

Doktori (Ph.D.) – értekezés tézis

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

SZÁNTÓ SÁNDOR DR.

Témavezetők:

Dr. Szekanecz Zoltán, M.D., D.Sc.

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

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
DEBRECEN

2004.

Bevezetés

A rheumatoid arthritis (RA) autoimmun gyulladásszerű betegség, mely rendszerint a diarthrodialis ízületeket érinti, porcdestrukcióhoz és csonterosiókhoz vezetve. Miközben a betegség elsődleges célszerve a synovialis ízület, nincs arra egyértelmű bizonyíték, hogy a porcanyag, csont vagy synovium bármely molekulája autoantigénként szerepel-e. Így a RA etiológiája ismeretlen és valószínűleg mind környezeti, mind genetikai faktorok egyaránt felelőssé tehetőek a betegség patogenezisében. A genetikai tényezők között a fő hisztokompatibilitási komplex („major histocompatibility complex” [MHC]) valószínűleg a legfontosabb predispozíciós faktor, de az MHC önmagában nem elégséges a betegség kiváltásához. Az elmúlt években számos nem-MHC lokuszt azonosítottak, melyek a betegség kiváltásában valószínűleg részt vevő gént tartalmaznak.

A RA összefüggése bizonyos HLA allélekkel már több mint két évtizede ismert, és az elmúlt években ezen MHC allélek nagyszámú alcsoportját fedezték fel polymerase láncreakció révén. 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. A különböző MHC allélek azonban komplex csoportokban öröklődnek, és mivel a DRB1 allélek szoros „linkage disequilibriumban” vannak olyan DQB1 allélekkel, mint a DQB1*0301 (HLA-DQ7) és a DQB1*0302 (HLA-DQ8), nem könnyű meghatározni, hogy a HLA-DRB1 allélek önmagukban vagy a HLA-DQB1 allélekkel kombinációban 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. 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. A nem-MHC lokuszok azonosítása során nyert humán vizsgálati eredmények alátámasztására hasznos kísérletes megközelítés az olyan rágcsálók alkalmazása, melyek indukált gyulladással járó ízületi betegségei sok vonatkozásban hasonlítanak a RA-re.

A RA-re legjobban hasonlító állatmodellek közé azok tartoznak, melyek a porc extracelluláris mátrix (ECM) valamely komponensével (II. típusú kollagén, proteoglikán [PG] [aggrekán], link protein, humán porc glycoprotein-39) történő szisztémás immunizációval válthatók ki genetikailag fogékony egerekben és patkányokban. 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. Akárcsak a RA, a PGIA is polygénus jellegű, és mind az MHC, mind a nem-MHC komponensek fontos szereppel bírnak az arthritis kialakulásában. Az elmúlt években sok nem-MHC fogékonysági lokuszt azonosítottak PGIA-ben, mely megfeleltek azoknak a humán kromoszóma régióknak („quantitative trait loci”), melyeket családvizsgálatok segítségével azonosítottak RA-ben.

A PG komplex makromolekula. Központi fehérjészála mintegy 2400 aminosavból áll, amihez glükózaminoglikán (GAG) oldalláncok (chondroitin- szulfát és keratan-szulfát) kovalens kötéssel kapcsolódnak. 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. Néhány szerkezeti változás, mint a részleges deglikoziláció vagy a központi fehérjelánc hasítása különböző metalloproteinázok által in vivo is létrejöhet a normál porc PG turnover során, ráadásul ezek a változások még jelentősebbek gyulladással járó körülmények között. A PG lebomlásakor létrejövő fregmentumok kiválthatnak és/vagy fenntarthatnak lokális immunreakciókat a fogékony állatok vagy a RA-

es betegek ízületeiben. A humán porc PG elleni immunválasz valóban kimutatható RA-es betegekben is, alátámasztva azt a hipotézist, hogy más autoantigénekhez hasonlóan a humán porc PG az autoimmun gyulladásos reakció célpontja lehet RA-es ízületi folyamatokban.

