

# **Biomarkerek (autoreaktív antitestek, T sejtek és extracelluláris vezikulák) vizsgálata rheumatoid arthritisben**

Doktori értekezés

**Misják Petra**

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola



**Témavezető:** Dr. Buzás Edit, egyetemi tanár, D.Sc

**Hivatalos bírálók:** Dr. Bodolay Edit, egyetemi tanár, D.Sc

Dr. Varga Lilian, tudományos főmunkatárs, PhD

**Szigorlati bizottság elnöke:** Dr. Gergely Péter, egyetemi tanár, D.Sc

**Szigorlati bizottság tagjai:** Dr. Dérfalvi Beáta, egyetemi tanársegéd, PhD

Dr. Miklós Katalin, PhD

Budapest

2012

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>Rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Rheumatoid arthritis .....</b>	<b>8</b>
1.1.2. A rheumatoid arthritis kialakulásában szerepet játszó tényezők .....	8
1.1.2.1. Genetikai tényezők.....	8
1.1.2.2. Környezeti tényezők.....	9
<b>1.2. A Patogenezisben érintett tényezők és biomarkerek rheumatoid arthritisben .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Autoantitestek .....	9
1.2.1.1. Reumafaktor.....	9
1.2.1.2. Ciklikus citrullinált protein ellenes autoantitestek .....	10
1.2.1.2.1. Citrullinált fibrinogén ellenes autoantitestek.....	13
1.2.1.2.2. Citrullinált vimentin ellenes autoantitestek .....	14
1.2.1.2.3. Citrullinált II-es típusú kollagén ellenes autoantitestek.....	14
1.2.1.2.4. Citrullinált $\alpha$ -enoláz ellenes autoantitestek .....	15
1.2.1.3. Természetes autoantitestek.....	15
1.2.2. T sejtek.....	16
1.2.2.1. CD4+ T sejtek .....	17
1.2.2.1.1. T <sub>H</sub> 1 sejtek .....	18
1.2.2.1.2. T <sub>H</sub> 17 sejtek .....	19
1.2.2.1.3. T <sub>H</sub> 2 sejtek .....	20
1.2.2.1.4. T <sub>reg</sub> sejtek.....	21
1.2.2.2. CD8+ T sejtek .....	22
1.2.2.3. T sejt homeosztázis RA-ban.....	23
1.2.3. Extracelluláris vezikulák, mint új típusú betegség biomarkerek.....	25
1.2.3.1. Extracelluláris vezikula típusok .....	25
1.2.3.1.1. Exoszómák .....	25
1.2.3.1.2. Mikrovezikulák .....	26
1.2.3.1.3. Apoptotikus testek.....	27
1.2.3.2. Biomarkerként alkalmazott extracelluláris vezikula típusok.....	28
1.2.3.2.1. Endothel eredetű mikrovezikulák (eMV) .....	28
1.2.3.2.2. Vérlemezke eredetű mikrovezikulák ( <i>platelet</i> MV, pMV) .....	29
1.2.3.3. Az extracelluláris vezikulák vizsgálata .....	30
1.2.3.3.1. Az EV vizsgálatának „buktatói” .....	30
1.2.3.3.3. Az EV-k méretének meghatározására alkalmazott módszerek.....	31
1.2.3.3.4. Biológiai mintákból származó extracelluláris vezikula kimutatást befolyásoló preanalitikai tényezők.....	32
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>34</b>
<b>3. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Egértörzsek és immunizációs protokollok .....</b>	<b>35</b>
3.1.1. Felhasznált egértörzsek .....	35
3.1.2. Peptid immunizáció .....	35
3.1.3. Aggregán arthritis indukció .....	35
<b>3.2. Antigének.....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Glikozidázzal emésztett aggregán.....	36
3.2.2. Szintetikus peptidok .....	36
<b>3.3. Humán minták .....</b>	<b>37</b>
3.2.1. A természetes autoantitestek vizsgálatához felhasznált minták .....	37
3.2.2. A mikrovezikulák vizsgálatához felhasznált minták.....	38

<b>3.4. Immunsejtek in vitro vizsgálata .....</b>	<b>39</b>
3.4.1. Proliferációs esszé.....	39
3.4.3. ELISPOT .....	39
3.4.4. Génexpressziós vizsgálatok .....	40
<b>3.5. Antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló vizsgálatok .....</b>	<b>41</b>
3.5.1. ELISA rendszerek .....	41
3.5.1.1. Anti-GAG antitestek kimutatása CovaLink ELISA-val .....	41
3.5.1.2. Össz IgM és IgG szintek meghatározása .....	41
3.5.1.4. Anti-komplement komponens 3 (C3) ELISA.....	42
3.5.1.5. Anti-GAG antitestek kötődése glikozidáz-emésztett aggregánhoz .....	42
3.5.1.6. Anti-CCP antitest-koncentráció meghatározása .....	42
3.5.1.7. Reumafaktor kimutatása.....	42
3.5.1.8. C-reaktív protein (CRP) meghatározása.....	43
3.5.2. Szénhidrát chip.....	43
3.5.3. Immunhisztokémia.....	43
3.5.4. Áramlási citometriás vizsgálatok .....	44
3.5.4.1. Peptid-MHC kötődési vizsgálatok.....	44
3.5.4.2. Immunkomplex és membránvezikula kimutatás .....	44
3.6.2.4. Vezikuláris annexinV kimutatás.....	45
<b>3.6. Az extracelluláris vezikulákkal kapcsolatos egyéb vizsgálatok .....</b>	<b>45</b>
3.6.1. Extracelluláris vezikulák izolálása .....	45
3.6.1.1. Thymus eredetű mikrovezikula és apoptotikus test izoláció .....	45
3.6.1.2. Humán synoviális folyadék és vérplazma eredetű mikrovezikula izolálás .....	46
3.6.2. Az extracelluláris vezikulák vizsgálati módszerei .....	47
3.6.2.1. Mikroszkópos vizsgálatok.....	47
3.6.2.1.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	47
3.6.2.1.2. Immun-elektronmikroszkópia .....	47
3.6.2.1.3. Atomerő mikroszkópia .....	48
3.6.2.1.4. Fluoreszcens mikroszkópia.....	48
3.6.2.2. Dinamikus fényszórás elemzés (DLS) .....	48
3.6.2.3. Az extracelluláris vezikulák és az immunkomplexek elkülönítése .....	49
3.6.2.3.2. Mesterséges immunkomplex előállítása .....	49
3.6.2.3.3. Mikrovezikulák és immunkomplexek detergens lízise .....	50
3.6.2.4. Tömegspektrometriás elemzés .....	50
<b>3.7. Statisztikai elemzés .....</b>	<b>51</b>
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. A glükózaminoglikán-ellenes természetes autoantitestek vizsgálata rheumatoid arthritiben .....</b>	<b>53</b>
4.1.1. GAG-ellenes antitestek kimutatása szérumból .....	53
4.1.2. A synoviális folyadék anti-GAG antitest-koncentrációja .....	54
4.1.3. Anti-GAG antitestszint, mint betegség-aktivitási marker .....	55
4.1.4. A reumafaktor és az anti-GAG antitestek kapcsolata .....	59
4.1.5. Az anti-CCP és az anti-CSC IgM antitestszintek közötti összefüggés.....	59
4.1.6. Anti-GAG antitest keresztreaktivitásának vizsgálata .....	59
4.1.7. Anti-GAG antitest kötődési gátlás anionos gyantával .....	60
4.1.8. Az anti-GAG antitestek kötődése glikozidáz-emésztett humán porc aggregánhoz.....	60
4.1.9. Szérumból és SF antitestek szénhidrát-felismerési mintázatának vizsgálata .....	61
4.1.10. Szénhidrát-specifikus antitestek kötődése a porcmátrixhoz.....	62
<b>4.2. A citrullináció T sejtés antigénfelismerésre gyakorolt hatása .....</b>	<b>63</b>
4.2.1. A különböző helyen citrullinált humán ATE peptidok által kiváltott T sejtés válasz .....	63
4.2.2. Az 5/4E8 T sejtés hybridoma peptidspecifitásának tesztelése .....	65
4.2.2. <i>Padi</i> génexpresszió kimutatása egér thymusban .....	66
4.2.3. A saját (egér) porc aggregán-eredetű peptidokkal szembeni T sejtés válasz .....	66

