

Ph.D. értekezés tézisei

**Lehetséges immunológiai mechanizmusok
vizsgálata rheumatoid arthritis kísérletes
állatmodelljében**

Dr. Hanyecz Anita

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



Témavezető:

Dr. Boldizsár Ferenc

Programvezető:

Prof. Dr. Németh Péter

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Lénárd László

Pécs
2013

ÖSSZEFOGLALÁS

A rheumatoid arthritis (RA) egy szisztémás autoimmun betegség, melynek fő támadáspontjai az ízületek, jelezve a lehetséges autoantigének synoviális ízületekben való jelenlétét. RA-ban szenvedő betegek perifériás vérmintáiban celluláris immunválasz detektálható porc mátrix komponensekkel, úgymint a proteoglikán aggregáttal (PG) szemben. Ezen autoantigének legnyilvánvalóbb forrása az immunológiai szempontból kivételes ízületi porc, mely avaszkuláris, és ezáltal nem áll ún. immunológiai ellenőrzés alatt. A rheumatoid arthritis egyik legrelevánsabb állatmodellje a proteoglikán (aggregán)-indukált arthritis. Bár alapvető mechanizmusai még nem teljesen tisztázottak, a T sejtek, különösen a CD4⁺ limfociták döntő szerepet játszanak a betegség iniciálásában. Korábbi tanulmányok számos T sejt epitópot tártak fel a humán aggregán magfehérjéjében, és a C-terminális lokalizációjú G3 doménben elhelyezkedő egyik epitóp (p135H elnevezésű peptid: ²³⁷³TTYKRRLQKRSSRHP) arthritis indukcióban betöltött lehetséges szerepére derült fény.

Munkánk első részében kísérletet tettünk ezen szintetikus p135H (humán) peptid finomabb epitópszerkezetének és funkciójának felderítésére, amelynek további érdekessége, hogy a számos, RA-val társult HLA-DR4 allélben és gyakori humán kórokozókban jelenlévő ún. "shared epitope"-pal nagyfokban homológ szekvencia motívumot tartalmaz. Tovább vizsgálva a p135H által képviselt T sejt epitóp betegség patogenezisben betöltött közvetlen szerepét, p135H-val érzékenyített BALB/c egerekből származó, p135H-val *in vitro* restimulált limfocitákat transzferáltunk SCID egerekbe. A humán és egér p135 peptid szekvenciák különbsége, és az epitóp rejtett jellegének ellenére képesek voltunk kimutatni, hogy a p135H-specifikus limfociták "előérzékenyített" SCID egerekbe történő transzfere az arthritis gyors kialakulásához vezetett. Mivel a porc proteoglikán aggregán G3 doménje elveszik a normális turnover, illetve patológiás állapotok során, egy antigén-orientált T sejt migráció arra fogékony egyéneknél hozzájárulhat az RA szervspecifitásához.

A tanulmány második felében összehasonlítottuk egy potens, nem-irritáló adjuváns, a dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA) és a komplett Freund adjuváns (CFA) hatásait arthritisre fogékony egértörzsekben. Az összesített immunválasz (antitest termelés és antigén-specifikus T sejt válasz) nagyfokban hasonló volt, ha a humán PG-t CFA-ban vagy DDA-ban alkalmaztuk immunizálás során, habár a DDA használata egy súlyosabb fokú arthritis kialakulását segítette elő, és a PG, illetve II-es típusú kollagén antigének szuboptimális dózisa is elegendő volt a gyulladás kialakulásának létrejöttéhez. Kimutattuk továbbá, hogy a DDA a nem-specifikus (natív) immunválasz, és T helper 1-es típusú immunválasz irányában ható immunreguláció hatékony aktiválása révén fejt ki hatását. Mivel számos potenciális autoantigén (pl. II-es típusú kollagén, proteoglikán aggregán) azonosítható számos RA-ban szenvedő betegben, feltételezhetjük, hogy látszólag ártalmatlan anyagok adjuváns hatást fejthetnek ki a humán szervezetben a natív immunitás aktivációja/stimulációja révén, ezáltal megteremtve az autoimmunitás patofiziológiai alapjait arra fogékony egyéneknél.

BEVEZETÉS

1. Az aggregán molekula szerkezete és funkciója

A proteoglikánok proteín poliszacharid molekulák, melyek az ízületi porc nedves tömegének 10-20%-át alkotják, biztosítva annak szakítószilárdságát. A chondrocyták termelik, majd a mátrixba szekretálják őket, és funkciójuk az ízületi porc folyadék- és elektrolit-egyensúlyának fenntartása.

Az proteoglikán aggregán (PG) egy több funkcionális domént tartalmazó moduláris proteoglikán, melynek magfehérjéje három globuláris, G1, G2 és G3 elnevezésű régióból áll. A G1 és G2 domént egy rövid interglobuláris domén, míg a G2 és G3 domént egy hosszú, keratin- és kondroitin-szulfátban gazdag kapcsolódó részt tartalmazó régió választja el. Az aggregán molekulák az extracelluláris mátrixon belül nem izoláltak, hanem PG-aggregátumok formájában fordulnak elő. Mindegyik aggregátum egy centrális hialuronsav szálból, és a belőle elágazó mintegy 200 aggregán molekulából áll.

Az aggregán-“vesztés” az arthritissel társult porcdegradáció fő jelensége. Létezik azonban egy öregedéssel összefüggésbe hozható G3 domén-vesztés is, melynek során a G3 domén mintegy 92%-ka veszik el a normális proteoglikán turnover során, míg a molekula maradék, hialuronsavhoz kötött része a porcban visszatartva marad.

2. A porcalkotó komponensek immunogenitása

A porc azon kevés immunológiailag kivételes helyzetben lévő szövetek közé tartozik, mely tulajdonképpen avaszkuláris, ezért nem áll szoros belső immunológiai felügyelet alatt. Degradációja során azonban antigén tulajdonsággal rendelkező molekulák válnak szabaddá, és következményesen felismerhetővé válnak az immunrendszer számára. Az ízületi komponensek tehát immunválaszt aktiválhatnak és tarthatnak fenn.

Az ízületek ellen irányuló immuntámadást a “molekuláris mimikri” mechanizmusa révén egyéb/külső antigénekre adott keresztreakció is iniciálhatja. Az efajta autoimmun folyamat végeredménye további porcdestrukció és még több autoantigén felszabadulása lehet. Ez krónikus, önfenntartó gyulladáshoz vezethet genetikailag fogékony, autoimmun reakció létrehozására hajlamos egyéneknél.

Rheumatoid arthritisben szenvedő betegek perifériás vérében PG-specifikus celluláris immunválasz, valamint synoviális folyadékjukban immunreaktív PG-fragmensek detektálhatók. Ezen tények mind azt bizonyítják, hogy a proteoglikán aggregán fontos szerepet játszhat a perifériás ízületek ellen irányuló autoimmunitás kialakulásában.

3. A rheumatoid arthritis (RA) és kísérletes állatmodelljei

Habár az RA szisztémás autoimmun betegség, ízületi támadáspontja a synoviális ízületekben lévő lehetséges autoantigének jelenlétére utal. Az RA legrelevánsabb állatmodelljei azok, amelyek porc mátrix komponensekkel, pl. proteoglikán aggregánnal vagy II-es típusú kollagénnel indukálhatók. Mindkét modellrendszer alapja immunológiai keresztreakció, vagyis az immunizáló heterogén (pl. humán) porcantigének ellen termelő T sejtek és antitestek felismerik, és következményesen megtámadják az egér saját szöveget.

3.1. Proteoglikán-indukált arthritis (PGIA)

Genetikailag fogékony egértörzsek (pl. BALB/c) glükózaminoglikán oldalláncoktól megfosztott humán porc proteoglikánnal történő szisztémás immunizálása progresszív polyarthritist kialakulásához vezet. Miként azt a klinikai és radiológiai analízis, csontszcintigráfias vizsgálat, laboratóriumi tesztek és a diarthrodialis ízületek

hisztopatológiai tanulmányai alátámasztják, a PGIA sok hasonlóságot mutat a humán RA-val.

A PGIA-t először a BALB/c törzsben írták le, de bizonyos C3H kolóniák is fogékonyak bizonyultak (pl. C3H/HeJCr). Az immunizációs protokoll során, nőstény egereket intraperitoneálisan 100 µg porc PG-vel oltunk komplett Freund adjuvánsban, melyet azonos dóziszú PG inkomplett Freund adjuvánsban történő injekciója követ a 21. és 42. napokon. Az ízületi gyulladás kezdeti klinikai manifesztációi a 3. vagy 4. antigén injekció után jelennek meg. Az ízületi gyulladás a perifériás kisízületek polyartikuláris synovitisével kezdődik. A korai fázisban limfociták és polymorfonukleáris leukociták árasztják el a synoviumot, melyet a synoviális sejtek és fibroblasztok masszív, "tumorszerű" proliferációja követ. Miután az állatban arthritis alakul ki, az ismételt "spontán"gyulladásos epizódok az ízületi porc teljes destrukcióját és a szubkondrális csont erozióját eredményezik, amely súlyos perifériás ízületi deformitásokhoz vezet.

A PGIA BALB/c egerekben T sejt-dependens és (auto)antitest/B sejt-irányított betegség. A CD4⁺ T sejtek összefüggésbe hozhatók a PGIA kialakulásával, amelyet azon megfigyelések is alátámasztanak, hogy anti-CD4 monoklonális antitest kezelés az arthritis prevencióját eredményezi, illetve a betegség transzfere az arthritises állatból származó T sejtek jelenlétét igényli. A BALB/c egerek genetikailag T helper (Th) 2-es típusú immunválaszra predisponáltak, azonban ezen egerek PG-vel történő immunizálása az interleukin (IL)-4-hez képest lényegesen magasabb arányú interferon (IFN)-γ termelést indukál, jelezvén, hogy a PGIA egy Th1-es típusú válasz, és a PG/CFA-val történő immunizálás elegendő Th1-es stimulus ahhoz, hogy a Th2-es típusú válasz felé történő genetikai hajlandóságon felülkerekedjen.

3.2. Kollagén-indukált arthritis (CIA)

A kollagén-indukált arthritist először egyetlen, komplett Freund adjuvánsban (CFA) emulzifikált II-es típusú kollagén (CII) intradermális úton történő beadásával, patkányokban sikerült kiváltani. Később kimutatták, hogy hasonló patológiás reakció indukálható főemlősökben és egerekben is. A CIA natív autológ vagy heterológ CII-vel indukálható. A CII/CFA-val történő immunizálás a perifériás ízületek gyors és súlyos polyarthritiséhez vezet, amely először az antigén beadását követő 3-4. hét táján jelenik meg, majd progresszív módon rosszabbodik további 2-4 hétig, mielőtt lassan mérséklődik. A betegség indukció primér mediátorai CII-reaktív CD4⁺ T sejtek, és a lokalizált krónikus gyulladásos válaszhoz vezető fő immunmechanizmus a B sejtek komplementfixáló anti-CII autoantitest termelése. A CIA a nagymennyiségű IFN-γ termelés alapján Th1-mediált betegség. RA-ban szenvedő betegekben a porc II-es típusú kollagéjével szembeni autoreaktivitás egyértelműen kimutatható.

4. Dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA), mint potens adjuváns PGIA-ban és CIA-ban

Számos állatmodell utánoszhatja a humán RA-t, azonban legtöbbjüket adjuvánssal történő antigén beadása előzi meg. A komplett Freund adjuvánsban (CFA) lévő mycobakteriális hősokkfehérjék ismertén nagyon potens, nem-specifikus immunstimulátorok, melyek elősegítik a szisztémás T sejt válasz kialakulását. Ezek a CFA-ban található hősokkfehérjék azonban számos nem kívánt mellékhatást okoznak, beleértve a CFA-indukált irritációt és granuloma képződést, amely az intraperitoneális térben következményes adhéziókhoz vezet, valamint a mycobakteriális komponensekkel szembeni immunreakciót.

A dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA) egy hatásos, nem-irritáló adjuváns, amely a T sejt stimuláció révén jelentősen fokozza az antigén-specifikus B sejt

aktivációt és immunglobulin termelést. A DDA használat különleges haszna számos autoimmun rágszálómodellben, hogy az immunregulációt a Th1-es típusú válasz felé tolja el. A DDA-t azonban adjuvánsként korábban soha nem tesztelték PGIA-ban és CIA-ban.