Célkitűzések

Munkám során arra kerestem a választ, hogy

1. PGIA-ben a dimethyldioctadecyl ammonium-bromid (DDA), egy erőteljes és a hagyományosan használt Freund adjuvánsok mellékhatásaitól mentes adjuváns alkalmazása milyen hatású, **illetve a hősokk és a geldanamycin (a 90 kDa-os hősokk fehérje steroid receptorral való kötődését és a T sejt aktivációt gátló hatású molekula) gátolja-e az arachidonsav felszabadulását mononukleáris sejtekben,**
2. a RA-re hajlamosító MHC II. osztályú molekulákkal együtt a humán porc PG bemutatásra kerül-e egér T sejtek részére,
3. meg kívántam határozni, hogy a humán PG központi fehérjeláncának epitópjai képesek-e arthritist indukálni arthritisre rezisztens vagy fogékony genetikai háttér esetén,
4. és fel akartam térképezni a PG valamennyi előre jelezhető T sejt epitópját, melyek bemutatásra kerülhetnek az RA-ben leggyakoribb hajlamosító allélek által.

Anyagok és módszerek

HLA class II-transgenic mice

Az egerek saját MHC II. osztályú molekulák vonatkozásában deficiensek voltak, mivel a H-2E α gén promóter régiójában jelenlevő spontán mutációt (H-2^b haplotípusban)

kombinálták a H-2A β gén célzott károsításával (A β ⁰ deficiens). A négy eredeti traszgenikus vonal HLA-DR2.Ab⁰ (DRB1*1502), HLA-DR3.Ab⁰ (DRB1*0301), HLA-DR4.Ab⁰ (DRB1*0401), és HLA-DQ8.Ab⁰ (DQA1*0301 koexpresszálva DQB1*0302-vel) volt.

Antigének, immunizáció és az arthritis vizsgálata

A PG-t humán felnőtt porcból nyertük, és a GAG oldalláncokat chondroitinase ABC-vel való emésztéssel távolítottuk el. A szóbjövő peptid szekvenciák kiválasztása az MHC-kötő minták, a T sejt epitópokban gyakori α -helix amfipatikus szekvencia minták és a hidrofób "strip-of-helix" algoritmus alapján történt. Ezen válogatás eredményeképpen kiválasztott összesen 143 PG központi fehérjelánc peptidet szintetizáltattunk. Ezt a 143 peptidet használtuk a T sejt válasza (T sejt proliferáció és interleukin-2 [IL-2] termelés) kezdeti szűrésére HLA-traszgenikus és vad típusú BALB/c egerekben. A T sejt válaszokat kiváltó peptideket használtuk peptid immunizációs kísérletekre és epitóp szűrés vizsgálatokra.

Epitóp szűrésre 6-8 hetes egereket injekcióztunk intraperitonealisan és a talp bőre alá komplett Freund adjuvánsban (CFA) feloldott PG antigénnel vagy szintetikus peptiddel. Az egereket a „priming” injekció után 9 nappal vagy a harmadik intraperitoneális immunizációt követő 9-10 nappal végeztük el. Az intraperitonealisan 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 sejt válaszáat a PG vagy az egyes szintetikus peptidek jelenlétében határoztuk meg.

Arthritis kiváltásához különböző HLA II. osztályú transzgéneket expresszáló és saját endogén II. osztályú MHC molekulát tekintve deficiens 8-12 hetes egereket, valamint ezek vad típusú testvéreit 3 hetes időközökkel intraperitonealisan immunizáltuk. Mivel a PG-nal és DDA/CFA-sal történt immunizáció kisebb mortalitást és súlyosabb arthritis okozott, mint a PG-nal és CFA/inkomplett Freund adjuváns (IFA)-sal végzett, az egereket felváltva

injekcióztuk (minden második injekció) PBS-ben oldott PG-al és 1 mg dimethyldioctadecylammonium-bromiddal (DDA), illetőleg PBS-ben és komplett Freund adjuvánsban emulgeált PG antigénnel. Az ízületi duzzanat megjelenését tekintettük az arthritis kialakulási idejének. Egy általánosan elfogadott értékelési rendszert, mely a gyulladáson és hyperaemiáján alapul (0-4-ig minden végtagon) használtunk a betegség súlyosságának becslésére. Az arthritises és nem arthritises állatok végtagjait kimetszettük, fixáltuk és decalcifikáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A szöveti metszeteket hematoxyllinnal és eozinnal festettük meg hisztopatológiai vizsgálat céljára.

