mice during the entire experiment. The expression of the CD44 molecule (a marker of activated/memory T cells) in the CD4⁺ T cell population showed a similar pattern to that of CD25 in TCR-TgA mice, but was less consistent and remained significantly lower in TCR-TgB at almost all time-points tested. Because co-stimulatory molecules profoundly influence T cell activation and signaling, we examined CD28, CTLA-4, ICOS and PD-1 expression in CD4⁺ T cells in both TCR-Tg mouse lines. No significant differences were observed in CD28^{high}, CTLA-4^{high} or PD-1^{high} CD4⁺ T cell percentages. Naive TCR-TgB mice exhibited three to four times more ICOS^{high}CD4⁺ T cells compared to naive TCR-TgA mice. However, during immunization the proportion of ICOS^{high}CD4⁺ T cells showed a constantly increasing trend in TCR-TgA mice, especially in the peripheral LNs. In contrast, the percentage of ICOS^{high}CD4⁺ cells in TCR-TgB mice decreased to a very low level after the first rhG1 injection and remained at this significantly reduced level at most time points tested. Interestingly, a peak of both CD44 in LNs and ICOS in spleen expression was observed in CD4⁺ T cells in TCR-TgB mice 5 days after the second rhG1 injection, which may indicate a temporary (short-term) activation of these preactivated CD4⁺ T cells following the antigen injection.

Tregs play an important role in regulating immune functions by limiting the activation of T and B cells. Their impaired function or reduced numbers may lead to

autoimmunity. Therefore, we hypothesized that the reduced arthritis susceptibility in TCR-TgB mice may be due to a significantly higher level of Tregs that could suppress autoreactive T cells. We compared the Treg ratios in naive transgenic mice, but no significant difference was found between TCR-TgA and TCR-TgB mice. Unexpectedly, in response to immunization, a considerable Treg expansion was observed in TCR-TgA mice, especially in the peripheral LNs, which was not found in TCR-TgB mice. Although there was an upregulation of Tregs in the spleens of TCR-TgB mice after the 2nd and 3rd immunizations, significantly more Tregs were found in the spleens of TCR-TgA mice during the entire experiment.

4. Accelerated in vitro apoptosis in TCR-TgB CD4⁺ T cells

Impaired AICD of arthritogenic T cells is considered to be one of the underlying mechanisms in the development of arthritis, and we have observed previously spontaneous arthritis in aging TCR-TgA mice. Therefore, we hypothesized that the phenotypic differences between the two lines might be attributed to differences in T cell signaling and apoptosis. Accelerated apoptosis of CD4⁺ T cells in TCR-TgB mice could explain the phenotype of attenuated arthritis. Therefore, we cultured purified CD4⁺ T cells with 5/4E8 peptide pretreated irradiated A20 antigenpresenting cells for 3 days in vitro and measured the antigen stimulation-induced apoptotic T cell death. The percentage of early apoptotic (annexin V⁺/7-AAD⁻) T cells was significantly higher in the cell cultures harvested from TCR-TgB mice during the entire immunization period, whereas the corresponding CD4⁺ T cell cultures of TCR-TgA mice contained significantly more viable (non-apoptotic annexin V⁻/7-AAD⁻) T cells.

5. Higher TCR expression and TCR signaling strength in CD4⁺ T cells in TCR-TgB compared to TCR-TgA mice

AICD is controlled by TCR signal strength together with co-stimulatory signals. Although the two transgenic lines expressed TCRs specific for the same epitope (same transgenic construct), they were generated independently. Therefore, it was possible that the TCR expression on CD4⁺ T cells from the two transgenic lines was different. We compared the cell surface expression of TCR V β 4, CD3 and CD4 in transgenic T cells using a flow cytometric saturation binding test. Surprisingly, TCR-TgB mice expressed approximately twice as much TCR V β 4 and CD3 as TCR-TgA mice, but the amount of CD4 was similar in both strains. Thus, the amount of CD4 expression did not correlate with other components of the TCR complex such as V β 4 and CD3. To confirm this difference, we determined the copy numbers of the TCR-Tg V β 4 and V α 1.1 chains by qPCR in the genomic DNA isolated from both TCR-Tg lines. Interestingly, there were seven copies of V α 1.1 but only three copies of V β 4 of the transgene in homozygous TCR-TgA mice, whereas there were six copies of both TCR chains in homozygous TCR-TgB animals. Because TCR is always expressed as a heterodimer on the surface of peripheral T cells, these qPCR results confirmed the results of our flow cytometric analysis, demonstrating that TCR-TgA mice indeed expressed half as much TCR as TCR-TgB mice. The higher TCR expression, associated with the delayed onset and decreased severity of arthritis, prompted us to determine if AICD of CD4⁺ T cells increased in TCR-TgB mice. More specifically, we asked whether the significantly higher expression of TCR and CD3 in TCR-TgB mice correlated with the phosphorylation levels of ZAP-70, ERK1/2 and p38, three key parameters of T cell signal strength. To this end, purified CD4⁺ T cells were co-cultured with A20 cells in the presence of the 5/4E8 peptide for 1 h. We found that the TCR signal-elicited