5. A rheumatoid arthritis és a *HLA-DRB1* “shared epitope”

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az RA szorosan összefügg olyan *HLA-DRB1* allélekkel, amelyek a DR β láncban a 70-74 pozícióban lévő öt aminosav hosszúságú szekvencia motívumot kódolnak, és gyakran “shared epitope” (SE) néven említnek. A jól ismert SE-kódoló allélek a következők: a *HLA-DRB1*04* allél csoport tagjai, a *HLA-DRB1*0101* vagy **0102*, a *HLA-DRB1*1402* és a *HLA-DRB1*1001*. A betegség SE-pozitív betegekben korábban kezdődik és sokkal nagyobb erozióval jár, mint SE-negatív egyéneknél. Ismerve az MHC-molekulák antigén prezentációban betöltött szerepét, az általános feltevés az arthritogén, saját eredetű peptid szelektív megkötését és prezentációját, vagy idegen antigének molekuláris mimikrijét, vagy pedig a T sejt repertoár szelekció szerepét tekinti alapjául. Nemrégiben kimutatták, hogy a SE egy potens immunstimulációs ligand is, amely egy nitrogén-oxid által mediált útvonalat aktivál más sejtekben, és a T sejt differenciációt a Th17-es típusú válasz felé tolja el.

6. Az aggregán T sejt epitóp feltérképezése

Egy korábbi epitóp feltérképező tanulmány során, a feltételezett T sejt epitópokat, összesen 143 szintetikus peptidet használva, 27 olyan peptidszekvenciát azonosítottunk, amelyek PG-vel immunizált BALB/c egerekben T sejt választ indukáltak. A T sejt epitópok közül 4 dominánsnak (vagy “arthritogén”-nek), míg a többi szubdominánsnak vagy rejtettnek bizonyult. A feltételezett T sejt epitópokat tartalmazó, 15 aminosav hosszúságú szintetikus peptideket önmagukban vagy más peptidekkel kombinálva használtuk BALB/c egerek hyperimmunizálásához (4x1-100 μ g peptid egerenként), porc PG-vel történő ko-immunizáláshoz, vagy olyan egerekben, amelyeket megelőzően porc PG-vel pre-immunizáltunk. Míg a porc PG-vel immunizált pozitív kontroll csoportban következetesen kialakult arthritis (95-100%), az immunizáláshoz bármely kombinációban használt peptidek egyike sem indukált betegséget, sőt, néhány peptid inkább immuntoleranciát okozott.

Mivel a szintetikus peptidekkel történő (hyper)immunizáció, beleértve az arthritogénnek nevezett peptideket is, nem indukált arthritist a megismételt kísérletekben sem, a negyedik (utolsó) peptid injekciót követően 4 héttel a peptiddel immunizált egereknek egyetlen dózis porc PG-t adtunk (100 μ g fehérje). Kiemelendő, hogy egyébként egyetlen injekció porc PG nem indukál arthritist, és az injekciót követő 2-3. héten csupán mérsékelt antitest termelés és T sejt válasz detektálható. Továbbra sem észleltünk arthritist a peptid-immunizált, majd PG-t kapott BALB/c egerekben, kivéve egyetlen csoportot, amelyet az ún. p135-ös peptiddel immunizáltunk. Tíz p135- (hyper)immunizált egér közül hatban 9-12 napon belül arthritis alakult ki, és négy pedig az egyetlen humán PG injekciót követő 3 héten belül arthritises lett.

A p135H (humán) peptidszekvencia (²³⁷³TTYKRRLQKRSSRHP) a PG C-terminális, szénhidrát oldalláncoktól mentes G3 doménjében található, és ezt a peptidet eredetileg inkább rejtettként, mint arthritogénként azonosítottuk. Érdekes módon, a p135H peptid nagyfokú szekvencia homológiát mutat gyakori, humán patogénekben található fehérjékkel (pl. számos bakteriális hősokkfehérjével), és az humán RA-ra hajlamosító *HLA-DR4* allélekben található leggyakoribb szekvencia motívummal (QKRAA), a “shared epitope”-pal.

CÉLKITŰZÉSEK

I. p135H-specifikus limfociták és T sejt hybridomák arthritis indukcióban betöltött szerepének vizsgálata

A tanulmány célja az volt, hogy tovább vizsgáljuk, vajon a p135H peptid által reprezentált T sejt epitóp közvetlen szerepet játszik-e a betegség patogenezisében, és hogy a háttérben rejlő pontos immunológiai mechanizmusokat feltárjuk.

Célkitűzéseink elérése érdekében a következő kísérleti tanulmányokat végeztük el:

1. p135-ös peptiddel történő (hyper)immunizációs kísérletek és limfociták peptiddel történő érzékenyítése (priming).
2. p135-reaktív T sejt hybridomák generálása.
3. Limfociták és T sejt hybridomák peptid-specifikusságának és antigén-specifikus citokin termelésének meghatározása.
4. A p135-specifikus limfociták és p135-reaktív T sejt hybridomák sejtfelszíni markereinek meghatározása.
5. A T sejt hybridomák MHC restrikciójának azonosítása.
6. A p135-ös peptid epitópmagjának és antigén tulajdonságáért felelős aminosav részeinek azonosítása.
7. A p135-ös peptid MHC-kötő komponenseinek meghatározása.
8. p135-reaktív T sejt hybridomák T sejt receptorainak azonosítása.
9. SCID egerekbe történő arthritis transzfer p135H-specifikus limfociták és p135H-reaktív T sejt hybridomák közvetítésével.

II. A dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA) adjuváns hatásának vizsgálata proteoglikán-indukált arthritisben (PGIA) és kollagén-indukált arthritisben (CIA)

PGIA-t és CIA-t indukáltunk standard immunizációs protokoll szerint komplett Freund adjuvánsban (CFA) emulzifikált porc PG-eket vagy humán II-es típusú kollagént (CII) használva, és összehasonlítottuk azzal a PGIA-val és CIA-val, amelyet olyan immunizációs protokoll alapján generáltunk, amelyben ugyanazokat az antigéneket DDA adjuvánssal adtunk be. A kísérletek során az immunizáló és saját PG-re és CII-re adott immunválaszt, az arthritis kezdeti időpontját, incidenciáját és súlyosságát vizsgáltuk.

Ebben a tanulmányban a következő kísérleteket végeztük el:

1. Antigén tulajdonsággal rendelkező alkotórészek izolálása különböző fajok porcából.
2. Különböző beltenyésztett egértörzsek immunizálása standard PG/CFA vagy CII/CFA protokoll szerint, illetve DDA adjuvánst használva.
3. Arthritis kezdeti időpontjának, incidenciájának és súlyosságának vizsgálata.
4. Antigén-specifikus T sejt válasz, antitest-és citokintermelés vizsgálata.
5. Sejtfelszíni markerek azonosítása.
6. Sejtizolálás és SCID egerekbe történő arthritis transzfer.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Antigén tulajdonságú komponensek porcból történő izolálása

A teljes porckivonatokat 4M-os guanidin-klorid extrakcióval nyertük újszülött és felnőtt humán és szarvasmarha ízületi porcból, szarvasmarha orrporcból, anyajuh és sertés ízületi porcból, csirke sternumporcból, újszülött egerek porcos vázszöveteiből és patkány chondrosarcomából. A porckivonatokat víz ellenében dializáltuk és liofilizáltuk (finomítatlan porckivonat), vagy tovább tisztítottuk ismételt cézium-klorid gradiens ultracentrifugálással, nagy tisztaságú porc proteoglikánok kinyerése érdekében. A tisztított porc PG-ket immunizációhoz deglikoziláltuk, vagy kezeletlenül hagytuk. A II-es típusú kollagént NaCl-dal 0.5 M-os ecetsavban 4°C-on egymást követő, ismételt precipitációval tisztítottuk.

2. Szintetikus peptidok

A humán aggregán magfehérje szekvenciáját (p135H) képviselő 15 aminosav hosszúságú peptidet, illetve más fajok, így egér, szarvasmarha, kutya és sertés ennek megfelelő szekvenciáit a Research Genetics szintetizálta (Carlsbad, CA). A p135-ös peptidok egy aminosavval eltolt variánsait, valamint egyetlen aminosav-szubsztituált (Ala vagy Gly) változatait a Chiron Mimotopes szintetizálta (Clayton, Victoria, Australia).

3. Állatok

A különböző törzsbe tartozó, különböző korú és nemű egerek a következő forrásokból származtak: National Cancer Institute (NCI; Frederick, MD), Charles River Laboratories (Kingston, NY, Raleigh, NY és Portage, MI), Harlan (Madison, WI), Taconic Farm (Germantown, NY) és The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Minden egeret ugyanabban a helységben tartottunk a Comparative Research Center-ben (Rush University, Chicago, IL). A BALB/c eredetű nőstény SCID egereket (NCI/NCrC.B-17-scid/scid) az NCI-től szereztük, csíramentes környezetben tartottuk, és ezen egereket használtuk arthritisz transzfer kísérletekhez.

4. Immunizációs protokollok

4.1. p135-ös peptid-(hyper)immunizációs kísérletek és limfociták peptiddel történő érzékenyítése (priming)

Nőstény BALB/c egereket intraperitoneálisan (i.p.) három, különböző dózisu p135-ös peptiddel komplett Freund adjuvánsban (CFA) oltottunk be (1.0 µg, 10 µg és 100 µg/injekció), majd a 21., 42. és 63. napon hasonló injekciókat adtunk, azzal a különbséggel, hogy itt a peptidet inkomplett Freund adjuvánsban (IFA) emulzifikáltuk. Mivel a negyedik injekciót követően sem alakult ki ízületi gyulladás, a 84. napon egyetlen dózis i.p. proteoglikánt is injektáltunk ezen egereknek (100 µg fehérje IFA-ban).

Nőstény BALB/c egerek talppárnájába egy alkalommal 100 µg humán p135-öt (p135H), vagy egér p135-öt (p135M) fecskendeztünk CFA-ban. Az egereket 9 nappal később feláldoztuk, és popliteális nyirokcsomóikat eltávolítottuk. A peptiddel érzékenyített nyirokcsomó sejteket 1%-os normál szingenikus egérszérumot és 5%-os magzati borjúszérumot tartalmazó Dulbecco által módosított Eagle mediumban tenyésztettük p135H vagy p135M jelenlétében (50 µg/ml). Az életképes limfocitákat 3 nappal később Lympholyte M-en (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) történő

grádiens centrifugálással izoláltuk, és további 1 napig IL-2 jelenlétében tenyésztettük. Ezen p135H- és p135M-specifikus, *in vitro*-restimulált limfocitákat SCID egerekbe történő sejtranszferhez vagy T sejt hybridoma generáláshoz szükséges fúzióhoz használtuk.

4.2. Adjuváns tanulmány: a DDA és CFA hatásának összehasonlítása

Különböző beltenyésztett törzsbe tartozó nőstény és hím egereket (12-16 hetes korúak), valamint azok F₁ hibridjeit használtuk a kiválasztott immunizációs protokollok összehasonlításához. Azokban a kísérletekben, ahol a különböző porc PG-k és/vagy finomítatlan porc kivonatok hatásait hasonlítottuk össze, különböző glikozidázokkal történő kezelésekkkel vagy anélkül, idősebb (a reprodukciós időszak csúcán túljutott) nőstény BALB/c egereket immunizáltunk.

Az egereket 100 µg deglikozilált porc PG-vel, finomítatlan porc kivonattal vagy humán porc CII-vel injektáltuk i.p. A DDA finom kationos liposzóma formáját (micella) 10 mg/ml DDA szuszpenzió (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) PBS-ben (pH 7.4) 56-63°C-on, 15–20 percig történő melegítésével, majd jégen való lehűtésével nyertük. Ezen micella formájú DDA-t azonos térfogatú antigénnel kevertük össze (1 mg CII/ml vagy 1 mg PG magfehérje/ml PBS), és az antigén/DDA micella emulziót (össz. 200 µl) i.p., szubkután (s.c.) vagy intradermálisan (i.d.) injektáltuk.

Négy fő állatsoportot kezeltünk az alábbi "standard" immunizációs protokollok egyike alapján. Az 1-es számú protokoll szerint (PG/CFA) 100 µl CFA-ban (Difco, Detroit, MI) emulzifikált 100 µg PG fehérje és 100 µl PBS keverékével i.p. injektáltunk a 0. napon. A 21. és 42. napon azonos dózisú PG-t IFA-ban (Difco) adtuk be i.p. A 2-es számú protokollban azonos antigén dózist, injektálási időpontokat és i.p. beadási módot alkalmaztunk, de az antigént (PG/PBS) 100 µl PBS-ben oldott 1 mg DDA micellával kevertük össze. A 3. protokollban 0.1M-os ecetsavban oldott 100 µg CII-t használtunk (1 mg CII/ml PBS), amelyből egyenlő térfogatú CFA-val emulziót készítettünk. Az emulziót (100 µg CII) ezt követően vagy i.p., vagy a faroktőbe i.d. adtuk be a 0. és 21. napokon. A 4-es számú protokollban azonos dózisú CII-t 100 µl DDA micellában alkalmaztunk i.p. vagy i.d.