Az antigén-specifikus T sejt válaszok, antitestek és citokinek mérése

A PG immunizált egereket 4-5 héttel az ötödik antigén injekció után véreztettük el. Az egerek szérumait összegyűjtöttük, a lép és nyirokcsomó sejteket a PG/peptid specifikus T sejt válaszok mérésére használtuk. Az antigén specifikus válaszokat a PG vagy a szintetikus peptid jelenlétében mértük. 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 ^3H -thymidine beépülést. Az antigén specifikus T sejt választ stimulációs indexben fejeztük ki. Az interferon- γ (IFN γ) és interleukin-4 (IL-4) antigén specifikus termelődését a sejttenyészetek felülúszójában ELISA technikával mértük meg.

A PG specifikus antitesteket szintén ELISA-val mértük meg. Az „immunoplate”-eket humán vagy egér porc PG-vel fedtük, majd a szabad kötőhelyeket PBS-ben oldott zsírmentes tejjel blokkoltuk. A szérumokat növekvő hígításban alkalmaztuk, és mind a teljes anti-PG antitestek, mind a PG-specifikus antitestek izotípusainak koncentrációját meghatároztuk peroxidáz-konjugált kecske anti-egér IgG-vel, vagy patkány anti-egér IgG1-el és IgG2a-val.

Az arachidonsav mononukleáris sejtekből történő felszabadulásának vizsgálatához humán mononukleáris sejteket használtunk. A ^3H -arachidonsavval jelölt sejtekből, hősokk és különböző koncentrációjú geldanamycinnel való előkezelés után phorbol 12-myristate 13-

acetattal és kalcium ionophorral történő aktivációt követően vizsgáltuk az izotóp felszabadulását.

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^d és humán HLA-DR vagy HLA-DQ elleni monoklonális antitestekkel jelöltük. A fluoreszcenciát FACScan flow cytométerrel és CellQuest software-el mértünk és analizáltunk.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízist az SPSS programot használva végeztünk. Mann-Whitney és Wilcoxon tesztek alkalmaztunk csoportok közötti összehasonításra. A 0.05-nél kisebb P értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

PG-nal és DDA/CFA vagy CFA/IFA adjuvánsokkal immunizált egerek PGIA-ének incidenciája és súlyossága

A két különféle módon immunizált, kereskedelmi úton beszerezhető BALB/c egerekben hasonlítottuk össze a fő klinikai paramétereket (arthritis megjelenés és incidencia). A kilencedik-tizedik hétre a DDA/CFA-sal való immunizálás után az incidencia 100%, az arthritis súlyossága pedig szignifikánsan magasabb volt, mint a CFA/IFA-sal immunizált csoportban. A DDA okozta mortalitás sokkal alacsonyabb volt, mint a Freund adjuváns által okozott.

A hősök és a geldanamycin hatása mononukleáris sejtek arachidonsav termelésére

A hősök kezelést követő 20. órától, illetve a geldanamycin kezelés után a PMA-val és kalcium ionophorral aktivált sejtekből jelentősen csökkent a jelzett arachidonsav felszabadulása, ami az említett kezelések immunszuppresszív hatása mellett szólt.

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

A négy eredeti kevert (vagyis PGIA rezisztens) genetikai háttérrel rendelkező HLA-transzgenikus vonalat és PGIA-re fogékony vad típusú BALB/c egereket immunizáltunk, és vizsgáltunk arthritis előfordulására. 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 perifériás ízületeiben a gyulladásnak sem klinikai, sem szövettani jele nem volt észlelhető még 4 héttel az ötödik PG antigén injekciót követően sem.

Annak megítélésére, hogy a csökkent immunválasznak tulajdonítható-e az arthritis hiánya a transzgenikus egerekben, megmértük mind a PG elleni sejtes és humorális immunválaszt. 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. Hasonlóan a T sejtes 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.Ab⁰ csoportot), mint a vad típusú BALB/c egerekben. Ezek az eredmények azt mutatták, 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 transzgénekkal együttműködve.