4.2.5. A P70-84 specifikus TCR-tg egér eredetű lépsejtek proliferatív válasza peptidstimuláció hatására .....	69
4.2.6. A szintetikus peptid MHC-kötődésének vizsgálata .....	70
<b>4.3. MV-k és proteinkomplexek biofizikai paramétereinek vizsgálata .....</b>	<b>71</b>
4.3.1. MV mérettartomány meghatározás .....	71
4.3.2. Immunkomplexek méretének meghatározása .....	72
4.3.3. Immunkomplexek kimutatása áramlási citometriával .....	75
4.3.4. Az IK-k hatása az extracelluláris vezikulák áramlási citometriás mérésére .....	77
4.3.4.1. A kimutatási módszer fejlesztése .....	77
4.3.4.2. IK-k MV felszíni kötődésének vizsgálata .....	78
4.3.4.3. Az immunkomplexek jelenlétének hatása a rutin áramlási citometriás MV fenotípzálásra .....	78
4.3.4.5. Magas IK tartalmú mintákban a MV szám kvantitatív meghatározása .....	81
4.3.5.6. Áramlási citometriás festés során a MV kapun belüli észlelhető álpozitív események .....	82
4.3.4.7. Az MV preparátumokat IK-k szennyezhetik .....	83
<b>4.4. Thymus eredetű Mikrovezikulák tömegspektrometriás elemzése .....</b>	<b>85</b>
4.4.1. Thymus eredetű MV-k és apoptotikus testek együttes izolálása .....	85
4.4.2. A mikrovezikulák és apoptotikus testek fehérjetartalmának meghatározása .....	86
4.4.3. Vezikulákkal asszociált annexinV kimutatása áramlási citometriával .....	87
4.4.5. Vezikuláris fehérjék csoportosítása lokalizáció és funkció szerint .....	88
4.4.6. Mikrovezikuláris fehérjék funkciójának vizsgálata Ingenuity útvonalelemzéssel .....	90
4.4.7. Az általunk azonosított mikrovezikuláris és apoptotikus test fehérjék összevetése az Exocarta adatbázisban található fehérjékkel .....	91
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>92</b>
<b>6. Következtetések .....</b>	<b>103</b>
<b>7. Összefoglalás .....</b>	<b>105</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>106</b>
<b>9. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>107</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>135</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>137</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFM	atomerő mikroszkópia, <i>atomic force microscopy</i>
ACR	<i>American Collage of Rheumatism</i>
ANOVA	variancia-analízis, <i>analysis of variance</i>
AnnV	annexinV
Arg	arginin
ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
BALB/c	proteoglikán indukált arthritisre érzékeny, beltenyésztett albínó egértörzs
BSA	marha szérum albumin, <i>bovine serum albumin</i>
CCP	ciklikus citrullinált peptid
CD	katalogizált sejtfelszíni marker sorszámát bevezető előtag, <i>cluster of differentiation</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
cDNS	komplementer DNS
CEP-1	citrullinált $\alpha$ -enoláz peptid 1
CFA	komplett Freud adjuváns
CIA	kollagén indukált arthritis, <i>collagen-induced arthritis</i>
CRP	C-reaktív protein
CXCL	CXC kemokin ligand
CSA,B,C	kondroitin szulfát A, B, C
DAS28	<i>Disease Activity Score for 28</i> , rheumatoid arthritis jellemzésére alkalmazott klinikai score
DLS	dinamikus fényszórás analízis, <i>dynamic light scatter analysis</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	dezoxiribonukleotid-difoszfát
DDT	ditiotreitól
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eMV	endothel eredetű mikrovezikula, <i>endothelial cell-derived microvesicle</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
EV	extracelluláris vezikula

FcγRII/II	II/III-as típusú Fcγ receptor
FCS	embrionális borjúsavó, <i>fetal calf serum</i>
FITC	fluoreszcein izotiocianát
Foxp3	<i>forkhead box P3</i> transzkripciós faktor
FSC-H	előre irányuló fényszórás, <i>forward scatter</i>
GAG	glükózaminoglikán
GAPDH	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GPI	glükózfoszfát-izomeráz
GPIIb/IIIa	glikoprotein IIb/IIIa
HA	hialuronsav, <i>hyaluronic acid</i>
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HGPRT	hipoxanthin-guanin foszforibozil transzferáz, <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HLA	humán leukocytá antigén
HRP	torma peroxidáz, <i>horse radish peroxidase</i>
HS	heparán szulfát
HSP	hősokk fehérje, <i>heat shock protein</i>
hTRET	humán telomeráz reverz transzkriptáz
IFNγ	interferon gamma
IFNγR	interferon gamma receptor
Ig	immunglobulin
IK	immunkomplex
IL	interleukin
K/BxN	GPI specifikus T sejteket hordozó, spontán arthritis kialakulásával jellemezhető egértörzs
KS	keratán szulfát
LAMP1	lizoszóma asszociált membrán fehérje, <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LF	laktoferrin

LPS	lipopoliszaharid
MBP	mielin bázikus protein
MCV	mutáns citrullinált vimentin
Mek	mitogén-aktivált/extracelluláris szignál-regulált kináz kináz
MHCII	fő hisztokompatibilitási komplex, <i>major histocompatibility complex</i>
MV	mikrovezikula
NOD	nem kövér diabetikus egértörzs, <i>non-obese diabetic mice</i>
OA	osteoarthritis
OD	optikai denzitás
ORFI	Országos Rheumatológiai és Fizioterápiás Intézet
OVA	ovalbumin
PAD <sub>2</sub>	peptidil-arginin deimináz
PAK	p21 aktivált kináz, p21-activated kinase
PBS	foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	polimeráz láncreakció, <i>polymerase chain reaction</i>
PE	fikoeritrin, <i>phycoerythrin</i>
PGIA	proteoglikán indukált arthritis, <i>proteoglycan-induced arthritis</i>
PMSF	fenil-metán-szulfonil-fluorid, <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
pMV	vérlemezke eredetű mikrovezikula, <i>platelet-derived micovesicle</i>
PS	foszfatidil szerin
PTPN22	protein tirozin foszfatáz nonreceptor 22, <i>protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22</i>
RA	rheumatoid arthritis
Raf	szerin/threonin specifikus protein kináz
RF	reumafaktor
RP-HPLC	reverz-fázisú, magas teljesítményű folyadék kromatográfia, <i>reverse-phase high-performance liquid chromatography</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SE	„shared” epitóp
SF	synoviális folyadék, <i>synovial fluid</i>
SKG	ZAP-70 fehérjét kódoló génben mutációt hordozó egértörzs
SPF	patogénmentes, <i>specific pathogen free</i>

SSC-H	oldalirányú szórás, <i>side scatter</i>
STAT4	<i>signal transducer and activator of transcription</i> , transzkripció faktor
TCR	T sejt receptor
TCR-tg	T sejt receptor transzgénikus
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
T <sub>H</sub>	helper T sejt
TI	T sejt independens
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	tumor nekrozis faktor
TRAF1-C5	komplement komponens 5-TNF asszociált faktor 1, <i>complement component 5-TNF receptor-associated factor 1</i>
TREC	T sejt receptor excizíós kör, <i>TCR excision circle</i>
T <sub>reg</sub>	regulátoros T sejt
TS1xHAI	hemagglutininra specifikus TCR-rel rendelkező transzgénikus egértörzs, amelyben spontán arhritis alakul ki
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
UPLC	nagynyomású folyadék kromatográfia, <i>ultra performance liquid chromatography</i>
Zap70	zéta lánc asszociált protein kináz 70, <i>zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

\* A dolgozatban az alábbi helyesírási elveket igyekeztem következetesen érvényesíteni: szövegtani képletek és diagnózisok esetében latinos, egyéb esetben a magyar helyesírást alkalmaztam.



## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1. RHEUMATOID ARTHRITIS**

A rheumatoid arthritis (RA) a felnőtt lakosság körülbelül 1%-át érintő, krónikus ízületi gyulladással járó, szisztémás autoimmun betegség. A klinikai megjelenés és a betegség lefolyása egyénenként igen változó lehet. Kezdeti tünetként mindkét oldalon szimmetrikusan megjelenő ízületi fájdalmak, duzzanat, fokozódó reggeli ízületi merevség jelentkeznek. Jellemző az ízületek és a csontok progresszív radiológiai károsodása, amelyek megfelelő kezelés hiányában ízületi deformitásokhoz és súlyos mozgáskorlátozottsághoz vezetnek. Az ízületeken kívüli érintettség kialakulási valószínűsége (érrendszer, bőr, tüdő) napjainkra a terápiás eljárások fejlődésével nagymértékben csökkent (1). A nőkben háromszor gyakrabban kialakuló betegség multifaktoriális, kialakulása genetikai és környezeti okokra egyaránt visszavezethető.

