

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**T sejtek vándorlásának jellemzése az ízületekben és az ízületeket
drenáló nyirokcsomókban proteoglikán indukált arthritisztes
egerekben**

Dr. Kobezda Tamás

Témavezető: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2014.

T sejtek vándorlásának jellemzése az ízületekben és az ízületeket drenáló nyirokcsomókban proteoglikán indukált artritiszes egerekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Kobezda Tamás, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Mozgásszervi betegségek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Buzás Edit, az MTA doktora
Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK, Szemészeti Klinika könyvtára
2014. június 17. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora
Dr. Nagy György, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Buzás Edit, az MTA doktora
Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora
Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora
Dr. Nagy György, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet,
„A” épület tanterme
2014. június 17. 13 óra

Bevezetés

A reumatoid artritisz (RA) krónikus autoimmun gyulladós megbetegedés, ami a Föld lakosságának egy százalékát érinti. Korai tünete a kisízületek szimmetrikus gyulladása, ami később szisztémás megbetegedésbe csap át: megtámadja a szerkezet, valamint az ízületeket is tönkre teszi. Azt már régóta tudjuk, hogy az autoreaktív T sejtek szerepet játszanak az RA kialakulásában, de nem ismerjük az ízületbe vándorló T sejtek szerepét. Az RA állatmodelljei kiválóan alkalmasak annak bemutatására, hogy a T sejtek hogyan indítják el a gyulladós folyamatokat, segítséget nyújtanak a patomechanizmus megértéséhez, valamint új terápiás eljárások kidolgozásához. Az egyik leggyakrabban használt egér artritisz modell a proteoglikán indukált artritisz (PGIA), amit humán ízületi porc proteoglikánnal (PG) a BALB/c egerek intraperitoneális immunizációja révén lehet kiváltani. A modell egyik jellegzetessége, hogy az artritiszes egerekből izolált T és B sejtek súlyos kombinált immunodeficiens (SCID) egérbe való befecskendezésével a betegség átadható ezeknek az állatoknak.

A granulociták és makrofágok nagy száma az RA-ban érintett ízületekben arra utal, hogy a T sejtektől független folyamatoknak is fontos szerepe van az ízületben végbemenő változásokban. Az ízületekben megtalálható kis T sejt populáció főleg regulatórikus T sejtekből (Treg-ekből) áll, melyek jelenléte másodlagos bevándorlást valószínűsít a gyulladás helyszínére. Mindezek az elfogadott nézet szerint az ízületbe érkező T sejtek a citokin és a kemokin produkción keresztül stimulálják a környező sejteket és indítják el a helyi gyulladós folyamatokat.

Az elmúlt évtizedben a multifoton mikroszkóp alkalmazása nagyban hozzájárult, hogy jobban megértsük a T sejtek mozgását és kapcsolatait más sejtekkel. A legtöbb kutatócsoport genetikusan módosított egereket használ, melyekben a különböző modellekhez használt antigéneket (Ag) a T sejtek nagyobb eséllyel ismerik fel. Ezen T sejtek nagy részén az antigénnre specifikus T sejt receptor

(T cell receptor – TCR) található, ami specifikus a modell Ag egyetlen epitópjára. A TCR-transzgenikus (TCR-Tg) egerek T sejt motilitását tanulmányozó kutatások eredményei ellentmondásosak, azonban elfogadott nézet, hogy a T sejtek Ag-t bemutató antigén-prezentáló sejtekkel (APC) való interakciója a T sejtek lelassulásához vezet. A lelassult T sejtek az APC-vel való hosszú ideig tartó kapcsolat következtében aktiválódnak, majd osztódnak, vagy nagy sebességgel távoznak a nyirokcsomóból. A dolgozatban bemutatott kísérletekben elsőként tanulmányoztuk a T sejtek egymás közötti, valamint a T sejtek és APC-k közötti kapcsolatokat egy komplex autoimmun ízületi gyulladáshoz vezető modellben.

Célkitűzések

A munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Szükség van-e a T sejtekre a PGIA kialakulásakor az ízületekben?

Hogy a kérdésre választ kapjunk, SCID egerekbe befecskendezett fluoreszcens festékkel jelölt T sejtek mozgását vizsgáltuk az bokaízületekben és az ízületeket drenáló (térd mögötti, vagy popliteális) nyirokcsomókban a PGIA kialakulása alatt. Érdekes módon, míg az ízületekben nem sikerült T sejteket kimutatni, a nyirokcsomóban ezen sejtek végig megtalálhatóak voltak. Ha azonban T sejteket nem fecskendeztünk be (csak APC-eket), a betegség nem alakult ki. Ez arra utalt, hogy a T sejtek jelenléte nélkülözhetetlen a nyirokcsomókban a betegség kezdeti szakaszában, míg jelenlétük az ízületekben elhanyagolható.

