

**Doktori (Ph.D.) – értekezés**

**HUMÁN PORC PROTEOGLIKÁN AGGREGKÁN ARTHRITIS  
INDUKCIÓBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA  
HLA-HUMANIZÁLT EGEREK BEN**

Készítette:

**SZÁNTÓ SÁNDOR DR.**

Programvezető:

**Prof. Dr. Szegedi Gyula, M.D., D.Sc.**

Témavezetők:

**Dr. Szekanecz Zoltán, M.D., D.Sc.**

**Dr. Glant Tibor, M.D., D.Sc.**

Debreceni Egyetem  
Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
DEBRECEN

2004.

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	3
<b>2. CÉLKITŰZÉS</b> .....	12
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	13
3.1. HLA II. osztályú transzgenikus egerek.....	13
3.2. Antigének, immunizáció és az arthritis vizsgálata.....	14
3.3. Az antigén-specifikus T sejt válaszok, antitestek és citokinek mérése.....	17
3.4. Flow cytometria.....	18
3.5. Statisztikai analízis.....	18
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	19
4.1. Vad típusú BALB/c egerek szisztémás immunizációja humán porc proteoglikánnal és komplett Freund vagy dimethyl dioctadecylammonium-bromid (DDA) adjuvánsok alkalmazásával.....	19
4.2. Az eredeti kevert (PGIA rezisztens) genetikai háttérrel rendelkező HLA-transzgenikus egerek szisztémás immunizációja.....	20
4.3. A proteoglikán elleni sejtes és humorális immunválasz mérése PG/adjuvánsal immunizált HLA-transzgenikus és vad típusú BALB/c egerekben.....	21
4.4. A T sejt epitóp repertoár PG immunizált HLA-transzgenikus egerekben.....	22
4.5. A HLA-DR4 és HLA-DQ8 transzgenikus egerek BALB/c genetikai háttérbe történt visszakeresztezésének hatása az arthritis iránti fogékonyságra.....	25
4.6. A PGIA klinikai és hisztopatológiai jellemzői HLA transzgenikus BALB/c egerekben.....	28
4.7. A PG specifikus peptidok immunogenitása HLA-DR4.Ab <sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab <sup>0</sup> transzgenikus BALB/c egerekben.....	29
4.8. A PG specifikus peptidok immunogenitása peptidokkal előimmunizált HLA-DR4.Ab <sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab <sup>0</sup> transzgenikus BALB/c egerekben.....	31
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b> .....	33
<b>6. ÚJ EREDMÉNYEK</b> .....	39
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	41
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	43
<b>9. RÖVIDÍTÉSEK</b> .....	44
<b>10. HIVATKOZÁSOK</b> .....	45
<b>11. A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS BESZÁMOLÓK</b>	
<b>JEGYZÉKE</b> .....	52

## 1. BEVEZETÉS

A rheumatoid arthritis (RA) autoimmun gyulladós betegség, mely a népesség körülbelül 1%-át érinti, ezen belül a nők aránya 60-70%. Az RA nemcsak gyakorisága, hanem a betegség krónikus lefolyása és súlyos következményei által is kiemelkedő fontosságú a betegségek között. A diarthrodialis ízületekben kialakuló gyulladós folyamat ugyanis synovialis pannus képződéséhez, majd az ízületi porc és a subchondralis csont erosiojához vezetve az érintett ízületek súlyos destrukcióját és következményes funkciózavarát okozza. A RA mozgásszervi megnyilvánulásai a kéz és láb kisízületeinek szimmetrikus gyulladása mellett gyakran megfigyelhetők a csuklóokban, bokákban, térdekben és egyéb perifériás ízületekben is, mely a betegek önellátását, mozgását is jelentősen korlátozza. Ráadásul a gerinc érintettsége az atlantoaxiális ízület destrukciója következtében hirtelen halállal is fenyegeti a RA-ben szenvedő beteget. A betegség ízületi manifesztációi mellett a belső szervek (pl. tüdő) is súlyosan érintettek lehetnek, valamint a betegség kezelésében alkalmazott gyógyszerek (pl. szteroidok, antimetabolitok stb.) jelentős mellékhatások veszélyével fenyegetnek. A fentiek alapján a RA-szel kapcsolatos kutatások napjaink kísérletes reumatológiájának sarokkövét jelentik.

A RA etiológiája az intenzív kutatások ellenére mindmáig nem tisztázott teljesen. Környezeti tényezők éppúgy szerepet játszanak patogenezisében, mint a genetikai faktorok (1;2). A genetikai tényezőkön belül a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) valószínűleg a legfontosabb predispozíciós tényező a RA kialakulása szempontjából (2-5), de az MHC önmagában nem elégséges a betegség kialakításához (2;6;7). Ezt támasztja alá az is, hogy az elmúlt években számos lokuszt azonosítottak az MHC-n kívül is, mely szintén szerepet játszhat a betegség mechanizmusában (8-11).

A RA összefüggése bizonyos HLA allélekkel már több mint két évtizede ismert (12), és az elmúlt években ezen MHC allélek nagyszámú alcsoportját fedezték fel. Bár jelentős eltérések vannak a különböző etnikai csoportok között, nyilvánvalóvá vált, hogy a HLA-DRB1 \*0101, \*0401, \*0404 vagy \*0405 allélek valamelyikét hordozó egyének nagyobb valószínűséggel betegednek meg RA-ben, mint az ezen alléleket nem hordozók (13;14). A különböző MHC allélek azonban komplex csoportokban öröklődnek, és mivel a DRB allélek szoros „linkage disequilibriumban” vannak olyan DQB1 allélekkel, mint a DQB1\*0301 (HLA-DQ7) és a DQB1\*0302 (HLA-DQ8)(15), nem könnyű meghatározni, hogy a HLA-DRB1 vagy HLA-DQB1 allélek önmagukban, egymástól függetlenül, vagy kombinációban közösen segítik elő a RA kialakulását.

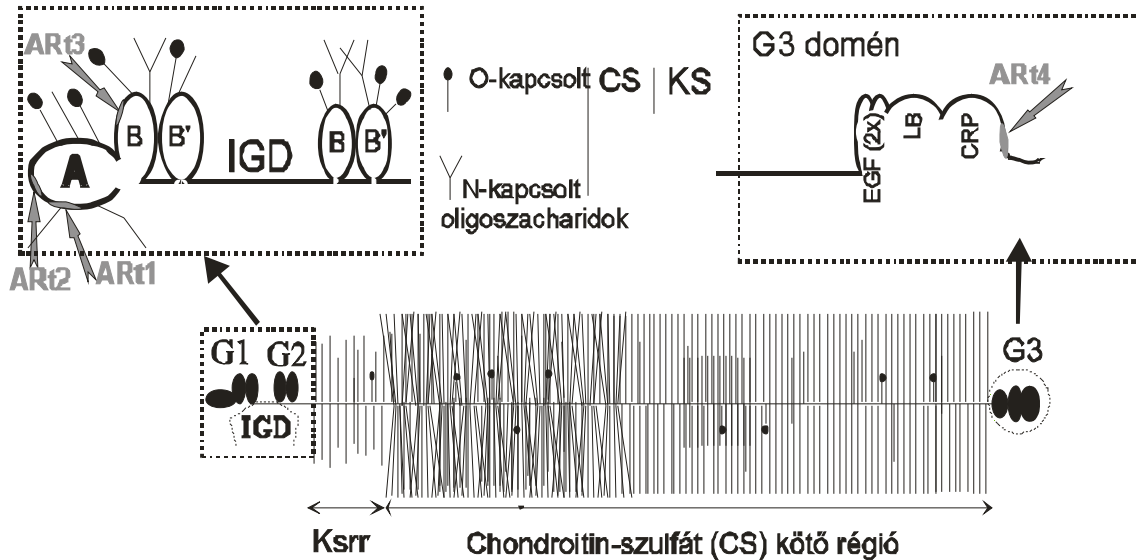
Miközben az MHC a legerősebb genetikai tényező az RA iránti fogékonyságban, számos nem-MHC lokusz is kapcsolatot mutat a betegséggel olyan családokban, ahol több egyénben is előfordult RA (8-11;16). Általános probléma viszont az ilyen, teljes genomot feltérképező vizsgálatokban, hogy a humán populáció extrém nagy genetikai variációi miatt meglehetősen gyenge kapcsolat mutatható ki a nem-MHC lokuszok és a betegség iránti fogékonyság között (1). A nem-MHC lokuszok azonosítása során nyert humán vizsgálati eredmények kiegészítésére és megerősítésére hasznos kísérletes megközelítés volt az olyan rágcsálók alkalmazása, melyek indukált gyulladásos ízületi betegségei sok vonatkozásban hasonlítanak a RA-re (összefoglaló közlemények: (5;17)).

A RA-ben tehát a genetikai tényezők bonyolult egymásra hatása eredményezi a betegség létrejöttét, és a betegség iránti fogékonyság szempontjából felmerülő MHC és nem-MHC allélek szerepe nem teljesen tisztázott. Ráadásul arra sincsen egyértelmű bizonyíték, hogy miközben az elsődlegesen károsított szerv az ízület, az ízületen belüli képletek közül a porcszövet, csont vagy a synovium valamely makromolekulája lehet-e az elsődleges autoantigén, vagy válhat autoantigénné a gyulladásos folyamat során. Részben állatmodellek,

részben humán kutatások alapján a leginkább valószínűsíthető autoantigének a porc extracelluláris mátrixának (ECM) makromolekulái. A RA-re legjobban hasonlító állatmodellek közé azok tartoznak ugyanis, melyek a porc ECM valamely komponensével történő szisztémás immunizációval genetikailag fogékony egerekben és patkányokban válthatók ki. A szóbjövő antigének közül a II. típusú kollagénről, a proteoglikánról (PG) (aggregán), a link proteínról és a humán porc glycoprotein-39-ről igazolódott, hogy használhatók arthritis kiváltására (18-22), vagyis valószínűleg szerepelhetnek autoantigénként humán viszonyok között is. Ugyancsak az ECM makromolekulák RA pathomechanizmusában betöltött központi szerepe mellett szól az is, hogy a porc egyike azon néhány szövetnek, mely avaszkuláris, ezért nincs kitéve a belső immunológiai „surveillance”-nek. A porcmátrix károsodása esetén azonban az ECM molekulák felszabadulhatnak, és az immunrendszer által felismerve autoimmun gyulladási folyamatokat indukálhatnak. Ezt a felvetést támasztja alá, hogy a humán porc PG elleni humorális és celluláris immunitás kimutatható volt esetenként RA-ban és juvenilis RA-ban szenvedő betegeken (23-27).

A porc PG aggregán és a II. típusú kollagén a porc ECM-ának két legfontosabb strukturális összetevője, melyek szintéziséért a viszonylag ritkán elhelyezkedő chondrocyták felelősek. A porc többféle PG-t tartalmaz, így a nagy aggregáló PG-t és a kis PG-okat (biglycan, decorin, fibromodulin és lumican). Ezek közül a PG aggregán a legjelentősebb tömegű, mely a porc szárazanyag tartalmának kb. 20%-át teszi ki. A PG aggregán molekulák százai kapcsolódnak egyetlen hialuronsavlánchoz, egy nagy aggregátumot alkotva, ami a II. típusú kollagén szálak hálóját megköti. Az aggregán név ezen PG molekula hialuronsav kötő és aggregátum képző képességére utal, és központi szerepe miatt az aggregán és a PG neveket gyakran szinonimaként használják a molekula megnevezésére. A PG központi fehérjeszála mintegy 2400 aminosavból áll, amihez glükózaminoglikán (GAG) oldalláncok (chondroitin-

szulfát és keratan-szulfát) kovalens kötéssel kapcsolódnak (17), melyek nagy mennyiségű vizet megkötve biztosítják a porc rugalmasságát (1. ábra).



**1. ábra** A porc proteoglikán aggregán (PG) sematikus ábrázolása. A humán porc PG ( $M_r \sim 2 \cdot 3 \cdot 10^6$  dalton) egy hosszú központi protein láncot (2396 aminosav) tartalmaz, amihez chondroitin-szulfát (CS;  $M_r \sim 2 \cdot 3 \cdot 10^4$  dalton) és keratan-szulfát (KS;  $M_r \sim 1 \cdot 2 \cdot 10^4$  dalton) glükóz aminoglikán oldalláncai kapcsolódnak, O-kapcsolt és N-kapcsolt oligoszacharidokkal együtt (17). A központi fehérjeláncban a következő domének, szubdomének találhatóak: a G1 domén az A, B, és B' gyűrűkkel, az interglobuláris domén a G1 és G2 domének között, a G2 domén a B és B' gyűrűkkel; a KS gazdag régió (Ksrr) a G2 domén és a CS kötő régió között, a CS (CS1+CS2) kötő régiók és a G3 domén, mely az epidermális növekedési faktor szerű, lektin kötő szerű és komplement szabályozó protein szerű szubdoméneket tartalmazza. Mintegy 100-120 CS oldallánc kapcsolódik a központi lánc egy hosszú, de korlátozott szakaszához (CS kötő régió). Bár a legtöbb KS lánc egy rövid régióra korlátozódik, KS oldalláncok a központi fehérjelánc teljes hosszában jelen lehetnek és gyakran elfedik a T sejt epitópokat. A PG molekula N- és C-terminális végeink részletesebb strukturális jellemzői láthatók az ábrán bekeretezve, míg a nyilak a G1 és G3 domén arthritogén T sejt epitópjainak pozícióit mutatják.