#### **1.1.2. A rheumatoid arthritis kialakulásában szerepet játszó tényezők**

##### **1.1.2.1. Genetikai tényezők**

Az első adatok, amelyek felhívták a figyelmet az RA részben genetikai meghatározottságára, a testvérpárok, illetve az egy- és kétpetűjű ikrekre irányuló vizsgálatokból származtak. Míg az RA általános előfordulási valószínűsége 1 % körüli, addig testvérpárok esetében az együttes előfordulás esélye 2-4 % közöttinek adódott. Ez a valószínűség kétpetűjű ikrek esetében 3,5 %-ra, egypetűjű ikreknél pedig 12-15 %-ra nőtt (2). Az utóbbi adatokon alapuló, későbbiekben is megerősített tanulmányok alapján az RA genetikai meghatározottsága 60% körüli értékre tehető (2-4).

A legkorábban azonosított, és egyben a legfontosabb genetikai hajlamosító tényezőt a HLA lókuszt jelenti. A HLA-DRB1 azon allélvariánsai, amelyek egy 5 aminosavból álló konzervatív, úgynevezett közös („*shared*”) epitóp (QKRAA, QRRAA, RRRAA) szekvenciát hordoznak, RA-ra hajlamosító allélokként ismertek.

Mára a HLA mellett több mint 30 olyan lókuszt ismert, amelyek különböző alléljai hozzájárulhatnak az RA kialakulási valószínűségének növekedéséhez. Néhány fontosabbat kiemelve ezek közé sorolható a PTPN22, PAD4, TRAF1-C5, STAT4, CD28, CD40 fehérjéket kódoló régió (5).

### 1.1.2.2. Környezeti tényezők

Eddigi ismereteink szerint az RA kialakulásában a legfontosabb környezeti rizikófaktort a dohányzás jelenti. Az összefüggést az úgynevezett szeropozitív (ciklikus citrullinált antitest (anti-CCP pozitív) RA betegek esetében írták le, ahol ez a kapcsolat erősen függött a *shared* epitópot hordozó HLA-DRB-1 allélok jelenlététől (6-8). Annak ellenére, hogy a dohányfüstben számos szövetkárosodást és gyulladást okozó toxikus mutagén jelenlétét igazolták (9), a dohányzásnak a betegség kialakításában játszott pontos szerepe máig nem ismert. A dohányzás RA kialakításában játszott lehetséges szerepét megerősíti, hogy a dohányzó páciensek tüdejében egyaránt emelkedett a citrullinációt végző peptidil-arginin dezimináz (PAD) 2 enzim, illetve a citrullinált fehérjeszint is (10). Az anti-CCP pozitív betegek 60%-ában van jelen IgA izotípusú reumafaktor (RF), amely szintén a mukózális felszínek érintettségére utal (11).

A fertőzések autoimmun betegségekre hajlamosító szerepe évtizedek óta a figyelem középpontjában áll (12, 13). Újabb eredmények szerint az anti-CCP pozitív RA kialakulásában szerepe lehet a periodontitisben szenvedő páciensek szájüregében emelkedett arányban jelen lévő, kórokozó *Porphyromonas gingivalis*-nak. A Gram-negatív baktérium a PAD enzim bakteriális megfelelőjét expresszálja. Az enzim valószínűleg bakteriális és humán fehérjéket egyaránt citrullinálhat (14, 15). Az így létrejövő citrullinált neoepitópok jelenléte más tényezőkkel együtt hozzájárulhat a saját antigénekkal szembeni immuntolerancia megszűnéséhez.

A fent említett két legfontosabb tényezőn kívül az irodalomban felvetődő hipotézisek közé tartozik a levegő szennyezettségének és a szilikát tartalmú anyagoknak a hozzájárulása az RA kialakulásához (16).

## 1.2. A PATOGENEZISBEN ÉRINTETT TÉNYEZŐK ÉS BIOMARKEREK RHEUMATOID ARTHRITISBEN

### 1.2.1. Autoantitestek

#### 1.2.1.1. Reumafaktor

Az RF leggyakrabban az IgM, IgG és IgA immunglobulin osztályba tartozó autoantitest, amely az IgG molekulák Fc régióját ismeri fel (17, 18). Az autoantitestet

leírása Waaler nevéhez fűződik. RA-s betegek szérumában írta le az autoantitestek jelenlétét, agglutináció aktiváló faktor néven (19). Vizsgálata az anti-CCP antitest szintek mérése mellett RA-ban nagymértékben segíti a diagnózis megállapítását.

RA-ra utaló klinikai tünetek megjelenésekor a szerológiai vizsgálatok során elsőként gyakran az IgM és/vagy IgG RF szinteket határozzák meg. A betegek 60-80%-ában kimutatható a plazma RF jelenléte, ugyanakkor az autoantitest nem nevezhető betegség-specifikus markernek. Magas autoantitest titer jelenhet meg más autoimmun kórképek esetében is (pl: Sjögren szindróma), illetve általában alacsonyabb koncentrációban jellemző lehet más reumás tünetekkel járó betegségekben, osteoarthritisben, krónikus fertőzésekben, valamint 10%-os gyakorisággal egészségesegekben is.

A prognosztikus markerként is fontos szerepet betöltő RF autoantitestek termelődése az anti-CCP antitestekkel együtt évekkal előzheti meg a betegség kialakulását (20, 21). Az IgG, IgM, de számos tanulmány szerint elsősorban az IgA RF szintje és a csonterózió között pozitív összefüggés mutatható ki (22).

Az RF labor diagnosztikában betöltött kiemelt jelentősége ellenére az antitest betegség patomechanizmusban betöltött szerepe máig nem teljes egészében feltárt (17). A nem patológiás körülmények között, egészséges állapotban termelődő RF autoantitestekre jellemző a polireaktivitás, az affinitásérés hiánya, IgG Fc régióval szembeni alacsony reaktivitás (23, 24). Ezzel ellentétben az RA-s, gyulladt ízületi synovium B sejtei affinitásérést követően létrejöttek, nagy affinitású RF-t termelnek. Valószínűleg immunkomplexek (IK) formálásával és komplement fragmentumok kötésével járhatnak hozzá a gyulladás kialakulásához és fenntartásához (25, 26).

### **1.2.1.2. Ciklikus citrullinált protein ellenes autoantitestek**

A citrullin az arginin poszttranszlációs modifikációjával létrejövő, nem esszenciális aminosav. A folyamatot a  $\text{Ca}^{2+}$  függő PAD enzim katalizálja, amelynek öt, különböző szöveti expresszióval jellemezhető izoformája ismert (27-29). Ezek közül a PAD2 és a PAD4 jelenlétét írták le az RA-s synoviális membránban (27, 30, 31), a synoviális folyadék (SF) sejteiben (32), és magában a SF-ban (33, 34).

A PAD enzimek számos fiziológiás folyamat katalizálásában töltnek be nélkülözhetetlen szerepet. A bőrben a keratin és filaggrin molekulák citrullinációja teszi lehetővé a keratinocyták terminális differenciációjához szükséges proteolitikus hasítást,

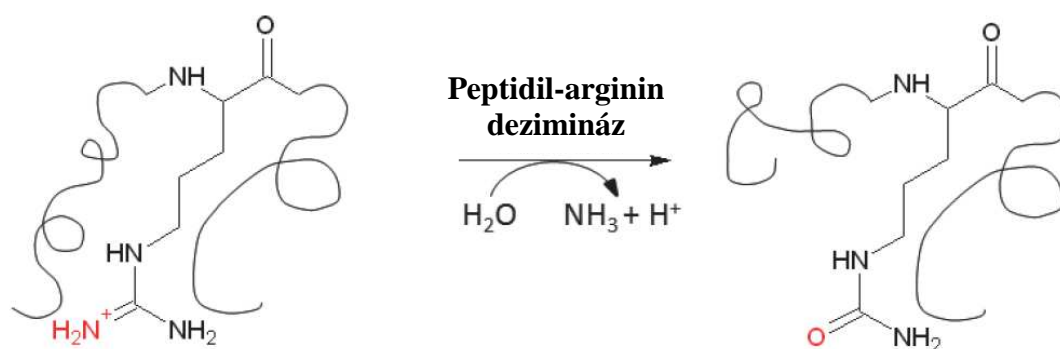
és keresztkötések létrejöttét (35). A szőrtüsző fő szerkezeti fehérjéje, a trichohyalin, és a haj kutikulasejtjeinek érésében érintett fehérje, az S100A3, szintén PAD szubsztrátok (36). A központi idegrendszerben fiziológiás a mielin bázikus proteinek (MBP) citrullinációja, amely a mielinhüvely elektromos szigetelését biztosítja.