- Ha a T sejtek nélkül nem alakul ki artritisz, akkor miért nem hatékonyak a T sejteket célzó terápiák RA-ban?

Erre a kérdésre az tudományos irodalomban próbáltam választ keresni. A T sejtet célzó terápiák hatékonynak bizonyultak más állatmodellekben is (mint a CIA és

KBxN artritisz), azonban RA-ban hatástalanok. Ennek okát talán a T sejteknek a betegségben betöltött szerepében valamint a betegség klinikai lefolyásában kell keresni.

- Mivel a T sejtek jelenléte a nyirokcsomókban feltétlenül szükséges az artritisz (PGIA) kifejlődéséhez az egerekben, további kísérleteimet a nyirokcsomókra összpontosítottam. Arra voltam kíváncsi, hogy van-e különbség az Ag-vel már találkozott (Ag felismerő), és a naív T sejtek mozgása között a nyirokcsomókban, illetve hogy a megfigyelt mozgás hasonlít-e más tanulmányokban leírtakhoz, amikor modell Ag-eket használtak és naív TCR-Tg egerekből izolált T sejtek mozgását vizsgálták.

A T sejtek mozgását egy komplex RA modellben elsőként vizsgáltuk multifoton mikroszkóppal. A genetikusan manipulált TCR-Tg egérmodelleknél a T sejtek válasza minden esetben egy izolált esemény. Ezzel ellentétben az artritiszes egerekből nyert T sejtek viselkedése az autoimmun artritisz kifejlődéséhez köthető, ezért ezen sejtek nyirokcsomóban való mozgásában történt változások megértése választ adhat in-vivo T sejt aktivációval és a betegség progressiójával kapcsolatos kérdésekre. Először is azt szerettem volna megtudni, hogy van-e különbség az Ag-specifikus és a naív T sejtek mozgásában, illetve hogy ezek a különbségek valóban specifikusak-e a PG-re, mint a PGIA modellre releváns Ag-re. Kutatócsoportunk több alkalommal kimutatta, hogy a PG-vel immunizált artritiszes egerek T sejtjei sokkal jobban reagálnak a PG-re (in-vitro proliferációs válasz és proinflammatorikus citokinek termelése szintjén), mint a nem immunizált naív egerek T sejtjei. Ezen kísérletek azt igazolják, hogy az artritiszes állatokból izolált T sejt populáció több PG (Ag)-specifikus T sejtet tartalmaz, mint a naív egerekből származó populáció. Bár nem kétséges, hogy az artritiszes egerekben is vannak Ag-t nem felismerő T sejtek, a megkülönböztetés érdekében az artritiszes egerekből izolált T sejteket Ag felismerő sejteknek, míg a nem immunizált

állatokból származókat naív sejteknek nevezem a továbbiakban. Az Ag felismerő és naív T sejteknek a releváns Ag-vel történt találkozás utáni mozgásának összehasonlításán túlmenően még az alábbi kérdéseket tettük fel:

- Van-e kompetíció a naív és az Ag felismerő T sejtek között az Ag-hez való hozzájutásban?
- Az ízületi gyulladásnak van-e hatása a T sejtek mozgására az ízületet drenáló nyirokcsomóban?

Ezzel arra kerestük a választ, hogy van-e szerepe a kompetíciónak a naív és az Ag-felismerő T sejtek között a releváns Ag-vel rendelkező APC-kért, valamint hogy egy ízület gyulladása megváltoztatja-e az ízületet drenáló nyirokcsomókban található T sejtek mozgását.

Módszerek

Antigén, egerek, immunizáció és az artritisz súlyossága

BALB/c és EGFP-LysM-Tg egereket (mely utóbbiak zöld fluoreszcens transzgént expresszálnak a granulocitákban és BALB/c háttérbe lettek visszakeresztezve) térdprotézis műtéten átesett oszteoartritiszes betegek porcából kivont PG-vel immunizáltunk. (1) A kísérletek egy csoportjához vad típusú (wild type, WT) valamint SCID BALB/c egereket, illetve EGFP LysM-Tg egereket használtunk. (2) A további kísérletekhez WT felnőtt nőstény BALB/c egereket használtunk mind recipiensnek mind donornak (lehetek artritiszesek vagy nem immunizáltak). (3) Az in vitro kompetíciós kísérletekhez pozitív kontrollként humán PG specifikus TCR-Tg egereket használtunk. Az ízületek gyulladásának súlyosságát egy 0-16-ig terjedő vizuális skálán pontoztuk.