A T sejt epitóp repertoár proteoglikánnal immunizált HLA-transzgenikus egerekben

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 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, T sejt proliferációval számos PG peptid epitóp is azonosítható volt a központi fehérjeláncon belül.

A különböző HLA transzgént 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. Ráadásul a négy domináns/arthritisogén peptid közül 3, amit korábban BALB/c egerekben azonosítottak szintén T sejtes választ indukált HLA-DR4.Ab⁰ és/vagy HLA-DQ8.Ab⁰ egerekben.

A G1 domén két domináns régiója mellett számos részlegesen átfedő vagy nem átfedő peptid szintén T sejtes válaszokat indukált a négy különböző transzgenikus vonalban (különösen a HLA-DR4.Ab⁰ és DQ8.Ab⁰ transzgenikus egerekben), bár rendszerint kisebb intenzitással, 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 sejtes választ indukált a DR4.Ab⁰ és DQ8.Ab⁰ egerekben (11 a 20-ból a DR4, és 8 a 15-ből a DQ8 csoportban), míg ez az arány csak kb. 20% volt a DR2.Ab⁰ és DR3.Ab⁰ egerek esetén (2 a 11-ből a DR2 és 3 a 15-ből a DR3 csoportban). Ráadásul a vad típusú BALB/c egerekben azonosított domináns/arthritisogén epitópok egyike (2379-2394 aminosavak a G3

doménen belül), ami 1 vagy 2 konzervatív aminosav cseréjével tartalmazza a „shared epitóp” szekvenciát (QKRAA), szintén pozitív volt DR4 és DQ8 transzgenikus egerekben is.

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 visszakereszteztünk 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, b.) a PG központi fehérjeláncának számos peptid epitópja indukált erős T sejtet választ ezekben a transzgenikus egerekben és c.) a DR4 és DQ8 transzgenikus egerek a vad típusú BALB/c egerek domináns/arthritisogén 4 epitópja közül legalább kettőre válaszoltak. A DR4 és DQ8 allélek expresszióját és az I-Ad hiányát a lépsejtek és a perifériás mononukleáris sejtek felszínén flow cytometriával is megerősítettük.

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 arthritis kifejléséhez. Bár a HLA transzgenikus egerek arthritisének indukciójához legalább egy további antigén injekcióra volt szükség, a PGIA előfordulási gyakorisága és súlyossága alacsonyabb volt a HLA-DR4.Ab⁰ és DQ8.Ab⁰ transzgenikus/kongenikus egerekben, mint a vad típusú BALB/c egerekben. Ez a különbség különösen kifejezett volt a DR4.Ab⁰ transzgenikus/kongenikus vonal esetén.

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

Miközben a klinikai jellemzők, 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.

A proteoglikán specifikus peptidok immunogenitása HLA-DR4.Ab⁰ és HLA-DQ8.Ab⁰ transzgenikus BALB/c egerekben

A PG-nal immunizált BALB/c genetikai háttérű DR4.Ab⁰ és DQ8.Ab⁰ 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-nal immunizált DR4.Ab⁰ és DQ8.Ab⁰ 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. Míg néhány peptid a PG-nal 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 11 DR4 asszociált és a 8 DQ8 asszociált erős/domináns peptid szintén pozitív választ hozott létre a DR4.Ab⁰ és a DQ8.Ab⁰ BALB/c egerekben, hasonlóan a kevert genetikai háttérű DR4.Ab⁰ és a DQ8.Ab⁰ egerek esetében mért értékekhez. A peptidokkal stimulált sejtek szignifikáns mennyiségű IL-2-t és IFN γ -t termeltek, ezzel szemben nagyon kis mennyiségű IL-4-et. Általában megállapítható volt, hogy magas IFN γ /IL-4 arány volt észlelhető arthritises egerekben, ami rendszerint még kifejezettebb volt DQ8.Ab⁰, mint DR4.Ab⁰ transzgenikus BALB/c egerekben. Ugyanakkor azonban szignifikáns összefüggés nem volt észlelhető az arthritis jelenléte és bármely peptid T sejt általi felismerése között.