A citrullináció gyulladási folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata az utóbbi években egyre intenzívebben folyik. Kísérletesen igazolták, hogy a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) stimulációjának következményeként a CXCL8 (37) és CXCL10 (38) kemokinek citrullinálódnak. A jelenség alapvetően módosítja e kemokin molekulák hatását számos biológiai folyamatban.

Igazolták, hogy a fibrinogén trombinkötő helyén történő citrullináció hatására csökken a trombinfüggő fibrinogén polimerizáció (39, 40). Ez utóbbi fiziológiás szerepe még nem tisztázott, valószínűleg a fibrindepozíció negatív szabályozó folyamatoként, a gyulladási válasz csökkentésében lehet szerepe. Érdekes jelenség, hogy az RA ízületben gyakran kifejezett fibrindepozíció figyelhető meg (41).

RA-ban a citrullináció valószínűleg az egyes proteinek arthritogénitálásának megváltoztatásával járulhat hozzá a betegség kialakulásához és fenntartásához. Az arginintartalmú peptidek gyakran játszanak központi szerepet a fehérjék térszerkezetének kialakításában (42). Az arginin guanidino csoportjának pozitív töltése révén ionos kölcsönhatások, hidrogénhidás szerkezetek, szubsztrátok, kofaktorok megkötése válik lehetővé. Sőt, az arginin, mint a legpolárosabb aminosav, legtöbbször a proteinek felszínén, vagy ahhoz közel, az enzimatiszikus módosításhoz elérhető pozícióban helyezkedik el (42).

Mivel a citrullin semleges töltésű aminosavnak tekinthető, a citrullinációknak köszönhetően csökken a fehérjék össztöltése. Az aminosavcsere az ionos interakciók módosulása következtében a háromdimenziós térszerkezet, végső soron pedig a funkció megváltozásához vezethet. A citrullináció hatására bekövetkező háromdimenziós fehérjeszerkezet változásra példaként említhető a patológiás mértékű MBP citrullináció. A fehérje a módosítás eredményeként az eredetinel „nyitottabb” konformációt vesz fel (43), így hozzáférhetőbbé válik olyan enzimek számára, amelyek az MBP-t hasítani képesek (44). Az így felszínre kerülő, immunrendszer számára is hozzáférhető citrullinált neoepitópok kiindulási lépést jelenthetnek az immuntolerancia áttöréséhez vezető folyamatok elindításában.



**1. ábra: Az arginin citrullinációja során lejátszódó, peptidil-arginin dezimináz által katalizált entimatis folyamat (45)**

A citrullináció az RA pathomechanizmusában betöltött esetleges szerepére vonatkozó vizsgálatok az anti-CCP antitestek azonosításával kezdődtek el. Mivel a RF faktor nem tekinthető betegség-specifikus markernek, további kutatások folytak olyan autoantigén kimutatására, amely jelenléte a betegséghez köthető. Ilyen autoantigénként azonosították a citrullinált proteineket.

Az első citrullinált fehérjék kimutatására alkalmazott teszt az anti-perinukleáris faktor vizsgálat volt. A módszer magas RA-specifitással és változó szenzitivitással bírt. A teszt során a szérum mintákat humán szájnyálkahártya sejtenyészettel együtt inkubálták, majd a mag körüli granuláris struktúrákkal reagáló antitestek jelenlétét indirekt fluoreszcenciával tették láthatóvá (46). Hasonlóképpen mutattak ki anti-keratin antitesteket patkány nyelőcső sejtenyészettel felhasználásával (47). A közelmúltban derült fény arra, hogy mindkét antitest a minták citrullinált filaggrin fehérjéivel reagált (48-50).

A szenzitivitás fokozása érdekében napjainkban kifejlesztett teszt az anti-CCP antitestek kimutatását célozza. Már az első generációs anti-CCP tesztek diagnosztikus szenzitivitása (70%) és specificitása (96%) jóval magasabbnak adódott a korábban alkalmazottakhoz viszonyítva (51). Az első tesztek alapját a citrullinált filaggrinból származó ciklikus szintetikus peptidek jelentették (52). A ma is használatos második generációs anti-CCP teszteknel véletlenszerűen képzett aminosavsorrendű ciklikus citrullinált peptid antigéneket alkalmaznak, amelyeket a lehető legnagyobb szenzibilitás elérését szem előtt tartva választottak. Az így kifejlesztett ELISA rendszert alkalmazva

82%-os érzékenység és 98%-nál magasabb specificitás érhető el (53). Az anti-CCP antitesteknek a korai diagnosztikában igen fontos szerepük van, mivel a klinikai tünetek megjelenése előtt gyakran évekkel pozitívitás mérhető, amely egyben súlyosabb, erózívabb betegségfolyást jelez (20, 54, 55). Az anti-CCP és a korábbi tesztek jól alkalmazhatóaknak bizonyultak a diagnosztikában. Ugyanakkor nem adtak kielégítő választ arra a kérdésre, hogy melyek lehetnek a fő, autoantitestek termelődését is kiváltó, a betegség kialakulásában szerepet játszó, és egyben az ízületben is megtalálható autoantigének (a keratin és a filaggrin nincs jelen az ízületben) (56). Az utóbbi évek kutatási eredményei közé tartozik a következő potenciális autoantigének azonosítása: citrullinált fibrinogén/fibrin, citrullinált vimentin, citrullinált II-es típusú kollagén és citrullinált  $\alpha$ -enoláz. A következőekben a fenti, újonnan azonosított antigéneket mutatom be röviden.

#### **1.2.1.2.1. Citrullinált fibrinogén ellenes autoantitestek**

A fibrin prekursor fehérjéje, a fibrinogén, RA-ban az egyik legjobban jellemzett autoantigén. Citrullinált változata nagy mennyiségben termelődik a gyulladt ízületben (57, 58). A citrullinált fibrinogén ellenes antitestek szenzitivitása RA-ban kissé alacsonyabb (66%), de specificitása az anti-CCP antitestekének megfelelő (59). Számos *in vitro* kísérletet végeztek a fibrinogén immunválaszt kiváltó epitópjainak feltérképezésére. Sebbag és mtsai öt immunodomináns, citrullint tartalmazó B sejt epitópot határoztak meg a fehérjén belül (48). Ezzel szemben egy másik munka során a fibrinogén *in vitro* citrullinációjával az előbbi peptidek közül csak három jelenlétét sikerült kimutatni (27). További vizsgálatokra van szükség annak eldöntésére, hogy a fenti erős immunválaszt indukáló peptidek közül melyek citrullinációja mehet végbe *in vivo* a gyulladt ízületben is.

A citrullinált fibrinogén gyulladásban betöltött szerepének vizsgálatokor fény derült arra, hogy az immobilizált, citrullinált fehérjéket tartalmazó immunkomplexek (IK) Fc $\gamma$ RII-n keresztül monociták TNF $\alpha$ -termelését indukálják (60). Indirekt bizonyítékot találtak arra, hogy a fenti IK-k komplement komponensekkel együtt megtalálhatóak az RA ízületi pannusban is (61). Így valószínűsíthető, hogy a citrullinált fibrinogént tartalmazó IK-k az előbbi receptorokon keresztül közvetített gyulladáshoz citokintermelés kiváltásával járulhatnak hozzá az RA patogenezéséhez (62).

### 1.2.1.2.2. Citrullinált vimentin ellenes autoantitestek

A vimentin a citoskeleton dinamikus szerveződésében szerepet játszó intermedier filamentum fehérje. Részt vesz a sejtorganellumok transzportjában, a sejt migrációban és a sejtsztódási folyamatokban. A citrullinált változatot elsőként placenta és lép sejt lízátumban Sa antigén néven írták le (63). Az RA-s betegek 40%-ában mutatható ki az ellene termelt antitest, és jelenléte egyben súlyosabb betegség lefolyást is valószínűsít (64).

A citrullinált vimentin létrejötte valószínűleg apoptotikus folyamatokhoz köthető. Erre utal, hogy *in vitro*  $Ca^{2+}$  beáramlást (így apoptózist) előidéző ionofórok hatására makrofágokban kimutatták a jelenlétét (32, 65). Bang és mtsai számos, RA szérummal reagáló citrullinált és mutáns vimentin izoformát mutatott ki RA-s betegek synoviális folyadékából (66). Tömegspektrometriás analízissel meghatározták az izoformák közötti különbségeket, amelyet eredményeik szerint elsősorban glicin-arginin mutáció és bizonyos argininek citrullinációja okozott.

A fent bemutatott eredményeken alapul az anti-mutáns citrullinált vimentin teszt (anti-MCV) kidolgozása, amelyhez rekombináns, három ponton mutált (16Gly és 59Gly→Arg, 50Arg→His) citrullinált vimentint alkalmaznak (66). Az anti-CCP2 teszthez viszonyított szenzitivitás tekintetében eltérőek az irodalmi adatok, de mellettük mindenképpen mint alternatív lehetőség vehető figyelembe (67-69).