Immun sejtek szeparálása, festése és transzferje in vivo mikroszkópiához

A sejteket naív és artritiszes egerek lépjeiből és nyirokcsomóiból a T sejteket dúsító kitékkel izoláltuk. A T sejteket nem tartalmazó frakciót (amely főleg Ag-prezentálásra képes B sejteket tartalmaz) a T sejtek depletálása révén nyertük. A kísérletektől függően, a T sejteket és a B sejteket (APC-eket) fluoreszcens festékekkel megjelöltük. Dendritikus sejtek (DC) transzferjéhez a DC-eket az egerek csontvelőjéből tenyésztettük 10 napig granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor jelenlétében. Az EGFP LysM-T egerek esetében jelölés nem volt szükséges, mivel ezek az egerek zöld fluoreszcens fehérjét expresszálnak a granulocitáikban. A kísérletek céljától függően különböző sejtranszfereket végeztünk:

1, Piros fluoreszcens festékkel jelzett T sejteket és zöld fluoreszcenciával jelzett vagy festetlen APC-eket fecskendeztünk SCID egerekbe hogy a sejtek mozgását az ízületekben valamint a térd mögötti nyirokcsomókban követni tudjuk. A mikroszkópos vizsgálatokat 2, 4 órával illetve 1, 2, 3, 4, 7, 12 és 18 nappal a transzfer után végeztük. Az EGFP LysM-Tg BALB/c egereket arra használtuk, hogy a granulociták mozgását vizsgáljuk az ízületekben.

2, Zöld naív és piros Ag felismerő (artritiszes egerekből származó) T sejteket naív egérbe fecskendeztünk, és 2-3 órával később intraartikularisan PG-t adtunk a bokaízületükbe. A kontroll egerek ízületébe vagy PBS-t (phosphate buffer solution) vagy ovalbumint (OVA) adtunk, mint irreleváns Ag-t. A multifoton mikroszkópos felvételeket az antigén beadás utáni 2 és 48 óra között végeztük, hogy a nyirokcsomóban a T sejtek mozgását az idő függvényében vizsgáljuk. Hogy a nyirokcsomókba új T sejtek ne lépjenek be, MEL-14-et (L-selectin blokkoló antitest) adtunk 2 órával a felvételek készítése előtt.

3, Zöld naív és piros Ag felismerő T sejteket adtunk artritiszes recipienseknek, hogy a T sejteknek a PG-vel immunizált állatok nyirokcsomóiban való

mozgását tanulmányozzuk. A felvételeket 4, 24, 48 és 72 órával a transzfer után készítettük. Ezek az egerek is kaptak MEL-14-et 2 órával a felvételek készítése előtt.

4, Zöld T sejteket transzferáltunk artritiszes recipiensekbe, hogy eldöntsük volt-e kompetíció az Ag-felismerő illetve a naív T sejtek között az előbbi kísérletben. A kísérlet többi paramétere megegyezik az előzővel.

5, Végül csontvelőből tenyésztett DC-eket valamint PG-t fecskendeztünk artritiszes egerekbe, hogy a DC-knek a naív és az Ag felismerő T sejtekkel való kapcsolatát vizsgálhassuk.

In vivo multifoton mikroszkópia

A légzési mozgásból eredő hibák minimalizálására, az egerek ketamint és xylazint kaptak intramuszkulárisan az anesztézia indukcióhoz, majd az altatást izofluoránnal 100% oxigén jelenlétében tartottuk fenn.

A külső boka valamint a térd feletti bőrt mikrosebészeti eszközökkel eltávolítottuk, majd a nyirokcsomót a felszínre hoztuk. Az egereket ragasztóval valamint ragasztó szalagokkal az imaging chamberre rögzítettük. Mind az imaging chamber, mind az objektív hőmérsékletét állandó 37 °C fokon tartottuk. A képek elkészítéséhez a PrairieView szoftvert használtuk, az elkészített képsorozatokból 3 dimenziós illetve time lapse sorozatokat készítettünk.