phosphorylation of ZAP-70 and p38 was significantly higher in TCR-TgB than in TCR-TgA mice, whereas ERK1/2 phosphorylation was similar.

DISCUSSION

Epitope mapping of mitochondrial inner membrane enzyme-specific autoantibodies-the role of natural autoantibodies in autoimmunity

As genetically conserved antigens play a special role in both physiological and pathological autoimmunity, we used mitochondrial inner membrane enzymes as model antigens for the demonstration of nAAbs in the serum samples of healthy blood donors, autoimmune and heart transplanted patients by immune serological methods. Low affinity autoantibodies from IgM isotype (in low concentration) were present in all three investigated groups. The amount of these antibodies were stable, and the individual values did not change in time. Autoantibodies with high serum concentrations from IgM isotype were significantly more frequent in the patients with autoimmune conditions, while antibodies with elevated serum concentration from IgG isotype were specific for heart transplanted patients. We sought that CS is released during post-transplantation vasculopathy, and this could elicit an adaptive type immune response. The presence of autoantibodies with IgG isotype could be the result of the targeting type immune responses against the foreign transplanted graft. In autoimmune patients the target of the pathological immune reactions is not that antigen, so it was not a coincidence when the autoantibody profile of autoimmune patients was similar to healthy individuals. The amount of autoantibodies with IgG isotype fluctuated during the years.

We presume – in accordance with the literature- that the autoantibodies with IgM isotype are part of the physiological immunity, while autoantibodies with IgG isotype take part in the pathological immune responses. We continued our investigations with the epitope mapping of these autoantibodies with the use of CS antigen fragment library displayed on phage lambda, and a synthetic overlapping decapeptide system. Our results showed that hCS-specific antibodies are present in the human sera, but we could not identify privileged regions on the enzyme typical for only one group. The fine epitope pattern on CS is different under physiological and pathological conditions. Anti-hCS antibodies with IgM isotype seem to belong to the pool of naturally occurring antibodies. Sera affinity purified on CS cross reacts with bacterial CS. Despite the fact that E.coli CS and mammalian CS exhibit long homologies in their primary structure, the cross-reactive epitopes which we identified by autoantibodies carry altered primary structures with strong identical motifs in electric charge and hydrophobicity. The epitope pattern recognized on the bCS showed more differences between the three groups when compared to the hCS enzyme.

In theory, naturally occurring antibodies “specific” for a given self antigen could fulfill the function of participating in innate defense mechanisms and at the same time recognize a target antigen in a systemic autoimmune disease. Similarly to the initiation of immune response the maintenance of tolerance involves all three compartments of the immune system. Disturbances in co-operation among innate, natural, and adaptive immune system components may result in the impairment of both targeting type immune response and the self tolerance, thus paving the way for development of immunodeficiencies and pathological autoimmune phenomena.