### 1.2.1.2.3. Citrullinált II-es típusú kollagén ellenes autoantitestek

Az ízületi porc fő makromolekuláris komponensének citrullinált változata ellen irányuló autoantitesteket elsőként korai RA-ban mutattak ki. Az immundomináns, kollagén eredetű citrullinált peptid ellenes autoantitestek a betegek 40%-ában fordulnak elő (70, 71). A páciensekben 15-25%-os gyakorisággal a nem módosított II-es típusú kollagénnel reagáló antitestek is jelen lehetnek (70, 72). Az utóbbi immunglobulinok előfordulását leírták más gyulladásos és autoimmun kórképekben is, így a citrullinált változattal ellentétben nem tekinthetőek betegség-specifikusnak (70, 72, 73).

#### 1.2.1.2.4. Citrullinált $\alpha$ -enoláz ellenes autoantitestek

Az enoláz erősen konzervatív felépítésű, széleskörű szöveti expresszióval jellemezhető homo-, illetve heterodimer fehérje. Három izotípusa ismert:  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -enoláz. A  $\beta$ -enoláz izomszövetben, a  $\gamma$ -enoláz idegszövetben mutatható ki. Ezzel ellentétben az  $\alpha$ -enoláz a szervezet minden sejtjében expresszálódó, multifunkcionális protein (74). Fontos szerepet játszik a glikolízisben, a sejtnövekedés szabályozásában, a hypoxia toleranciában szerepet játszó folyamatokban. Jelen van a sejtek felszínén, ahol a plazminogén aktivációján keresztül hozzájárul a fibrin degradációhoz. Az extracelluláris mátrix átalakításával szerepet játszik a sejt migráció elősegítésében (75). A humán sejtek mellett jelenléte számos baktérium (76-78), gomba (79) és parazita (80, 81) felszínén egyaránt kimutatható.

Az  $\alpha$ -enoláz az RA patomechanizmusában betöltött lehetséges szerepére utal, hogy a betegek synoviális membránjában (45), illetve a sejtmentes SF-ben emelkedett  $\alpha$ -enoláz szint mutatható ki (34). A citrullinált  $\alpha$ -enoláz ellenes autoantitestek jelenléte RA specifikusnak bizonyult (33). Rekombináns, *in vitro* citrullinált  $\alpha$ -enoláz antigént használva a betegek körülbelül 70%-a bizonyult autoantitest pozitívnak (45). A fehérje aminosav-szekvenciájának vizsgálatakor Lundberg és mtsai az aminoterminus közelében azonosítottak egy olyan immundomináns B sejt epitópot, amely két pozícióban is hordozott *in vitro* citrullinálható arginint. Ez a peptid az irodalomban citrullinált  $\alpha$ -enoláz peptid-1 (CEP-1) néven szerepel. Az RA betegek 37%-ában mutattak ki ezzel a szekvenciával reagáló antitesteket (82).

Valószínűsíthető, hogy a citrullináció eredményeként megváltozhat az enoláz monomer konformációja, így a dimer módosult biológiai aktivitással rendelkezhet. A poszttranszlációs módosulás felelős lehet a sejt felszínén megjelenő fehérje megváltozott plazminogénkötő és aktiváló képességéért, hozzájárulva az RA-s ízületben tapasztalt csökkent fibrinolízishez, és fibrin lerakódáshoz (45).

#### 1.2.1.3. Természetes autoantitestek

A szérumban jelenlévő IgM, IgG és IgA molekulák döntő többsége jelen ismereteink szerint B1 B sejtek által termelt természetes autoantitest. A polireaktív, alacsony affinitással jellemezhető immunglobulinok a fertőzésekkel szembeni első védelmi vonalat jelentik (83). Cohen és Young a természetes autoantitesteket olyan



„immunológiai homonculus” rendszerként jellemezték, amelyet a konzervatív, így gyakran mikrobákban is előforduló epitópokkal reagáló antitestek építenek fel (84). A rendszer egészségesekben nagyfokú hasonlóságot mutat, ezért zavarai, illetve változása betegségek korai markereként, vagy pedig prediktoraként használhatók (85, 86).

A szénhidrát-specifikus autoantitestek fontos szerepet játszhatnak az autoimmunitáshoz vezető antigénprezentációs folyamatokban. Példaként említhető az aggrakán arthritis, az RA egyik egérmódelje, amelyben az immunválasz kiváltásához elengedhetetlen lépés a porcalkotó aggrakán molekula kondroitin szulfát (CS) láncainak enzimatisz emésztése. Az így keletkezett CS csonkok erőteljes B sejt aktivációt indukálnak. Az arthritis kialakulásához a szénhidrát-specifikus B sejtek a proteoglikánok prezentálásával járulhatnak hozzá (87).

A különböző betegségekben megfigyelhető természetes autoantitest szintekre vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Polgár és mtsai eredményei szerint az RA és a szeronegatív spondyloarthritis esetén emelkedett a porc kis proteoglikán molekulái, a biglikán és dekorin ellenes SF antitestek szintje. RA esetében kimutatták, hogy a szintén porcalkotó aggrakán molekulával és a biglikánnal reagáló szérum és SF eredetű természetes autoantitest koncentrációk között szoros pozitív összefüggés figyelhető meg. Ez a korreláció feltehetően a közös, mindkét proteoglikán molekulában előforduló glükózaminoglikán (GAG) oldalláncok jelenlétének köszönhető (88).

### **1.2.2. T sejtek**

A T limfociták RA-ban betöltött fontos szerepére elsőként 1975-ben Van Boxel és mtsai hívták fel a figyelmet, amikor kimutatták, hogy a T sejtek a gyulladt RA-s synoviumban nagy mennyiségben vannak jelen (89). A későbbi vizsgálatok ezt az első megfigyelést alátámasztva az RA-s ízületben mind a CD4+, mind pedig CD8+ T sejtek jelenlétét igazolták. Szintén a CD4+ T sejtek szerepére utal, hogy a betegségben a legjelentősebb genetikai rizikófaktort az antigénbemutatásért felelős fehérjét kódoló HLA-B\*08:01 allélok jelentik. Számos kutatási eredmény szól amellett, hogy a gyulladáshoz citokinek, kemokinek és receptoraik, illetve a T sejtek effektor molekulái az RA pathomechanizmusában szintén központi szerepet töltenek be (90).

Az RA állatmodellek számának bővülésével mára olyan kísérleti rendszerek érhetőek el, amelyek nagyban hozzájárulhatnak a betegség kialakulásában és fenntartásában szerepet játszó tényezők feltárásához. Két nagy betegség modellcsoportot különíthetünk el: az indukált és a spontán állatkísérletes modelleket. Az előbbieket esetében az arthritises tünetek megjelenését genetikailag érzékeny állatok alkalmazásával, antigén oltásával idézik elő. A spontán modelleknél a genetikailag módosított egértörzsekben a betegség külső beavatkozás nélkül fejlődik ki. A következőekben a T sejtek betegségben betöltött lehetséges szerepét elsősorban néhány kiemelt, gyakran alkalmazott spontán és indukált modellben leírt eredmény alapján mutatjuk be.

### 1.2.2.1. CD4+ T sejtek

A CD4+ T sejtek meghatározó szerepe az állatkísérletes vizsgálatok alapján is igazolódni látszik. A kollagén indukált arthritis (CIA, *collagen induced arthritis*) olyan autoimmun gyulladással járó egér polyarthritis modell, amely számos jellemzőjében a humán RA-nak megfeleltethető. A modellben a kollagén-specifikus CD4+ T sejtek a betegség kialakításában kulcsfontosságúak (91, 92). Ezt bizonyítja, hogy a kísérletes arthritis megjelenése megelőzhető volt a kísérleti állatok anti-T sejt receptor (TCR) (93), illetve anti-CD4 (94) antitest kezelésével. Az antigén-specifikus CD4+ T sejtek jelenléte a sikeres adoptív transzfer kísérletek feltételének bizonyult (95).

Szintén a T sejtek fontos szerepe mutatható ki a proteoglikán indukált arthritisben (PGIA, *proteoglycan induced arthritis*). Az indukált modellben a genetikailag érzékeny egerekben (BALB/c, C3H) a humán porc aggregátum proteoglikán oltásával váltható ki a krónikus, progresszív polyarthritis tüneteinek megjelenése. A betegség kialakulásakor az antigénspecifikus T és B sejtek jelenléte döntőnek bizonyult. Bármely sejtpopuláció eltávolítása megelőzte az arthritis kialakulását (96).