Képanalizálás

A time-lapse módszerrel felvett T sejt mozgást Imaris Trackkel analizáltuk a légzési mozgásokból eredő artefaktumok eltávolítása után. A következő paraméterekre voltunk kíváncsiak: elmozdulás, átlagsebesség, motilitási koefficiens (az elmozdulás osztva az eltelt idő négyzetgyökével) és a mozdulatlan sejtek aránya az összes sejthez viszonyítva. A kapott adatokat Microsoft Excellel elemeztük.

Immunhisztokémia

SCID egerek hátsó lábait illetve nyirokcsomóit (a kísérletek után) OCT beágyazóba helyeztük és lefagyasztottuk. 8 mikrométeres metszeteket készítettünk kriosztát segítségével, amiket -20°C -on tároltunk. Immunfestés előtt a metszeteket acetonnal fixáltuk valamint PBS pufferben hígított 5%-os kecskeszérummal és 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációjú anti-CD16/CD32 (Fc receptorok elleni) monoklonális antitesttel (mAb) blokkoltuk. Az immunfestéshez Alexa Fluor 488 konjugált B220 mAb-t használtunk a B sejtek kimutatására, illetve Pacific Blue konjugált mAb-t CD35 ellen a folliculáris DC-k azonosítására. A metszeteket 10%-os pufferált formaldehides fixálás után multifoton mikroszkóppal képeztük le.

MHC II-peptid tetramer kötő assay

A kísérlethez allophycocyaninnal (Apc) jelölt humán PG specifikus peptidet tartalmazó egér MHC II tetramert, valamint negatív kontrollként irreleváns (nem PG-specifikus) Apc-jelölt tetramert használtunk. Pozitív kontroll T sejteket naív heterozigóta PG-TCR-Tg BALBc egerek lépéből nyertünk. Tisztítás után a három T sejt populációt (naív WT, Ag felismerő WT és naív PG-TCR-Tg) 24 órán keresztül 5 ng/ml egér interleukin-2 (IL-2) jelenlétében tenyésztettük. A tetramerek hozzáadása előtt az Ag felismerő WT T sejt populációt piros fluoreszcens festékkel megfestettük, míg a másik kettőt festetlenül hagytuk. A T sejt mintákat a tetramer kötő vagy kompetíciós kísérletekhez a következőképpen csoportosítottuk: (1) naív T sejtek (2) Ag-felismerő T sejtek (3) PG-TCR-Tg T sejtek (4) Ag-felismerő (piros) T sejtek jelöletlen naív T sejtekkel (5) Ag-felismerő (piros) T sejtek naív PG-TCR-Tg T sejtekkel. A sejt mintákat 16 órán keresztül inkubáltuk 0, 0.3, 0.6, 1.2 illetve 2.4 μg APC-jelölt PG tetramer vagy APC jelölt CLIP tetramer (10% FBS-t tartalmazó 100 μl DMEM médiumban) jelenlétében standard sejtenyésztési körülmények között. A sejteket ezután lemostuk és megjelöltük Fitc-el konjugált patkány anti-egér CD4 Ab-vel vagy nem

specifikus patkány Fitc IgG2b-vel. A tetramer kötő CD4+ T sejtek százalékos arányát áramlási citométerrel határoztuk meg.

Statisztikai elemzés

A statisztikai analízist Microsoft Excel Analysis Toolpak és az SPSS programokkal végeztük. A minta homogenitás szórása függvényében az adatokat vagy közvetlenül használtuk, vagy analízis előtt transzformáltuk. A két mintacsoport összehasonlításához Student t tesztet vagy Mann-Whitney U tesztet használtunk. Akkor vettük szignifikánsnak a különbséget, ha a p értéke kisebb vagy egyenlő volt mint 0,05.

Eredmények

A PGIA kialakulása alatt csak kis számú T sejt található az ízületekben adoptív transzfer után.

Multifoton mikroszkóp segítségével nem tudtuk megbízhatóan kimutatni a donor egerek limfocitáit a SCID egerek bokaízületeiben, sem az artritisz kifejlődése előtt, sem azután. Korai időpontokban néha láttunk leukocitákat, melyek véletlenül megfestődtek, azonban ezeket is csak a szinóviális szövet ereiben. Ezzel ellentétben, a beadott T és B limfociták végig (18 napig) megtalálhatóak voltak az ízületet drenáló nyirokcsomó T és B sejt zónáiban. További kísérletekben immunhisztokémiával és áramlási citometriával a fenti eredményeket megerősítettük.

Ag-vel való találkozás után a naív és az artritiszes egerekből szeparált T sejtek máshogy viselkednek a recipiens egerek nyirokcsomóiban.