5. Az arthritis értékelése

A p135-specifikus limfocitákkal vagy T sejt hybridomákkal transzferált egerek lábait naponta megvizsgáltuk. A DDA/CFA összehasonlítással kapcsolatos kísérletekben a 21. napig az egerek lábait hetente kétszer, majd ezt követően naponta vizsgáltuk. Az arthritis kezdeti időpontjának az első ízületi duzzanat megjelenését tekintettük. Duzzanaton és hyperaemián alapuló standard pontozási rendszert (0-4 pont/láb, max. 16 pont/állat) alkalmaztunk a betegség súlyosságának megítélésére. Az arthritises és nem-arthritises egerek végtagjait és gerincét kipreparáltuk, fixáltuk, dekalcifikáltuk, lemetsztük, és a szövetmetszeteket hematoxin-eozinnal festettük meg hisztopatológiai vizsgálat elvégzése céljából.

6. Sejtvonalak és tenyésztő médiumok

A BW5147.G.1.4 (TCRα/β+), A20 (H-2^d), CTLL-2 és EL-4.IL-2 sejtvonalakat az American Type Culture Collection-tól szereztük be (Manassas, VA). A tenyésztő médium minden sejttípus számára Dulbecco által módosított Eagle médium volt (DMEM), amely vagy hővel inaktivált (56°C, 30 perc) 10 %-os magzati borjúsérumot (FCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), vagy 1%-os gyűjtött egérsérumot tartalmazott. Minden tenyészetet 37°C-on 5%-os CO₂-tartalmú, párásított levegő környezetben tartottuk.

7. p135-reaktív T sejt hybridomák előállítása

A p135H vagy p135M peptid-specifikus limfocitákat a fent leírt módon generáltuk. Ezen limfocitákat BW5147.G.1.4 thymoma sejtekkel fuzionáltuk (máshol leírtak szerint). A fuzionált sejteket 96-lyukú lemezekbe helyeztük, és a hybridomákat hypoxanthin/aminopterin/thymidin (Sigma-Aldrich) és 15%-os FCS tartalmú médiumban szelektáltuk. A hibridek p135H és p135 M peptid-reaktivitását besugárzott (140 Gy) antigén-prezentáló sejt-ként szolgáló A20 limfómasejtekkel teszteltük. A peptid-reaktív T sejt hybridomákat lefagyasztottuk, és azon sejteket, amelyek megőrizték antigén (p135)-specifitásukat a második tesztelés után is, limitált hígítási módszerrel klónoztuk.

8. Antigén-specifikus sejtproliferáció, citokin szekréció és antitest termelés mérése

A lép- és nyirokcsomósejteket a kísérletek végén összegyűjtöttük. Az immunizált egerek szérumait az immunizációs időszakban (hetente 1-2x a retroorbitalis plexusból) és a kísérletek végén gyűjtöttük.

A sejtproliferáció vizsgálata céljából p135H- és p135M-érzékenyített nyirokcsomósejteket (3×10^5 sejt/lyuk), vagy T sejt hybridomákat (5×10^4 sejt/lyuk) tenyésztettünk p135H és p135M, vagy analóg peptidek jelenlétében (25–50 $\mu\text{g/ml}$) 36 órán keresztül. Antigén-prezentáló sejt-ként irradiált A20 B sejt limfómasejteket (10^5 sejt/lyuk) használtunk a T sejt hybridomák számára 25–50 $\mu\text{g/ml}$ p135H, p135M vagy analóg peptidek jelenlétében vagy hiányában.

Az adjuvánsokat összehasonlító tanulmányban az antigén-specifikus T sejt választ lépsejtekben vagy PG/adjuváns-érzékenyített nyirokcsomósejtekben (3×10^5 sejt/lyuk) 25 μg PG fehérje/ml vagy 25–50 μg CII jelenlétében mértük.

Mindkét tanulmányban az antigén-specifikus IL-2 termelést 2 napos felülűszóból mértük CTLL-2 bioassay alkalmazásával. Az eredményeket a peptid- vagy PG-stimulált sejtek percenkénti beütésszámát (cpm) elosztva a nem-stimulált sejtekével, stimulációs index formájában fejeztük ki.

Az antigén-specifikus IFN γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 és TNF α (BD Biosciences, San Diego, CA vagy R&D Systems, Minneapolis, MN) termelést négy napos sejttenyészet felülűszóból (3×10^6 sejt/ml) enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA) alkalmazásával a gyártó utasításai alapján mértük meg. Az immunizált állatok szérumában termelődött citokineket (IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 és TNF α) a kísérletek végén szintén ELISA-val mértük meg.

Az antigén-specifikus antitesteket ELISA-val kvantifikáltuk. Maxisorb immunlemezeket (Nunc, Roskilde, Dánia) humán vagy egér porc proteoglikánokkal (0.1 μg fehérje/lyuk) vontunk be, és a szabad kötőhelyeket 1%-os PBS-ben oldott zsírmentes tejjel blokkoltuk. A szérumokat növekvő hígításokban alkalmaztuk, és a teljes anti-PG antitesteket, valamint a PG-specifikus antitestek izotípusait határoztuk meg peroxidáz-konjugált, kecskében termelt anti-egér IgG (Accurate, Westbury, NY), vagy anti-egér IgG1 vagy IgG2 patkány monoklonális antitesteket (mAb) (Zymed, South San Francisco, CA) használva szekunder antitestként. A szérum antitest szinteket a megfelelő egér IgG-izotípus standardokhoz (Zymed) vagy egér szérum immunglobulin frakciókhoz (Sigma-Aldrich) hasonlítva számoltuk ki. A teljes szérum IgG frakciót ELISA segítségével, egér κ -lánc-specifikus peroxidáz-jelölt patkány mAb használatával határoztuk meg (BioSource, Camarillo, CA). A színreakciót ELISA leolvasóval 405 nm-en kvantifikáltuk (Coulter, Hialeah, FL).

9. Sejt felszíni markerek áramlási citometriával történő meghatározása

Röviden, vagy 10^6 , az immunizáció különböző időpontjaiban kinyert, nem-szeparált lépsejtet, antigén-érzékenyített egerek nyirokcsomó sejtjeit vagy peritoneális öblítőfolyadékból nyert sejteket fluorescein-isothiocyanattal vagy phycoerythrinrel jelölt, vagy biotinizált anti-CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD44 és CD69 (T sejt és T sejt aktivációs markerek), anti-T sejt receptor (TCR) α/β , TCR γ/δ és különböző TCR V_β láncok-ellenes mAb-val, anti-CD45/B220 mAb-val (B sejt marker), anti-CD68 vagy F4/80 (monocita/makrofág marker), anti-Gr-1 (myeloid sejt vonal marker) és anti-CD11c (aktivált dendritikus sejt marker) monoklonális antitestekkel inkubáltunk. Negatív kontrollként a megfelelő fluorescens festékkel jelölt izotípus kontroll antitesteket használtunk. A mintákat FACScan áramlási citométerben CellQuest software segítségével analizáltuk (Becton Dickinson, San Jose, CA).

10. p135-reaktív T sejt hybridomák MHC-restrikciója

A hybridoma sejteket A20 antigén-prezentáló sejtekkel p135H vagy p135M peptidek, és vagy anti-I-A^d (BD Pharmingen) vagy pedig anti-I-E^d (Cedarlane Laboratories) mAb-k (5–20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban) jelenlétében tenyésztettük. A mAb-k IL-2 termelésre gyakorolt hatását CTLL-2 bioassay-vel határoztuk meg. Izotípus kontroll antitesteket használtunk negatív kontrollként.

11. A p135-ös peptid epitópmagjának és antigenitásáért felelős aminosav-elemeinek meghatározása

Az MHC- és TCR-kötésért felelős kritikus peptidszekvenciák további karakterizálása céljából egy aminosavval eltöltött peptidet használtunk (p2367-2396), hogy meghatározzuk a p135H-specifikus H74/4 T sejt hybridoma által felismert minimális peptidhosszúságot. Ezt követően, a p135H egyetlen aminosav-szubsztituált (Ala vagy Gly) variánsait használtuk az antigenitásért felelős aminosavak azonosítására. Mindkét esetben, a H74/4 hybridoma sejteket a fent említett peptidekkel vagy azok nélkül tenyésztettük (20 $\mu\text{g/ml}$ vagy 40 $\mu\text{g/ml}$) irradiált A20 antigén-prezentáló sejtek jelenlétében, és a felülúszóban termelődött IL-2 szekréciót CTLL-2 assay-vel mértük meg.

12. A p135-ös peptid MHC-kötő elemeinek meghatározása

Minden peptid, beleértve azokat is, amelyek a H74/4 hybridoma sejteket nem stimulálták, MHC-kötő képességét teszteltük. A20 limfómasejteket (2×10^5) 2–4 μg biotinizált p135H-val vagy szintetikus egyetlen aminosav-szubsztituált p135H peptidvariánsokkal inkubáltunk 2 óráig 37°C -on 100 μl PBS-ben. Két mosás után (1%-os FCS-tartalmú PBS) a sejteket 1.5 μg streptavidin-R-phycoerythrinrel inkubáltuk 30 percig szobahőn. A sejteket ismételt mosás után FACSCalibur-on analizáltuk (Becton Dickinson). Az eredményeket geometriai átlagértékként fejeztük ki CellQuest Software segítségével (Becton Dickinson). Kompetitív gátláshoz nem-biotinizált identikus peptidszekvenciák hígítási sorozatát alkalmaztuk, illetve specificitás kontrollként nem-biotinizált anti-avidin IgG-t használtunk.

13. p135-reaktív T sejt hybridomák T sejt receptorainak azonosítása

Teljes celluláris RNS-t izoláltunk T sejt hybridomákból TRIzol reagens módszerrel használva a gyártó utasításai alapján (Invitrogen, Carlsbad, CA). Az egyes-szálú complement DNS-t (cDNS) 1 μg teljes RNS-ből, oligo(dT) primert és SuperScript reverz transzkriptáz kiegészítőt (Invitrogen) használva szintetizáltuk. A cDNS-t templátként használtuk a TCR V_α és V_β régió transzkriptumainak amplifikálásához. A T sejt

hybridomák ismeretlen V_{β} génjeinek amplifikáláshoz degenerált upstream primert (5'-ATGTACTGGTATCAGCAG-3') C_{β} downstream primerrel (5'-GCCAAGCACACGAGGGTAGCC-3') párosítottunk. A V_{α} gének amplifikálásához egy konszenzus upstream primert (5'-TGGTACNDVCAGCATCCYGGVGAAGGCC-3') használtunk egy C_{α} downstream primerrel (5'-AGCTTTCATGTCCAGCACAG-3'). 35 ciklus után (94°C 45 sec., 60°C 45 sec., 72°C 2 min.), a PCR termékeket Qiaex II gél-extrakciós kit (Qiagen, Valencia, CA) használatával 1.5%-os agarózgélből kinyertük és ABI 310 Genetic Analyzer-rel szekvenáltuk (Perkin Elmer).

14. Sejtizolálás és arthritis transzfer

14.1. Arthritis transzfer p135H-specifikus limfociták és p135H-reaktív T sejt hybridomák segítségével

Adoptív transzfer kísérletekhez SCID egereket szuboptimális mennyiségű (arthritis indukcióhoz elégtelen), akut arthritises BALB/c egerekből származó lépsejtekkel és PG antigénnel "előérzékenyítettünk". A nem-szeparált lépsejteket (4×10^6) szingenikus recipiens SCID egerekbe i.p., 100 μ g PG-vel adtuk be a 0. napon. Ezeket az "előérzékenyített" egereket alap kontrollcsoportnak tekintettük, és minden egyéb kísérleti csoportnál referenciaként használtuk.

Az első kísérleti csoport második injekciójaként a 7. napon 5×10^6 p135H-specifikus, p135H-érzékenyített BALB/c egerekből származó, *in vitro*-stimulált limfocitákat kapott 80 μ g p135H-val együtt. A második csoport irreleváns peptiddel (p130H: ¹⁵³⁰STLVEVVTASTASE) érzékenyített egerekből származó, *in vitro*-stimulált limfocitákat (5×10^6) kapott 80 μ g szintetikus p130H-val együtt. A p130H peptid a humán aggrekán magfehérjéjének glükózaminoglikán kapcsolódási régiójában elhelyezkedő rejtett T sejt epitópot tartalmaz, és negatív kontrollként szolgált. A harmadik kísérleti csoport a 7. napon (p135H-specifikus T sejt hybridomák alcsoportjai) 1×10^6 hybridomasejtet kapott i.v., 80 μ g p135H i.p. beadásával együtt. A pozitív kontrollcsoport a 7. napon egy második, akut arthritises BALB/c egerekből származó, 1×10^7 lépsejtet tartalmazó injekciót kapott i.p. Minden kísérletben legalább 5 SCID egeret használtunk csoportonként egymással párhuzamosan, majd a kísérleteket 3-5 alkalommal megismételtük.

14.2. Arthritis transzfer PG/CFA-val, illetve PG/DDA-val immunizált egerekből származó lépsejtek felhasználásával

Az egysejt-szuszenziókat arthritises BALB/c egerek lépéből készítettük. A donor egereket porc PG/CFA-val vagy PG/DDA-val immunizáltuk, ahogy azt fent az 1-es és 2-es számú protokollokban leírtuk. Minden transzfer kísérletben SCID egereknek a 0. napon 1.5×10^7 nem-szeparált lépsejtet adtunk i.p. 100 μ g porc PG-vel együtt, a 7. napon pedig 1×10^7 lépsejtet injektáltunk.

15. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist SPSS software (10.0.5 és 7.5 verzió, SPSS, Chicago, IL) alkalmazásával végeztük el. Mivel minden *in vitro* teszt eredménye normális eloszlást mutatott, Student-féle kétmintás *t*-próbát használtunk a p135 peptiddel kapcsolatos kísérletekben két csoport eredményeinek összehasonlítására. A szignifikancia szintet $P \leq 0.05$ -ra állítottuk. A DDA/CFA immunizációs kísérletekben a Mann-Whitney- és Wilcoxon-próbákat alkalmaztuk a csoportok közötti összehasonlításhoz. Mind az 5%-os, mind pedig az 1%-os szignifikancia szinteket használtuk.

EREDMÉNYEK

I. A p135-ös peptid-specifikus limfociták és T sejt hybridomák arthritis indukcióban betöltött szerepének vizsgálata

I.1. Egyetlen dózis porc proteoglikánnal kiváltott arthritis indukció p135H-immunizált BALB/c egerekben

Minden p135H-val vagy más fajok analóg aggregátum peptidjeivel immunizált BALB/c egérben egyetlen humán PG injekció beadását követően arthritis alakult ki. Az arthritis incidenciája és súlyossága különbözött, a p135M (egér) peptid injekciót kapott állatok csoportjában volt a legalacsonyabb. Mivel a p135H szekvencia a konzervált QKRSS motívumot tartalmazza, amely hasonlóságot mutat az RA-s betegek *HLA-DR*-jében jelenlévő "shared epitope"-pal (QKRAA), valamint az *Escherichia coli*-ban lévő DnaJ proteinnel, megváltoztatott szekvenciájú szintetikus p135-ös peptidanalógokat is használtunk. A konzervatív aminosav-helyettesítés (SS helyett AA) nem változtatta meg a p135H peptid arthritogénitását, és a "shared epitope"-ot tartalmazó DnaJ vagy *HLA-DR4* peptidek is képesek voltak BALB/c egerek arthritisre való "pre-szenzibilizálására". Ezen eredmények megerősítették, hogy a p135-ös szekvencia vagy a "shared epitope"-ot tartalmazó peptidek képesek érzékenyíteni BALB/c egereket, azonban egyik peptid-hyperimmunizált egérben sem alakult ki arthritis utólagos PG-injekció (egyetlen dózis) beadása nélkül.

I.2. p135H- és p135M-érzékenyített BALB/c egerek *in vitro* mutatott T sejt válaszai

Mivel minden szintetikus p135-ös peptid képes volt BALB/c egerek érzékenyítésére, a következő kérdés az volt, hogy vajon a p135H (humán)-specifikus T sejtek keresztreakálnak-e a p135M (egér/saját)-mel érzékenyített egerek T sejtjeivel. A p135M (egér) peptid képes volt BALB/c egerek érzékenyítésére, és mind a p135H, mind pedig a p135M által érzékenyített egerek limfocitái keresztreakciót mutattak különböző fajok analóg peptidjeivel. A porc PG azonban egyik p135 peptid-specifikus limfocitában sem váltott ki stimulációt, amely a p135-ös szekvenciában lévő T sejt epitóp rejtett jellegére utal. Ez nemcsak a p135H- és M-specifikus peptidekre volt igaz, hanem minden p135-ös peptidekre, az *E.coli* DnaJ-re és a p135H-AA szubsztituált analóg peptidekre is.

I.3. A p135H- és p135M-specifikus és *in vitro*-restimulált limfociták sejtfelszíni markerei és citokin szekréciója

A p135-ös peptid-specifikus limfociták többségben CD4⁺ (CD3⁺ sejtek 63%-ka) és TCR α/β ⁺ (70%) sejtek voltak. A CD3⁺ sejtek 16%-ka CD25⁺, és a T sejtek 30%-ka V β 8⁺ volt. A CD3⁺ T sejtek (73%) és CD45/B220⁺ B limfociták (25%) aránya a peptiddel érzékenyített nyirokcsomókban nagyon hasonló volt a p135H- és p135M-mel oltott egerekben. A peptid-specifikus CD4⁺ sejtek túlnyomó többségben Th1-es fenotípust mutattak, nagymennyiségű IFN- γ -t termelve, kétszer annyit a p135H-, mint a p135M-stimulált tenyészetben, míg IL-4 csak nyomokban volt kimutatható. A TNF- α tulajdonképpen nem volt detektálható, és peptid-specifikus IL-5 és IL-10 termelés csak a p135H-érzékenyített állatok nyirokcsomó tenyészeiben volt észlelhető. Ezen adatok összességében azt mutatják, hogy mind a saját és nem-saját p135-ös peptidszekvenciák képesek T sejt válasz kiváltására BALB/c egerekben, és e peptiddel történő érzékenyítés döntően Th1-es választ indukál.

I.4. SCID egerekben történő arthritis indukció p135H peptid-specifikus limfocitákkal

In vivo sejttranszfert használtunk aggregán epitóp-specifikus limfocita populációk arthritis-indukáló képességének meghatározására. A recipiens SCID egerek "prearthritises" állapotba hozatala, és az arthritis kifejlődéséhez szükséges idő csökkentése céljából, akut arthritises donor BALB/c egerek "szuboptimális" számú lépsejtjének (4×10^6) és egyetlen dózis (100 μ g) humán proteoglikán beadásával "előérzékenyítettük" az egereket. A recipiens SCID egerek preszenzitizációja különösen hasznosnak bizonyult, amikor a metasztatikus viselkedésű T sejt hybridomákat használtuk a transzfer kísérletek során. Azon SCID egereknél, amelyek csupán egyszer kaptak 4×10^6 nem-szeparált, akut arthritises BALB/c egerekből származó lépsejtet, a transzfert követő 2 héten belül nem alakult ki arthritis, és a későbbiek során is kevesebb, mint 50%-uk lett arthritises, nagyon alacsony súlyossági pontszámokkal. Ezen preszenzitizált SCID egereket tekintettük alap kontrollcsoportnak.

A kísérleti csoportok (kivéve az alap kontrollcsoportot) további, 5×10^6 peptid-érzékenyített, 3 napig a szintetikus peptiddel *in vitro*-restimulált nyirokcsomósejtet kaptak. A p135H peptid-specifikus limfociták minden preszenzitizált SCID egérben arthritis indukáltak viszonylag magas súlyossági pontszámokkal (közéérték \pm SD: 5.0 ± 2.2), hasonlóan azokhoz, amelyek akut arthritises BALB/c egerek 1×10^7 számú lépsejtjeit kapták (pozitív kontroll). Ellenben, az alap kontrollcsoportban lévő recipiens SCID egerek csupán 50%-ban alakult ki arthritis, enyhe és esetenként csak átmeneti formában (1.8 ± 0.8 súlyossági pontszámmal), hasonlóan az irreleváns peptid (p130)-specifikus és *in vitro*-restimulált limfocitákat kapott csoporthoz (62%-os incidencia és 2.4 ± 0.5 súlyossági pontszám). A transzfer kísérletek egyértelműen jelezték, hogy a p135-ös peptid képes limfociták aktiválására, és ezen sejtek egy adoptív transzfer rendszerben arthritist képesek indukálni. Az nem tisztázott, hogy csupán a peptiddel immunizált BALB/c egereknél miért nem alakult ki arthritis, de a p135H epitóp rejtett jellege lehet ennek valószínű oka.

I.5. A p135H-specifikus limfociták által adoptív módon transzferált arthritis hisztopatológiai jellegzetességei

A SCID egerek arthritises ízületeinek hisztopatológiai jelenségei hasonlóak, és tulajdonképpen megkülönböztethetetlenek voltak a proteoglikán-indukált arthritis primér vagy adoptív-transzferált formáitól. A mononukleáris sejtek synoviumban történő akkumulációja az első klinikai tünetek megjelenésével egyidőben megfigyelhetőek voltak. Néhány nappal később, a gyulladás (hyperaemia és duzzanat) progressziójával a limfociták még nagyobb számban voltak jelen a synoviumban és a periartikuláris ízületi kötőszövetben, és a proliferáló synoviális sejtek pannus-szerű struktúrát alkottak. Az ízületi rés megnagyobbodott a limfocitákban és neutrofilekben gazdag synoviális exsudátumnak köszönhetően. Az arthritis még inkább előrehaladott állapotában (arthritis kezdetétől számított $\sim 2-3$ hét), szubkondrális csonterozióval kísért ízületi porckárosodás volt megfigyelhető. Az alap kontrollcsoportban és az irreleváns peptid (p130)-specifikus limfocitákat kapott csoportban a 19. napig gyulladáshoz nem voltak észlelhetőek.

I.6. A p135-ös peptid-specifikus T sejt hybridomák jellegzetességei

A következő fontos lépés a p135-ös szekvencián belül lévő kritikus T sejt epitóp azonosítása, és a TCR- és MHC-kötőhelyek meghatározása volt. Ennek elérése céljából, p135-specifikus TCR-kat egyöntetűen és stabilan expresszáló T sejt hybridomákat generáltunk, p135H- és p135M-érzékenyített, *in vitro*-restimulált limfociták BW5147

thymoma sejtekkel történő fúziója révén. A stabil p135H- and p135M-specifikus hybridomákat többszörös klónozás során szelektáltuk. A p135H peptid-specifikus H74/4 elnevezésű hybridoma p135H-val történő stimulációra erős választ adott, és a szarvasmarha, kutya és sertés szekvenciákat kisebb válaszhintenzitás-beli különbségekkel felismerte. A H74/4 hybridoma felismerte továbbá a p135H-AA peptidváltozatot, amelyben a két szerint alaninre cseréltük a "shared epitope"-ban megtalálható szekvencia létrehozása céljából. Ezzel ellentétben, a p135M-specifikus M24/4 elnevezésű hybridoma nem mutatott keresztreakciót más fajok homológ szekvenciáival.

Míg mind a p135H- és p135M-specifikus hybridomák viszonylag nagymennyiségű IFN- γ -t és TNF- α -t termeltek a peptid-stimuláció hatására, a p135M-specifikus hybridomák szignifikáns mennyiségű IL-5-öt és IL-10-et is szekretáltak. Ezen különbség lehet annak oka, hogy a p135M-specifikus hybridomák miatt nem transzferáltak (indukáltak) arthritist SCID egerben.

Minden stabil T sejt hybridomát, beleértve a H74/4-et és M24/4-et is, *in vivo* teszteltünk arthritis indukáló képességének meghatározása céljából (hasonlóan a peptid-specifikus limfocitákhoz). Az egyetlen különbség az volt, hogy a T sejt hybridomákat a májat is érintő metasztatikus tulajdonságuk miatt intravénás úton injektáltuk (i.p. helyett). A p135H-reaktív T sejt hybridomák (a H74/4 szerepelt prototípusként a részletesebb karakterizálás során) következetes módon arthritist indukáltak preszenzitizált SCID egerekben, habár a betegség incidenciája és súlyossága alacsonyabb (70%-os incidencia; 4.29 ± 3.2 súlyossági pontszám) volt ezen állatokban, mint a p135H-specifikus *in vitro*-stimulált limfocitákat, vagy arthritises donor BALB/c egerekből származó PG-stimulált limfocitákat kapott egerekben.

A H74/4 T sejt hybridoma CD4⁺ volt, nagymennyiségű TCR α/β /CD3 komplex és döntően V β 10 és V α 1.2 transzkriptum expresszióval. Szignifikáns mennyiségű IL-2, TNF- α és IFN- γ -t szekretált p135H-stimuláció során, IL-4-t azonban nem termelt, jelezvén a Th1-es alcsoportozású tartozását. A p135H peptid felismerése MHC II-es osztályhoz kötött volt. A p135H peptid az I-E^d molekulához kapcsolatosan prezentálódik, mivel az I-E^d elleni monoklonális antitest teljesen gátolta a H74/4-es hybridoma p135-specifikus IL-2 szekrécióját.

I.7. A p135H peptid T sejt hybridoma (H74/4) által történő felismerésben kritikus magszekvenciájának meghatározása

Hogy meghatározzuk az arthritogén H74/4 T sejt hybridoma által felismert pontos epitóp-szekvenciát, első lépésben azonosítottuk azt a minimális peptidmagot, amely szükséges a hybridoma stimulálásához. Ehhez egy aminosavval elcsúsztatott átfedő peptideket használtunk (p2367–2396). Antigén-prezentáló sejt-ként egy rágszáló B sejt-es limfómavonalat (A20) használtunk, és az IL-2 termelést CTLL-2 bioassay-vel határoztuk meg. A kapott eredmények alapján a T sejt hybridoma aktiválásához szükséges minimális szekvenciának a 2374–2382 pozíciójú aminosavakat (TYKRRLQKR) magában foglaló peptidmag bizonyult.