Investigation of pathological autoimmunity in the rhG1-induced arthritis model

Co-operation between autoreactive (Th1 and Th17) CD4⁺ T cells and antibody-secreting (and antigen-presenting) B cells is indispensable for the initiation and progression of systemic autoimmune arthritis. Both PGIA and GIA, similar to RA, are T cell-dependent B cell-mediated autoimmune diseases. Adoptive transfer experiments have proved that neither T nor B cells alone were sufficient for the transfer of the disease, and that only co-injection of both cell types was successful. Therefore, T–B cell co-operation is definitely required for the development of PGIA and GIA. In this TCR-Tg study we used the GIA model by immunizing mice with rhG1 protein, and stimulating/activating CD4⁺ T cells of TCR-Tg mice with their 5/4E8 epitope-specific synthetic peptide. We observed that rhG1 provoked severe arthritis in TCR-TgA mice, whereas a milder form of the disease with significantly delayed onset developed in TCR-TgB mice, which was comparable to that described in WT BALB/c mice. This was an unexpected result, because both TCR-TgA and TCR-TgB mice possess the same 5/4E8 (PG)-specific (monoclonal) TCR expressing CD4⁺ T cell repertoire. From the laboratory parameters analysed, elevated levels of serum anti-G1 antibodies (IgG1/IgG2a, cross-reactive with the G1 domain of mouse PG) in the TCR-TgA line, shortly after the second immunization but before the appearance of visible inflammatory symptoms, suggest that these antibodies may have contributed to the accelerated disease development. The higher B cell percentage in TCR-TgA mice was consistent with the higher serum anti-G1 antibody levels. Previous studies have indicated that the concentrations of antigen-specific antibodies in sera, especially autoantibodies, correlate well with the severity of the disease in WT BALB/c mice, and that such antibodies can already be detected long before the appearance of the first inflammatory symptoms. However, despite the higher B cell numbers at most time-points tested during the immunization period, the serum antibody levels in TCR-TgA mice never reached the levels measured in WT BALB/c controls. One possible explanation for the lower autoantibody concentration in TCR-Tg mice is the highly restricted TCR repertoire, specific for only one epitope. None the less, the role of B cells in the development of the disease is unquestionable, even in this epitope-restricted TCR-Tg model. Secretion of antigen-specific antibodies, however, is only part of B cell function because B cells are important antigenpresenting cells in PGIA and most probably in GIA as well. Therefore, specific co-operation between antigen-primed T cells and antigen-specific B cells appears to be a critical component of arthritis induction. The higher number of B cells in TCR-TgA mice could present the antigen to T cells more effectively, leading to accelerated T cell activation. Indeed, the highest expression of the T cell activation markers during the immunization with rhG1 protein was observed on TCR-TgA CD4⁺ T cells. As mentioned above, the CD4⁺ T cells of TCR-TgA mice, unlike those of TCR-TgB mice, expressed more activation markers, such as CD25 and CD44. Activation of CD4⁺ T cells is central for the initiation of both PGIA and GIA, and these T cells in TCR-TgB mice were not activated as strongly as TCR-TgA T cells by immunization. Therefore, the lower percentage of activated T cells in TCR-TgB mice could account for the delayed disease onset and less severe arthritis. An additional difference between the TCR-Tg lines was that a larger percentage of ICOS^{high} CD4⁺ T cells were present in TCR-TgA mice, especially in the peripheral LNs. ICOS has been shown to be indispensable in collageninduced arthritis and K/BxN arthritis models, and certain ICOS polymorphisms are associated with RA. ICOS is expressed prominently by follicular T helper (Tfh) cells in lymphoid organs. Tfh cells have been shown to provide critical support to autoreactive B cells in systemic autoimmunity and in the initiation of arthritis

in K/BxN mice. Therefore, here, the lower percentage of ICOS^{high} CD4⁺ T cells (most probably Tfh) cells could also contribute to the diminished antibody production and the lower severity of autoimmune arthritis in TCR-TgB mice.

Tregs play a central role in peripheral tolerance and the prevention of autoimmunity, but the role of natural Tregs is controversial both in human RA and in its corresponding animal models. In the present study, an attractive explanation could have been that the higher number of Tregs were responsible for the lower incidence and diminished severity of GIA in TCR-TgB mice. On the contrary, indicating that Tregs play a dispensable role in regulating the autoimmune processes in PGIA and GIA. However, the role of Tregs in autoimmune processes, especially in arthritis, is still not completely understood, and further studies are needed to improve our understanding of the role of Tregs in RA.