Naív egerekből izolált zöld valamint artritiszes egerekből izolált piros T sejteket adtunk naív egerekbe majd multifoton mikroszkóppal vizsgáltuk a sejtek mozgását Ag indukcióra. Ez lehetőséget biztosított a naív T sejtek első reakciójára

(„priming”), valamint az Ag által stimulált T sejtek reaktivációjára. Hasonlóan más multifoton mikroszkópos kísérletekhez, a két csoport mozgásában nem volt különbség az első két órában az antigén beadása után. A 4 órás időpontnál mindkét csoport mozgékonyasága csökkent, bár a mozdulatlan sejtek aránya magasabb volt az Ag-felismerő csoportban. Ez arra utal, hogy az antigén prezentáció 4 órával az intraartikuláris Ag beadása után a leghatékonyabb a drenáló nyirokcsomóban, mikor is az intenzív APC-T sejt interakció eredményeképpen az Ag-felismerő T sejtek teljesen lelassulnak. Két órával később a T sejtek mozgékonyaságukat részlegesen visszanyerték, azonban a kezdeti szintet nem érték el. Az Ag-felismerő T sejteknek a mozgékonyasága azonban még mindig szignifikánsan a naív T sejtek szintje alatt maradt. A mozgási paraméterekben megfigyelhető különbségek egyértelműen az Ag-felismerő T sejtek PG felismerésének eredménye volt mivel PG helyett irreleváns OVA vagy PBS ízületbe való beadása nem vezetett a fenti különbségekhez.

8 órával az antigén beadása után azonban már nem volt különbség a két csoport mozgási paramétereit között, melyek hasonlóak voltak az Ag (PG) beadása előtti állapothoz. Ez arra utal, hogy az Ag egyszeri beadása annak rövid ideig tartó bemutatásához, és csak rövid ideig tartó kapcsolatok létrejöttéhez vezet a T sejtek és az APC-k között. Bár a kísérletben az APC-eket nem tettük láthatóvá, azt feltételezzük, hogy a mozgási paraméterekben található különbségek a kétféle T sejt populáció között a magasabb Ag felismerő sejtszám és azoknak az MHC-PG-hez való nagyobb affinitása eredményének tudhatók be.

Ag felismerő T sejtek hosszabban tartó kapcsolatba lépnek az APC-vel az ízületet drenáló nyirokcsomókban az artritiszes recipiensekben, mint az egyszerre transzferált naív T sejtek.

Az előző kísérletet követően szerettük volna megtudni, hogy mi történik, ha ugyanazokat a sejteket artritiszes egérbe transzferáljuk. A mikroszkópos felvételeket

4 és 72 óra közötti időpontokban végeztük (az Ag beadását követően). A naív egerekben kapott eredményekhez viszonyítva a naív T sejtek mozgásának leállása a negyedik órában sokkal prominensebb volt, a sejtek majdnem ugyanannyi hányada vált mozdulatlanná, mint az Ag-felismerőké. A naív sejtek azonban a 24. órában leváltak az APC-kről és 72 óra elteltével visszanyerték a kezdeti mozgási sebességüket. Ez arra utalt, hogy vagy csak átmenetileg kapcsolódtak az APC-khez a nyirokcsomókban, vagy csak részleges hozzáférésük volt ezekhez a sejtekhez, mert az Ag felismerő T sejtek megelőzték őket a versenyben.

Az Ag iránti kompetíció az Ag felismerő T sejtek számával arányos.

Az Ag felismerő T sejtek egyértelműen előnnyel indulnak az Ag-ért való versengésben, mivel többen vannak, és az Ag-hez való affinitásuk is magasabb. A fenti kísérletekben az ízületbe beadott PG koncentrációja feltehetőleg nagyon alacsony volt az ízületet drenáló nyirokcsomókban ezért ideális körülményeket teremtett a T sejtek közötti kompetícióhoz. Az alábbi kísérletben azt vizsgáltuk, hogy ez a kompetíció kimutatható-e in vitro tetramer kötéssel, aminek mértékét áramlási citometriával ki lehet mutatni. A PG-tetramer kötése egyértelműen kimutatható volt, még suboptimális dózisu tetramer hozzáadása esetén is. A tetramer kötő naív T sejtek száma magasabb volt az Ag felismerő T sejtek hiányában, ami arra utal, hogy az Ag-specifikus T sejtek megelőzték azokat az Ag kötésben. A tetramer kötés specificitásának kimutatására további kompetíció volt megfigyelhető az Ag felismerő és a naív PG-TCR-Tg T sejtek között. Kompetíció nem volt kimutatható magasabb (szaturáló) dózisu PG tetramer jelenlétében, és úgyszintén nem volt kimutatható ha a T sejteket a kontroll (irreleváns CLIP) tetramerrel inkubáltuk. Ez a kísérlet azt bizonyítja, hogy a különbségek a T sejtek motilitása között az artritiszes recipiens nyirokcsomóiban a PG epitópokat prezentáló APC-kért való versengés eredménye.