A domináns és kriptikus PG epitópok megkülönböztetéséhez a DR4.Ab⁰ és DQ8.Ab⁰ transzgenikus/kongenikus BALB/c állatokat előimmunizáltuk azokkal az egyedi peptidokkal, amik erős T sejt válaszokat váltottak ki a teljes PG-vel való immunizáció után, és a

teszteket 9 nappal a peptid injekció után hajtottuk végre. A kiválasztott peptidek közül a p28-42 és p271-285-ös provokálta a legjelentősebb T sejt proliferációt és a dominánsan Th-1 típusú citokin termelést mindkét transzgenikus vonalban. A DQ8.Ab⁰ 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 γ termelést váltottak ki, IL-4 termelést pedig egyáltalán nem indukáltak. Három másik peptid (p76-90, p265-279 és a p277-291) a DR4.Ab⁰ és a p2379-2394 peptid a DQ8.Ab⁰ BALB/c egerekben csak nagyon gyenge T sejt proliferációt és IL-2, IFN és IL-4 termelést indukált előimmunizálás után, 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.

Megbeszélés

Munkánk célja annak tisztázása volt, hogy a humán porc PG antigénként bemutatásra kerül-e a RA-re hajlamosító II. osztályú MHC molekulák által, és amennyiben így van, meg kívántuk határozni a humán porc PG epitóp repertoárját HLA transzgenikus egerekben, illetve vizsgáltuk, hogy a HLA transzgenikus egerek kifejlesztenek-e arthritist humán porc PG-nal való immunizációt követően.

Bár a PGIA rezisztens és PGIA fogékony törzsek nagymértékben hasonló immunválaszt adtak porc PG-nal való immunizálás után, az arthritis iránti fogékonyság nyilvánvalóan függött mind a megfelelő MHC allél, (legyen az H-2^d, DRB1*0401 vagy DQ8B1*0302), mind a megfelelő genetikai háttér (BALB/c) jelenlététől. PGIA-ben az MHC

és nem-MHC 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^d, illetve H-2^k alléleket hordoznak) fogékonyak PGIA-re, míg a kongenikus BALB/B vonal (mely arthritis szempontjából rezisztens H-2^b allélt hordoz BALB/c háttér mellett) teljesen rezisztens PGIA-re. A nem-MHC gének arthritis iránti fogékonyságban betöltött szerepét mutatja, hogy míg a BALB/c egerek (H-2^d) 100%-os hajlamot mutatnak PGIA-re, sem a DBA/2, sem a NZB egerek (pedig mindkét törzs szintén H-2^d-t hordoz) nem fejlesztenek ki arthritist PG-nal való immunizáció után. 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 kifejllesztett arthritist II. típusú kollagénnel történt immunizációt követően.

Az egér H-2^d (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 kifejlődéséhez a MHC és nem-MHC allélek optimális kombinációja szükséges. Bár a RA-re hajlamosító DRB1 (DR4) allélt gyakran észlelték DQB1 (DQ8)-cal kapcsolatosan 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 egerekben, mind a humán DR4 és DQ8 molekulák és a T sejt receptorok között. Ezek a 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 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.Ab⁰ és DQ8.Ab⁰ egerekben is.

Arthritises vad típusú BALB/c egerekben végzett korábbi epitóp tesztelési kísérletek után nem volt meglepő, hogy PG-nal immunizált transzgenikus 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 transzgenikus egerekben, miközben ezek a szekvenciák nem voltak megjósolhatók potenciális T sejt epitópként sem a DRB1*0401, sem a DQB1*0302 allélek esetén azokban a tanulmányokban, melyek többféle modellezési és előrejelzési módszert alkalmaztak. Ugyancsak feltűnő volt, hogy ezzel szemben néhány peptid a G1 doménon belül és egy peptid szekvencia (¹⁷⁸⁵GAYYGSGTPSSFP) a chondroitin-szulfát kötő régióon belül, amit nagy affinitású T sejt epitópként prognosztizáltak, nem bizonyult immunogénnek humanizált egerekben.

Ezért a továbbiakban egyéb algoritmusokat és epitóp előrejelzési módszerekkel kapott eredményekkel is összevetettük a DR4 és DQ8 transzgenikus 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 epitópokat vizsgáltuk.

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 transzgenének expressziója közötti eltéréssel, részben a két HLA allél által prezentált különböző epitóp repertoárral magyarázhatók.