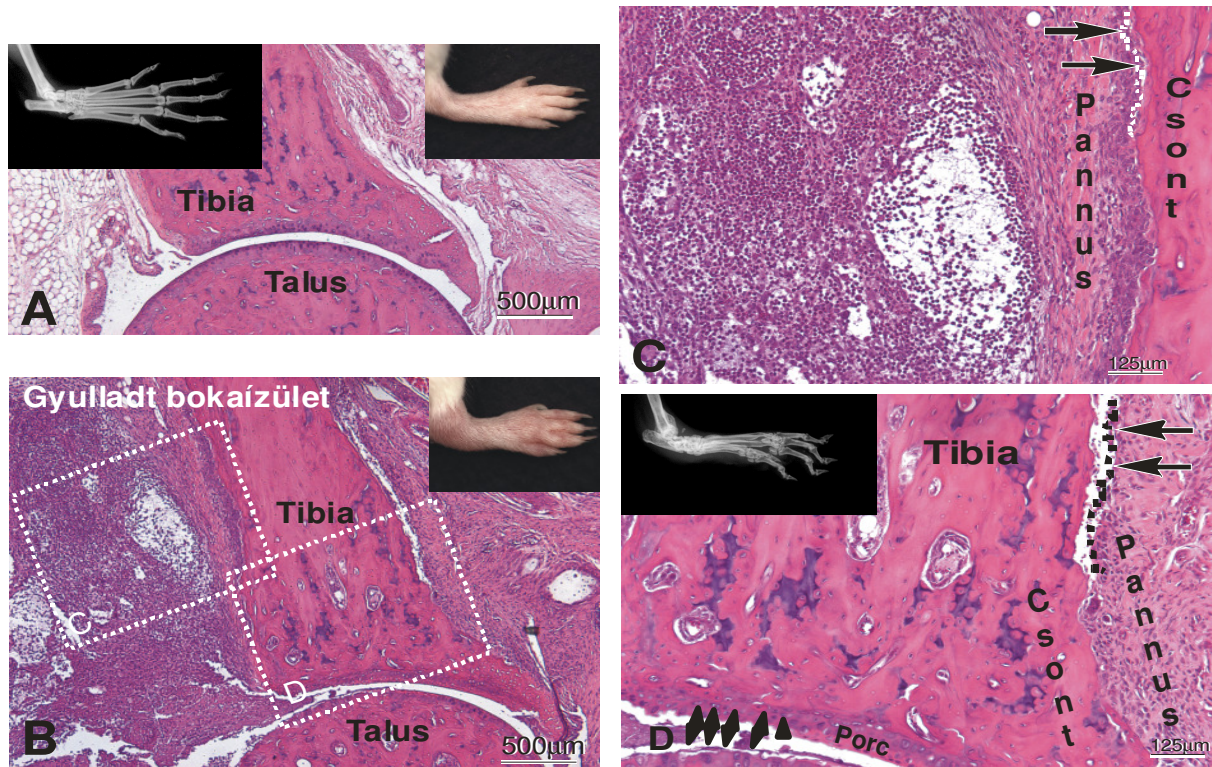
A nagyszámú GAG oldallánc (>120/PG molekula) elfedheti a központi fehérjelánc antigénhelyeit, így az intakt PG relatíve gyenge antigén. A negatív töltésű GAG oldalláncok enzimatisz eltávolítása jelentősen növeli a molekula PGIA indukciójában kihasznált immunogenitását (17). Néhány szerkezeti változás, mint a részleges deglikoziláció (28) vagy a központi fehérjelánc hasítása különböző metalloproteinázok által (29;30) in vivo is létrejöhet a normál porc PG turnover során, és ezek a változások még jelentősebbek

gyulladásos körülmények között. A PG lebomlásakor létrejövő fregmentumok kiválthatnak és/vagy fenntarthatnak immunreakciókat a fogékony állatok vagy a RA-es betegek ízületeiben. A fentieknek megfelelően, a PG központi fehérjeszála intakt formában gyenge B sejt stimulátor, de proteolitikus lebontása, pl. metalloproteinázok által olyan neoepitópokat generál, melyek jelentősen immunogének akár autológ, akár heterológ rendszerekben (31;32). Ráadásul a GAG specifikus B sejtek, melyek chondroitin-szulfát vagy keratan-szulfát ellen termelődtek, kiváló antigén prezentáló sejtekké válva jóval effektívebben tudják prezentálni a PG-t a T sejteknek, mint azt a makrofágok teszik. Ez a B sejt receptorokon keresztüli effektív PG felvételt és/vagy intracelluláris feldolgozást eredményezhet. A gyenge B sejt stimulációval szemben a PG-al szemben jelentős T sejt válasz indukálható. Bár a különböző törzsek közötti jelentős fokú PG szerkezeti homológia alapján csak korlátozott számú immunodomináns régió volna várható a PG központi fehérjeláncán, a humán porc PG 27 és 21 T sejt epitópja váltott ki T sejt választ BALB/c és C3H egerekben (33;34). A humán porc PG elleni immunválasz kimutatható RA-es betegekben is (24;25;27), alátámasztva azt a hipotézist, hogy más autoantigénekhez hasonlóan a humán porc PG az autoimmun gyulladásos reakció célpontja lehet RA-es ízületi folyamatokban.

A PG-indukált arthritis (PGIA) sok hasonlóságot mutat a RA-hez a klinikai kép, az immunológiai tényezők, a radiológiai elváltozások és a diarthrodialis ízületek hisztopatológiai képe vonatkozásában (összefoglaló közlemény: (17)). Az állatmodell a genetikailag fogékony BALB/c vagy C3H egértörzsekben váltható ki keratan-szulfát és chondroitin-szulfát oldalláncuktól megfosztott humán porc eredetű PG-nal. A PGIA kiváltása során hagyományosan 100-150 µg antigén proteint (porc PG) használnak, melyet az első injekció során komplett Freund adjuvánsban emulgeálnak. A komplett Freund adjuvánsban jelenlevő mycobacterialis hősök proteinek ugyanis közismerten hatásos nem-specifikus immunstimulátorok, melyek jelentősen potenciálják a szisztémás T sejt válaszokat (35;36). A

következő injekciók során az antigént ásványi olaj emulzióban (inkomplett Freund adjuváns) alkalmazzák, melyek nem tartalmazzak mycobacterialis összetevőket. Az ásványi olajok vagy olajszármazékok, mint a prisztán, synovialis gyulladásokat válthatnak ki különböző (fogékony) rágcsáló törzsekben (37-39). A komplett Freund adjuváns azonban éppen a hőszokk protein tartalmánál fogva, nemcsak az arthritis kialakulását segíti elő, hanem a kísérletes állatok jelentős leromlásához, gyakran elvesztéséhez vezet. Ráadásul a peritoneális ürben az injekciók helyén az egerekben jelentős mértékű irritáció és granulóma képződés figyelhető meg (40), tovább rontva az állatok állapotát. Ezen negatív hatások csökkentéséhez és az arthritis incidenciájának és súlyosságának növeléséhez a közelmúltban kezdtek alkalmazni egyéb adjuvánsokat, így a pozitív töltésű kvaterner amint, a dimethyldioctadecylammonium-bromidot (DDA), mellyel a komplett Freund adjuvánst részben vagy teljes egészében helyettesíteni lehetett (41).

PGIA-ben az ízületi gyulladás kezdeti tünetei, melyek a végtagok hyperaemiájában és duzzanatában nyilvánulnak meg, az antigén második-negyedik intraperitoneális injekciója után alakulnak ki. Az gyulladás rendszerint a kis perifériás ízületek polyarticularis synovitisével kezdődik. A betegség korai fázisában a synovium mononukleáris sejtes infiltrációját a synovialis sejtek és a fibroblastok nagyfokú proliferációja követi. Az arthritis megjelenése után megfigyelhető hullámzó jellegű gyulladásos epizódok az ízületi porc destrukcióját és a subchondrális csont erózióját eredményezve a perifériás ízületek súlyos deformitásához vezetnek (20;42-47) (2. ábra).



**2. ábra** A PG-indukált arthritis (PGIA) klinikai, hisztopatológiai és röntgenképe BALB/c egerekben. Az A kép normál bokaízületet, míg B kép egy súlyosan gyulladt bokaízületet mutat 2-3 héttel az arthritis kezdete után. A képek jobb felső sarkában levő felvételek a megfelelő hátsó végtagok makroszkópos képét mutatják. A B képen látható bekeretezett területek nagyobb nagyítással láthatók a C és D képeken. A csont és a csontot resorbeáló lágyszövet (pannus) közötti határvonalat szaggatott vonalak és fekete nyilak, míg a porceróziók helyét a tibia és a talus egymás felé néző felszínén nyílfejek jelölik. A betegség ezen akut/szubakut fázisában az ízületben masszív limfocitás és granulocitás infiltráció mellett kiterjedt porc és csonteróziók is megfigyelhetők. A gyorsan proliferáló makrofág és fibroblaszt-szerű sejteket tartalmazó pannus különböző citokineket és kemokineket termel, melyek más sejteket aktiválnak, és különböző adhéziós receptorok expresszióját indukálják. A pannus sejtei termelik a mátrix metalloproteinázokat is, melyek károsítják a porcot és a csontot.

A betegség progressziójával az ízületek deformálódnak, a növekedési porcok és a gerinc intervertebrális discusai felszívódnak, és a gerinc ankilotizál (20;42;47). A gyulladásos folyamat a szervezet egyéb porcait, így a bordák, fülek és a légzőtraktus porcszöveteit nem érinti.

A PGIA kialakulása a genetikailag fogékony egerekben az immunizáló (humán) és a saját (egér) PG közötti keresztreaktív immunválaszon alapul (42;43;48-50). Bár az immunizáló antigén elleni antitestek már az immunizációt követő második héten

megjelennek, majd a 8-12. hét között megfigyelhető csúcsot mutatnak (43), valamint termelődésük kifejezett korrelációt mutat a betegség incidenciájával, sem ezekkel az antitestekkel, sem a PG-specifikus B sejtekkel nem vihető át a betegség naiv szingén egerekbe (44;49;51). A PGIA adoptív átviteléhez az arthritises állatok T és B sejtjeire egyaránt szükség van (44;52), és a PG specifikus Th1 sejtek synoviumban való megjelenése tűnik a legfontosabb komponensnek az arthritis kialakulása szempontjából (50-52).

Akárcsak a RA, a PGIA is polygénus jellegű, és mind az MHC, mind a nem-MHC komponensek fontos szereppel bírnak az arthritis kialakulásában (53;54). A fogékonyágban domináló szerepet játszó MHC allélek mellett az elmúlt években sok nem-MHC fogékonyági lokuszt azonosítottak PGIA-ben, mely megfeleltek azoknak a humán kromoszóma régióknak, melyeket családvizsgálatok segítségével azonosítottak RA-ben (17).

Jelen munkám során egérmodellben igyekeztem megvalósítani, illetve modellezni a humán RA-re pathomechanimusához leginkább hasonlító kísérletes arthritist. Ehhez olyan genetikailag manipulált egereket használtunk, melyek saját II. osztályú MHC molekulájának expressziójára nem voltak képesek, ugyanakkor expresszáltak különböző humán HLA II. osztályú antigéneket. Ezen HLA antigének közül a humán populációs vizsgálatok alapján RA-re fogékonyágot közvetítő HLA-DR4 és HLA-DQ8-at, a neutrális HLA-DR3-at és a potektív HLA-DR2-t vizsgáltuk. Ráadásul a PGIA-t humán porc eredetű PG-al indukáltuk. Vagyis az egérmodell és a kísérletes arthritis egerekben megvalósított humán kísérletnek is volt tekinthető abban a vonatkozásban, hogy az emberi PG, mint autoantigén, humán HLA antigének általi bemutatását monitoroztuk. A humán porc PG aminosav szekvenciájának ismeretében vizsgálni lehetett a lehetséges PG epitópok immunválaszban betöltött szerepét, következtetve az egyes PG szakaszok immunogenitására és arthritis indukcióban betöltött szerepére is. Emellett, mivel a vizsgált egerek közül a HLA-DR4-et és HLA-DQ8-at expresszálók rendelkezésre álltak arthritésre rezisztens (kevert) és arthritésre fogékony

(BALB/c) genetikai háttérrel is, vizsgálni lehetett a nem-MHC genetikai háttér szerepét is a kísérletes arthitises egérmodellben.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérletes munkám során olyan transzgenikus egereket használtam, amelyek II. osztályú humán MHC alléleket expresszálnak, de hiányoznak belőlük a saját II. osztályú antigének ( $A\beta^0$  deficiens/vagy  $Ab^0$ )(55). Ezekben az egerekben, valamint vad típusú BALB/c egerekben humán porc eredetű PG-al indukáltunk arthritist.

A fent leírt egér arthritises modell alkalmazásával arra kerestem a választ, hogy

1. a HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4 és HLA-DQ8 II. osztályú molekulák tudják-e a humán porc PG-t egér T sejt számára prezentálni.
2. a megjósolható PG epitópok közül melyek indukálnak jelentős fokú T sejt immunválaszt immunizált egerekben, utalva ezen T sejt epitópok domináns szerepére az arthritis indukációjában.
3. A domináns T sejt epitópok milyen citokin választ indukálnak az immunizált egerekben, következésképpen ezzel az epitóp arthritis-indukáló (Th1) vagy arthritis ellen védő (Th2) szerepére.
4. Az eredeti arthritisre rezisztens (kevert) és az arthritisre fogékony (BALB/c) genetikai háttér mellett lehet-e arthritist indukálni a humanizált egerekben, következésképpen ezzel a genetikai háttér szerepére az arthritis kialakulásában.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. HLA II. osztályú transzgenikus egerek

A kísérleteinkben használt egerek különböző HLA II. osztályú alléleket expresszálnak, de a saját MHC II. osztályú molekulák vonatkozásában deficiensek (56). Saját működő II. osztályú MHC gént azért nem hordoznak, mivel a H-2E $\alpha$  gén promoter régiójában jelenlevő spontán mutációt (H-2<sup>b</sup> haplotípusban) kombinálták a H-2A $\beta$  gén célzott károsításával (A $\beta$ <sup>0</sup> deficiens) (55).

A DRB1\*1502 (HLA-DR2.Ab<sup>0</sup>) transzgenikus egerek létrehozásához a HLA-DRB1\*1502 gént mikroinjektálták SWR X B10 embriókba, majd a „founder”-eket visszakeresztették C57Bl/10 törzsbe, és a transzgént keresztezéssel átjuttatták H2-Ab<sup>0</sup> egerekbe. A DRB1\*1502 molekula MHC heterodimerrel való expresszióját H2-Ab<sup>0</sup> Ea transzgenikus egerekkel való keresztezéssel érték el (57).

A DRB1\*0301 (HLA-DR3.Ab<sup>0</sup>) transzgenikus egereket egy HLA-DR $\alpha$ -t tartalmazó genomikus fragment és egy DRB1\*0301 $\beta$  fragment (C57Bl/6 X DBA/2) F1 X C57Bl/6 embriókba való injekciójával hozták létre. Ezt követően a pozitív „founder”-eket visszakeresztették C57Bl/10 törzsbe (58), majd a B10.M egerekbe való ismételt visszakeresztés után a DR3 gént II. osztályú (H2 haplotípus)-negative H2-Ab<sup>0</sup> törzsbe jutatták be keresztezéssel.

HLA-DRB1\*0401 (HLA-DR4.Ab<sup>0</sup>) transzgenikus egereket létrehozásának (59) kezdeti lépéseként a DRB1\*0401 gén mutációját indukálták a humán MHC és az egér CD4 molekulák interakciójának optimalizálásához (60). A vektort (SWR x B10) F1 egerekbe injektálták és a „founder” egereket keresztették H2-Ab<sup>0</sup>Ea egerekkel hasonlóképpen, mint az HLA-DR2.Ab<sup>0</sup> vonal esetén történt (57).

A DQA1\*0301 és DQB1\*0302 (HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup>) transzgenikus egereket létrehozása során (61) HLA szegmenteket tartalmazó kozmidokat mikroinjektáltak CBA/J X B10.M embriókba és a pozitív egereket visszakeresztették B10.M egerekkel. Ezeket a transzgenikus egereket aztán szintén H2-Ab<sup>0</sup> egerekkel keresztették.