I.8. Egyetlen aminosavval szubsztituált peptidek stimulációs aktivitásának vizsgálata

A p135H peptid magszekvenciájában lévő aminosavak funkcionális szerepének tanulmányozása céljából, egyetlen aminosavval szubsztituált analóg peptidek stimulációs aktivitását teszteltük a H74/4 T sejt hybridomán. A P1, P7 és P9 pozíciókban lévő aminosav-szubsztitúcióknak (Ala vagy Gly), az eredeti peptiddel összehasonlítva, nem volt hatása a stimulációs aktivitásra. A P2-P6 és P8 pozíciókban

lévő aminosav-szubsztitúciók azonban teljesen eltörölték a T sejt választ, jelezvén, hogy ezen aminosavak kritikusak a T sejt hybridoma által történő felismerésben.

I.9. A p135H peptid I-E^d-kötő aminosavainak meghatározása

Az A20 antigén-prezentáló sejteken lévő I-E^d molekulákkal történő interakcióért felelős aminosavak azonosítása céljából, egyetlen aminosavval szubsztituált (Ala vagy Gly) peptidanalógok I-E^d-kötő képességét vizsgáltuk áramlási citometria segítségével. Négy szubsztitúció vezetett lényeges csökkenéshez az I-E^d molekulához történő kötődést illetően. Ezek többnyire bázikus aminosavak voltak a P2 (Tyr), P3 (Lys), P4 (Arg) és P5 (Arg) pozíciókban. A p135H-ban lévő pozitív töltésű aminosavak feltehetően az E^d β -lánc 114 (Glu) és 155 (Asp) helyein lévő negatív aminosavakkal állnak interakcióban. A P1, P7 és P9 szubsztitúciók kivételével, amelyeknek nem volt értékelhető hatása a T sejt stimulációra, minden más aminosavnak (P2 [Tyr], P3 [Lys], P6 [Leu] és P8 [Lys]) feltehetően a TCR általi felismerésben volt szerepe.

II. A dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA) adjuváns hatásának vizsgálata proteoglikán-indukált arthritisben (PGIA) és kollagén-indukált arthritisben (CIA)

II.1. A PGIA incidenciája és súlyossága arthritisre fogékony BALB/c és C3H kolóniákban

Egy csoportban, amely proteoglikánt DDA-ban beadva kapott i.p. (PG/DDA), szignifikánsan előbb és sokkal súlyosabb formában jelent meg az arthritis, mint azokban a BALB/c egerekben, amelyek ugyanolyan dózisu PG-t kaptak komplett és inkomplett Freund adjuvánsban (PG/CFA).

A PGIA genetikailag fogékony BALB/c vagy C3H törzsekben indukálható csupán, de mivel a betegség súlyossága és a fogékonyság változó lehet még ugyanazon rágcsálótörzs különböző kolóniái között is, összehasonlítottuk a fő klinikai paramétereket (arthritis kezdete, incidenciája és súlyossága) a kereskedelmileg elérhető BALB/c és C3H kolóniákban.

Habár minden BALB/c egerben és a legfogékonyabb C3H kolóniákban PG/DDA immunizálást követően egyöntetűen 100% volt az arthritis incidenciája a 9-10. hétre, a végső arthritis súlyossági pontszámokat illetően szignifikáns különbség mutatkozott a BALB/c egerek (arthritis pontszám: 11.6 ± 1.6) és a legfogékonyabb C3H kolóniák között (arthritis pontszám: 7.2 ± 2.1).

II.2. Beltenyésztett rágcsálótörzsek proteoglikán-indukált arthritisre való fogékonysága

A PGIA-ra való fogékonyságot mind MHC- és nem-MHC-gének határozzák meg, és a fogékony BALB/c (H-2^d) és C3H (H-2^k) törzsek különböző kolóniái variabilitást mutatnak a PGIA incidenciája és súlyossága tekintetében. Ezért a következő nyilvánvaló kérdés az volt, hogy vajon ugyanazzal (H-2^d vagy H-2^k), vagy különböző haplotípussal rendelkező más beltenyésztett rágcsálótörzsekben kialakul-e PGIA PG/DDA immunizálást követően.

Míg minden rágcsálótörzs, tekintet nélkül H-2 haplotípusukra vagy genetikai hátterükre, jó immunválaszt mutatott PG/DDA immunizálásra, a BALB/c és C3H törzseken kívül más PGIA-ra fogékony törzset nem találtunk. Ez igen érdekes volt, mivel számos rágcsálótörzs ugyanazon II-es osztályú alléleket hordozta (H-2^d vagy H-2^k haplotípus), és PG-immunizálásra a fogékony BALB/c és C3H kolóniákhoz hasonló, vagy esetenként annál erőteljesebb T- és B-sejtes választ mutattak.

II.3. DDA-val és különböző fajkból izolált proteoglikánokkal történő immunizálás arthritogén hatásának vizsgálata

Korábbi tanulmányok során különböző fajok porc PG-jét teszteltük BALB/c egerekben adjuvánsként CFA-t használva, arthritis-indukáló képességük meghatározása céljából. A magzati humán és sertés porcból, valamint a felnőtt humán és kutya porcból nyert PG-k voltak az egyetlenek, amelyek képesek voltak BALB/c egerekben arthritis indukcióra, glükózaminoglikán oldalláncok eltávolítását követően. Más fajok porc PG-je Freund adjuvánsokkal beadva BALB/c egerekben nem indukált arthritis, vagy csak enyhe és átmeneti gyulladást nagyon alacsony incidenciával (<10%).

Adjuvánsként DDA-t használva néhány, különböző fajból származó PG-t újratesteltünk. Váratlan módon, magzati és felnőtt szarvasmarha, valamint felnőtt sertés és juh porc PG-k ugyanolyan arthritogénnek bizonyultak, mint az újszülött vagy felnőtt porcból származó PG-k, ha adjuvánsként DDA-t használtunk. Továbbá, az osteoarthritis porcból származó finomítatlan porckivonat is kitűnő arthritogén anyagnak bizonyult, ha a kondroitin- és keratán-szulfát oldalláncokat eltávolítottuk; ugyanolyan hatásos volt, mint a nagytisztaságú humán porc PG. Tehát, a lipofil DDA adjuvánst használva, a Freund adjuvánssal csekély arthritogenitást mutató PG-k is arthritist voltak képesek indukálni BALB/c egértörzsben, maximum incidenciával és magas súlyossági pontszámokkal.

II.4. PGIA-ra fogékony egerek perifériás ízületeinek és gerincének hisztopatológiai jellegzetességei

A PG/DDA-val immunizált egerekben a klinikai pontszámok jól megfeleltek a hisztopatológiai abnormalitásoknak a perifériás kisízületekben, hasonlóan a "klasszikus" PG/CFA által indukált PGIA formához.

Jelentős különbség volt, hogy a synoviális gyulladással egyidőben masszív spondylitis volt észlelhető minden PG/DDA-val immunizált arthritises BALB/c egérben. Ez különösen szokatlan volt, mert a spondylitis típusosan a perifériás ízületek gyulladását követően 2-4 hónappal jelenik meg PG/CFA-val immunizált BALB/c egerekben.

II.5. A DDA hatásmechanizmusa adjuvánsként

A PG/CFA- vagy PG/DDA-immunizált BALB/c egerekben a humán PG-re adott T- és B-sejtes immunválasz összesített eredménye nagymértékben hasonló volt, és a pro-inflammatorikus citokinek szérumszintjei még kifejezettebbek voltak a PG/CFA-immunizált állatokban, mint azokban amelyeket PG/DDA-val injektáltunk.

A PG- vagy II-es típusú kollagén (CII)-ellenes szérum antitest szintek hasonlóak, vagy alacsonyabbak voltak a DDA-t kapott csoportokban. Jelentős különbséget találtunk azonban a két különböző adjuvánssal injektált csoportok között az antigén-specifikus IgG1:IgG2a és IFN- γ :IL-4 arányok tekintetében. Míg a DDA és CFA T sejt válaszra gyakorolt összesített hatása nagymértékben hasonló volt, a PG-érzékenyített lépsejtek vagy nyirokcsomósejtek antigén (PG)-specifikus citokintermelése szignifikánsan különbözött, és egyértelműen a Th1-es típusú immunválasz felé tolódott azon csoportokban, ahol DDA-t használtunk adjuvánsként.

Hogy betekintést nyerjünk a DDA lokálisan gyakorolt hatásmechanizmusába, és megértsük, hogy a DDA miért támogatja erőteljesebben a PGIA-t, BALB/c egereket intraperitoneálisan injektáltunk PBS-sel, PBS/IFA-val, PBS/CFA-val vagy PBS/DDA-val, porc PG-vel vagy anélkül. A peritoneális mosófolyadékából és a lépből sejteket nyertünk ki az első injekciót követően 6 és 12 órával, majd a 9. napig 24 óránként, a 14. és 21. napon, valamint 9 nappal a második vagy harmadik injekció után. Amint várható volt, a sejtszám szignifikánsan magasabb volt, és 24-48 óra után érte el a maximumot az

adjuvánsokat kapott csoportokban, a PBS- vagy PG/PBS-injekciókat kapott csoportokhoz képest, és ezek a szintek soha nem tértek vissza a normál állapotra. A beáramlott sejtek döntően neutrofil granulociták voltak (70-85%), és a neutrofilek aránya minden vizsgált időpontban következetesen a CFA-injektált csoportokban volt a legmagasabb. A DDA-val injektált csoportok peritoneális mosófolyadékjában a sejtszám a CFA-injektált állatok sejtszámának kb. kétharmada-egyharmada volt a 9-14. napon. Ezen csoportokban (DDA) a sejtek szinte kizárólag F4/80⁺ makrofágok (közéérték ± SD: 79 ± 11%) és CD3⁺ T sejtek (7.0 ± 2.6%) voltak, és a CD4⁺ sejtek több, mint 60%-ka aktivált állapotban volt (CD4⁺/CD69⁺). Továbbá, a peritoneális mosófolyadékban lévő CD11c⁺ aránya és teljes száma (dendritikus sejtek) a legmagasabb a PG/DDA-injektált csoportban volt.

II.6. DDA alkalmazása kollagén-indukált arthritisben (CIA)

A CIA kezdete nagyfokban hasonló volt a DBA/1 egerek különböző csoportjaiban, de 100 %-os incidencia csak a CII/DDA-immunizált egerekben volt észlelhető a 2. injekció után, a CII/CFA-val injektált állatokhoz képest szignifikánsan magasabb arthritis pontszámmal. Az immunizáció módja (intradermális versus intraperitoneális) azonban az arthritis indukció kritikus komponense volt; az incidencia csupán 60%-ot ért el még a harmadik i.p. CII injekciót követően is, függetlenül attól, hogy CFA-t vagy DDA-t használtunk adjuvánsként. Megjegyzendő, hogy bár mindkét egértörzs (BALB/c és DBA/1) immunválaszt mutatott humán PG vagy CII-vel történő immunizálásra, a DBA/1 egerekben nem alakult ki arthritis PG/DDA immunizálás után, és a BALB/c egerek sem mutatták az arthritis jeleit CII/CFA vagy CII/DDA-immunizálást követően.

A LEGFONTOSABB SAJÁT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. A p135-ös peptid-specifikus limfociták és T sejt hybridomák arthritis indukcióban betöltött szerepének vizsgálata

1. A humán porc proteoglikán (aggregán) T sejt epitóp feltérképezését követően, a humán aggregán G3 doménjében elhelyezkedő, és a "shared epitope"-pal (QKRAA) nagyfokban homológ szekvencia-motívumot tartalmazó p135H elnevezésű peptid (²³⁷³TTYKRRLQKRSSRHP) BALB/c egerekben egyetlen porc proteoglikán injekciót követően arthritist indukált. Megjegyzendő, hogy egyetlen injekció porc proteoglikán (PG) önmagában arthritist nem képes létrehozni.

2. A p135H (humán) peptid-specifikus T sejtek keresztreakciót mutattak a p135M (egér)-specifikus T sejtekkel. A porc PG azonban egyik p135-érzékenyített limfocita stimulációjára sem volt képes, jelezve a p135-ös szekvenciában lévő T sejt epitóp rejtett jellegét.

3. A p135-ös peptid-specifikus nyirokcsomósejtek többnyire CD4⁺ és TCRα/β⁺-ak voltak, és nagymennyiségben termeltek IFN-γ-t, jelezve, hogy mind a saját és nem-saját p135-ös peptidszekvenciák T sejtet választ váltanak ki BALB/c egerekben, és e peptidekkel történő érzékenyítés döntően Th1-es típusú választ indukál.