A spontán modellek közül gyakran alkalmazott K/BxN arthritis modellben a betegség kialakulására érzékeny K/BxN egértörzset a NOD és a glükóz-6-foszfát izomeráz (GPI) fehérje specifikus TCR-transzgenikus egértörzsek (C57B1/6 TCR-tg) keresztezésével hozták létre. A szisztémásan előforduló GPI specifikus T sejtek elősegítik a GPI specifikus B sejtek aktivációját, és autoantitest termelését. A patogén autoantitestek az ízületi felszínhez kötve immun-effektormechanismusok indukálásával idézik elő a gyulladást (97). A patológias folyamatot elindító T sejtek mellett a B sejtek

fontos szerepére utal, hogy a K/BxN egerekben kialakult arthritis az állatok szérumával egészséges egyedekbe átvihető. Ez utóbbi, úgynevezett K/BxN szérumtranszfer modell az előzőekkel ellentétben átmeneti ízületi gyulladással jellemezhető (98).

Szintén spontán arthritis kialakulásával jellemezhető az SKG egértörzs. Az állatok a T sejt jelátvitelben fontos szerepet betöltő ZAP70 fehérjét kódoló gén mutáns variációját hordozzák. Az autoimmunitás kialakulása valószínűleg a mutáció következtében megváltozott thymus T sejt szelekciós küszöb következménye (99). Adoptív transzfer kísérletekben a CD4<sup>+</sup> T sejtek elegendőnek bizonyultak az antitestek jelenléte nélkül is az arthritis indukciójához. Ugyanakkor az SKG egerekben patogén-mentes környezetben nem alakul ki a betegség, utalva a T sejtek szerepe mellett a természetes immunrendszer által biztosított szignálok fontosságára (100). A modellben észlelt spontán autoimmunitás kialakulásának egy lehetséges magyarázata, hogy a csökkent TCR szignalizáció következtében a thymusban nem szelektálódnak ki az autoreaktív klónok. Ugyanakkor a regulátoros T sejt aktivitás, a szignalizációs útvonal működésében bekövetkezett változásnak köszönhetően jelentősen csökkent. Ez pedig az immunválasz szabályozási zavarához vezethet (101).

Az újonnan leírt TS1xHAII egér modellben a spontán arthritis olyan egerekben alakul ki, amelyek hemagglutininra specifikus TCR transzgen mellett MHCII promotor irányítása alatt álló hemagglutinin fehérje génjét hordozzák. A betegség megjelenését ebben az esetben is az antigén specifikus CD4<sup>+</sup> T sejtek aktivációja, és a szisztémás gyulladással citokinek termelődése idézi elő (102).

A fenti modellekben leírt eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a B sejtek mellett a T sejteknek döntő szerepük lehet az arthritis patomechanizmusában. Hasonló következtetés vonható le az alábbiakban bemutatott CD4<sup>+</sup> T sejtek alpopulációinak (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>, T<sub>reg</sub>) vizsgálatokor.

#### **1.2.2.1.1. T<sub>H1</sub> sejtek**

A T<sub>H1</sub> sejteknek a kísérletes arthritis patomechanizmusában betöltött szerepére vonatkozó ismereteink nagy része a CIA és K/BxN egérmodellek vizsgálatából származnak.

CIA-ban a T<sub>H1</sub> sejtek által termelt fő citokin, az IFN $\gamma$  antitesttel történő neutralizációja felgyorsította a betegség lefolyását, hatására a gyulladt ízületekben és a

synoviumban magasabb IL-17 értékek voltak mérhetőek (103). Ezt az eredményt erősíti meg, hogy Frey és mtsai kimutatták, hogy IFN- $\gamma$ R génkiütött egerekben a CIA szintén súlyosabb tünetekkel jelentkezik. Ugyanakkor a fenti tanulmányban leírták, hogy K/BxN arthritisben az IFN- $\gamma$ R hiányos egerekben a betegség lefolyása a CIA modellben leírtakkal ellentétben enyhébbnek bizonyult (104).

Érdekes módon CIA esetében az immunizálást követő 6. napig mutatható ki az IFN $\gamma$  jelenléte a nyirokcsomókban (105). A T<sub>H</sub>1 sejtek túlsúlya a modellben ennek megfelelően szintén csak az arthritis kialakulását megelőzően volt kifejezett (106). További vizsgálatokkal igazolódott, hogy az IFN $\gamma$  hatásának szempontjából fontos figyelembe venni a betegség stádiumát. Korai CIA-ban az IFN $\gamma$  neutralizáció megelőzte a betegség kialakulását, későbbi stádiumban pedig ezzel ellentétben súlyosbította a tüneteket (107). Így feltehető, hogy ebben a modellben elsősorban a betegség kialakításában és a kezdeti szakaszában töltenek be fontos szerepet az IFN $\gamma$  termelésért jelentős részben felelős T<sub>H</sub>1 sejtek (94).

Az IFN $\gamma$ -nak a két egérmodellben betöltött ellentmondásos szerepére magyarázatot jelenthet a spontán fellépő K/BxN arthritisben hiányzó, de CIA esetében alkalmazott, adjuváns immunmoduláló hatása.

Az egérmodelles kísérleti eredmények mellett számos irodalmi adat utal a T<sub>H</sub>1 sejtek fontos szerepére a humán betegségben is. Az RA-s synoviumban az IFN $\gamma$  termelő CD4+ T sejtek jelenlétének kimutatása megerősíti azt a hipotézist, hogy a betegséget döntően T<sub>H</sub>1 citokin túlsúly határozza meg (108-110).

#### **1.2.2.1.2. T<sub>H</sub>17 sejtek**

Az elmúlt évek kutatási eredményei a T<sub>H</sub>1 sejtek mellett a T<sub>H</sub>17 sejtek szerepére hívták fel a figyelmet. Állatkísérletes rendszerben a legtöbb T<sub>H</sub>17 sejtek szerepére vonatkozó irodalmi adat szintén a CIA modell esetében áll rendelkezésünkre. Yamaguchi és mtsai igazolták, hogy a főleg e sejtek által termelt IL-17A mellett a citokincsalád két másik tagjának, az IL-17B és IL-17C-nek is fontos szerepe lehet az arthritis pathomechanizmusában (111).

Az IL-17 fontosságára utaló eredmények közé sorolható az a megfigyelés, hogy a genetikailag IL-17A deficiens egerek esetében a CIA jóval enyhébb tünetekkel jelentkezik (112). Sőt, a betegség kialakulása után közvetlenül alkalmazott IL-17-et

célzó antitestkezeléssel a betegség progresszió és a csonterózió jelentősen csökkenthetőnek bizonyult (113).

Az előbbiekkal ellentétben a genetikailag IL-17 deficiens egerekben a PGIA, mind a klinikai, mind a szövettani paramétereket tekintve, a kontroll állatokéval megegyező súlyosságú formában jelentkezett (114). Ugyanakkor az IFN $\gamma$  deficiens állatokban (melyekben a PGIA késleltetetten jelenik meg), a vad típusú egerekhez viszonyítva tízszeres IL-17 szint emelkedéssel jár a PGIA kialakulása. Mindkét citokinre deficiens egerekben az arthritis jelentősen enyhébb tünetekkel, később alakul ki (115).

A spontán arthritis kialakulásával járó SKG modell esetében Hirota és mtsai szintén kimutatták, hogy az arthritis kialakulása T<sub>H</sub>17 - valamint e populáció fejlődését elősegítő IL-6 citokin függő - módon történik (116).

A humán betegségben a T<sub>H</sub>17 sejtek jelentőségét jelzi, hogy a gyulladt synoviumban jelen lévő IL-17 citokin mennyisége és a betegség súlyossága között pozitív összefüggés mutatható ki. *In vitro* humán kísérletes eredmények igazolták, hogy az IL-17-nek szerepe van az RA synoviocita aktivációs, migrációs és túlélési, apoptózist gátló folyamatainak elősegítésében. Az IL-17 betegség kialakulásában betöltött szerepének feltárása lehetővé tette olyan új, az IL-17A citokint célzó, gátló hatású terápiás monoklonális antitestek kifejlesztését, amelyek klinikai vizsgálata jelenleg fázis I és II szinten zajlik (117).

#### 1.2.2.1.3. T<sub>H</sub>2 sejtek

A T<sub>H</sub>2 válaszban alapvető szerepet játszó IL-4-et kiemelve elmondhatjuk, hogy a citokint elsősorban aktivált T sejtek, hízósejtek, NKT sejtek, eozinofil és bazofil granulociták termelik. Ez a T<sub>H</sub>2 sejtek differenciációjában fontos szerepet játszó citokin gátolja az IFN $\gamma$  termelődést és a T<sub>H</sub>1 választ, illetve elősegíti a B sejtek IgG és IgE izotípus váltását.