Polymerase láncreakciót (PCR) használtunk a genomikus DNS szűrésére, ezzel volt kimutatható a megfelelő HLA II. osztályú transzgén jelenléte és a H-2A lokuszt szétválasztó neomycin rezisztencia gén jelenléte (55). A humán MHC II. osztályú antigének sejtfelszíni expresszióját perifériás vér leukocitákon flow cytometriás vizsgálattal is igazoltuk. Későbbi kísérleteinkhez BALB/c genetikai háttér eléréséhez a DRB1\*0401 (HLA-DR4) vagy DQA1\*0301/DQB1\*0302 (HLA-DQ8) transzgént hordozó egereket visszakeresztettük, ehhez „marker-asszisted speed congenic” metodikát használtunk. Vagyis a HLA II. osztályú transzgént és a neomycin rezisztencia gént együttesen hordozó visszakeresztett hibrid hímeket először kiválasztottuk, majd a pozitív hímek közül mintegy 150 polimorfikus markert használva szűrtük ki a leginkább BALB/c genetikai háttérrel rendelkezőket (17;54;62). Így a legmegfelelőbb hímeket választottuk ki a következő keresztezésekre. Hét visszakeresztés után a heterozigóta hímeket és nőstényeket (melyek mind a HLA II. osztályú transzgént, mind a neomycin rezisztencia gént hordozták) összekeresztettük, hogy homozigóta utódokat hozzanak létre. A homozigóta egereket flow cytometriával szűrtünk a HLA transzgén expressziójának és az I-A<sup>d</sup> hiányának vizsgálatára.

### **3.2. Antigének, immunizáció és az arthritis vizsgálata**

A teljes porc extraktumot humán felnőtt pocból nyertük 4M-os guanidin klorid extrakcióval (42;63). Az extraktumot ismételt CsCl gradiens ultracentrifugálással tovább tisztítottuk disszociatív körülmények között (42;63). A tisztított PG extraktumot GAG oldalláncok eltávolítása érdekében kondroitináz ABC-vel (Seikagaku America, Falmouth,

MA, USA) kezeltük (5 egység/100 mg PG 0.1 mMTris-acetate puffer, pH 7.6, 24 h, 37 °C) (20;42;63). A PG-t ezt követően endo- $\beta$ -galaktozidázzal (Seikagaku America) emésztettük (0.1 egység/100 mg PG, sodium acetate puffer, pH 5.8) a felnőtt porcban jelenlevő keratan-szulfát oldalláncok eltávolításához (42;48;63). Mivel a keratan-szulfát és a chondroitin-szulfát oldalláncok PG számos domináns/arthritisogén epitópját elfedhetik, ezen GAG oldalláncok eltávolítása kritikus fontosságú a PG központi fehérjelánc domináns/arthritisogén T sejt epitópjainak felszínre hozásában (17;43;48). A PG extraktumot diethylaminoethyl (DEAE; Whatman, Clifton, NJ, USA) ioncserélő kromatográfiával nyertük ki (64). A meg nem kötött frakciót 0.15 M-os NaCl-dal nyertük ki, és hyaluronan-Sepharose-al absorbeáltuk (65) a GAG mentes G1 domének és a porc link protein eltávolításához (48). A mintákat vízzel szemben dializáltuk és liofilizáltuk. Az antigenitás szempontjából egyáltalán szóba jövő peptid szekvenciák teoretikus kiválasztása az MHC-kötő minták (66), a T sejt epitópokban gyakori  $\alpha$ -helix amfipatikus szekvencia minták (67) és a hidrofób "strip-of-helix" algoritmus (68) alapján történt. Ezen válogatás eredményeképpen a kiválasztott összesen 143 PG központi fehérjelánc peptid (84 a G1 doménben és 59 egyéb régiókban) lefedte valamennyi feltételezett helyet 3 aminosavas eltolásokkal (33), és a nem feltételezett régiók mintegy 25 %-át is. A peptideket pin módszerrel szintetizáltattuk (Chiron Mimotopes, Raleigh, NC, USA). Ezt a 143 peptidet használtuk a T sejt válasza (T sejt proliferáció és interleukin-2 termelés) kezdeti szűrésére HLA-traszgenikus és vad típusú BALB/c egerekben. A T sejt válasza kiváltó peptideket amid-blokkolt C-terminussal szintetizáltattuk nagy mennyiségben (Research Genetics, Huntsville, AL, USA) és használtuk mind a peptid immunizációs kísérletekre, mind az epitóp-szűrés munkákra. A peptideket DMSO-ban oldottuk (10 mg/ml), majd 1 mg/ml-es koncentrációig tovább hígítottuk savanyított 0,1M-os foszfát pufferben (pH 4,5), ezt követően -20 °C-on tároltuk.

A kísérleti protokollokat a chicagai Rush Egyetem Orvosi Központjának Állatgondozói és Felhasználói Bizottsága hagyta jóvá. Valamennyi egeret azonos körülmények között tartottunk. Eпитóp szűrésre 6-8 hetes egereket injekciótunk 100 µl komplett Freund adjuvánsban (CFA; Difco, Detroit, MI, USA) feloldott 100 µg PG antigénnel vagy 50 µg szintetikus peptiddel. Az injekciókat intraperitoneálisan vagy a hátsó végtagi talpbőr alá adtuk. Az egereket a „priming” injekció után 9 nappal, vagy a harmadik intraperitoneális immunizációt követő 9-10 nappal véreztettük el. Az intraperitoneálisan oltott egerekből a lépet, a talp bőre alá immunizált egerekből a popliteális és az inguinalis nyirokcsomókat távolítottuk el. A lép vagy a nyirokcsomó sejtek T sejtjes válaszát 25 µg/ml szintetikus peptid jelenlétében három vagy négy párhuzamos méréssel határoztuk meg.

Arthritis kiváltásához különböző HLA II. osztályú transzgenket expresszáló és saját endogén II. osztályú MHC molekulát tekintve deficiens egereket, valamint ezek vad típusú testvéreit 3 hetes időközökkel intraperitoneálisan immunizáltuk. Az egereket felváltva injekciótunk (minden második injekció) 200 µl PBS-ben (pH 7,4) oldott 200 µg PG-al és 1 mg dimethyldioctadecylammonium-bromiddal (DDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) (17), illetőleg 100 µl PBS-ben (pH 7,4) és 100 µl komplett Freund adjuvánsban emulgeált 200 µg PG antigénnel. A vad típusú testvérek mellett, amikor egy új kísérletes csoportot immunizáltunk, 10-12 korban egyező BALB/c nőstény egeret (National Cancer Institute, Frederick, MD, USA) szintén immunizáltunk azonos dózisu PG antigénnel és adjuvánssal, pozitív kontrollként alkalmazva ezt a csoportot. Valamennyi immunizált egér végtagjait a második antigén injekcióig (21. nap) hetente egy alkalommal, majd hetente 3 alkalommal megvizsgáltuk, hogy az arthritisek kialakulását és progresszióját pontosan észlelhessük. Az ízületi duzzanat megjelenését tekintettük az arthritis kialakulási idejének. Az általánosan elfogadott értékelési rendszert, mely a gyulladáson és hyperaemiáján alapul (0-4-ig minden végtagon, a maximális lehetséges 16-os értékkel állatokként) használtuk a betegség

súlyosságának becslésére (17;20;42). Az arthritises és nem arthritises állatok végtagjait kimetszettük, fixáltuk és decalcifikáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A szöveti metszeteket hematoxylinnal és eozinnal festettük meg hisztopatológiai vizsgálat céljára.

### **3.3. Az antigén-specifikus T sejt válaszok, antitestek és citokinek mérése**

A PG immunizált egereket, hacsak nem használtuk azokat peptid azonosítási kísérletekre, 4-5 héttel az ötödik antigén injekció után véreztettük el (kb. 112-129 nappal az elsődleges immunizálás után). Az egerek szérumait összegyűjtöttük, a lép és nyirokcsomó sejteket a PG/peptid specifikus T sejt válaszok mérésére használtuk. Az antigén specifikus válaszokat 50 µg PG protein/ml vagy 25 µg/ml szintetikus peptid jelenlétében négy párhuzamos mintában mértük ( $3 \times 10^5$  sejt/lyuk, 96 lyukú lemez). Az antigén specifikus interleukin-2 (IL-2) termelést a 48 órás felülúszóban CTLL-2 „bioassay”-vel mértük, a T sejt proliferációt pedig az ötödik napon határoztuk meg megmérve a  $^3\text{H}$ -thymidine beépülést (42;53;54;62). Az antigén specifikus T sejt választ (a direkt T sejt proliferációt vagy a CTLL-2 sejtek választ a felülúszóban levő IL-2-re) stimulációs indexben fejeztük ki, amely az antigén stimulált tenyészetekben és a nem stimulált kultúrákban jelenlévő inkorporált  $^3\text{H}$ -thymidine percenkénti beütésszámának arányaként definiálható. Az interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), interleukin-4 (IL-4) és tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) antigén specifikus termelődését, pontosabban a citokinek koncentrációját a sejttenyészet felülúszójában ( $3 \times 10^6$  sejt/ml), a tenyésztés negyedik napján ELISA technikával mértük meg (BD Biosciences, San Diego, CA, USA vagy R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (53;54;62).

A PG specifikus antitesteket szintén ELISA-val mértük meg(53;54;62). A Maxosorp „immunoplate”-eket (Nunc, Roskilde, Dánia) humán vagy egér porc PG-vel fedtük (0,1 µg protein/lyuk, 96 lyukú lemez), majd a szabad kötőhelyeket PBS-ben (pH 7,4) oldott 1%-os zsírmentes tejjel blokkoltuk. A szérumokat növekvő hígításban alkalmaztuk, és mind a

teljes anti-PG antitestek mennyiségét, mind a PG-specifikus antitestek izotípusainak koncentrációját meghatároztuk peroxidáz-konjugált kecske anti-egér IgG-vel (Accurate, Wetbury, NY, USA), vagy patkány anti-egér IgG1-el és IgG2a-val (Zymed, San Francisco, CA, USA), mint szekunder antitestekkel (53;54;62). A szérum antitest koncentrációkat a megfelelő egér IgG izotípus standardok (valamennyi a Zymedtől) vagy tisztított egér IgG (Sigma-Aldrich) révén számítottuk ki (53;54;62).

### **3.4. Flow cytometria**

Az egér II. osztályú MHC és a HLA molekulák antigén prezentáló sejtek felszínén történő expressziójának meghatározásához heparinizált perifériás vért vagy lépsejteket használtunk. A sejteket fluoreszcein isotiocianáttal vagy fikoeritrinnel jelzett egér I-A<sup>d</sup> és humán HLA-DR vagy HLA-DQ elleni monoklonális antitestekkel (BD Biosciences) jelöltük, és az egyes vagy kettős festésű minták fluoreszcenciáját mértük és analizáltunk FACScan flow cytométerrel és CellQuest software-el (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) (56;69).

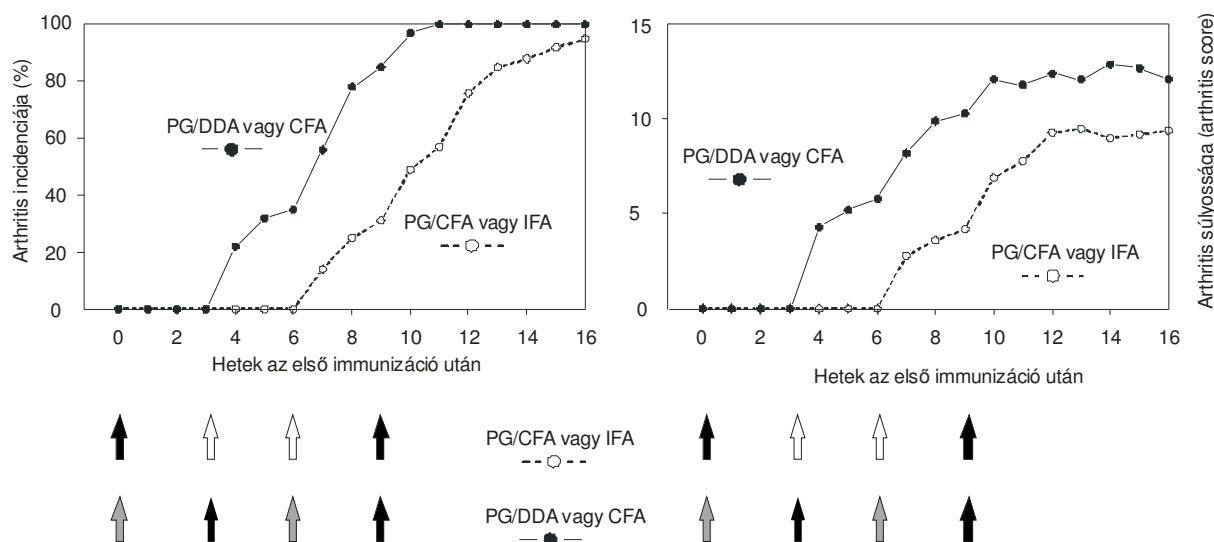
### **3.5. Statisztikai analízis**

Statisztikai analízist az SPSS program 7.5 verzióját használva végeztünk (SPSS, Chicago, IL, USA). Mann-Whitney és Wilcoxon tesztek alkalmaztunk csoportok közötti összehasonításra. A 0.05-nél kisebb P értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK

### **4.1. Vad típusú BALB/c egerek szisztémás immunizációja humán porc proteoglikánnal és komplett Freund vagy dimethyldioctadecylammonium-bromid (DDA) adjuvánsok alkalmazásával**

A PGIA indukciójában az antigént hagyományosan komplett Freund adjuvánsban emulgeálják és alkalmazzák intraperitoneális injekció formájában genetikailag fogékony egerekben. A komplett Freund adjuváns intraperitoneális injekciója két, de még inkább három alkalommal a kísérletes állatok 15-30%-nak elvesztéséhez vezet, ezért az immunizálási folyamatban a második és harmadik injekció során ásványi olajban (inkomplett Freund adjuváns) emulgeált antigént használnak. Mivel ezzel az immunizálási módszerrel a harmadik antigén injekció után csak 30-40%-os arthritis incidencia érhető el, gyakran szükség van a negyedik antigén/komplett Freund adjuváns injekcióra is, ami viszont jelentős mortalitással és letalitással jár. A halálozás csökkentéséhez, az arthritis incidenciájának és súlyosságának növeléséhez előzetes kísérleteink során az első, harmadik és ötödik antigén injekciót DDA adjuvánssal együtt alkalmaztuk, és ennek hatását összehasonlítottuk a hagyományos immunizálási eljárással. A DDA adjuváns alkalmazásával az immunizálással kapcsolatos mortalitás gyakorlatilag megszűnt, az arthritis incidenciája a harmadik injekció után elérte a 100%-ot, és a kumulatív indexszel jellemezhető súlyosság meghaladta a hagyományos immunizálási eljárással elérhető. Ezen eredmények alapján kísérleteink további részében arthritis indukciójára a PG-t felváltva alkalmaztuk DDA-ban és komplett Freund adjuvánsban.