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 α /V β lánc hipervariábilis régióján belül a peptidkötőhelyek lokalizációjának megítélésére.

Vagyis kombinált transzgenikus vonalak, melyek párhuzamosan expresszálják a humán CD4/HLA-DR4/DQ8 alléleket és 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.

Összefoglalás

Kísérleteinkben arthritis indukáló antigénként humán porc PG-t használtunk saját II. osztályú MHC molekulák helyett különböző HLA alléleket expresszáló, arthritisre fogékony vagy rezisztens genetikai háttérű humanizált egerekben.

Igazoltuk, hogy az emberi PG a HLA II. osztályú transzgének révén egér T sejtek számára bemutatásra kerül.

A kísérleti rendszer lehetőséget nyújtott számunkra, hogy azonosítsuk a humán porc PG epitópjait, melyeket a RA-re hajlamosító HLA molekulák prezentálnak. Az előre jelezhető epitópok mellett a PG molekula néhány előre nem jelezhető szekvenciája is erős T sejt epitópként került felismerésre HLA-DR4.Ab⁰- és HLA-DQ8.Ab⁰-transzgenikus egerekben.

DDA-t, egy erős és nem irritáló, a Freund adjuvánsok mellékhatásaitól mentes adjuvánst használva HLA-DR4.Ab⁰ és HLA-DQ8.Ab⁰ transzgenikus BALB/c egerekben PGIA-t lehetett kiváltani, de nem lehetett arthritist indukálni kevert genetikai háttérű transzgenikus egerek esetén. Megállapítható volt, hogy bár az arthritises ízületek szövettani jellemzői enyhébbnek tűntek a transzgenikus/kongenikus egerekben, mint a vad típusú BALB/c egerekben, nem volt minőségi különbség a gyulladt ízületek megjelenése között. Mivel a porc PG HLA-DR4 vagy DQ8 által prezentált epitópjai csak megfelelő genetikai háttér esetén indukálnak arthritist, igazolni tudtuk a nem-MHC asszociált gének szerepét a betegség mechanizmusában.

Megállapítható volt, hogy hősokra adott válasz perifériás mononukleáris sejtek esetén magában foglalja a csökkent arachidonsav felszabadulást, a geldanamycin ilyen jellegű hatása pedig ennek a molekulának gyulladáscsökkentő farmakológiai felhasználásánál lehetőségét veti fel.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Angol nyelven:

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.

IF: 7.19

2. Hanyecz A, Berlo SE, **Szanto S**, Broeren CP, Mikecz K, Glant TT. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1665-76.

IF: 7.19

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.

IF: 1.40

4. **Szanto S**, Csermely P, Kovacs I, Csongor J, Illes A, Bako G, Szegedi G, Sipka S. Inhibition of arachidonic acid release from human peripheral mononuclear cells by heat shock treatment and geldanamycin. *Immunol Lett.* 2002; 83:181-5.

IF: 1.71

Magyar nyelven:

5. **Szántó S**, Glant TT, Szekanecz Z. Arthritises állatmodellek. *Magyar Immunológia* (közlésre elfogadva)

6. **Szántó S**. Rheumatoid arthritis. *Granum* (közlésre elfogadva)

Egyéb saját közlemények:

Angol nyelven:

7. Csipo I, Czirjak L, **Szanto S**, Szerafin L, Sipka S, Szegedi Gy. Decreased serum tryptophan and elevated neopterin levels in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1995; 13:269-270.

IF: 1.92

8. Sipka S, Szucs K, **Szanto S**, Kovacs I, Lakos G, Antal-Szalmas P, Szegedi G., Gergely P. Inhibition of calcineurin activity and protection against cyclosporine A induced cytotoxicity by prednisolone sodium succinate in human peripheral mononuclear cells.

Immunopharmacology. 2000; 48:87-92.

IF: 0.78

9. Szabo Z, Szilasi M, Brugos L, **Szanto S**, Kovacs I, Szeles M, Lakos G, Antal-Szalmas P, Edes I, Sipka S. Differences in the changes of allergen-specific IgE serum levels and the chemiluminescence of peripheral blood phagocytes in patients with allergic rhinoconjunctivitis during the ragweed season. *Immunol Lett.* 2000; 74:201-5.