4. Adoptív transzfer rendszert használva, a p135H-specifikus limfociták arthritist indukáltak "pre-szenzitizált" SCID egerekben, viszonylag magas incidenciával és súlyossági pontszámokkal. A SCID egerek arthritises ízületeinek hisztopatológiai jelenségei megkülönböztethetetlenek voltak a proteoglikán-indukált arthritis primér és adoptív-transzferált formáitól. Nem tisztázott, hogy a p135H-(hyper)immunizált

BALB/c egerekben miért nem alakult ki arthritis korábban, de valószínű, hogy a p135H epitóp rejtett jellege lehet ennek oka.

5. Egy p135H peptid-specifikus T sejt hybridomát (H74/4) alkalmazva meghatároztuk a p135H finomabb epitóp szerkezetét. A 2374–2382 lokalizációjú aminosavakat (TYKRRLQKR) határoztuk meg a peptid magrégiójaként. A p135H-specifikus H74/4-es hybridoma általi felismerése MHC II-höz kötött volt, mivel a p135H-t I-E^d molekulák prezentálták. Centrálisan elhelyezkedő bázikus aminosavak a P2 (Tyr), P3 (Lys), P4 (Arg) és P5 (Arg) pozíciókban bizonyultak felelősnek a p135 I-E^d-hez történő kötődéséért, míg a P2 (Tyr), P3 (Lys), P6 (Leu) és P8 (Lys) elhelyezkedésű aminosavak a T sejt receptor által történő felismerésben játszottak szerepet. A p135-reaktív T sejt hybridoma a Th1-es alcsoportozathoz tartozott, és következetesen arthritist indukált “pre-szenzitizált” SCID egerekben, bár a betegség incidenciája és súlyossága alacsonyabb volt, mint a p135H-érzékenyített és *in vitro*-restimulált limfociták által indukált esetben.

II. A dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA) és komplett Freund adjuváns (CFA) adjuváns hatásának összehasonlítása proteoglikán-indukált arthritisben és kollagén-indukált arthritisben

1. Az összesített immunválasz (antitest termelés és antigén-specifikus T sejt válasz) nagyfokban hasonló volt, ha CFA-t, illetve DDA-t használtunk adjuvánsként humán porc proteoglikán beadásánál. Az értékelhető különbségek az alábbiak voltak:

2. A PG/CFA-val immunizált egerekben szignifikánsan magasabb szérum pro-inflammatorikus citokinszinteket és PG-specifikus IgG1 szinteket mértünk, azonban az IgG2a szint nem volt magasabb.

3. A PG/DDA-val immunizált egerekben magasabb antigén-specifikus IFN- γ :IL-4 arányt, és szignifikánsan alacsonyabb IgG1:IgG2a arányt észleltünk, mint a PG/CFA-immunizált egerekben, jelezve a Th1/Th2 arány kifejezett eltolódását egy Th1-es típusú immunválasz felé a PG/DDA-val injektált egerekben.

4. A PG/DDA-érzékenyített nyirokcsomósejtjeiben igen magas volt az aktivált CD3⁺, CD44^{High} sejtek aránya; az arthritises egerek lépsejtjeiben (de nyirokcsomósejtjeiben nem) a CD4⁺ sejtek megnövekedett aránya volt megfigyelhető a CD8⁺ sejtekhez képest; továbbá szignifikánsan nagyobb számú CD4⁺/CD69⁺ sejtet észleltünk a PG/DDA-immunizált BALB/c egerek peritoneális folyadékjában.

5. A DDA-t kapott állatokban legalább 2-4-szeres volt a intraperitoneális térbe beáramló makrofágok száma, nagyobb számú CD11c⁺ dendritikus sejtrel, de szignifikánsan kevesebb polimorfonukleáris sejtrel kísért.

6. A DDA használata egy súlyosabb formájú és magasabb incidenciájú arthritis kialakulását segítette elő, valamint szuboptimális dózisu porc proteoglikán és II-es típusú kollagén antigének, és szuboptimális arthritogén hatású PG-k (CFA használathoz viszonyítva) is képesek voltak arthritis indukcióra a natív immunitás erőteljesebb aktiválása révén.

MEGBESZÉLÉS

A proteoglikánról (aggrekán) kimutatták, hogy genetikailag fogékony BALB/c egerekben progresszív polyarthritist indukál. Habár a háttérben rejlő mechanizmusok még nem teljes mértékben tisztázottak, a T sejtek, különösen a CD4⁺ limfociták nélkülözhetetlen szerepet játszanak a betegség iniciációjában. Korábbi tanulmányunk számos T sejt epitópot tárt fel a humán aggrekán magfehérje részében, amelyek többsége a kisebb fokban glikozilált G1 doménben helyezkedett el. Érdekes módon, egy, a humán proteoglikán C-terminális részén lévő G3 doménben elhelyezkedő epitópnak, úgy tűnt, szerepe van az arthritis indukcióban. BALB/c egerek hyperimmunizációja ezen, ²³⁷³TTYKRRLQKRSSRHP szekvenciájú szintetikus peptiddel (p135H) progresszív polyarthritist indukált, ha azt egyetlen dózis porc proteoglikán injekció beadása követte. Megjegyzendő, hogy egyetlen injekció porc proteoglikán nem képes önmagában arthritis indukcióra.

A p135H (humán) peptid által reprezentált T sejt epitóp betegség patogenezisben játszott közvetlen szerepének további vizsgálata céljából, p135H-érzékenyített BALB/c egerekből származó p135H-stimulált limfocitákat transzferáltunk SCID egerekbe. Az adoptív transzferált arthritis SCID egerekben mind a klinikai megjelenést, mind a hisztopatológiai jelenségeket illetően a proteoglikán-indukált arthritissel sok hasonlóságot mutatott, úgymint a synoviális membránban zajló limfocita/limfoblaszt proliferáció, pannus képződés, synoviális hiperplázia, és az ízületi porc és szubkondrális csont eroziója. A sejtfelszíni markerek expressziója és antigén (p135H)-indukált citokinprofil alapján a p135H-specifikus limfociták döntő többsége a Th1-es alcsoporthoz tartozott. Ezen sejtek *in vitro* keresztreakciót mutattak a humán, szarvasmarha, kutya és sertés, csakúgy, mint az egér (saját) szóban forgó (p135) peptidszekvenciáival. A humán és egér szekvenciák között lévő reakció egy nagyfokú epitóp "szóródást" ("spreading") jelez, mely a BALB/c egerekben kialakuló arthritis immunpatológiai alapját képezheti.

A p135H (humán)- és p135M (egér)-specifikus T sejtek további karakterizálása céljából p135H- és p135M-specifikus T sejt hybridomákat generáltunk, és a TCR- és MHC-kötőhelyek finomabb epitóp-specifitásának meghatározására használtuk őket. Míg a p135H- vagy p135M-specifikus limfociták más fajból származó p135-ös peptidekkel keresztreakciót mutattak, csak kevés p135H-specifikus hybridoma transzferált arthritist "pre-szenzitizált" SCID egerekbe, míg a p135M (egér)-specifikus T sejtekből származó hybridomák nem voltak képesek gyulladás indukálására. Ez a T sejt hybridomák peptidstimulációra bekövetkező különböző citokinprofiljával és/vagy különböző epitóp-specifitásával magyarázható. Míg a p135-ös peptidszekvencia lehetővé teszi a keresztreakciót a humán és egér T sejt populációk között, az individuális hybridomák epitóp-specifitása szigorúan egyetlen peptidszekvenciára korlátozódik. Tulajdonképpen, minden, ebben a tanulmányban előállított p135H-specifikus hybridoma ugyanazt a magszekvenciát és TCR-kötőhelyet ismerte fel.

Különleges jellegzetessége ennek a T sejt epitópnak, hogy a p135H tartalmaz egy konzervált aminosav-szekvenciát (QKRSS), amely feltűnő hasonlóságot mutat a "shared epitope"-pal (QKRAA). A "shared epitope" és analóg szekvenciák konzervatív helyettesítéssel (QK/RRA/SA/S) nagyszámban megtalálhatók protein adatbázisokban, sugallva, hogy ez a szekvencia motívum meglehetősen ubiquitaer funkcióval bír. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy rheumatoid arthritissel (RA) asszociált bizonyos HLA-allélek (pl. *HLA-DR4/Dw4* és *DR9*) harmadik hypervariábilis régiójában jelen van ez az 5-aminósav hosszúságú motívum, és ezen "shared epitope" jelenléte progresszív és destruktív betegség kimenetelt jelezhet. HLA-ból származó, a "shared

epitope”-ot magukban hordozó peptidek random módon szelektálhatnak T sejteket, amelyek a saját eredetű peptidet alacsony affinitással kötik. Később az élet során, ezek a korábban nyugvó QKRAA-specifikus T sejtek aktiválódhatnak, “shared epitope”-ot tartalmazó exogén peptidek magas affinitással történő megkötése által.

Nemrégiben vált ismertté, hogy a “shared epitope” potens immunstimulációs ligandként is működik, amely más sejtekben (pl. dendritikus sejtekben) NO-mediált utat aktivál, és a T sejt differenciálódást az autoimmun betegségek, így az RA patogenezisében is szerepet játszó T sejt alcsoport, a Th17-es sejtek irányába polarizálja.

Érdekes módon, gyakori humán kórokozókban található fehérjék, mint az *Escherichia coli* (DnaJ hősokkfehérje), *Lactobacillus lactis* és *Brucella ovis* (DnaJ hősokkfehérje), és Epstein-Barr vírus (gp110 fehérje) is expresszálják nagyfokban immunogén fehérjékben a “shared epitope”-ot, és számos, ezen antigénekre adott immunválasz detektálható RA-ban szenvedő betegekben. Ezenkívül, adatbázisban történő keresés feltárta, hogy a p135H peptid nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat (76%; TTYKRR—RSSR) a humán JC polyomavírus VP3 kapszidproteinjével; ezen vírus széleskörűen elterjedt a humán populációban, és a progresszív multifokális leukoencephalopathia etiológiai tényezője. A vírus a gyermekeket tünet nélkül betegíti meg, majd látens jelen van a vesékben, tonsillákban és központi idegrendszerben, és jelentős T sejt dysfunkciót okozva reaktiválódhat a későbbiekben. Ezek a szekvencia adatok azt sugallják, hogy immunológiai keresztreakció létezik bizonyos RA-asszociált HLA-allélek, a fent nevezett humán kórokozók immunogén fehérjéi és a humán porc proteoglikán p135H elnevezésű T sejt epitópja között. A p135H peptid és a “shared epitope”-ot tartalmazó változata, a p135H-AA között valóban nagyfokú keresztreaktivitást észleltünk.

Az immunrendszer időnkénti, nyálkahártyákon át történő expozíciója ezekkel a bakteriális vagy virális antigénekkal, a nyugvó QKRAA-specifikus T sejtek aktivációjához vezethet, majd ez a T sejt aktiváció állandósulhat a “shared epitope”-ot tartalmazó saját eredetű peptidekkel történő találkozás révén. Hogy ezen limfociták miért vándorolnak a perifériás ízületekbe, nyitott kérdés marad, és az ízületi célponttal bíró patogén autoimmun folyamatot még részben homály fedi. Vonzó feltételezés azonban, hogy a humán porc proteoglikánban lévő p135H szekvencia a “shared epitope” homológjaként szolgálhat, a QKRAA-reaktív T limfociták ízület-specifikus “homing”-jáért lehet felelős, és részt vehet az RA-ban zajló autoimmun folyamatok iniciációjában (ld. az ábrát).