**3. ábra** A proteoglikán indukált arthritis incidenciája és súlyossága humán porc proteoglikán aggregáttal való immunizációt követően. A PG-t komplett Freund adjuvánsban (CFA) (tömött nyíl), inkomplett Freund adjuvánsban (IFA) (üres nyíl) és dimethtyldioctadecylammonium-bromidban (DDA) (árnyékolt nyíl) emulgeáltuk. **A.** Az arthritis incidenciáját hetente kétszer vizsgáltuk. **B.** Minden állat minden végtagját megvizsgáltuk hetente kétszer a gyulladás vonatkozásában (0-4 score), ami minden immunizált állatnál egy arthritis score-t eredményezett (0-16 score). A nyilak az injekciók idejét jelölik. Az ábrán négy független kísérlet eredményét (n = 10-15 állat kísérletenként) összegeztük.

#### 4.2 Az eredeti kevert (PGIA rezisztens) genetikai háttérrel rendelkező HLA-transzgenikus egerek szisztémás immunizációja

Az eredeti kevert (vagyis PGIA rezisztens) genetikai háttérrel rendelkező HLA-transzgenikus egereket (HLA-DR2.Ab<sup>0</sup>, DR3.Ab<sup>0</sup>, DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus vonalak) és PGIA-re fogékony vad típusú BALB/c egereket (pozitív kontroll csoport) immunizáltunk, és vizsgáltunk arthritis előfordulására kísérleteink kezdetén. A PGIA-re fogékony BALB/c egerek mintegy 70%-a fejlesztett ki arthritist 7-10 nappal a harmadik PG injekció után, és 100%-a lett arthritises a negyedik PG injekciót követő 3 héten belül. Ezzel szemben a HLA-transzgenikus egerek (30-102 immunizált állat az egyes vonalak esetén) perifériás ízületeiben a gyulladásnak sem klinikai, sem szövettani jele nem volt észlelhető még 4 héttel az ötödik PG antigén injekciót követően sem (1. táblázat).

1. táblázat HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus kevert genetikai háttérű és vad típusú BALB/c egerek PG indukált arthritisének jellemzői\*

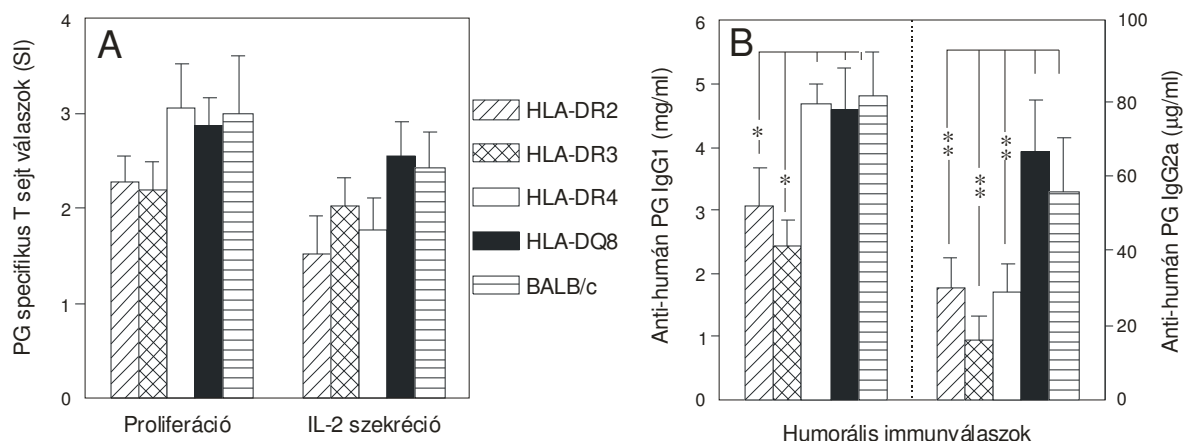
BALB/c egér csoport	Arthritis incidencia Arthritises/összes (%)	Arthritis megjelenés napja átlag±SD	Arthritis súlyossági foka átlag±SD
HLA-DR2.Ab <sup>0</sup> transzgenikus	0/43 (0)	nem értelmezhető	nem értelmezhető
HLA-DR3.Ab <sup>0</sup> transzgenikus	0/30 (0)	nem értelmezhető	nem értelmezhető
HLA-DR4.Ab <sup>0</sup> transzgenikus	0/102 (0)	nem értelmezhető	nem értelmezhető
HLA-DQ8.Ab <sup>0</sup> transzgenikus	0/75(0)	nem értelmezhető	nem értelmezhető
Vad típus (pozitív kontroll)	63/63 (100)	55±3	6,1±0,9

\*Az egereket 200 µg humán porc PG-nal (PG; proteinként mérve) és adjuvással 5 alkalommal intraprioneálisan immunizáltuk 4 független kísérletben. A kísérleteket az első injekciótól számított 112-138 napon fejeztük be (részletesen ld. az Anyagok és módszerek részt). Az arthritis megjelenési napjának és az arthritis súlyossági fokának megállapításánál csak az arthritises állatokat vettük figyelembe.

#### **4.3 A proteoglikán elleni sejtes és humorális immunválasz mérése proteoglikán/adjuvánssal immunizált HLA-transzgenikus és vad típusú BALB/c egerekben**

Annak megítélésére, hogy a csökkent immunválasznak tulajdonítható-e az arthritis hiánya transzgenikus egerekben, megmértük mind a PG elleni sejtes és humorális immunválaszt a PG/adjuvánssal immunizált HLA-transzgenikus és vad típusú BALB/c egerekben. Az antigén specifikus T sejtes válaszok, akár a proliferációt, akár az IL-2 termelést mértük (CTLL-2 bioassay), a különböző transzgenikus vonalakban és az arthritises BALB/c egerekben nagyon hasonlóak voltak (4A. ábra). Ugyanez volt a helyzet, amikor a PG-

antigénnel előimmunizált nyirokcsomó sejteket vagy az első, második vagy harmadik intraperitonealis injekció után a lépsejteket teszteltük. Hasonlóan a T sejt válaszhoz, mindegyik transzgenikus egérvonal mutatott humán PG elleni antitestválaszt az immunizáció után, bár a PG specifikus IgG1 és IgG2a szérumszintje alacsonyabb volt a HLA-transzgenikus egerekben (kivéve a HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> csoportot), mint a vad típusú BALB/c egerekben (4B. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy miközben egyetlen HLA-transzgenikus vonal sem fejlesztett ki arthritist, valamennyi jól reagált a humán porc PG-al történt immunizációra, vagyis az egér T sejtek hatékonyan prezentálták a humán PG-t a HLA II. osztályú transzgénekkel együttműködve.



**4. ábra** Proteoglikánnal (PG) immunizált HLA-DR2.Ab<sup>0</sup>, HLA-DR3.Ab<sup>0</sup>, HLA-DR4.Ab<sup>0</sup>, HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus (valamennyiben hiányzó saját II. osztályú hisztokompatibilitási komplex molekulával [Ab<sup>0</sup>]) és vad típusú BALB/c egerek immunválaszai (n=12 egér/csoport). Az egereket a negyedik PG és komplett Freund adjuváns injekció után 9-10 nappal öltük meg, és **A**, az antigén specifikus T sejt proliferációt és intrleukin-2 (IL-2) termelést és **B**, a PG specifikus IgG1 és IgG2a antitestek szérumszintjét határoztuk meg. Az értékek az átlagot és a SD-t mutatják. \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01. SI = stimulációs index.

#### 4.4. A T sejt epitóp repertoár proteoglikánnal immunizált HLA-transzgenikus egerekben

Mivel a HLA-transzgenikus egerek humán porc PG-al történt immunizációja T sejt választ és antitesttermelést is kiváltott (4 ábra), a következő nyilvánvaló lépés annak

meghatározása volt, hogy a PG központi fehérjeláncának mely T sejt epitópjait prezentálták a különböző MHC allélek. Ezekhez a kísérletekhez a HLA transzgenikus egereket (6-12 csoportonként) humán PG-nal intraperitonealisan immunizáltunk, és in vitro meghatároztuk a feltételezett T sejt epitópoknak megfelelő 143 peptid elleni immunválaszt. Amellett, hogy valamennyi transzgenikus vonal kifejtett immunválaszt a teljes PG molekula ellen (4A. ábra), T sejt proliferációval számos PG peptid epitóp is azonosítható volt a központi fehérjeláncon belül. A 5. ábra azokat a peptid szekvenciákat foglalja össze, melyek T sejt proliferációt és IL-2 termelést váltottak ki a 4 HLA transzgenikus vonal közül legalább egyben, és egyúttal mutatja a pozitív peptidek lokalizációját a teljes PG központi fehérjeláncon belül.

	Peptid szekvencia	Peptid Elhelyezkedés	MHC allélek				BALB/c I-A <sup>d</sup>
			Humán HLA-DR2	DR3	DR4	DQ8	
G1 domén	VETSDHDNSLSVSIP	1-15	-	-	+	-	-
	DNSLSVSIPQPSPLR	7-21	+	-	-	-	-
	LSVSIPQPSPLRVLL	10-24	-	+	-	-	+
	VLLGTSLTIPCYFID	22-36	-	+	+	+	-
	GTSLTIPCYFIDPMH	25-39	+	+	+	+	+
	LTIPCYFIDPMHPVT	28-42	+	+	+	+	-
	PMHPVTAPSTAPLA	37-51	-	+	+	-	-
	STAP <b>PLAPRIKWSRV</b> S	46-60	-	-	-	+	+
	<b>GRVRVNSAY</b> QDKVSL	73-87	-	+	+	-	+
	RVNSAYQDKVSLPNY	76-90	-	+	+	+	-
Interglobuláris domén	<b>PAIPSDATLE</b> VQSLR	91-105	-	+	-	-	-
	PSDATLEVQSLRSND	94-108	-	-	+	-	-
	DGFHQCD <b>AGWLADQTV</b>	175-190	-	-	+	+	-
	PEKFTFQEAANECRRL	242-257	-	-	+	-	-
	AANECRRLGARLATT	250-264	-	+	-	+	-
	ECRRLGARLATTGHV	253-267	-	+	+	+	-
	GHVYLAWQAGMDMCS	265-279	+	-	+	+	-
	YLAWQAGMDMCSAGW	268-282	+	+	+	+	+
	WQAGMDMCSAGWLAD	271-285	+	+	+	+	-
	GMDMCSAGWLADRSV	274-288	-	-	+	-	-
KS-kötő domén	MCS <b>AGWLADRSVRYP</b>	277-291	-	-	+	-	-
	<b>AGWLADRSVRYP</b> ISK	280-294	-	-	+	-	-
	LGVRTVYVHANQGTGY	304-318	-	-	-	+	-
	RTVYVHANQGTGYDPD	307-321	-	+	-	+	-
	G2 <b>GWLADQTVRYP</b> IVSPRT <sup>P</sup>	508-525	-	-	+	-	-
	ETSASGVGDLSGLPSG	944-959	+	-	-	-	-
	LSGETSGVPDLGQP	1651-1665	+	-	-	-	-
	VSGESSRAEIGSSLP	1770-1784	+	+	-	-	+
	DSGSPDLSETTSAFHE	1989-2004	-	-	+	+	+
	VDAERRCREQQSHLSS	2208-2223	+	-	-	-	+
Kondroitin szulfát kötő domén	<b>LQKRSSRHP</b> RRSRPST	2379-2394	+	+	+	+	+
G3 domén	EGF						
	LB						
	CRP						

Domináns/összes epitóp (peptid)    2/11    3/15    11/20    8/15    3/9

**5. ábra** A humán porc proteoglikán (PG) aggregán sematikus ábrázolása és a humán PG központi fehérjeláncának HLA-DR2.Ab0, HLA-DR3.Ab0, HLA-DR4.Ab0, HLA-DQ8.Ab0 egerekben kimutatható T sejt epitópokat tartalmazó peptid szekvenciái. Az ábra bemutatja azt a 31 HLA-pozitív peptidet, melyeket a humán porc PG érett központi fehérjeláncának első aminosavjától számoztunk. Arthritises BALB/c egerekben 27 T sejt epitópot azonosítottunk (33), és ebből a 27 I-A<sup>d</sup> asszociált peptidből 9-et a négy vizsgált HLA allélből legalább egy szintén prezentálni képes (utolsó oszlop). A BALB/c egerekben leírt 4 domináns/arthritisogén epitópból (17) 3 szintén pozitív volt DR4.Ab0 és DQ8.Ab0 egerekben is (szaggatott aláhúzás). A peptid/epitóp térképező kísérletekben az egereket 9-10 nappal negyedik intraperitoneális injekció után öltük meg, és az antigén specifikus lépsejt proliferációt és interleukin termelést határoztuk meg (6-12 egér/HLA-transzgenikus csoport). A más időpontokban immunizált különböző csoportok összehasonlítására a konzekvensen pozitív eredményeket stimulációs indexként (SI) fejeztük ki és 2-3 kísérlet eredményeit vontuk össze. A következőket pozitív T sejt válaszokat SI>1,5 (+) és SI>2,5 (árnyékolt +) ábrázoltuk. A vastagbetűs, aláhúzott szekvenciák azok a T sejt epitópok, melyeket a DR4 kötő peptidnek jósltak korábbi vizsgáltak (33;70;71). Figyelemre méltó, hogy a 31 HLA kötő peptid közül 24 volt a humán PG G1 doménjében azonosítható, és a két leginkább domináns peptid régió (a DR4 és DQ8 oszlopok bekeretezett területei) eredetileg nem voltak erős T sejt epitópoknak és/vagy DR4 kötő szekvenciának jóslhatók.

Általánosságban megállapítható, hogy a különböző HLA transzgén expresszáló egerek a PG epitópok különböző csoportjait ismerték fel. A központi fehérjelánc G1 doménjén belül azonban 2 olyan szakasz is elkülöníthető volt, (p25-42 és p268-285 peptidek által képviselt régiók), melyek valamennyi HLA-transzgenikus egérben erősen immunogénnek bizonyult szekvenciákat tartalmaznak (5. ábra). Ráadásul a négy domináns/arthritisogén peptid közül 3, amit korábban BALB/c egerekben azonosítottak (33;48), szintén T sejtet választ indukált HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és/vagy HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> egerekben.

A G1 domén két domináns régiója (p25-42 és p268-285) mellett, számos részlegesen átfedő vagy nem átfedő peptid szintén T sejtet választ indukált a négy különböző transzgenikus vonalban (különösen a HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus egerekben), bár rendszerint kisebb intenzitással (4. ábra), mint a domináns régiókban levő peptidek. Összehasonlítva a négy HLA transzgenikus egércsoport epitóp profilját azt tapasztaltuk, hogy a pozitív peptidek kb. 50%-a erős T sejtet választ indukált a DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> egerekben, míg ez az arány csak 20% volt a DR2.Ab<sup>0</sup> és DR3.Ab<sup>0</sup> egerek esetén (5. ábra). Ráadásul a vad típusú BALB/c egerekben azonosított domináns/arthritisogén epitópok egyike (2379-2394 aminosavak a G3 doménen belül (69) szintén pozitív volt DR4 és DQ8 transzgenikus egerekben is. Ez utóbbi epitóp esetén figyelemre méltó, hogy 1 vagy 2 konzervatív aminosav cseréjével tartalmazza a RA pathomechanizmusában kiemelkedő fontosságúnak tulajdonított „shared epitóp” szekvenciát (QKRAA).