Kompetíció hiányában a naív T sejtek lelassulása is megfigyelhető az artritiszes recipiensek nyirokcsomóiban.

Hogy megvizsgáljuk a naív T sejtek mozgását versengés hiányában, Ag felismerő sejtek hozzáadása nélkül adtunk be naív T sejteket artritiszes egerekbe az Ag (PG) intraartikulárisan oltása után. A kísérlet többi paramétere megegyezett az előző kísérletben leírtakkal. A naív T sejtek megálltak és gyakorlatilag mozdulatlanok maradtak az első 24 órában. Ezután a motilitásuk emelkedni kezdett és a mozdulatlan sejtek aránya közel lineárisan csökkent 24 és 72 óra között. Ez arra utalt, hogy mikor a beadott naív T sejteknek nem kellett exogén Ag-specifikus T sejtekkel versengeni (legfeljebb az endogén T sejtekkel megküzdeni) az Ag-ért, akkor ténylegesen jobb hozzáférésük volt a PG epitopokat prezentáló APC-khez.

A naív T sejtek mozgását az ízületet drenáló nyirokcsomókban befolyásolja az ízület gyulladása.

Ebben a kísérletben megismételtük az előzőt, azonban a naív T sejtek mozgását nem gyulladt bokákat drenáló nyirokcsomókban vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy bár a T sejtek kezdeti sebessége magasabb volt a nem gyulladt ízületeket drenáló nyirokcsomókban, a gyulladtakat drenálóknál a T sejtek hamarabb visszanyerték a mozgékonyágukat. Ez arra utal, hogy a gyulladásnak moduláló hatása van az antigén bemutatás dinamikájára az ízületet drenáló nyirokcsomókban.

Bár az Ag-felismerő T sejtek kapcsolatba lépnek a transzferált és újonnan a nyirokcsomóba migrált DC-kel, hosszán tartó kapcsolatok csak az endogén APC-kel figyelhető meg.

Néhány kísérletben együtt transzferáltunk bokába fecskendezett DC-ket és intravénásan beadott naív vagy Ag-felismerő T sejteket artritiszes egerekbe, hogy a közöttük végbemenő interakciókat vizsgálhassuk. 24 óra elteltével a transzferált DC-k

megtalálhatóak voltak a nyirokcsomókban, azonban a naív és Ag-felismerő T sejtek csak rövid ideig tartó kapcsolatokat hoztak létre velük. Ugyanezek a sejtek azonban hosszú ideig tartó kapcsolatokat hoztak létre a nyirokcsomóban található autofluoreszcens „objektumokkal”. Mivel az APC-k endocitotikus vezikulumai tartalmaznak autofluoreszcens anyagot, ezek az objektumok nagy valószínűséggel az egér saját APC-it reprezentálják.

Diszkusszió

Fluoreszcens festékkel jelölt sejtek migrációját vizsgáltuk a bokában és az azt drenáló nyirokcsomóban első alkalommal egy autoimmun RA modelben. Érdekes módon az artritisz kialakulása alatt gyakorlatilag nem láttunk T sejteket a bokaízületben egyetlen vizsgált időpontban sem. Bár más kutatócsoport is megjegyezte, hogy az artritisz állatmodellek gyulladt ízületeiben kevés a T sejt, ennek okát nem keresték.