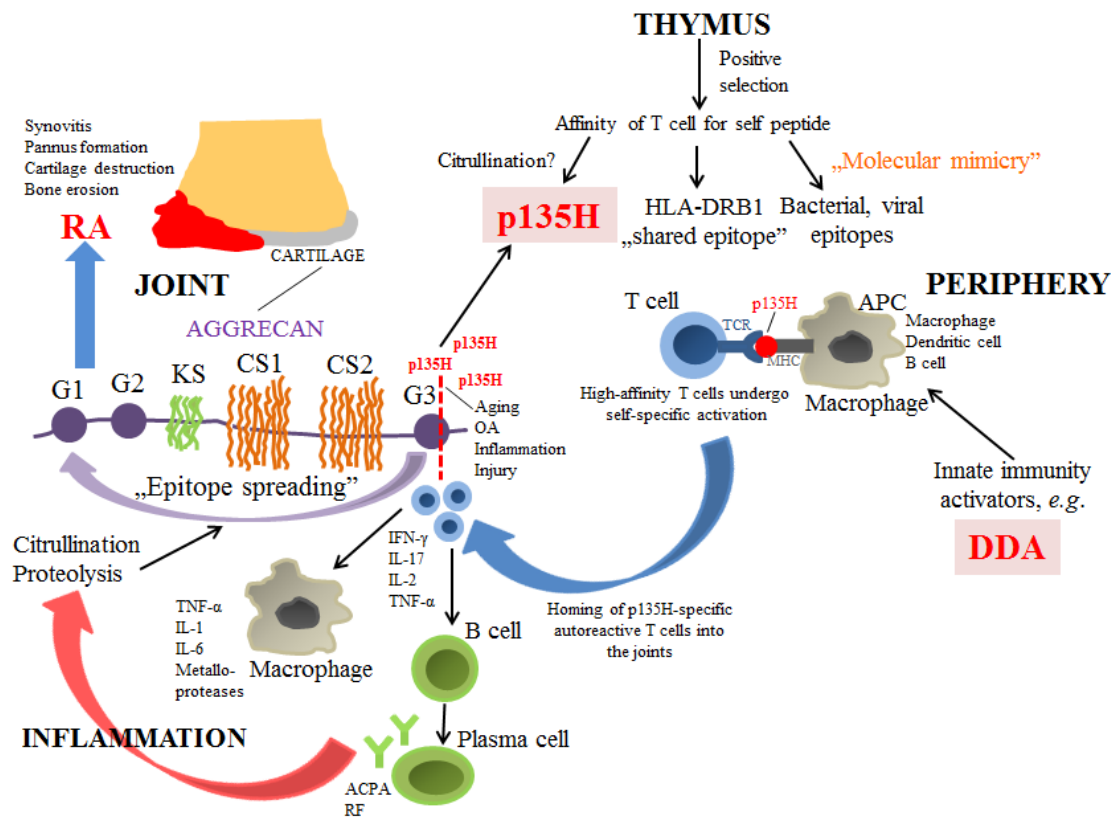
Az arthritishez társult porcdegradáció fő jelensége az aggregáncvesztés. Az aggregánc G3 doménjének öregedéssel összefüggő elvesztése is ismert azonban; a G3 domén 92%-ka elveszik a normális proteoglikán turnover során, míg a molekula maradék, hialuronsavhoz kötött része a porcban marad. Az aggregánc C-terminális farka hasítódik le először, és a konszenzus szekvenciák két, egymás után elhelyezkedő részlete (RRXXK és RXXR) involvált a legkorábbi hasításban. Érdekes módon, mindkét leírt hasítási hely a p135H peptiden belül található (TTYKRRXXKRXXRHP). Így tehát a normális turnover vagy a G3 domén megnövekedett proteolitikus folyamatai következtében (pl. gyulladás vagy porcsérülés miatt) szignifikáns mennyiségű p135H válhat szabaddá az ízületi porcból, hogy azután az ízületben az immunrendszer számára exponálódjon (ld. az ábrát).

Mivel a p135H peptid nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat a “shared epitope”-pal, molekuláris mimikri alapját képezheti. A G3 doménben lévő p135H peptidet a QKRAA-specifikus T sejtek felismerhetik, amelyek az ízületbe migrálva, és ott lokálisan szaporodva, hozzájárulhatnak az arthritis kifejlődéséhez. Ezért feltételezzük, hogy a G3 domén C-terminális része szerepet játszik a T sejtek kezdeti aktivációjában,

majd később a molekula többi része, beleértve a G1 domént, válik fő célponttá. Ezt a folyamatot “epitóp szóródásként” (epitope spreading) értelmezhetjük, vagyis az autoimmun gyulladás során neo-epitópok keletkezhetnek, pl. a molekula más részeinek citrullinációja révén, amelyek ezt követően az autoimmun folyamat további célpontjaivá válnak; vagy a megnövekedett proteolitikus aktivitás révén, melynek során más epitópok is exponálódnak az immunrendszer számára (ld az ábrát).

Ebben a tanulmányban kísérletet tettünk a humán proteoglikán G3 doménjének C-terminális régiójában lévő T sejt epitóp, a p135H peptid szerepének további vizsgálatára egy kísérletes állatmodellben. A humán és egér aminosav-szekvenciák közötti különbség, és az epitóp rejtett jellege ellenére, képesek voltunk kimutatni, hogy a p135H peptid-specifikus limfociták “pre-szenzitizált” SCID egerekbe történő transzfere arthritis gyors kialakulásához vezetett. Tehát, közvetlen bizonyítékunk van rá, hogy a p135H peptid olyan arthritogén epitópot tartalmaz, melyet az egerek T sejtjei képesek felismerni, és amely ezeket a sejteket a homológ egér peptidszekvenciát tartalmazó ízületekbe vonzza, így indukálva arthritist.

Ezt megelőzően, azt feltételezték, hogy minden arthritogén epitóp az aggregán molekula G1 doménjében található. Tisztított G1 domén önmagában, vagy G1 epitóp-specifikus T sejt vonalak BALB/c egerekben képesek voltak arthritist indukálni, továbbá RA-ban szenvedő betegek celluláris és humorális immunválaszt mutatnak a porc proteoglikán aggregán G1 doménjével szemben. Tudomásunk szerint, ez az első, a G3 doménben elhelyezkedő epitópra specifikus T sejtek által indukált arthritistről szóló jelentés.



A p135H és DDA feltételezett szerepe a rheumatoid arthritis patogenezisében.

A részletes leírást ld. a megbeszélésben. Az ábrában használt rövidítések: ACPA citrullinált protein/peptid-ellenes antitest, APC antigén-prezentáló sejt, CS kondroitin-szulfát, DDA dimethyldioctadecylammonium-bromid, G1, 2, 3 az aggregán 1-, 2-, 3-as számú globuláris doménjei, IFN

interferon, IL interleukin, KS keratán-szulfát, MHC major histocompatibility complex, OA osteoarthritis, p135H humán p135-ös peptid, RA rheumatoid arthritis, RF rheumatoid faktor, TCR T sejt receptor, TNF tumor nekrozis faktor.

A tanulmány második felében a dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA) arthritis indukcióra gyakorolt adjuváns hatását vizsgáltuk.

A DDA a lipofil négyértékű aminok csoportjába tartozik, melyet hatásos adjuvánsként több, mint 35 évvel ezelőtt írtak le. A DDA-t adjuvánsként sikeresen, mellékhatások jelentkezése nélkül alkalmazták gyermekeknek és várandós nőknek szánt vakcinákban. Széles körben használják továbbá kozmetikai összetételekben és szövetlágyító szerekben is. A DDA igen potens immunstimulátor, különösen negatív töltésű antigénnel, erős késői típusú hyperszenzitivitási reakciót provokálva. Hatásos, nem-irritáló adjuváns, amely a T sejt stimuláció által szignifikánsan fokozza az antigén-specifikus B sejt aktivációt és immunglobulin produkciót. Az autoimmun rágszáló modellekben a DDA használat különleges előnye, hogy az immunregulációt a Th1-es irányba tereli. A DDA-t adjuvánsként eddig azonban egyik rheumatoid arthritis autoimmun modellben sem tesztelték.

Számos humán autoimmun betegségnek van indukálható állatmodellje, melyek mindegyike genetikailag fogékony rágszáló törzsek vagy nem-emberszabású főemlősök célszerv-specifikus antigénnel és adjuvánsal történő immunizációját igényli. A modelltől és fajtól függően, 1-4 antigén-tartalmú injekció szükséges, és legalább egy injekció komplett Freund adjuváns (CFA)-tartalmú kell, hogy legyen. Tehát a CFA az autoimmun betegségek rágszáló modelljeiben kritikus komponensnek tűnik a magas incidencia és súlyosság elérésének indukciójában. Ugyanazon antigén inkomplett Freund adjuvánsban (IFA), alumínium-hidroxid gélben vagy szintetikus adjuvánsban történő használata, vagy elégtelen a betegség indukciójához, vagy az incidencia és súlyosság az antigén/CFA-indukált betegséghez képest messze alulmarad. Tehát, a natív immunitás (pl. makrofágok, dendritikus sejtek) és T sejtek nem-specifikus aktivációja ásványi olajban lévő mycobacterialis komponensek, úgymint a muramil-dipeptid, hősokkfehérje és trehalóz-dimikolát révén, kritikus komponens az autoimmun modellekben a saját antigénekre adott immunreakciók provokálásában.

Míg nagyszámú adjuváns használható állatok immunizálásához vagy humán vakcinákhoz, eddig a CFA maradt a kísérletes autoimmun modellek legpotensebb adjuvánsa. A CFA használata azonban számos mellékhatással jár, beleértve a mycobacterialis komponensekre adott immunreakciót is, és mivel nagymértékben irritáló összetevő, a CFA lokális granulomatózus szövetképződéssel és súlyos adhéziókkal járó steril gyulladást okoz, különösen az intraperitoneális térben.

Munkánk során arthritis-fogékony egértörzsekben összehasonlítottuk a CFA és IFA hatásait a DDA-val, hogy betekintést nyerjünk abba, hogy a DDA miként ér el még a Freund adjuvánsoknál is erőteljesebb hatást.

Az eddig tesztelt adjuvánsok közül csak a CFA és DDA bizonyult elég hatásosnak ahhoz, hogy proteoglikánnal (PG) vagy II-es típusú kollagénnel (CII) immunizált genetikailag fogékony egértörzsekben arthritist provokáljon. A PG-re vagy más antigénekre adott humorális és celluláris immunválaszt, valamint citokintermelést tekintve, a CFA egyenértékű, vagy a DDA-nál is hatásosabb adjuvánsnak bizonyult, és a CFA és DDA is szignifikánsan nagyobb immunválaszt és citokintermelést indukált, mint a PG/IFA-val történő immunizáció. A PG/DDA-val immunizált állatokban az antigén-specifikus Th1 és Th2 citokinek termelése, és a Th1/Th2 arány eltolódása a Th1-es típusú válasz felé, azonban szignifikánsan kifejezettebb volt a PG/Freund adjuvánsokhoz képest. A DDA-t kapott állatokban továbbá, legalább 2-4-szeres volt az

intraperitoneális térbe beáramló makrofágok száma, nagyobb számú CD11c⁺ dendritikus sejttel, de szignifikánsan kevesebb polimorfonukleáris sejttel kísértén. Szuboptimális dózisu porc PG-k és szuboptimális arthritogén hatású PG-k ugyanolyan hatásosnak bizonyultak a PGIA provokálásában, mint a humán porc PG; és a finomítatlan, de megfelelően deglikozilált porc-extraktum a nagyfokban tisztított humán porc PG-hez hasonló módon indukált arthritist, ha adjuvánsként DDA-t használtunk.

Összegezve, a DDA használata egy súlyosabb formájú arthritis gyors kialakulását hozta létre, és szuboptimális dózisu PG vagy CII antigén is elegendő volt a gyulladás indukciójához, a natív immunitás potensebb aktivációja által.

RA-ban tömeges bizonyíték áll rendelkezésre a natív immunitás állandó aktivációját illetően, mint ahogy azt a makrofág eredetű citokinek, úgymint a TNF- α , IL-1 és IL-6 folyamatos expressziója is mutatja. Makrofágoknak az RA patogenezisben betöltött központi szerepét támogatja továbbá az a tény, hogy a konvencionális terápiás szerek, mint a methotrexate vagy a citokin inhibitorok, a főként makrofágok általi citokintermelés csökkentése/gátlása révén fejtik ki hatásukat. A natív immunitás arthritis indukcióban játszott potenciális vagy kritikus szerepe ugyancsak egybevágh azokkal a tanulmányokkal, amelyek csak adjuváns (nem-specifikus stimulátort) használnak genetikailag fogékony rágcsálótörzsekben. Az olaj-, pristan- és szkvalén-indukált arthritis-szel kapcsolatos munkák megfigyelései, saját eredményeinkkel együtt felvetik a kérdést, hogy az "adjuvánsok" is szerepet játszanak-e és/vagy hozzájárulnak-e az ízületi gyulladás kialakulásához genetikailag fogékony egyénekben. Vajon mikrobák, környezetünkben található anyagok (kozmetikumok, mosószerek, ételadalékok) vagy endogén "saját" adjuvánsok (pl. lipid szkvalén) immunstimuláns molekulái okozhatnak-e vagy hozzájárulhatnak-e az autoimmun ízületi gyulladáshoz? Mivel számos lehetséges autoantigén (II-es típusú kollagén, proteoglikán aggregátum, link proteín, gp-39 vagy glükóz-foszfát-izomeráz) azonosítható az RA különböző alcsoportjaiban, vonzó feltételezés lehet, hogy a natív immunitás nem-specifikus stimulációja a betegség mechanizmusának kezdeti komponense lehet. Az immunreguláció zavara, a citokin/kemokin termelés, és az ízületekből származó, vagy azoktól független autoantigének jelenléte csak következményes, bár egyértelműen észlelhető események lehetnek a natív immunitás kezdeti, nem-specifikus aktivációjának folyamatában. Míg e hipotézis relevanciája átfogó tanulmányokat igényel még, saját megfigyeléseink egy ártalmatlan anyag adjuvánsként történő használatáról, támogatják ezt a lehetőséget (ld. az ábrát).