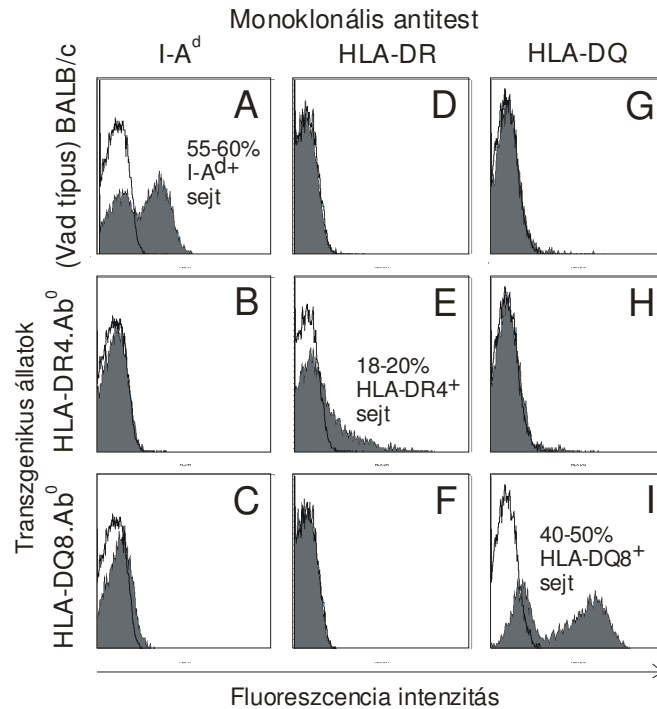
#### **4.5. A HLA-DR4 és HLA-DQ8 transzgenikus egerek BALB/c genetikai háttérbe történt visszakeresztezésének hatása az arthritis iránti fogékonyságra**

Annak meghatározásához, hogy a HLA-DR4 és HLA-DQ8 allélek az egér eredeti II. osztályú MHC-jének hiányában, arthritisre fogékony genetikai háttér jelenlétében képesek-e

autoimmun arthritist mediálni humán PG-al történő immunizációt követően, a HLA-DR4 és HLA-DQ8 transzgenikus egereket visszakereszteltünk PGIA-re fogékony BALB/c genetikai háttérbe.

Ezen két transzgenikus vonal kiválasztásában döntő jelentőségű volt, hogy a.) ismert a DR4 és DQ8 RA-el való szoros kapcsolata (13-15), b.) a PG központi fehérjeláncának számos peptid epitópja indukált erős T sejttes választ ezekben a transzgenikus egerekben (5. ábra) és c.) a DR4 és DQ8 transzgenikus egerek a vad típusú BALB/c egerek domináns/arthritisgén 4 epitópja közül legalább 2-re válaszoltak (33).

Mint ezt 147 polimorfikus markerrel való szűréssel PCR technikával is megerősítettük, a visszakereszteléseket követően a 17. kromoszómán elhelyezkedő MHC lokuszt kivéve mindkét vonal tiszta BALB/c genetikai háttérűvé vált. Másrészt flow cytometria révén ellenőriztük az eredeti egér MHC II. osztályú allél, illetve a sejt felszíni fehérje hiányát és a funkcionáló transzgen jelenlétét. Ennek megfelelően az I-A<sup>d</sup> expresszió kimutatható volt a vad típusú BALB/c egerekben (6A. ábra), míg ez hiányzott mind a DR4.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus (6B. ábra) és a DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus (6C. ábra) egerekben. A flow cytometria szintén igazolta a DR4 allél expresszióját a lépsejtek kb. 20 %-ának felszínén (6E. ábra), míg a DQ8.Ab<sup>0</sup> a BALB/c egerek lépsejtjeinek 40-50%-án volt kimutatható a DQ8 (6I. ábra).



**6. ábra** Az I-A<sup>d</sup>, HLA-DR és HLA-DQ allélek sejtfelszíni expressziójának flow cytometriás analízise PG aggregán immunizált vad típusú BALB/c, illetve HLA DR4.Ab<sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c egerek lépsejtjein. A nyitott hisztogramok az izotípus kontrollokat (háttér) mutatják; a sötétített hisztogramok az I-A<sup>d</sup>, DR és DQ molekulák expresszióját ábrázolják. Az ábrán számos mérés egy-egy reprezentatív mintája látható.

A hét -marker asszisztált- visszakeresztezés után a DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/BALB/c háttérre kongenikus egereket és a vad típusú BALB/c egereket 3 független kísérletben immunizáltuk humán PG-al. Míg a vad típusú BALB/c egerek 70-80%-a fejlesztett ki arthritist a harmadik injekció után, és 100%-uk volt arthritises a negyedik PG injekciót követően, mindkét transzgenikus/kongenikus vonal 5 antigén injekciót igényelt arthritissé fejlődéséhez (2 táblázat). Miközben a HLA transzgenikus egerek arthritisének indukciójához legalább egy további antigén injekcióra volt szükség, a PGIA előfordulási gyakorisága és súlyossága alacsonyabb volt a HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus egerekben, mint a vad típusú BALB/c egerekben. Ez a különbség különösen kifejezett volt a DR4.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus vonal esetén.

**2. táblázat** HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus BALB/c és vad típusú BALB/c egerek PG indukált arthritisének jellemzői\*

BALB/c egér csoport	Arthritis incidencia Arthritises/összes (%)	Arthritis megjelenés napja átlag±SD	Arthritis súlyossági foka átlag±SD
HLA-DR4.Ab <sup>0</sup> transzgenikus	16/66 (24) †	107±12†	3,7±1,7†
HLA-DQ8.Ab <sup>0</sup> transzgenikus	18/43 (42) †	104±8†	5,2±1,3‡
Vad típus (pozitív kontroll)	55/55 (100)	54±2	5,9±0,8

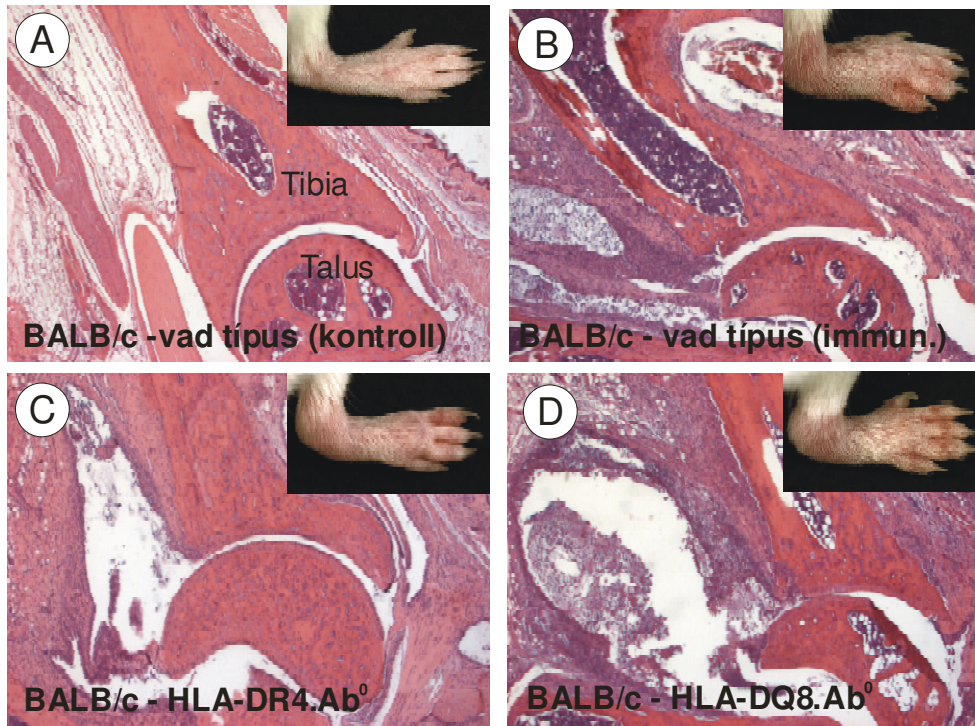
\*Az egereket 200 µg humán porc proteoglikánnal (PG; proteinként mérve) és adjuvással 5 alkalommal intraprioneálisan immunizáltuk 3 független kísérletben. A kísérleteket az első injekciótól számított 112-129 napon fejeztük be (részletesen ld. az Anyagok és módszerek részt). Az arthritis megjelenési napjának és az arthritis súlyossági fokának megállapításánál csak az arthritises állatokat vettük figyelembe.

† p < 0,01 a vad típushoz viszonyítva

‡ p < 0,05 a vad típushoz viszonyítva

#### 4.6. A PGIA klinikai és hisztopatológiai jellemzői HLA transzgenikus BALB/c egerekben

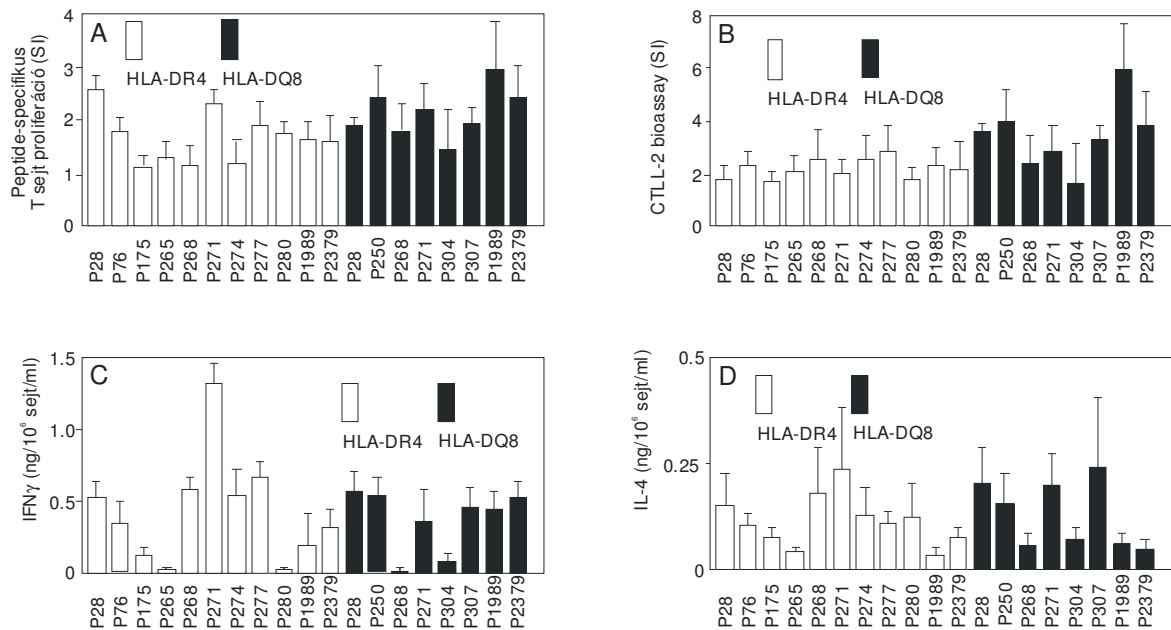
A HLA transzgenikus egerek arthritises ízületeinek hisztopatológiai jellemzői hasonlóak voltak a vad típusú BALB/c egerekben észlelt arthritisekéhez (17;20;42). Miközben a klinikai jellemzők (2. táblázat), a korai szövettani eltérések és a betegség előrehaladása valamivel enyhébbnek tűntek HLA transzgenikus/kongenikus egerekben, mint vad típusú BALB/c egerekben, tulajdonképpen nem volt minőségi különbség a gyulladt ízületek hisztológiai képében a transzgenikus és a vad típusú állatok között (7. ábra).



**7 ábra** Az egerek teljes hátsó lábának makroszkópos képe és megfelelő hisztológiai metszetek **A.** normál, nem immunizált vad típusú BALB/c egér, **B.** proteoglikán (PG) immunizált arthritises vad típusú BALB/c egér, **C.** HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c és **D.** HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c egér kb. 7-9 nappal a PG indukált arthritis kezdete után. (hematoxilin és eosin festés; eredeti nagyítás 4x-es)

#### 4.7. A proteoglikán specifikus peptidok immunogenitása HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus BALB/c egerekben

A PG-al immunizált BALB/c genetikai háttérű DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus egerekben észlelt immunválaszok (T sejt proliferáció, antitesttermelés és epitóp térképezés) egészében nagyon hasonlítottak az azonos HLA allélt hordozó, de kevert genetikai háttérű egerekben észlelt immunválaszokra. A PG epitópok immunogenitásának további jellemzéséhez, a PG-al immunizált DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> BALB/c egerek lépsejtjeit a PG központi fehérjeláncának kiválasztott epitópjainak megfelelő peptidok jelenlétében tenyésztettük, és megmértük az epitóp specifikus T sejt proliferációt és citokin termelést (8 ábra).



**8. ábra** Proteoglikán (PG) aggregánnal hiperimmunizált HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c egerek lépsejtjeinek epitóp specifikus T sejt proliferációja és citokin termelése (IL-2 CTLL-2 bioassay-vel, IFN $\gamma$  és IL-4). A vizsgált peptid epitópokat a 2. ábrán bemutatott „HLA-pozitív” peptidek alapján választottuk ki. Az egereket 10-12 nappal a negyedik intraperitonealis PG injekciót követően véreztettük el, és a lépsejtek peptid specifikus T sejt proliferációját (A), IL-2 (B), IFN $\gamma$  (C) és IL-4 (D) termelését mértük meg (mindkét transzgenikus/kongenikus vonalból 6-6 egér 3 független kísérletben). Az értékeket átlag  $\pm$  SD-ben adtuk meg. SI = stimulációs index.