The most interesting observation in TCR-TgA and TCR-TgB mice was the differential susceptibility of their CD4⁺ T cells to activation-induced apoptosis. Upon stimulation with the 5/4E8 peptide, T cells isolated from TCR-TgB mice exhibited higher sensitivity to apoptosis compared to the CD4⁺ T cells from TCR-TgA mice. Altered T cell apoptosis has been found to be a critical factor in the development of autoimmune arthritis, and TCR signaling threshold and co-stimulatory signals have been shown to regulate AICD. In our case, a saturation-binding test and qPCR analysis proved that CD4⁺ T cells from TCR-TgB mice expressed twice as much TCR and CD3 molecules than the T cells from the TCR-TgA line. Variance in the number of expressed TCRs on the cell surface may significantly influence signal strength through the TCR-initiated signaling pathway. Indeed, when TCR-TgB CD4⁺ T cells were engaged with the 5/4E8 peptide, significantly higher levels of phosphorylation of the key downstream signaling molecules (ZAP-70 and p38) were detected than in TCR-TgA T cells. In other words, the higher the TCR expression, the stronger the signaling response to the 5/4E8 epitope became. Thus, a 'too strong' TCR signal could have led to extensive apoptosis of self-reactive T cells during immunization with an antigen (rhG1) containing the 5/4E8 epitope. The importance of TCR signal strength has also been underlined in a recent human study: RA patients showed altered ERK and ZAP-70 phosphorylation levels upon CD3/CD28 stimulation, implicating a potential human relevance for our results.

Based on these results, we propose that TCR signal strength controls arthritis susceptibility in the two lines of PG-specific TCR-Tg mice. The differences in the phosphorylation levels of the downstream effectors in TCR signaling offered a logical explanation for the differences in arthritis severity. The different TCR levels in the two transgenic lines resulted in significant alterations of TCR signal strength. A strong PG (5/4E8 epitope)-specific TCR-initiated signal in TCR-TgA mice led to optimal T cell activation and, compared to WT, generated a 'super-arthritic' phenotype. In contrast, an extremely 'strong' TCR signal, due probably to higher TCR expression, led to in vivo T cell apoptosis and diminished arthritis in TCR-TgB mice. Thus, the correlation between TCR signal strength and arthritis severity is not linear: a weaker signal (as seen in the TCR-TgA mice) appears to be more 'optimal' for the activation of self-reactive T cells.

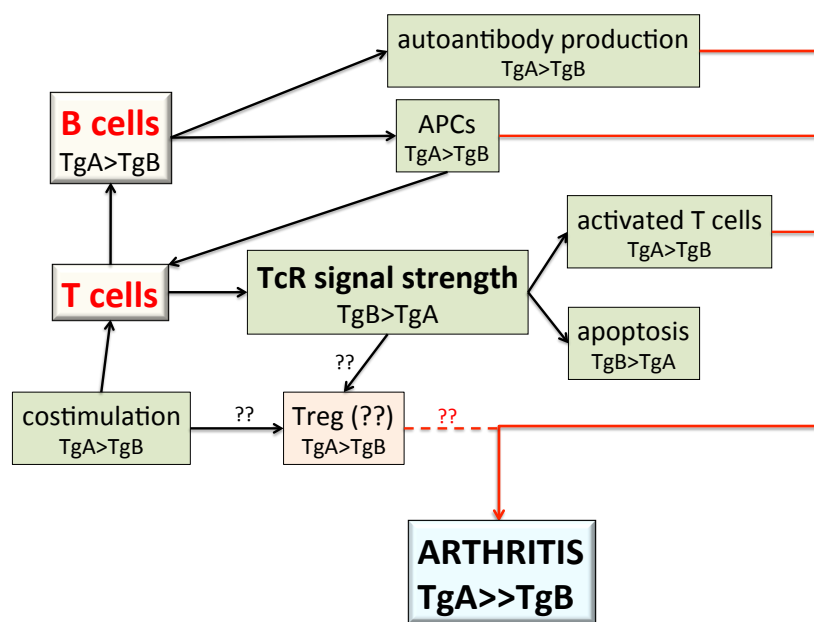


Figure 1. T cell receptor (TCR) signal strength controls arthritis severity in proteoglycan-specific TCR transgenic mice.