Érdekes módon, az állatkísérletes modelleket tekintve, a genetikai háttérüknek köszönhetően elsősorban T<sub>H</sub>2 citokin profillal jellemezhető egértörzsekben (pl: BALB/c), a kísérletes arthritis sokkal súlyosabb tünetekkel jelentkezik, mint a T<sub>H</sub>1 citokin profillal jellemezhető állatokban. Ugyanakkor az IL-4 szerepének vizsgálatát célzó kísérleti eredmények ellentmondásosnak bizonyultak.

CIA-ban az IL-4 gátló hatását számos irodalmi adat támasztja alá (94, 103, 118). A betegség stádiumát is figyelembe vevő kísérletekben az egerek IL-4 kezelése a betegség kialakulását megelőzően a tünetek megjelenésének késleltetésével, a betegség kialakulását követően pedig a tünetek enyhülésével járt (119, 120). Ugyanakkor más szerzők a betegség súlyosságának csökkentésében az IL-4 kezelést nem találták hatásosnak (121).

PGIA-ban az IL-4 citokin kezelés hatására hasonlóan a CIA modellhez a tünetek enyhülése volt megfigyelhető (122). Ezzel ellentétben a spontán K/BxN arthritis modellben leírták, hogy a CD4<sup>+</sup>T sejtek által termelt IL-4 a betegség kialakításában tölt be fontos szerepet (123).

Az RA betegek SF és szérum IFN $\gamma$  és IL-4 koncentrációinak vizsgálatakor a T<sub>H</sub>2 citokinekkal (IL-4) szemben egyértelműen a T<sub>H</sub>1 citokinek (IFN $\gamma$ ) dominanciája jellemző. Sőt, a T<sub>H</sub>2 citokin dominanciát elősegítő állapotokban (pl. terhesség), az RA-s tünetek egyértelmű javuló tendenciát mutatnak (124, 125). Ennek ellenére a T<sub>H</sub>2 válasz RA-ban betöltött pontos szerepének további vizsgálatát indokoltá teszi, hogy a betegség korai stádiumát tekintve, meglepő módon, az IFN $\gamma$  hiánya mellett IL-4 és IL-13, tehát a T<sub>H</sub>2 sejt válasza dominanciája mutatható ki (90). Összegzésképpen elmondható, hogy mind a humán kórképben, mind pedig az állatkísérletes modellekben az IL-4 patomechanizmusban betöltött pontos szerepének meghatározása további vizsgálatokat igényel.

#### **1.2.2.1.4. T<sub>reg</sub> sejtek**

A regulátoros T (T<sub>reg</sub>) sejtek a T<sub>H</sub>17 sejtekhez hasonlóan a T sejtek közelmúltban azonosított típusát képviselik. A T<sub>reg</sub> sejtek betegségszabályozó szerepét számos állatkísérletes modellben igazolták.

CIA modellben a T<sub>reg</sub> sejtek kimutathatóak az SF-ben és a nyirokcsomókban is (126, 127). Az arthritises állatok T<sub>reg</sub> sejtjei a kontrollhoz viszonyítva csökkent effektor T sejt szupressziós aktivitással rendelkeztek (126). A T<sub>reg</sub> sejtek adoptív transzferével az arthritises egerekben késleltethetőnek bizonyult a kollagén specifikus T és B sejtek megjelenése, valamint a betegség kialakulása (127). Kelchtermair és mtsai munkája szerint az IFN $\gamma$ R deficiens egerekben a CIA súlyosabb megjelenése részben a receptor

által közvetített folyamatok érintettsége miatt károsodott  $T_{reg}$  szuppressziós aktivitásnak tulajdonítható (128).

A spontán arthritisszel járó modellek közül az SKG modellben leírták, hogy  $T_{reg}$  sejtek száma és aktivitása is csökkent ebben az egértörzsben (101).

A NOD-Foxp3<sup>sf</sup> egerekben a *Foxp3* gén mutációja eredményeként szisztémás autoimmun betegség alakul ki (129). Ha a K/BxN modellben az arthritis kiváltására érzékeny egértörzs létrehozásakor keresztezési partnerként *Foxp3* deficiens (NOD) egereket alkalmazunk, olyan rendszert kapunk, ahol a  $T_{reg}$  sejtek hiányának köszönhetően az eredeti modellhez képest jóval súlyosabb arthritis alakul ki (130). Monte és munkatársai kimutatták, hogy az arthritises egerekből izolált  $T_{reg}$  sejtek az egészséges egerekből izolált anergiás  $T_{reg}$  sejtekkel ellentétben képesek ugyan proliferálni, de az apoptózisra jóval fogékonyabbak (131).

A  $T_{reg}$  sejtek szerepét a humán autoimmunitás kialakulásának megelőzésében is számos irodalmi adat erősíti meg. A betegség kialakulásához, fenntartásához hozzájárul a  $T_{reg}$  sejtek funkcionális deficienciája. Ehrenstein és mtsai RA páciensek  $CD4+CD25+T_{reg}$  sejtjeit vizsgálva a gátló funkció sérülését mutatták ki. A páciensekből származó sejtek a kontroll sejtekkel ellentétben nem tudták befolyásolni az anti-CD3 antitesttel, illetve LPS-sel stimulált T sejtek és makrofágok gyulladáshoz szükséges citokin termelését (132). A  $T_{reg}$  sejtek differenciálódásához nélkülözhetetlen Foxp3 transzkripciós faktor hiánya esetében súlyos szisztémás autoimmun betegség kialakulását írták le mind az emberben, mind pedig az állatkísérletes modellekben (133).

#### 1.2.2.2. CD8+ T sejtek

A  $CD4+$  T sejtekkel összevetve a  $CD8+$  T sejtek szerepéről mind az RA állatkísérletes modelljeiben, mind pedig a humán betegségben jóval kevesebbet tudunk. Az RA modellekben az irodalmi adatok egyaránt beszámolnak az arthritis kialakulását elősegítő és gátló funkciójukról.

$CD8+$  T sejt deficiens egerekben előidézett CIA-ben a sejtek hiánya nem okozott változást a betegség lefolyásában (134). Egy másik munka szerint a citotoxikus T sejtek eliminációja abban az esetben volt hatással a betegség kialakulására, ha a  $CD8+$  sejteket az előimmunizáló kollagén oltást követő második héten távolították el. Ekkor az

arthritis kialakulási valószínűsége csökkent, ugyanakkor a betegség súlyosságában nem történt változás (135).

PGIA-ban a CD8+ T sejtek eliminációját követően az adoptív transzfer kísérlet sugárkezelt egerekben nem volt sikeres (96), amely a T sejt populáció betegség kialakításában betöltött fontos szerepét jelzi. Ugyanakkor ennek ellentmondó eredmény, hogy az immunizált állatokban a CD8+ T sejtek eliminációja az arthritis súlyosbodásával járt (136).

Az RA-s SF-ben kimutatható a CD8+ limfociták jelenléte. Kang és mtsai eredményei szerint a CD8+ T sejtek az RA-s synoviumban kialakuló csíráközpontok funkcionális és strukturális egységének fenntartásával járulhatnak hozzá a betegség pathomechanizmusához (137), így szerepük pontosabb vizsgálata fontos részét képezheti a későbbi kutatásoknak.

### **1.2.2.3. T sejt homeosztázis RA-ban**

A RA pathomechanizmusának feltárását célzó kutatások sokáig elsősorban a gyulladt ízületben megtalálható, betegség-specifikus saját antigén azonosítására összpontosítottak, amellyel szemben megszűnő tolerancia a betegség kialakulását eredményezheti. Ugyanakkor az eddigi eredmények alapján körvonalazódni látszik, hogy az RA-t nem sorolhatjuk a klasszikus, szervspecifikus autoimmun betegségek közé. Minden stádiumát tekintve szisztémásnak tekinthető. A diagnosztikában alkalmazott, a betegség kialakulása előtt akár egy évtizeddel korábban kimutatható RF és az anti-CCP autoantitestek sem specifikusan csak ízületben megtalálható antigénekként reagálnak.

Az utóbbi évtizedben egyre több vizsgálati eredmény utal arra, hogy az RA-s betegek nem csupán egy adott saját antigénnel szemben adnak kóros választ, hanem ennél sokkal általánosabb immunrendszeri defektussal rendelkezhetnek. Az RA-s betegek biológiai életkora egyes jellemzők szerint érdekes módon akár 20 évvel meghaladhatja a valóságos életkort (138).