A 11 DR4 asszociált és a 8 DQ8 asszociált erős/domináns peptid szintén pozitív választ hozott létre a DR4.Ab<sup>0</sup> és a DQ8.Ab<sup>0</sup> BALB/c egerekben (8A. ábra), hasonlóan a kevert genetikai háttérű DR4.Ab<sup>0</sup> és a DQ8.Ab<sup>0</sup> egerek esetében mért értékekhez. Míg azonban néhány peptid a PG-al immunizált BALB/c kongenikus/transzgenikus egerekben jelentős mértékű T sejt proliferációt és jóval kisebb fokú IL-2 termelést váltott ki, mások éppen ellentétes választ indukáltak. A peptidekkel stimulált sejtek szignifikáns mennyiségű IL-2-t (8B. ábra) és IFN $\gamma$ -t (8C. ábra) termeltek, ezzel szemben nagyon kis mennyiségű IL-4-et (8D. ábra). Általában megállapítható volt, hogy magas IFN $\gamma$ /IL-4 arány volt észlelhető arthritises egerekben, ami rendszerint még kifejezettebb volt DQ8.Ab<sup>0</sup>, mint DR4.Ab<sup>0</sup>

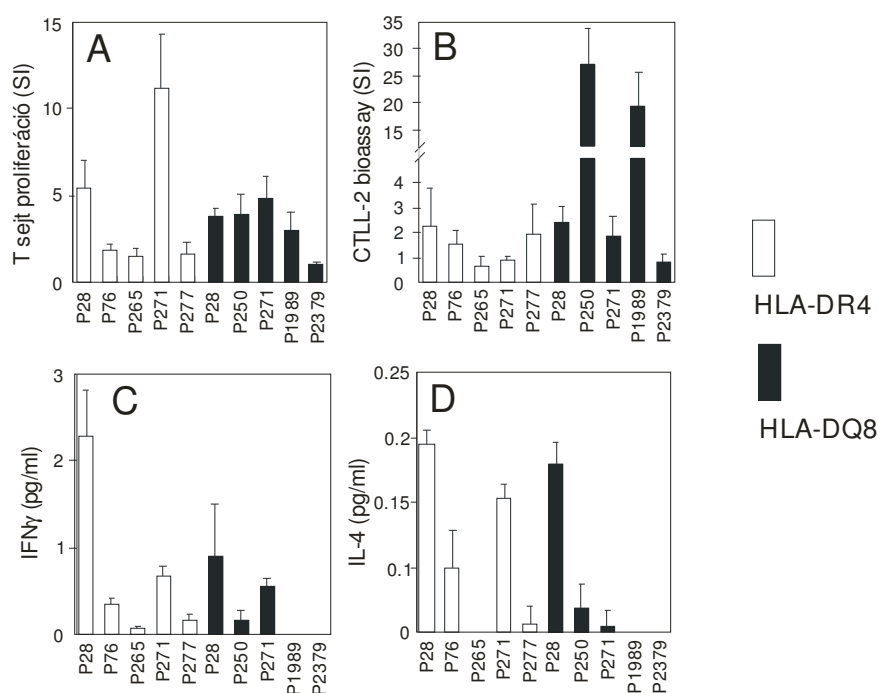
transzgenikus BALB/c egerekben. Ugyanakkor azonban szignifikáns összefüggés nem volt észlelhető az arthritis jelenléte és bármely peptid T sejt általi felismerése között.

#### **4.8. A proteoglikán specifikus peptidek immunogenitása peptidekkel előimmunizált HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus BALB/c egerekben**

A domináns és kriptikus PG epitópokat megkülönböztetéséhez a DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c állatokat előimmunizáltuk azokkal az egyedi peptidekkel, amik erős T sejtés válaszokat váltottak ki a teljes PG-vel való immunizáció után. Az egerek talpbőre alá adott peptid/komplett Freund adjuváns injekció után 9 nappal a poplitealis nyirokcsomókat eltávolítottuk, és a megfelelő (előimmunizáláshoz használt) peptidekkel kiváltott proliferációs válaszokat és citokin termeléseket vizsgáltuk. A 9. ábra összefoglalja a PG/peptid specifikus T sejtés válaszokat, magában foglalva a citokin termelés profiljait is.

A kiválasztott peptidek közül a p28-42 és p271-285-ös provokálta a legjelentősebb T sejtés proliferációt és a dominánsan Th-1 típusú citokin termelést mindkét transzgenikus vonalban. DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c egerekben, a nyirokcsomó sejtek stimulálása a p250-264 és p1989-2004-es peptidekkel, különösen erős IL-2 termelést váltott ki, míg ezek a peptidek csak relatíve gyenge IFN $\gamma$  termelést váltottak ki, IL-4 termelést pedig egyáltalán nem indukáltak (9. ábra, tömött oszlopok). Három másik peptid (p76-90, p265-279 és a p277-291) a DR4.Ab<sup>0</sup> és a p2379-2394 peptid a DQ8.Ab<sup>0</sup> BALB/c egerekben csak nagyon gyenge T sejt proliferációt és IL-2, IFN és IL-4 termelést indukált előimmunizálás után (9A-C.), bár a T sejtek által felismerésre kerültek PG immunizációt követően a DR4 és DQ8 transzgenikus egerekben. A szintetikus peptidekkel előimmunizált egerekből származó nyirokcsomó és lépsejtek nem válaszoltak humán PG-vel való stimulációra. Így azok a peptidek, melyeket PG

immunizációt követő erős T sejt válasz alapján választottunk ki kriptikus epitópoknak tekinthetők.



**9. ábra** HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus/kongenikus BALB/c egerek tenyésztett nyirokcsomó sejtjeinek peptid specifikus T sejt proliferációja és citokin termelése (IL-2 CTL-2 bioassay-vel, IFN $\gamma$  és IL-4) 50  $\mu$ g peptiddel és 100  $\mu$ l komplett Freund adjuvánszal (CFA) való előimmunizálás után. A peptid/CFA emulziót a talp bőre alá injektáltuk és a poplitealis és inguinalis nyirokcsomókat 9 nappal később eltávolítottuk. A nyirokcsomó sejtek peptid specifikus (25  $\mu$ g/ml) T sejt proliferációját (A) és IL-2 (B), IFN $\gamma$  (C) és IL-4 (D) termelődését mértük (6 egér csoportonként). Ugyanezt a kísérletet megismételtük mind nyirokcsomó, mind lépsejtekkel talpba, illetve intraperitonealisan adott előimmunizálás után (11 egér minden peptid, két független kísérletben). Miután a válaszokban szignifikáns különbségeket nem találtunk a peptid primolt nyirokcsomó és lépsejtek között, a három kísérlet eredményeit (összesen 26 duplikált assay minden peptidre) összegeztük. Az értékeket átlag  $\pm$  SD-ben adtuk meg.

## 5. MEGBESZÉLÉS

A humán génállományon belül különböző MHC allélek hajlamosítanak leginkább RA-re (1;2;5;7), de az MHC önmagában nem elégséges a betegség kialakításához (2;72). Az arthritis iránti fogékonysággal kapcsolatba hozható nem-MHC lokuszok azonosítását célzó, teljes humán genom szűrésre vonatkozó tanulmányok azonban nagyon körülményesek és bizonytalan eredményeket adnak a genetikailag rendkívül heterogén humán populációban. Azok az állatmodellek, melyek hasonlóságot mutatnak az öröklődés és a patofiziológiai jellemzők vonatkozásában a RA-hez (6;17), és különösen azok, melyekben a betegséget kontrolláló saját MHC-t RA-re hajlamosító HLA allélekkel cserélik ki, hasznos kísérletes megközelítést jelenthetnek a HLA molekulák autoimmunitásban betöltött szerepének tanulmányozásában (5;73-75).

Munkámban a humán porc PG-t használtam arthritist indukáló antigénként, olyan humanizált egerekben, melyek a saját II. osztályú MHC molekulájuk helyett HLA alléleket tartalmaztak, és arthritisre hajlamosító vagy rezisztens genetikai háttérrel rendelkeztek. Ez a kísérleti rendszer lehetőséget nyújtott számomra, hogy azonosítsam humán porc PG korábbi modellkísérletek során megjósolható azon epitópjait, amelyeket a RA-re hajlamosító HLA molekulák prezentálnak, és megerősítsem a nem-MHC asszociált gének kritikus szerepét a betegség mechanizmusában. Ráadásul a PG molekula központi fehérjeláncának néhány nem egyértelműen megjósolható szekvenciája is erős T sejt epitópként volt felismerhető a HLA-DR4.Ab<sup>0</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus egerekben, utalva a modellkísérletek és a valódi biológiai rendszer különbözőségeire és a modellkísérletek korlátaira.

Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a PGIA rezisztens és PGIA fogékony törzsek nagymértékben hasonló immunválaszt adtak porc PG-al való immunizálás után (17;62). Ugyanakkor az arthritis iránti fogékonyság nyilvánvalóan függött mind a megfelelő MHC allél, (legyen az H-2<sup>d</sup>, DRB1\*0401 vagy DQ8B1\*0302), mind a megfelelő genetikai háttér

(BALB/c) jelenlététől. PGIA-ben az MHC és a nem-MHC gének kritikus szerepére korábbi tanulmányok világítottak rá. Az MHC szerepére utaló egyik legjobb példa szerint, a vad típusú BALB/c és a kongenikus BALB/K egerek (melyek H-2<sup>d</sup>, illetőleg és H-2<sup>k</sup> alléleket hordoznak) fogékonyak PGIA-re, míg a kongenikus BALB/B vonal (mely arthritis szempontjából rezisztens H-2<sup>b</sup> allélt hordoz BALB/c háttér mellett) teljesen rezisztens PGIA-re (17;62). A nem-MHC gének arthritis iránti fogékonyságban betöltött szerepét mutatja, hogy míg a BALB/c egerek (H-2<sup>d</sup>) 100%-os hajlamot mutatnak PGIA-re (17), sem a DBA/2, sem a NZB egerek (mindkét törzs szintén H-2<sup>d</sup>-t hordoz) nem fejlesztenek ki arthritist PG-al való immunizáció után (17;43;62). Így nem volt meglepő, hogy kísérleteinkben a humanizált egerek RA-re hajlamosító MHC allélekkel és kevert genetikai háttérrel (CBA/J, B10.M, 129/Sv, C57BL/6) valamennyien rezisztensek voltak PGIA-re, annak ellenére, hogy néhány ezen transzgenikus egerek közül kifejlesztett arthritist II. típusú kollagénnel történt immunizációt követően (57;60;61;76-78).

A két legfontosabb arthritises egérmódel (PGIA és kollagén indukált arthritis (CIA)) közötti fogékonyságbeli különbség a különböző öröklődési mintázattal és a MHC más genetikai lokuszok feletti hatásában meglévő különbségekkel magyarázható (17;54). A MHC vonatkozásában heterozigóta egerek egyetlen CIA iránti fogékonysági alléljük (pl H-2<sup>q+/-</sup>) jelenlétében is képesek kifejleszteni arthritist II. típusú kollagénnel való immunizációt követően, ezzel szemben H-2<sup>d/d</sup> homozigótaság szükséges a PGIA kialakulásához (53;54). Vagyis a fogékonysági lokuszok között az MHC hatása sokkal erősebb kollagén indukált arthritisben, mint PGIA-ben (17;53;54). Ezzel kapcsolatban fontos azonban azt is hangsúlyozni, hogy a poligénes betegségek domináns öröklődésére vonatkozó bizonyítékok (mint ez látható CIA esetén) hiányoznak emberben, vagyis az öröklődési mintázat vonatkozásában a PGIA közelebb áll a humán RA-hez. Az egér H-2<sup>d</sup> (PGIA fogékonysági allél) helyettesítése DR4 vagy DQ8 allélekkel arthritis-fogékony (BALB/c) genetikai háttérű

egerekben lehetővé teszi PGIA indukcióját, ami szintén arra utal, hogy a betegség (a PGIA és a RA egyaránt) kifejlődéséhez a MHC és nem-MHC allélek optimális kombinációja szükséges. Bár a RA-re hajlamosító DRB1 (DR4) allélt gyakran észlelték DQB1 (DQ8)-cal kapcsoltan humán populációban, a humanizált egerekben a DRB1\*0401 vagy DQB1\*0302 is elégséges volt a humán porc PG arthritogenitásának kialakításához megfelelő (BALB/c) genetikai háttér esetén.

Kísérleteink fontos megfigyelése volt a PG immunizált egerekben megfigyelhető számos ellentmondás az előre jelzett és a valójában felismert T sejt epitópok között. A feltételezett T sejt epitópok meghatározásához használt különböző előrejelzési algoritmusok a MHC/peptid és a peptid/T sejt receptor struktúrák illeszkedésén alapultak mind BALB/c és C3H (I-A<sup>k</sup>) egerekben, mind a humán DR4 és DQ8 molekulák és a T sejt receptorok között. Ezek az előrejelzési eljárások, a humán porc PG központi fehérjeláncából 6-18 magas valószínűségi értékű T sejt epitópot jósoltak az egyes MHC-kre vonatkozóan. Egy másik tanulmányban a humán PG-ok központi fehérjeláncának B sejt epitópjait jósolták és vizsgálták meg (79). A fent említett vizsgálatok azt sugallták, hogy néhány helyet kivéve a teljes G1 domén, és a G2 domén G1-gyel nagyfokban homológ B és B' hurkai, valamint a G3 domén epidermális növekedési faktor szerű C terminális része számos, gyakran átfedő T és B sejt epitópokat tartalmazhat. Ezen előrejelzések gyakorlati teszteléséhez „pin szintetizált” peptidekkel 3 aminosavnyi elcsúsztatásokkal lefedtük a teljes G1, G2 és G3 domént éppúgy, mint a keratan-szulfát és chondroitin-szulfát-kötő régiók azon szekvenciáit, amelyek előre jelezhetőek voltak a modellkísérletek során. Így 143 szintetikus peptid szekvenciát teszteltünk humán porc PG-vel immunizált vad típusú BALB/c egerekben, és ezek közül 27-et azonosítottunk T sejt epitópként. Mind a 143 peptidet teszteltük T sejt válasz szempontjából DR4.Ab<sup>0</sup> és DQ8.Ab<sup>0</sup> egerekben is.

Arthritises vad típusú BALB/c egerekben végzett korábbi epitóp tesztelési kísérletek (33) után nem volt meglepő, hogy PG-al immunizált traszgenikus egerekben csak néhány HLA által prezentált peptid került felismerésre. Ugyancsak várható volt az is, hogy a modellezési megfontolások alapján nem előrejelezhető néhány epitópot is azonosítani lehet, ami igazolódott is a kísérletekben. Mindenképpen érdekes volt azonban, és további vizsgálatok szükségességét veti fel az a felismerés, hogy a PG központi fehérjelánc két régióját képviselő peptidek (p22-51 és p253-285) jelentősen immunogénnek bizonyultak mind a DR4, mind a DQ8 traszgenikus egerekben, miközben ezek a szekvenciák nem voltak megjósolhatók potenciális T sejt epitópként sem a DRB1\*0401(70;71), sem a DQB1\*0302 allélek esetén azokban a tanulmányokban, melyek többféle modellezési és előrejelzési módszert alkalmaztak (66-68). Ugyancsak feltűnő volt, hogy ezzel szemben néhány peptid a G1 doménon belül és egy peptid szekvencia (<sup>1785</sup>GAYYGSGTPSSFP) a chondroitin-szulfát kötő régióon belül, amit nagy affinitású T sejt epitópként prognosztizáltak (70;71), nem bizonyult immunogénnek humanizált egerekben.