On the base of our results, it seems that „the immunological steady-state” is one inevitable part of the physiological immune regulation, and one way of its manifestation is the nAAb network, which reacts for example with genetically conserved mitochondrial inner membrane enzymes, like CS, and that way helps in the development and maintenance of the tolerance against these autoantigens (Figure 2.). For the better understanding and research of the humoral autoimmunity, the detection of the regular antigen-specific antibody titers are not enough, and the analysis of the fine epitope pattern becomes necessary. The immunological steady-state, due to the network like co-operation of the whole immune system, can change in several ways and result in pathological autoimmune conditions (Figure 2.) An example is a single change in the cell function, like the alteration of the activation induced cell death of CD4⁺ T cells in the animal model of rheumathoid arthritis which caused pathological autoimmunity and permanent serious tissue destructions. These results reveal the possible necessity of the examination of cellular mechanisms besides the usual autoantibody screening test in the diagnostics of autoimmune diseases. Besides the cellular and humoral mechanisms of autoimmune processes the role of the genetic and environmental factors are inevitable. In conclusion, the examination and understanding of autoimmunity and autoimmune diseases needs a complex approach.

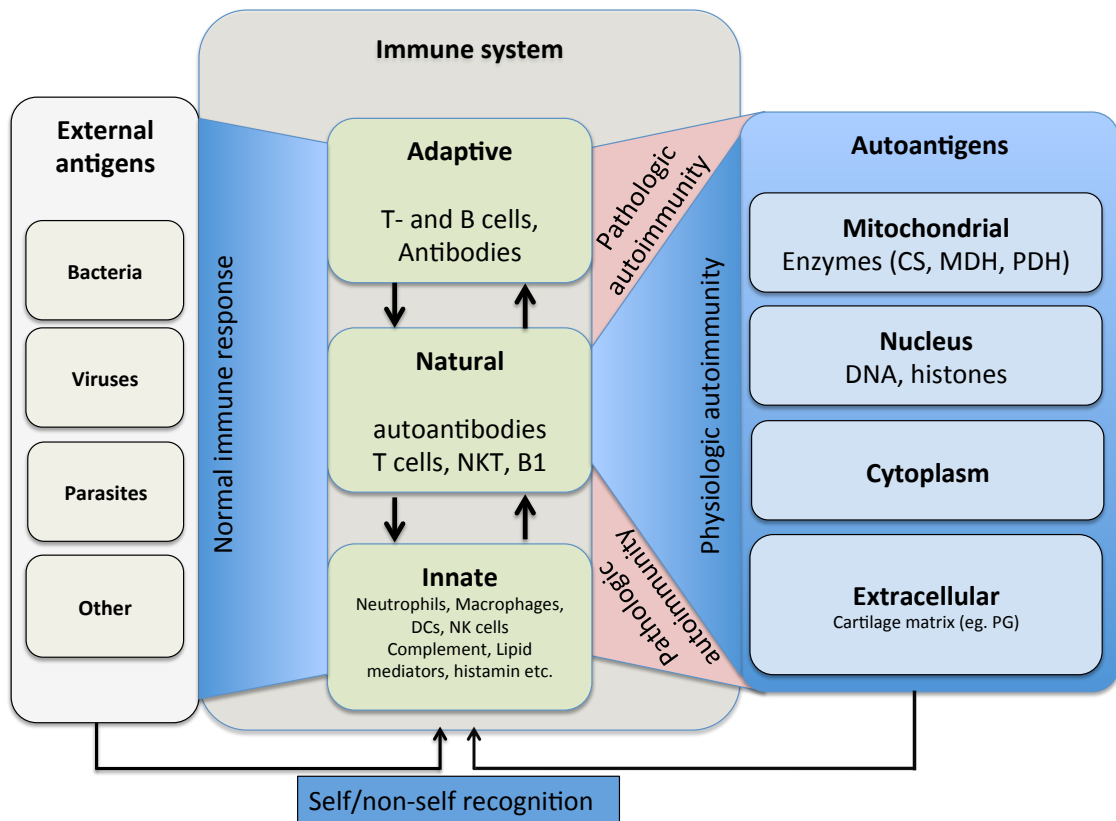


Figure 2. Changes in the immune regulation are responsible for pathological autoimmunity. Normal immune regulation guarantees the proper distinction between self and non-self structures. The incoming signals are processed by different levels of the immune system. The three levels (innate, natural and adaptive) are strictly related to each other. That way the effector mechanisms decide to offend the non-self and tolerate the self antigens. The natural immune system plays an important role in the maintenance of the tolerance against autoantigens. In case of the disfunction of immune regulation the immune responses „spread „ against self antigens, and the effector mechanisms of the adaptive and innate immune systems step in, and the loss of tolerance leads to pathological autoimmunity. Physiological autoimmune mechanisms are marked with blue, and pathological autoimmunity is marked with pink color.