IF: 1.71

10. Sipka S, Szucs K, **Szanto S**, Kovacs I, Lakos G, Kiss E, Antal-Szalmas P, Szegedi G, Gergely P. Glucocorticosteroid dependent decrease in the activity of calcineurin in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus.

Ann Rheum Dis. 2001; 60:380-4.

IF: 3.82

11. Sipka S, **Szanto S**, Szucs K, Kovacs I, Kiss E, Antal-Szamas P, Lakos G, Aleksza M, Illes A, Gergely P, Szegedi G. Decreased arachidonic acid release in peripheral blood monocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2001; 28:2012-7.

IF: 2.67

12. Glant TT, Kamath RV, Bardos T, Gal I, **Szanto S**, Murad YM, Sandy JD, Mort JS, Roughley PJ, Mikecz K. Cartilage-specific constitutive expression of TSG-6 protein (product of tumor necrosis factor alpha-stimulated gene 6) provides a chondroprotective, but not antiinflammatory, effect in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:2207-18.

IF: 7.19

13. Fulop C, **Szanto S**, Mukhopadhyay D, Bardos T, Kamath RV, Rugg MS, Day AJ, Salustri A, Hascall VC, Glant TT, Mikecz K. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development.* 2003; 130:2253-61.

IF: 7.66

Magyar nyelven:

14. **Szántó S**, Sipka S, Csipő I, Asztalos L, Varga L, Lócsey L. Az átültetett vese kilökődésének vizsgálatára használt laboratóriumi módszerek. *Orvosképzés* 1994; 69:41-49.

15. **Szántó S**, Sipka S, Csipő I, Gyimesi E, Asztalos L, Lócsey L, Balázs Gy., Szegedi Gy. Rutin immunológiai laboratóriumi módszerek a vesetranszplantált betegek rejekciójának monitorozásában. *Laboratóriumi Medicina* 1995; 22:243-247.

16. **Szántó S**, Kiss E, Szegedi Gy. Lupus nephritis és a vesetranszplantáció. *Allergológia és Klinikai Immunológia*

Az értekezés alapjául szolgáló publikált, idézhető absztraktok:

17. 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 (ACR 2002, poster presentation)

18. **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 (ACR 2003, poster presentation)

19. **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, oral presentation, Abott Abstract Award Winner)

Egyéb publikált, idézhető absztraktok:

20. Gonda A, **Szanto S**, Gal I, Mikecz K. Real-time analysis of leukocyte-endothelial cell interactions in vivo during inflammation in mice lacking CD44 or L-selectin or both. *Arthritis Rheum.* 2002; S46:78 (ACR 2002, poster presentation)

21. **Szanto S**, Gal I, Gonda A, Mikecz K. L-selectin and CD44 regulate leukocyte rolling in synovial microvessels in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; S48:272 (ACR 2003, poster presentation)

22. **Szanto S**, Adarichev VA, Nesterovitch AB, Gonda A, Szabo Z, Glant TT. Quantitative trait loci (QTLs) on chromosome 15 play crucial role in male and female susceptibility of proteoglycan-induced arthritis (PGIA). *Arthritis Rheum.* 2003; S48:149 (ACR 2003, poster presentation)

23. Gonda A, **Szanto S**, Gal I, Glant TT, Mikecz K. CD44 is critically involved in leukocyte extravasation during a Th2 type inflammatory response. *Arthritis Rheum.* 2003; S48:271 (ACR 2003, poster presentation)

24. **Szanto S**, Bardos T, Kolman KJ, Gonda A, Gal I, Glant TT, Mikecz K. TSG-6 (TNF α -stimulated gene-6)-deficiency accelerates inflammatory events, cartilage damage and bone erosion in a murine model of progressive polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; S48:252 (ACR 2003, oral presentation)

25. Gal I, **Szanto S**, Gonda A, Mikecz K. Intravital microscopy on the synovial microcirculation demonstrates a role for CD44 in inflammatory cell extravasation in a murine model of RA. *Arthritis Rheum.* 2003; S48:677 (ACR 2003, oral presentation)