Ezért a továbbiakban egyéb algoritmusokat és epitóp előrejelzési módszerekkel kapott eredményekkel (80-82) is összevetettük a DR4 és DQ8 traszgenikus egerekben különböző peptidekre adott T sejt válaszok eredményeit. Következésképpen megállapítható, hogy miközben a p22-51 és a p250-291 szekvenciák a modellezési eljárások során eredetileg nem voltak hatékony MHC kötő peptidekként kiválasztva, számos közepesen erős kötődési valószínűségű T sejt epitópot azonosítottak mindkét core protein régióban. Ezek alapján kijelenthető, hogy bár az epitóp előrejelzés elősegítheti a feltérképező kísérleteket, in vivo tesztek feltétlenül szükségesek az előrejelzések korrektségének megerősítéséhez. Szintén lehetséges azonban az is, hogy a GAG-kötő régióban elhibáztunk számos nem előre jelzett T sejt epitópot kísérleteink során, mivel csak a nagy valószínűséggel megjósolt T sejt epitópot vizsgáltuk kísérleteink folyamán.

Annak ellenére, hogy a DR4 allél a PG központi fehérjelánc valamivel nagyobb repertoárját képes bemutatni, mint a DQ8 allél, a DR4.Ab0 transzgenikus/kongenikus BALB/c egerek arthritis incidenciája és súlyossága jelentősen kisebb volt, mint a DQ8.Ab0 transzgenikus/kongenikus BALB/c vonal esetén. Ráadásul mind a DR4.Ab0, mind a DQ8.Ab0 transzgenikus/kongenikus egerekben az arthritis súlyossága és még inkább az arthritis előfordulása jóval alacsonyabb volt, mint a vad típusú BALB/c egerekben, illetve a HLA/transzgenikus BALB/c egerek legalább egy további PG injekciót igényeltek az arthritis kialakításához. A vad típusú és a HLA transzgenikus BALB/c egerek betegség incidenciája és súlyossága között észlelt különbségek részben az egér CD4 és HLA allél közötti komplex gyengeségével, részben az egér T sejt receptor és HLA közötti illeszkedés tökéletlenségével magyarázhatók. A két transzgenikus/kongenikus vonal közötti különbség részben a HLA transzgenek expressziója közötti eltéréssel, részben a két HLA allél által prezentált különböző epitóp repertoárral magyarázhatók.

A PG különböző T sejt epitópjainak immunogenitása pontosabban jellemezhető volt a peptidek T sejt proliferációra és citokin termelésre kifejtett hatásának vizsgálata révén. Így egy olyan hierarchikus rendszer is feltételezhető, melyben egyes epitópok hatására inkább a T sejtek proliferációja jön létre, míg mások inkább citokin termelést indukálnak. A peptidek által indukált citokin profilra inkább az IL-2 és az IFN- $\gamma$  dominanciája volt jellemző, szemben az IL-4 termeléssel, ami összhangban áll a RA-re és a PGIA-re egyaránt jellemző Th1 dominanciával.

Összefoglalva, kísérleteinkben a RA-ben potenciális autoantigénként szereplő PG-t használtunk HLA allélek szempontjából humanizált egerekben. Igazoltuk, hogy az emberi porc PG-k a humán MHC molekulák révén egér T sejtek számára bemutatásra kerülnek, és immunválaszt váltanak ki. Megvizsgáltuk PG epitóp repertoárját, mely a humanizált rendszer és a RA-re hasonló állatmodell használatával az eredmények humán RA-re vonatkozó

kiterjesztését is lehetővé teszi. Ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy a PG komplex szénhidrát struktúrái, melyek magukba foglalják a GAG- kötő régiók oldalláncait és az N- és O-kötött oligosaccharidokat is, komplikálhatják a képet, mivel ezek a szénhidrát struktúrák elfedhetik a T sejt epitópokat és/vagy interferálhatnak az antigén bemutatási folyamatokkal (25;48). További kísérletek szükségesek emellett az egér CD4 és a humán HLA allélek közötti kölcsönhatás in vivo vizsgálatára, a DR4 és DQ8 allélek koexpressziójának arthritis fogékonyságra és súlyosságra kifejtett hatásának vizsgálatára, valamint a T sejt receptor V $\alpha$ /V $\beta$  lánc hipervariábilis régióján belül a peptidkötőhelyek lokalizációjának megítélésére. Vagyis kombinált transzgenikus vonalak, melyek párhuzamosan expresszálják a humán CD4/HLA-DR4/DQ8 alléleket, a megfelelő T sejt receptor láncokat BALB/c genetikai háttér mellett hasznos eszköznek bizonyulhatnak a betegség mechanizmusának pontosabb meghatározásában, mutatva a humán porc autoimmun/arthritisogén epitópjait és a nem-MHC lókuszokat és géneket, melyek szerepet játszhatnak a RA patomechanizmusában.

## 6. ÚJ EREDMÉNYEK

Általánosságban megjegyzendő, hogy a világon elsőként vizsgáltuk HLA transzgenikus egerekben a PG szisztémás immunizációjának hatását, különös tekintettel a PG hatásra létrejött szisztémás immunválaszra, a PG epitópok repertoárjára és az arthritis indukcióra.

Megvizsgáltuk a kísérletes arthritis indukciójában korábban nem használt adjuváns, a DDA hatását PGIA-ben. Azt találtuk, hogy összehasonlítva a hagyományosan használt komplett és inkomplett Freund adjuvánsokkal, a DDA jelentősen növeli a PGIA súlyosságát és előfordulási gyakoriságát, miközben a kísérleti állatok körében észlelt mortalitás jelentősen csökkent.

Megvizsgáltuk a PGIA indukálhatóságát arthritisre rezisztens genetikai háttérrel rendelkező HLA-transzgenikus egerekben. Megállapítható volt, hogy a RA-re fogékonyságot közvetítő II. osztályú MHC allélek jelenléte önmagában nem elégséges a PGIA indukciójához, sejtetve a nem MHC genetikai háttér fontos szerepét.

Meghatároztuk a PG-nal történő szisztémás immunizáció hatását az arthritisre rezisztens HLA transzgenikus egerek sejtes és humorális immunválaszára, összehasonlítva az eredményeket a PGIA fogékony BALB/c egerekben észleltekkel. Megállapítható volt, hogy a transzgenikus egerekben létrejött immunválaszok intenzitása jelentősen nem különbözött az PGIA-re fogékony BALB/c egerektől, így az arthritis kialakulása vagy hiánya nem volt magyarázható az immunválaszok különbözőségével.

Humanizált egerekben jellemeztük a humán PG epitóp repertoárját a PG-nal történt szisztémás immunizációt követően. Ennek során a humán PG legnagyobb valószínűséggel arthritogén epitópot hordozó G1 és G2 domén egészét és a nagy kiterjedésű, de az arthritis indukcióban kisebb szereppel bíró chondroitin- és keratan-szulfát kötő régió modellezéssel előrejelzett szakaszait vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy miközben mind a négy különböző HLA

transzgenikus vonal az epitópok különböző csoportjait prezentálta, a G 1 doménon belül két régió erős sejtes immunválaszt indukált mindegyik transzgenikus vonalban. Összességében a HLA-DR4.Ab<sup>0</sup>, HLA-DQ8.Ab<sup>0</sup> transzgenikus egerek nagyobb számú PG epitópot effektívebben prezentáltak, szemben a HLA-DR2.Ab<sup>0</sup> és HLA-DR3.Ab<sup>0</sup> egerekkel, kísérletes módszerekkel is utalva ezen II. osztályú MHC molekulák RA iránti fogékonyságban betöltött szerepére. A modellezési eljárásokkal előre jelzett és a biológiai kísérletekben valóban prezentált epitópok közötti részleges különbözőségeket az epitóp térképezési eljárásokban a sejtes immunválaszok vizsgálatának fontosságát hangsúlyozta.

Az epitóp specifikus T sejt proliferáció és a citokin termelés vizsgálatával megállapítható volt, hogy a PG molekula mely epitópjai indukálnak inkább T sejtes proliferációt, és melyek stimulálják a vizsgált citokinek (IL-2, IFN $\gamma$  és IL-4) termelődését. Ezzel jellemezni lehetett az egyes epitópok arthritis indukcióban betöltött szerepét, hierarchikus rendszerbe foglalva azokat.

Humanizált egerekben humán PG-nal történt szisztémás immunizációval, új –a korábbiakban arthritis indukcióra nem használt adjuváns, a DDA alkalmazásával– arthritist tudunk kiváltani, és leírtuk ezen arthritis klinikai és hisztopatológiai jellemzőit. A vad típusú BALB/c egerekben kialakítható PGIA-szel összehasonlítva megállapítható volt, hogy a humanizált egerekben megfigyelhető arthritis kiváltásához erőteljesebb immunizálásra volt szükség, és összességében gyengébb intenzitású volt, mégis a transzgenikus egerekben megfigyelhető arthritis minőségileg nem különbözött a BALB/c egerekben észlelttől.

Munkánk során tehát bebizonyítottuk, hogy a HLA II. osztályú molekulák prezentálni tudják a humán porc PG központi fehérjeláncának epitópjait a T sejteknek, és kísérletes arthritist tudnak indukálni. Ugyancsak igazolható volt, hogy ebben az állatmodellben az MHC II. osztályú allélek mellett a nem-MHC háttér szintén meghatározó tényező az arthritis kialakulásában.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja annak tisztázása volt, hogy (1) a human porc PG antigénként bemutatásra kerül-e a RA-ra hajlamosító HLA-DR4 és/vagy HLA-DQ8 allélek által transzgenikus egerekben, és (2) a humán porc PG indukál-e arthritist fogékony vagy ellenálló nem-MHC genetikai háttér esetén.

Ennek tisztázására négy HLA transzgenikus egér-vonalat hoztunk létre, melyek az eredeti egér MHC II. osztályú allélek helyett humán alléleket hordoztak (HLA-DR2.Ab<sup>o</sup>, HLA-DR3.Ab<sup>o</sup>, HLA-DR4.Ab<sup>o</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>o</sup>), majd ezek közül kettőt (HLA-DR4.Ab<sup>o</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>o</sup>) visszakeresztettük BALB/c genetikai állományú egérbe. Az egereket az eredeti “kevert” genetikai háttérrel és a PG-indukált arthritiszre fogékony BALB/c háttérrel immunizáltuk humán porc PG-al és vizsgáltuk esetleges arthritis kialakulását. A T-sejtes immunválaszt (IL-2, IFN- $\gamma$  és IL-4 termelés és T-sejt proliferáció) meghatároztuk *in vitro* 15 aminosavból álló szintetikus peptidek jelenlétében. Összesen 143 T-sejt epitóp peptidet vizsgáltunk meg potenciális epitópként a PG molekula központi proteinláncából.

Mindkét HLA transzgenikus egércsoport (miközben saját II. osztályú molekulái hiányoztak) termelt antitesteket, és kifejtett T-sejtes immunválaszt a humán porc PG ellen. A különböző HLA transzgenikus vonalak immunválaszt adtak a humán porc PG különböző T-sejt epitópjaira, és jelentős IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 termelést és T-sejt proliferációt mutattak. Számos T-sejt epitóp került felismerésre a HLA-DR4 és HLA-DQ8 egerekben egyaránt, de egyik “kevert genetikai háttérű” HLA-transzgenikus egércsoportban sem volt kialakítható arthritis PG immunizációval. Amikor a HLA-DR4.Ab<sup>o</sup> és HLA-DQ8.Ab<sup>o</sup> egereket BALB/c genetikai háttér mellett immunizáltunk humán porc PG-vel, az állatok 35-50%-ában alakult ki arthritis. Bár az arthritis kialakulása késleltetett volt a HLA-transzgenikus egerekben, összehasonlítva a BALB/c egerekkel, az arthritis macroscopos és szövettani jellemzői hasonlóak voltak a BALB/c csoportban észlelttel.

Összefoglalva, kísérleteink jelentik az első bizonyítékot arra, hogy a (i) humán porc PG központi fehérjeláncának epitópjai a HLA II. osztályú molekulák által bemutatásra kerülhetnek, és (ii) a nem-MHC háttér éppoly fontos az arthritis kialakulásában, mint az MHC II. osztályú allélek.

## 8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Glant Tibor professzor úrnak és Dr. Szekanecz Zoltán tanár úrnak, akik témavezetőként kutatómunkámat irányították, a témaválasztásban és annak gyakorlati megvalósításában elengedhetetlenül fontos segítséget nyújtottak.

Köszönet illeti Dr. Szegedi Gyula professzor urat, aki nemcsak programvezetőként segítette munkámat, de a kutatáshoz szükséges immunológiai ismereteimet és szemléletmódomat is döntően alakította.

Köszönet illeti mindazon kollégáimat és munkatársaimat, akik munkájukkal, tanácsaikkal hozzájárultak munkámhoz. Külön köszönttel tartozom Dr. Mikecz Katalin professzornőnek, Dr Bárdos Tamásnak, Dr Gonda Andreának, Dr Suzanne Berlonak, Dr Búzás Editnek, Dr Koreny Tamásnak, Sonja Velinsnek és Dr Chella Davidnek, akik a kollaborációban nyújtottak jelentős elméleti és gyakorlati segítséget munkámhoz (Rush University Medical Center, Chicago, USA; Mayo Clinic Foundation, Rochester, USA).

Köszönöm feleségemnek, gyermekeimnek, szüleimnek és testvéremnek támogatásukat és azt a lehetőséget, hogy a családi háttér biztosításával nyugodt körülmények között végezhettem munkámat.

**9. RÖVIDÍTÉSEK**

DDA	dimethyldioctadecylammonium-bromid
RA	rheumatoid arthritis
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
ECM	extracelluláris mátrix
PG	proteoglikán
GAG	glükózaminoglikán
PGIA	PG-indukált arthritis
PCR	polymerase lánreakció
CFA	komplett Freund adjuváns
IL-2	interleukin-2
IFN $\gamma$	interferon- $\gamma$
IL-4	interleukin-4
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
IFA	inkomplett Freund adjuváns
SI	stimulációs index
CIA	kollagén indukált arthritis

## 10. HIVATKOZÁSOK

- (1) Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3:S265-S272.
- (2) Gregersen PK. Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity. *Arthritis Res* 1999; 1:37-44.
- (3) Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D et al. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989; 32:15-21.
- (4) Wordsworth B, Lanchbury J, Sakkas L, Welsh K, Panayi G, Bell J. HLA-DR4 subtype frequency in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus with the human leukocyte antigen class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:10049-10053.
- (5) Taneja V, David CS. Lessons from animal models for human autoimmune diseases. *Nat Immunol* 2001; 2:781-784.
- (6) Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today* 1995; 16:150-159.
- (7) Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1071-1079.
- (8) Cornelis F, Faure S, Martinez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:10746-10750.
- (9) Bali D, Gourley S, Kostyu DD, Goel N, Bruce I, Bell A et al. Genetic analysis of multiplex rheumatoid arthritis families. *Genes Immun* 1999; 1:28-36.
- (10) MacKay K, Eyre S, Myerscough A, Milicic A, Barton A, Laval S et al. Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom. *Arthritis Rheum* 2002; 46:632-639.
- (11) Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Etzel C et al. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: A replication study and combined analysis of 512 multicase families. *Arthritis Rheum* 2003; 48:906-916.
- (12) Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298:869-871.
- (13) Stastny P, Ball E, Kahn M, Olsen N, Pincus T, Gao X. HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1988; 27:132-138.
- (14) Meyer JM, Evans TI, Small RE, Redford TW, Han JF, Singh R et al. HLA-DRB1 genotype influences risk for and severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26(5):1024-1034.