Saját munkacsoportunk kimutatta, hogy ha a T sejtek számát csak a keringésben csökkentjük, annak nincs hatása az artritisz (PGIA) kifejlődésére, viszont ha a transzfer előtt a T sejteket deplécióval kiiktatjuk, arthritisz nem alakul ki. Ez arra utal, hogy a T sejtek jelenléte a nyirokszervekben, és az Ag-specifikus T sejtek által mediált autoantitest termelés szükséges a betegség kialakulásához. RA-ban azonban a 90-es évek eleje óta elérhető T sejt targeting terápiák (anti-CD4, anti-CD5, anti-CD7, anti-CD52 mAbs) nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. Ennek oka az lehet, hogy RA-ban poli- és oligoklonálisan felfszaporodott T sejtek találhatóak, melyek között autoreaktív populációk is előfordulhatnak. Az ízületi gyulladást azonban a legtöbb egérmodellben egy monofázisos immunológiai esemény előzi meg, vagyis egy erőteljes, de egyetlen Ag által kiváltott T sejt választ látunk a betegség kialakulása előtt. Ennek a válasznak csak egy töredéke irányul saját Ag-k ellen. A T sejteknek vagy azon molekuláiknak az eliminálásával, melyek nélkülözhetetlenek az effektor

funkcióhoz, az artritisz kialakulása könnyedén megállítható. Szintén jellemző az állatmodellekre a T sejtek korai részvétele a gyulladás kialakulásában, ezért a T sejt eliminációs terápiák akkor a leghatékonyabbak, ha a klinikai tünetek kialakulása előtt alkalmazzák őket. Type II collagen (CII) indukált artritiszben (CIA), anti-CD4 antitest adása a tünetek megjelenését követően már nem gátolja a betegséget, és nem tünteti el a CII reaktív patogén T sejt populációt. Ez részben azt is megmagyarázza, hogy ehhez hasonló, azaz T helper sejteket depletáló kezelés miért nem működött mikor RA-s betegeket kezeltek vele. Az állatmodellekre szintén jellemző az ellenregulációs mechanizmusok beindulása a betegség korai stádiumában. Ezért főleg a Treg-ek és a veleszületett immunrendszer sejtjei – többek között az ízületben megtalálható myeloid eredetű szuppresszor sejtek – lehetnek felelősek. Mivel ezek a sejtek hatékonyan csökkentik a T sejt mediált válaszokat és a gyulladást, ezért elképzelhető, hogy elfedik a T sejtet célzó terápiák hatékonyságát, ha már a betegség kialakulása után alkalmazzák őket.

A T sejtek közötti illetve a T és DC-k közötti interakciókra koncentrálva azt találtuk, hogy az Ag felismerő T sejtek az artritiszes egerekbe bekerülve a naív TCR-Tg sejtekhez hasonlóan mozognak mikor releváns Ag-t hordozó APC-vel találkoznak a nyirokcsomóban. A naív és az artritiszes T sejtek mozgása közötti különbségek a transzfer után egyértelműen kimutathatóak voltak mind az artritiszes, mind a naív egerekben. Ez összhangban van azzal az elmélettel, hogy az ismételt immunizáció PG-vel, adjuváns jelenlétében, jelentősen megnöveli a specifikus TCR-t expresszáló Ag-felismerő T sejtek számát. Az Ag-felismerő memória sejtek magasabb affinitású TCR-je, illetve a naív T sejtekhez viszonyított magasabb costimuláns és adhéziós molekulák expressziója elősegíti a hosszúéletű kontaktusok létrejöttét az APC-k és ezen T sejtek között. Ugyanezek a hosszú életű kapcsolatok csökkentették a naív T sejtek hozzáférését az APC-khez amikor azokat Ag felismerő T sejtekkel együtt transzferáltuk. A naív T sejtek és APC-k közötti interakció hosszabban tartott,

legalábbis átmenetileg, ha ezeket Ag felismerő versenytársak nélkül adtuk be. Ezekre a megfigyelésekre az APC-k magasabb száma, illetve hatékonyabb Ag prezentáló képessége részben magyarázatot ad, de egyéb tényezők, mint a recipiens egérben ismételt immunizáció illetve az ízületek destrukciója hatására keletkező új epitópok (többségében autoepitópok) is hozzájárulhatnak. Ezen epitópok bemutatása a naív T sejteknek az immunológiai értelemben vett „self-tolerance” áttöréséhez és autoimmun betegség kialakulásához vezethet. Erre bizonyíték, hogy az artritiszes egerek T sejtjei reaktivitást mutatnak a saját (egér) PG-re illetve egyéb, PG-vel nem kapcsolatos Ag-kre mint a citrullinált proteinek és saját IgG. Az Ag repertoár ilyenfajta kiterjedése, ami mind PGIA-s egerekben, mind RA-s betegekben megfigyelhető, nagy valószínűséggel intra- és intermolekuláris epitóp spreading-nek köszönhető.