SUMMARY OF OUR MOST IMPORTANT NEW RESULT

Epitope mapping of mitochondrial inner membrane enzyme-specific autoantibodies- the role of natural autoantibodies in autoimmunity

1. We successfully demonstrated the presence of mitochondrial inner membrane enzyme (CS, MDH, PDH) specific autoantibodies in all of the investigated groups (healthy, autoimmune and heart transplanted). The subgroups of healthy individuals did not show differences in the concentration and isotype of these autoantibodies. In the serum samples of patients with autoimmune diseases the autoantibodies with IgM isotype were presented in elevated concentration, while the autoantibodies from IgG isotype with high concentration were specific for the heart transplanted patients..
2. After in silico prediction of possible B and T cell epitopes, we constructed and successfully used synthetic overlapping peptide system for the epitope mapping of human and bacterial CS enzyme. We could not detect dominant epitopes specific for only one investigated group. We found differences in the fine pattern of the epitopes..
3. We affinity purified CS-specific antibodies from healthy and autoimmune serum samples with high CS reactivity with the use of porcine CS. These antibodies exclusively belonged to the IgM isotype.
4. We constructed a hCS random peptide fragment library displayed on phage lambda, and performed further epitope mapping with the CS affinity purified sera. We could not detect dominant and unique epitopes with this method also.
5. Affinity purified serum samples did not show cross reactivity with other mitochondrial inner membrane enzymes, but we could identify three cross reacting sequences on the bCS enzyme. The three recognized sequences show only a limited homology with hCS.

Investigation of pathologic autoimmunity in the rhG1-induced arthritis (GIA) model

1. With the intraperitoneal injection of rhG1 we could induce arthritis in T cell receptor transgenic mouse lines, which CD4⁺ T cells recognize the dominant epitope on the G1 domain of the proteoglycan molecule. Two founders with high TCR expression were backcrossed into genetically susceptible BALB/c strain, and that way the TCR-TgA and TCR-TgB lines were constructed. During the side-by-side immunizations profound differences between the two lines appeared. TCR-TgA mice exhibited accelerated and more severe arthritis than TCR-TgB mice in response to rhG1 immunization. The clinical phenotype and disease characteristics TCR-TgB were more similar to those found in WT BALB/c mice.
2. Serum parameters correlated with the clinical phenotype: TCR-TgA mice exhibited significantly more antigen-specific antibodies and inflammatory cytokines when compared to TCR-TgB littermates.
3. We found also differences when we characterized the lymphocyte subpopulations in the two strain. TCR-TgB mice expressed approximately twice as much TCR as TCR-TgA mice. Activated T cells (CD25^{high}, CD44⁺) were represented in higher ratio in the lymphoid organs of TCR-TgA mice when compared to TCR-TgB mice. We got controversial results with the examination of Treg (Tregs play important role in the regulation of tolerance/autoimmunity) cells in the two strains: more Tregs were observed in TCR-TgA mice than in

TCR-TgB mice during the entire immunization period. The elevated proportion of B cells in the lymphoid organs of TCR-TgA mice probably correlates with the higher concentration of antibodies and elevated number of activated T cells (through the more effective antigen presentation).

4. With the use of phospho-flow technique we detected accelerated cell signaling in TCR-TgB mice. After in vitro antigen stimulation TCR related cell signaling molecules (ZAP-70, p38) were phosphorylated on higher level in TCR-TgB mice.
5. The extremely 'strong' TCR signal, due probably to higher TCR expression, led to in vivo T cell apoptosis and diminished arthritis in TCR-TgB mice.