- (15) Ilonen J, Reijonen H, Arvilommi H, Jokinen I, Mottonen T, Hannonen P. HLA-DR antigens and HLA-DQ beta chain polymorphism in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990; 49:494-496.
- (16) Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Monteiro J et al. A genome-wide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases. *Am J Hum Genet* 2001; 68:927-936.
- (17) Glant TT, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms and genetics. *Crit Rev Immunol* 2003; 23:199-250.
- (18) Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146:857-868.
- (19) Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980; 282:666-668.
- (20) Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987; 30:201-212.
- (21) Verheijden GFM, Rijnders AWM, Bos E, De Roo CJJC, van Staveren CJ, Miltenburg AMM et al. Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1115-1125.
- (22) Zhang Y, Guerassimov A, Leroux J-Y, Cartman A, Webber C, Lalic R et al. Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage link protein. Involvement of distinct regions recognized by T- and B lymphocytes. *Am J Pathol* 1998; 153:1283-1291.
- (23) Poole AR, Glant TT, Mikecz K. Autoimmunity to cartilage collagen and proteoglycan and the development of chronic inflammatory arthritis. In: Glaurer AM, editor. *The Control of Tissue Damage*. Amsterdam: Elsevier Publishers (Biomedical Division), 1988: 55-65.
- (24) Glant T, Csongor J, Szücs T. Immunopathologic role of proteoglycan antigens in rheumatoid joint diseases. *Scand J Immunol* 1980; 11:247-252.
- (25) Guerassimov A, Zhang YP, Banerjee S, Cartman A, Leroux JY, Rosenberg LC et al. Cellular immunity to the G1 domain of cartilage proteoglycan aggrecan is enhanced in patients with rheumatoid arthritis but only after removal of keratan sulfate. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1019-1025.
- (26) Golds EE, Stephen IBM, Esdaile JM, Strawczynski H, Poole AR. Lymphocyte transformation to connective tissue antigens in adult and juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, ankylosing spondylitis, systemic lupus erythematosus and a non-arthritic control population. *Cell Immunol* 1983; 82:196-209.
- (27) Li NL, Zhang DQ, Zhou KY, Cartman A, Leroux JY, Poole AR et al. Isolation and characteristics of autoreactive T cells specific to aggrecan G1 domain from rheumatoid arthritis patients. *Cell Res* 2000; 10:39-49.

- (28) Ortutay Z, Polgár A, Gömör B, Géher P, Lakatos T, Glant TT et al. Synovial fluid exoglycosidases are predictors of rheumatoid arthritis and are effective in cartilage glycosaminoglycan depletion. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2163-2172.
- (29) Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, Harper CF, Hoerrner LA, Hutchinson NI et al. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* 1997; 100:93-106.
- (30) Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C et al. Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J* 1999; 344 Pt 1:61-68.
- (31) Hughes CE, Caterson B, White RJ, Roughley PJ, Mort JS. Monoclonal antibodies recognizing protease-generated neoepitopes from cartilage proteoglycan degradation. Application to studies of human link protein cleavage by stromelysin. *J Biol Chem* 1992; 267:16011-16014.
- (32) Hughes CE, Caterson B, Fosang AJ, Roughley PJ, Mort JS. Monoclonal antibodies that specifically recognize neoepitope sequences generated by 'aggrecanase' and matrix metalloproteinase cleavage of aggrecan: application to catabolism in situ and in vitro. *Biochem J* 1995; 305:799-804.
- (33) Buzás EI, Mikecz K, Hudecz F, Finnegan A, Glant TT. Identification of new T cell epitopes of human aggrecan core protein in BALB/c mice. *Arthritis Rheum* 1998; 41:S215.
- (34) Buzás EI, Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT. T-cell recognition of arthritogenic epitopes of cartilage proteoglycan (aggrecan) in C3H mice: a novel model of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:S374.
- (35) Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 91:95-101.
- (36) Anderton SM, van der Zee R, Prakken B, Noordzij A, van Eden W. Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J Exp Med* 1995; 181:943-952.
- (37) Wooley PH, Sud S, Whalen JD, Nasser S. Pristane-induced arthritis in mice. V. Susceptibility to pristane-induced arthritis is determined by the genetic regulation of the T cell repertoire. *Arthritis Rheum* 1998; 41:2022-2031.
- (38) Holmdahl R, Kvick C. Vaccination and genetic experiments demonstrate that adjuvant- oil-induced arthritis and homologous type II collagen-induced arthritis in the same rat strain are different diseases. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:96-100.
- (39) Lorentzen JC, Klareskog L. Susceptibility of DA rats to arthritis induced with adjuvant oil or rat collagen is determined by genes both within and outside the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 1996; 44:592-598.
- (40) Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001; 70:849-860.

- (41) Hanyecz A, Berlo SE, Szanto S, Broeren CPM, 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 Rheum* 2004; 50:1665-1676.
- (42) Glant TT, Cs-Szabó G, Nagase H, Jacobs JJ, Mikecz K. Progressive polyarthritis induced in BALB/c mice by aggrecan from human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1007-1018.
- (43) Mikecz K, Glant TT, Poole AR. Immunity to cartilage proteoglycans in BALB/c mice with progressive polyarthritis and ankylosing spondylitis induced by injection of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum* 1987; 30:306-318.
- (44) Mikecz K, Glant TT, Buzás E, Poole AR. Proteoglycan-induced polyarthritis and spondylitis adoptively transferred to naive (nonimmunized) BALB/c mice. *Arthritis Rheum* 1990; 33:866-876.
- (45) Dayer E, Mathai L, Glant TT, Mikecz K, Poole AR. Cartilage proteoglycan-induced arthritis in Balb/c mice: Antibodies recognize human and mouse cartilage proteoglycan and can cause depletion of cartilage proteoglycan with little or no synovitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1394-1405.
- (46) Finnegan A, Mikecz K, Tao P, Glant TT. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J Immunol* 1999; 163:5383-5390.
- (47) Glant TT, Bárdos T, Vermes C, Chandrasekaran R, Valdéz JC, Otto JM et al. Variations in susceptibility to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis among C3H substrains of mice. Evidence of genetically acquired resistance to autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2001; 44:682-692.
- (48) Glant TT, Buzás EI, Finnegan A, Negroiu G, Cs-Szabó G, Mikecz K. Critical role of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation. *J Immunol* 1998; 160:3812-3819.
- (49) Mikecz K, Glant TT. Immunoregulation of proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. *Am J Ther* 1996; 3:42-51.
- (50) Buzás E, Mikecz K, Brennan FR, Glant TT. Mediators of autopathogenic effector cells in proteoglycan-induced arthritic and clinically asymptomatic BALB/c mice. *Cell Immunol* 1994; 158:292-304.
- (51) Mikecz K, Glant TT. Migration and homing of lymphocytes to lymphoid and synovial tissues in proteoglycan-induced murine arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1395-1403.
- (52) Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Zhang J, Glant TT. T and B cell recovery in arthritis adoptively transferred to SCID mice: Antigen-specific activation is required for restoration of autopathogenic CD4+ Th1 cells in a syngeneic system. *J Immunol* 2002; 168:6013-6021.

- (53) Adarichev VA, Bárdos T, Christodoulou S, Phillips MT, Mikecz K, Glant TT. Major histocompatibility complex controls susceptibility and dominant inheritance, but not the severity of the disease in mouse models of rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 2002; 54:184-192.
- (54) Adarichev VA, Valdez JC, Bárdos T, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci. *J Immunol* 2003; 170:2283-2292.
- (55) Cosgrove D, Gray D, Dierich A, Kaufman J, Lemeur M, Benoist C et al. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* 1991; 66:1051-1066.
- (56) Bárdos T, Zhang J, Mikecz K, David CS, Glant TT. Mice lacking endogenous murine MHC class II develop spontaneous arthritis at advanced age. *Arthritis Rheum* 2001; 44:S270.
- (57) Gonzalez-Gay MA, Zanelli E, Khare SD, Krco CJ, Zhou P, Inoko H et al. Human leukocyte antigen-DRB1\*1502 (DR2Dw12) transgene reduces incidence and severity of arthritis in mice. *Human Immunol* 1996; 50:54-60.
- (58) Strauss G, Vignali DA, Schonrich G, Hammerling GJ. Negative and positive selection by HLA-DR3 (DRw17) molecules in transgenic mice. *Immunogenetics* 1994; 40:104-108.
- (59) Pan S, Treejo T, Hanson J, Smart M, David CS. HLA-DR4 (DRB1\*0401) transgenic mice expressing an altered CD4-binding site: specificity and magnitude of DR4-restricted T cell response. *J Immunol* 1998; 161:2925-2929.
- (60) Taneja V, David CS. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J Clin Invest* 1998; 101:921-926.
- (61) Nabozny GH, Baisch JM, Cheng S, Cosgrove D, Griffiths MM, Luthra HS et al. HLA-DQ8 transgenic mice are highly susceptible to collagen-induced arthritis: A novel model for human polyarthritis. *J Exp Med* 1996; 183:27-37.
- (62) Otto JM, Chandrasekaran R, Vermes C, Mikecz K, Finnegan A, Rickert SE et al. A genome scan using a novel genetic cross identifies new susceptibility loci and traits in a mouse model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2000; 165:5278-5286.
- (63) Glant TT, Mikecz K, Poole AR. Monoclonal antibodies to different protein-related epitopes of human articular cartilage proteoglycans. *Biochem J* 1986; 234:31-41.
- (64) Antonopoulos CA, Axelsson I, Heinegård D, Gardell S. Extraction and purification of proteoglycans from various types of connective tissue. *Biochim Biophys Acta* 1974; 338:108-119.
- (65) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol* 2001; 159:1711-1721.

- (66) Sette A, Buus S, Appella E, Smith JA, Chesnut R, Miles C et al. Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:3296-3300.
- (67) Rothbard JB, Taylor WR. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J* 1988; 7:93-100.
- (68) Stille CJ, Thomas LJ, Reyes VE, Humphreys RE. Hydrophobic strip-of-helix algorithm for selection of T cell- presented peptides. *Mol Immunol* 1987; 24:1021-1027.
- (69) Hanyecz A, Bárdos T, Berlo SE, Buzás E, Nesterovitch AB, Mikecz K et al. Induction of arthritis in SCID mice by T cells specific for the "shared epitope" sequence in the G3 domain of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2959-2973.
- (70) Boots AM, Verheijden GF, Schonings R, van Staveren CJ, Bos E, Elewaut D et al. Selection of self-reactive peptides within human aggrecan by use of a HLA-DRB1\*0401 peptide binding motif. *J Autoimmun* 1997; 10:569-578.
- (71) Hill JA, Wang D, Jevnikar AM, Cairns E, Bell DA. The relationship between predicted peptide-MHC class II affinity and T-cell activation in a HLA-DRbeta1\*0401 transgenic mouse model. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:R40-R48.
- (72) Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:9979-9984.
- (73) Hall FC, Cope AP, Patel SD, Sonderstrup G. Isolating the molecular suspect: HLA transgenic mice in the study of human autoimmune disease. *Br J Rheumatol* 1999;697-704.
- (74) Taneja V, David CS. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol Rev* 1999; 169:67-79.
- (75) Eming R, Visconti K, Hall F, Sekine C, Kobayashi K, Chen Q et al. Humanized mice as a model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3:S133-S140.
- (76) Bradley DS, Nabozny GH, Cheng S, Zhou P, Griffiths MM, Luthra HS et al. HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice - Implications in human rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1997; 100:2227-2234.
- (77) Andersson EC, Hansen BE, Jacobsen H, Madsen LS, Andersen CB, Engberg J et al. Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4- restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:7574-7579.
- (78) Pan S, Taneja V, Griffiths MM, Luthra H, David CS. Complementation between HLA-DR4 (DRB1\*0401) and specific H2-A molecule in transgenic mice leads to collagen-induced arthritis. *Hum Immunol* 1999; 60:816-825.

- (79) Negroiu G, Roughley PJ, Cs-Szabó G, Otto JM, Glant TT. Localization of autoimmune/arthritisogenic B cell epitopes of cartilage proteoglycans (PGs) by autoreactive antibodies to mouse aggrecan. *Arthritis Rheum* 1996; 39:S285.
- (80) Singh H, Raghava GP. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 2001; 17:1236-1237.
- (81) Rammensee HG, Friede T, Stevanović S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995; 41:178-228.
- (82) Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999; 50:213-219.

## 11. A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS BESZÁMOLÓK JEGYZÉKE

### Írásos közlemények:

#### Angol nyelvű:

1. **Szanto S**, Bardos T, Szabo Z, David CS, Buzas EI, Mikecz K, Glant TT. Induction of arthritis in HLA-DR4-humanized and HLA-DQ8-humanized mice by human cartilage proteoglycan aggrecan but only in the presence of an appropriate (non-MHC) genetic background. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1984-95.
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 Rheum.* 2004; 50:1665-76.
3. Glant TT, Adarichev VA, Nesterovitch AB, **Szanto S**, Oswald JP, Jacobs JJ, Firneisz G, Zhang J, Finnegan A, Mikecz K. Disease-associated qualitative and quantitative trait loci in proteoglycan-induced arthritis and collagen-induced arthritis. *Am J Med Sci.* 2004; 327:188-95.

#### Magyar nyelvű:

1. **Szántó S**, Glant TT, Szekanecz Z. Arthritises állatmodellek. *Magyar Immunológia* (közlésre elfogadva)
2. **Szántó S**. Rheumatoid arthritis. *Granum* (közlésre elfogadva)

#### Poszterek, előadások:

#### Publikált absztrakt:

1. Hanyecz A, Bardos T, Berlo SE, Mikecz K, **Szanto S**, Glant TT. A T Cell Hybridoma, Specific for an Epitope in the G3 Domain of Human Cartilage Proteoglycan, Induces Arthritis in SCID Mice. *Arthritis Rheum.* 2002; S46:300 (absztrakt)
2. **Szanto S**, Bardos T, Hanyecz A, David CS, Glant TT. 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. *Arthritis Rheum.* 2003; S48:148-149 (absztrakt)

#### Előadás:

1. **Szanto S**, Bardos T, Gonda A., David CS, Mikecz K, Glant TT. Peptide epitopes and arthritogenicity of human cartilage proteoglycan (PG) in human MHC class II transgenic mice (HLA-DR4 and HLA-DQ8). (EULAR 2004, Berlin, előadás, Abbott Abstract Award Winner)