A nyirokcsomókban található APC-k PGIA-s egerekben diverz specificitással rendelkező peptidek széles repertoárját képesek bemutatni. A transzferált T sejtek között valószínűleg vannak ezeket a (nem PG eredetű) peptideket felismerő T sejtek. Az a jelenség, hogy az Ag-felismerő T sejtek nagyobb valószínűséggel lépnek kapcsolatba az endogén APC-vel, mint a bokába befecskendezett, a nyirokcsomóba újonnan vándorolt PG-t prezentáló DC-vel, alátámasztja ezt a feltételezést. Végezetül azt találtuk, hogy az ízületi gyulladásnak hatása van az APC-T sejt interakcióra, mivel gyulladás hiányában a T sejtek ritkábban létesítenek hosszú ideig tartó kapcsolatot az APC-vel az ízületet drenáló nyirokcsomókban.

Összefoglalás

A PhD értekezésemben a T sejtek vándorlását, valamint mozgási tulajdonságait vizsgáltam a bokában és a bokát drenáló nyirokcsomókban. Eredményeim:

- A PGIA kialakulása nem jár együtt jelentős számú T sejtek bokába történő vándorlásával.

- A T sejtek aktivációjával kapcsolatos motilitási változásokat vizsgáltam in vivo, genetikusan nem módosított egerekben, első alkalommal egy komplex autoimmun gyulladós betegségben.
- Az Ag-felismerő T sejtek mozgási tulajdonságai hasonlóak a TCR transzgenikus egerekből izolált T sejtekéhez.
- A T sejtek mozgása jelentősen lelassul a PGIA-s egerek gyulladt ízületeit drenáló nyirokcsomókban.
- A naív T sejtek motilitását befolyásolja a gyulladás és a környezetükben lévő sejtek.
- A T sejt depléciós terápiák hatékonyságát egérmodellekben részben a T sejteknek a betegség előtti eliminálása, részben a betegség monofázisos lefolyása magyarázza.

Az RA állatmodelljei nélkülözhetetlenek a T sejtek migrációjának, a T sejt és APC közötti interakciók, valamint a naív és Ag-felismerő T sejtek közötti kompetíció in vivo vizsgálatához. További tanulmányok szükségesek ahhoz, hogy jobban megértsük a T sejtek szerepét az RA-ban, és hogy növeljük a T sejtek ellen irányuló terápiás stratégiákat vizsgáló állatkutatások értékét.

Iktatószám: DEENKÉTK/7/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kobezda Tamás
Neptun kód: BE5JUK
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kobezda, T.**, Ghassemi-Nejad, S., Mikecz, K., Glant, T.T., Szekanez, Z.: Of mice and men: How animal models advance our understanding of T-cell function in RA.
Nat. Rev. Rheumatol. Epub ahead of print (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2013.205>
IF:9.745 (2012)
2. **Kobezda, T.**, Ghassemi-Nejad, S., Glant, T.T., Mikecz, K.: In vivo two-photon imaging of T cell motility in joint-draining lymph nodes in a mouse model of rheumatoid arthritis.
Cell. Immunol. 278 (1-2), 158-165, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.08.003>
IF:1.743
3. Angyal, A., Egelston, C., **Kobezda, T.**, Olasz, K., László, A., Glant, T.T., Mikecz, K.: Development of proteoglycan-induced arthritis depends on T cell-supported autoantibody production, but does not involve significant influx of T cells into the joints.
Arthritis Res. Ther. 12 (2), R44, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/ar2954>
IF:4.357



További Közlemények

4. Ghassemi-Nejad, S., **Kobezda, T.**, Rauch, T.A., Matesz, C., Glant, T.T., Mikecz, K.: Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular joints in mice with autoimmune inflammatory arthritis.
Osteoarthritis Cartilage. 19 (4), 458-465, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.01.012>
IF:3.904
5. Hamel, K.M., Cao, Y., Wang, Y., Rodeghero, R., **Kobezda, T.**, Chen, L., Finnegan, A.: B7-H1 expression on non-B and non-T cells promotes distinct effects on T- and B-cell responses in autoimmune arthritis.
Eur. J. Immunol. 40 (11), 3117-3127, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040690>
IF:4.942
6. Doodes, P.D., Cao, Y., Hamel, K.M., Wang, Y., Rodeghero, R., **Kobezda, T.**, Finnegan, A.: CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthritis.
Arthritis Rheum. 60 (10), 2945-2953, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.24842>
IF:4.152
7. **Kobezda, T.**: The role of the foot in the mechanism of shock absorption.
Biomech. Hung. 2 (1), 31-38, 2009.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28.843

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 15.845

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.01.14