PUBLICATIONS

List of publications related to the thesis [IF: 21.708]:

1. **Olasz, Katalin**; Boldizsar, Ferenc; Kis-Toth, Katalin; Tarjanyi, Oktavia; Hegyi, Akos; van Eden, Willem; Rauch, Tibor; Mikecz, Katalin; Glant, Tibor: *T cell receptor (TCR) Signal Strength Controls Arthritis Severity in Proteoglycan-Specific TCR Transgenic Mice*. Clin. Exp. Immunol. 67(2): 346-55., 2012.
IF: 3.134*
2. Glant TT, Radacs M, Nagyeri G, **Olasz K**, Laszlo A, Boldizsar F, Hegyi A, Finnegan A, Mikecz K.: *Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 63(5): 1312-21., 2011.
IF: 8.435*
3. Czömpöly T, **Olasz K**, Nyárády Z, Simon D, Bovári J, Németh P.: *Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies*. Autoimmun Rev. 7(6):463-7., 2008.
IF: 5.371
4. Czömpöly T, **Olasz K**, Simon D, Nyárády Z, Pálinkás L, Czirják L, Berki T, Németh P.: *A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network?* Mol Immunol. 43(11):1761-8., 2006.
IF: 4.768

Other publications [IF: 30.361]:

5. Nagyeri G, Radacs M, Ghassemi-Nejad S, Tryniszewska B, **Olasz K**, Hutas G, Gyorfy Z, Hascall VC, Glant TT, Mikecz K.: *TSG-6 protein, a negative regulator of inflammatory arthritis, forms a ternary complex with murine mast cell tryptases and heparin*. J Biol Chem. 2011 Jul 1;286(26):23559-69., 2011.
IF: 5.328
6. Czömpöly T, Lábadi A, Kellermayer Z, **Olasz K**, Arnold HH, Balogh P.: *Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen*. J Immunol. 186(12):6981-9., 2011. IF: 5.745*
7. Nesterovitch AB, Szanto S, Gonda A, Bardos T, Kis-Toth K, Adarichev VA, **Olasz K**, Ghassemi-Najad S, Hoffman MD, Tharp MD, Mikecz K, Glant TT.: *Spontaneous insertion of a b2 element in the ptpn6 gene drives a systemic autoinflammatory disease in mice resembling neutrophilic dermatosis in humans*. Am J Pathol. 178(4):1701-14., 2011.
IF: 5.224*
8. Boldizsar F, Kis-Toth K, Tarjanyi O, **Olasz K**, Hegyi A, Mikecz K, Glant TT.: *Impaired activation-induced cell death promotes spontaneous arthritis in antigen (cartilage proteoglycan)-specific T cell receptor-transgenic mice*. Arthritis Rheum. 62(10):2984-94., 2010.
IF: 8.435
9. Angyal A, Egelston C, Kobezda T, **Olasz K**, László A, Glant TT, Mikecz K.: *Development of proteoglycan-induced arthritis depends on T cell-supported autoantibody production, but does not involve significant influx of T cells into the joints*. Arthritis Res Ther. 12(2): R44., 2010.
IF: 4.357

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

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all I would like to thank my supervisors **Prof. Péter Németh** and **Dr. Ferenc Boldizsár** for giving me the possibility to work at the Institute of Immunology and Biotechnology. I would also like to thank them for leading me during this scientific endeavor and for having faith in this project.

I would like to thank **Prof. Dr. Tibor Glant** for giving me the possibility to work for two years at the Rush University at Chicago, and for introducing me the experimental animal model of rheumatoid arthritis, and several modern laboratory technics.

I greatly appreciate the technical help and lead in the epitope mapping technique of **Dr. Tamás Czömpöly** and **Dr. Diána Simon**. I would also like to thank for **Dr. Zoltán Nyárády** for the help with bioinformatics related to the thesis.

I would like to thank **Prof. László Czirják** and **Prof. György Füst** and **Dr. Zoltán Prohászka** for the autoimmune patient's sera and for the Finnish blood donor serum samples, respectively.

I would like to thank **Dr. Alessandra Luzzago** for providing us the filamentous phage random peptide library and the lambda phage display vector.

I would like to thank **Prof. Ferencz Hudecz** and **Szilvia Bősze** for the multi-pin peptide synthesis.

I would also like to thank for my husband **Ákos Hegyi** for supporting my work during these years, and for the technical help in Chicago.

Finally, I would like to thank all members of Department of Immunology and Biotechnology and the members of Rush University Medical Center for helping me in this work.