Tanulmányaink alapját képező tényezők, egyrészt a humán porc proteoglikán G3 doménjében elhelyezkedő, feltételezett autoantigént képviselő p135-ös peptid, másrészt pedig a natív immunitás potens aktivátora, a DDA, a rheumatoid arthritis iniciációjában, fenntartásában és ízület-specifitásban szerepet játszó két szereplő lehet, többek között.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Összesített impakt faktor: 35.973

Az értekezés témájában írt saját közlemények (Impakt faktor: 17.26)

1. **Hanyecz A**, Bardos T, Berlo SE, Buzas E, Nesterovitch AB, Mikecz K, Glant TT.: Induction of arthritis in SCID mice by T cells specific for the "shared epitope" sequence in the G3 domain of human cartilage proteoglycan, *Arthritis and Rheumatism*, 2003, 48:2959-73, IF:7.19
2. **Hanyecz A**, Berlo SE, Szanto S, Broeren CP, Mikecz K, Glant TT.: Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype, *Arthritis and Rheumatism*, 2004, 50(5):1665-76, IF: 7.19
3. **Hanyecz A**, Olasz K, Tarjanyi O, Nemeth P, Mikecz K, Glant TT, Boldizsar F.: Proteoglycan aggrecan conducting T cell activation and apoptosis in a murine model of rheumatoid arthritis, *BioMed Research International*, 2013, accepted for publication, IF: 2.88

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények (Impakt faktor: 18.713)

1. Buzas EI, **Hanyecz A**, Murad Y, Hudecz F, Rajnavolgyi E, Mikecz K, Glant TT.: Differential recognition of altered peptide ligands distinguishes two functionally discordant (arthritogenic and nonarthritogenic) autoreactive T cell hybridoma clones, *Journal of Immunology*, 2003, 171:3025-33, IF: 7.014
2. Firneisz G, Zehavi I, Vermes C, **Hanyecz A**, Frieman JA, Glant TT.: Identification and quantification of disease-related gene clusters, *Bioinformatics*, 2003, 19:1781-6, IF: 6.701
3. Adarichev VA, Vermes C, **Hanyecz A**, Mikecz K, Bremer EG, Glant TT.: Gene expression profiling in murine autoimmune arthritis during the initiation and progression of joint inflammation., *Arthritis Research and Therapy*, 2005, 7(2):R196-207, IF: 2.965
4. Adarichev VA, Vermes C, **Hanyecz A**, Ludanyi K, Tunyogi-Csapo M, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT.: Antigen-induced differential gene expression profile in synovium prior to the onset of arthritis, *Autoimmunity*, 2006, 39(8):663-673, IF: 2.033

Publikált absztraktok

1. Vermes, C., Roebuck, K.A., Fritz, E.A., **Hanyecz, A.**, Glant, T.T.: Shedding of non-functional interleukin-6 (IL-6) receptor (IL6R or gp80) results in the activation of gp130-mediated signaling in human osteoblasts, *Arthritis and Rheumatism*, 2001, 44: S360
2. Czipri, M., Bardos, T., Stoop, R., Vermes, C., Gal, I., **Hanyecz, A.**, Mikecz, K., Watanabe, H., Yamada, Y., Glant, T.T.: A novel approach for gene therapy: complete

rescue of otherwise embryonic lethal defect in skeletal development, *Arthritis and Rheumatism*, 2001, 44: S581

3. Firneisz, G., **Hanyecz, A.**, Vermes, C., Bardos, T., Glant, T.T.: Gene expression profile in an animal model of rheumatoid arthritis using cDNA microarrays, *Arthritis and Rheumatism*, 2001, 44: S747

4. Bardos, T., **Hanyecz, A.**, Chella, S.D., Glant, T.T.: Human MHC class II transgenic mice recognize peptide epitopes of human cartilage proteoglycan (PG), *Arthritis and Rheumatism*, 2001, 44: S1473

5. Vermes, C., Bardos, T., Czipri, M., **Hanyecz, A.**, Lovasz, G., Bellyei, A., Fritz, E.A., Roebuck, K.A., Jacobs, J.J., Galante, J.O., Andersson, G.B.J., Glant, T.T.: Differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor-alpha on the functions of human osteoblast cells, *Orthop. Trans.*, 2002, 27:537

6. Czipri, M., Bardos, T., Vermes, C., **Hanyecz, A.**, Gal, I., Mikecz, K., Watanabe, H., Yamada, Y., Glant, T.T.: Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development, *Orthop. Trans.*, 2002, 27:311

7. **Hanyecz, A.**, Bardos, T., Berlo, S.E., Mikecz, K., Glant, T.T.: A T cell hybridoma, specific for an epitope in the G3 domain of human cartilage proteoglycan, induces arthritis in SCID mice, *Arthritis and Rheumatism*, 2002, 46:S300

8. **Hanyecz, A.**, Bardos, T., Berlo, S.E., Mikecz, K., Vermes, C., Glant, T.T.: A novel approach creating a "prearthritic" stage, for investigating the in vivo arthritogenic effect of T cell hybridomas, *Arthritis and Rheumatism*, 2002, 46:S483

9. Szanto, S., Bardos, T., **Hanyecz, A.**, Chella, D.S., Glant, T.T.: Human MHC class II transgenic mice (HLA-DR4 and HLA-DQ8) recognize peptide epitopes of human cartilage proteoglycan (PG), but develop arthritis only in a genetically susceptible background, *Arthritis and Rheumatism*, 2003, 48:S148

10. Firneisz, G., Zehavi, I., Vermes, C., **Hanyecz, A.**, Frieman, J.A., Glant, T.T.: A novel combination of methods to identify and quantify disease-related gene clusters, *Arthritis and Rheumatism*, 2003, 47:S447

11. Adarichev, V.A, Vermes, C, **Hanyecz, A**, Bremer, E, Glant T.T.: Gene expression profiling in murine adoptively transferred arthritis: Interaction of innate and adaptive immunity, *Arthritis and Rheumatism*, 2004, 50:S122

12. Adarichev, V.A, Vermes, C, **Hanyecz, A**, Bremer, E, Glant, T.T.: Profiling gene expression in antigen-stimulated lymphocytes, cells which induce arthritis in syngeneic SCID mice, *Arthritis and Rheumatism*, 2004, 50:S123

Könyvfejezet

Buzás Edit, **Hanyecz Anita**, Szekanecz Zoltán: Arthritis állatmodellek, Klinikai immunológia, szerk. Prof. Dr. Czirják László, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006, 2. fejezet, 101-105.

Poszter prezentációk és előadások

1. Bardos, T., **Hanyecz, A.**, Buzas, E.I., Glant T.T.: Pre- and co-immunization with self and non-self peptide sequences significantly modify proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice
Rush University Forum for Research and Clinical Investigation, 2001, Chicago, Illinois, USA
2. Vermes, C., Roebuck, K.A., Fritz, E.A., **Hanyecz, A.**, Glant, T.T.: Shedding of non-functional interleukin-6 (IL-6) receptor (IL6R or gp80) results in the activation of gp130-mediated signaling in human osteoblasts
65th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2001, San Francisco, California, USA
3. Czipri, M., Bardos, T., Stoop, R., Vermes, C., Gal, I., **Hanyecz, A.**, Mikecz, K., Watanabe, H., Yamada, Y., Glant, T.T.: A novel approach for gene therapy: complete rescue of otherwise embryonic lethal defect in skeletal development
65th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2001, San Francisco, California, USA
4. Firneisz, G., **Hanyecz, A.**, Vermes, C., Bardos, T., Glant, T.T.: Gene expression profile in an animal model of rheumatoid arthritis using cDNA microarrays
65th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2001, San Francisco, California, USA
5. Bardos, T., **Hanyecz, A.**, Chella, S.D., Glant, T.T.: Human MHC class II transgenic mice recognize peptide epitopes of human cartilage proteoglycan (PG)
65th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2001, San Francisco, California, USA
6. Vermes, C., Bardos, T., Czipri, M., **Hanyecz, A.**, Lovasz, G., Bellyei, A., Fritz, E.A., Roebuck, K.A., Jacobs, J.J., Galante, J.O., Andersson, G.B.J., Glant, T.T.: Differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor-alpha on the functions of human osteoblast cells
48th Annual Meeting, Orthopedic Research Society, 2002, Dallas, Texas, USA
7. Czipri, M., Bardos, T., Vermes, C., **Hanyecz, A.**, Gal, I., Mikecz, K., Watanabe, H., Yamada, Y., Glant, T.T.: Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development ("New Investigator Recognition Award"-winning poster)
48th Annual Meeting, Orthopedic Research Society, 2002, Dallas, Texas, USA
8. Firneisz, G., **Hanyecz, A.**, Vermes, C., Bardos, T., Glant, T.T.: Gene expression profile in an animal model of rheumatoid arthritis using cDNA microarrays
Rush University Forum for Research and Clinical Investigation, 2002, Chicago, Illinois, USA
9. Vermes, C., **Hanyecz, A.**, Andersson, G., Jacobs, J.J., Roebuck, K.A., Glant, T.T.: Shedding of the IL-6 receptor determines the ability of IL-6 to induce GP130-phosphorylation in human osteoblasts

Rush University Forum for Research and Clinical Investigation, 2002, Chicago, Illinois, USA

10. Vermes, C., **Hanyecz, A.**, Raman, C., Andersson, G., An, H., Jacobs, J.J., Dobai, J., Roebuck, K.A., Glant, T.T.: Pamidronate and 1,25-dihydroxy-vitamin-D3 inhibit tumor necrosis factor-alpha- and wear debris-induced interleukin-6 release and recover suppressed type 1 collagen synthesis in bone marrow-derived primary human osteoblasts

Rush University Forum for Research and Clinical Investigation, 2002, Chicago, Illinois, USA

11. **Hanyecz, A.**, Bardos, T., Berlo, S.E., Mikecz, K., Glant, T.T.: A T cell hybridoma, specific for an epitope in the G3 domain of human cartilage proteoglycan, induces arthritis in SCID mice

66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2002, New Orleans, Louisiana, USA

12. **Hanyecz, A.**, Bardos, T., Berlo, S.E., Mikecz, K., Vermes, C., Glant, T.T.: A novel approach creating a "prearthritic" stage, for investigating the in vivo arthritogenic effect of T cell hybridomas

66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2002, New Orleans, Louisiana, USA

13. Berlo, S.E., **Hanyecz, A.**, van Kooten, P., ten Brink, C., Glant, T.T., Prakken, B., van der Zee, R., Singh, M., van Eden, W., Broeren, C.: Immune modulation in proteoglycan-induced arthritis

"Translational research in autoimmunity" meeting, 2003, Genova, Italy

14. Szanto, S., Bardos, T., **Hanyecz, A.**, Chella, D.S., Glant, T.T.: Human MHC class II transgenic mice (HLA-DR4 and HLA-DQ8) recognize peptide epitopes of human cartilage proteoglycan (PG), but develop arthritis only in a genetically susceptible background

67th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2003, San Francisco, California, USA

15. Firneisz, G., Zehavi, I., Vermes, C., **Hanyecz, A.**, Frieman, J.A., Glant, T.T.: A novel combination of methods to identify and quantify disease-related gene clusters

67th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, 2003, San Francisco, California, USA

16. **Hanyecz A.**: A "shared epitope" szerepe a rheumatoid arthritis kialakulásában, 2004, Rezidens Fórum, Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Immunológiai és Reumatológiai Klinika

17. **Hanyecz A.**, Szász O., Moezzi M., Battyáni Z.: Súlyos gyógyszerallergiás eseteink, 2012, Pécs, Bőrgyógyászat és határterületei - Első multidiszciplináris kötelező szinten tartó tanfolyam, PTE, KK, Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezennel szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Dr. Boldizsár Ferencnek és programvezetőmnek Prof. Dr. Németh Péternek, hogy lehetővé tették számomra, hogy az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben Ph.D. tanulmányaimat befejezzem, valamint a tézisem elkészítéséhez nyújtott támogatásért és tudományos iránymutatásért.

Szeretném legmélyebb hálámat kifejezni tiszteletbeli mentoromnak, Prof. Dr. Glant Tibornak, hogy lehetővé tette számomra, hogy három éven keresztül a Rush Egyetemen (Chicago, IL, USA) dolgozhassam, hogy megismerkedhettem a proteoglikán-indukált arthritis kísérletes állatmodelljével, számos modern laboratóriumi technikát tanulhattam, valamint mindazért az útmutatásért és bátorításért, amelyet ezen tudományos munka közben nyújtott számomra.

Szeretnék köszönetet mondani a munkámhoz nyújtott segítségért a Chicago-i Rush Egyetem Molekuláris Medicina Intézetében dolgozó számos kollegámnak: Prof. Dr. Mikecz Katalinnak, Prof. Dr. Alison Finnegan-nek, Dr. Bárdos Tamásnak, Dr. Vermes Csabának, Suzanne Berlo-nak, Dr. Szántó Sándornak, Sonja Velins-nek és Kevin Kolman-nek, többek között.

Végül, de nem utolsó sorban, őszinte köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni családomnak, különösen szüleimnek, férjemnek és gyermekeimnek, szeretetteljes és bátorító támogatásukért és türelmükért.