Az RA-ban megfigyelhető T sejt jellemzők közé tartozik az életkornak nem megfelelő mértékű hematopoetikus őssejtszám csökkenés, illetve a hematopoetikus és T sejt telomérainak nagymértékű rövidülése (139). Koetz és mtsai kimutatták, hogy RA-s páciensekben a periférián csökkent az úgynevezett „T sejt excizíós körrel” (TREC, T



*cell excision circle*) rendelkező T sejtek száma (140). A TREC a TCR átrendeződési folyamatok során keletkező DNS fragmentum, amely a sejt osztódásával nem replikálódik (141, 142). A csökkent TREC+ T sejtek aránya olyan perifériás T sejt veszteségre utalhat, amelyet a thymus működése nem tud kompenzálni (143). Ennek következményeként jelentkezhet a homeosztatiszikus proliferáció növekedése (144).

A kromoszóma végeket védő teloméra szekvencia rövidülését a replikáció során a limfocitákban, a hematopoetikus sejtekben és spermiumokban a telomeráz enzim kompenzálja. Fujii és mtsai szerint a telomeráz aktivitás az enzim katalitikus alegységét kódoló humán telomeráz reverz transzkriptáz (hTRET) gén transzkripció gátlásának köszönhetően az RA T sejtek esetében csökkent. Ez a kísérleti eredmény magyarázatot jelenthet a rendellenes T sejt teloméra hosszúságra (145). Ugyanebben a tanulmányban kimutatták, hogy a csökkent telomeráz aktivitás a teloméra régiótól független módon növelte a proliferáló T sejtek apoptózis-érzékenységet. Az RA-s beteg eredetű T sejtek megnövekedett apoptózishajlamához az előbbieket mellett hozzájárul több DNS javításban érintett enzim expressziójának csökkenése (146).

A fentiek alapján számos kísérleti eredmény utal az RA-s páciensek T sejt homeosztázis defektusára. Mindezek ellenére nem tisztázott, hogyan okozhatnak ezek a rendellenességek autoimmunitást. A betegség kialakulásának magyarázatára három különböző mechanizmus is elképzelhető:

1. A fokozott T sejt apoptózis következtében megnövekedett homeosztatiszikus proliferáció olyan T sejtek túlélését segítheti elő a periférián, melyek affinitása nagyobb a saját antigénekkal szemben. Ez a hipotézis magyarázatul szolgálhat arra a jelenségre, hogy az RA-ban megjelenő autoantitestek gyakran ubikviter autoantigénekre specifikusak (138, 147).
2. A megnövekedett homeosztatiszikus proliferáció elősegítheti az effektor T sejt differenciációt. Az ilyen sejtek gyakran CD28 negatívak, és olyan szabályozó molekulákkal rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik, hogy a sejtek ne csak a professzionális antigén prezentáló sejtektől kapják a kostimulációs szignált a gyulladt szövetekben (148-151).
3. Singh és mtsai RA-s pácienseknél a T sejt aktivációs küszöb szabályozásában fontos szerepet játszó Raf-Mek-ERK jelátviteli útvonal megváltozott működését írták le (152). Az útvonalhoz kötött megnövekedett válaszképesség citokin

kezelés hatására normál T sejtek esetén is kiválthatónak bizonyult. Az útvonal működésében bekövetkezett változás eredményeként az RA-s T sejtek aktivációs küszöbének csökkenését mutatták ki (152).

Az RA-s pácienseknél igen valószínű, hogy a fent felsorolt mechanizmusok együttesen lehetnek jelen, és válthatják ki az immuntolerancia bizonyos antigénekkal szembeni megszűnését, végső soron pedig a betegség kialakulását.

### **1.2.3. Extracelluláris vezikulák, mint új típusú betegség biomarkerek**

#### **1.2.3.1. Extracelluláris vezikula típusok**

Az extracelluláris vezikulák (EV) az extracelluláris tér evolúciósan konzervált módon keletkező komponensei, amelyek a sejtekből nyugalmi állapotban, aktiváció illetve apoptózis során szabadulnak fel. A fenti, sejtek közötti kommunikációban fontos szerepet betöltő képleteket kettős foszfolipid membrán határolja. Az EV kutatás napjaink egyik legforrongóbb orvosi biológiai kutatási területe. A téma újszerűsége miatt egységes terminológia napjainkban van kialakulóban. A következőekben a vezikulatípusok bemutatásakor néhány kisebb változtatással a Thery és mtsai által bevezetett nevezéktant alkalmaztuk (153). Biokémiai sajátosságai és a keletkezési mechanizmusuk alapján az utóbbi évek vizsgálatai nyomán számos EV csoportot különböztethetünk meg (153). Az alábbiakban a három legismertebb EV típust mutatjuk be részletesen.

##### **1.2.3.1.1. Exoszómák**

- Az exoszómák, mint ektoenzim aktivitással rendelkező vezikulák leírása Trams és mtsai nevéhez fűződik (154).
- A foszfolipid membránnal körülvett képletek átmérője 50-100nm közötti, így a vírusok mérettartományával összevethető.
- A sejtekből folyamatosan és/vagy indukció során (153), a multivezikuláris testek sejtmembránnal történő összeolvadása révén szabadulnak fel (155).
- A legtöbb irodalmi adat az immun- (T sejt, B sejt, makrofág) és tumorsejt eredetű exoszómák funkcióival kapcsolatban áll rendelkezésre.
- Az exoszómáknak szerepet játszanak az onkogén receptorok (156), HIV partikulák horizontális transzferében (157), antigénbemutatásban (153, 158),

immunstimulációs és gátló folyamatokban (153) , valamint a mRNS és miRNS molekulák transzferében (159).

- A külső membránrétegben foszfatidil-szerin (PS) mutatható ki (160). Exoszóma markereknek tekinthetők a CD63, CD81, CD9, LAMP1 és TSG101 molekulák (161, 162).
- Az izolálási és detektálási technikái közé tartozik a szukróz grádiens ultracentrifugálás (163), transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), Western blot és a tömegspektrometria.

#### 1.2.3.1.2. Mikrovezikulák

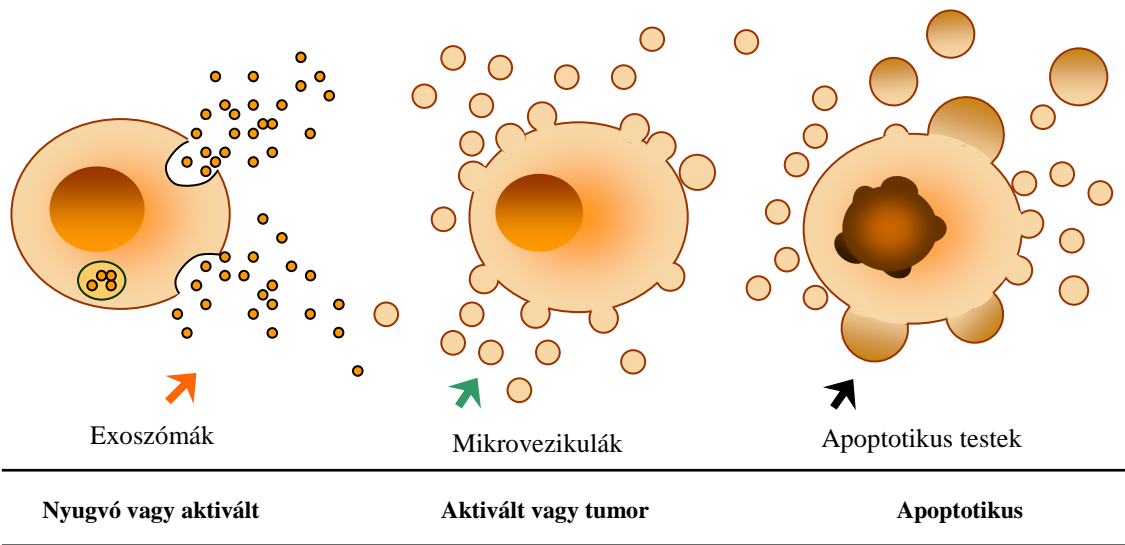
- A mikrovezikulákat (MV) elsőként Chargaff és West említi 1946-ban, mint a vérlemezkementes plazmából származó, kiülepíthető, trombinképző faktort (164).
- A MV-k foszfolipid membránnal körülvett, 100-1000nm átmérőjű struktúrák (153). Vérplazmában, saját eredményeink szerint 100-400nm körüli átmérővel jellemezhetőek. A mérettartományuk átfed az IK-kéval és a baktériumokéval (165).
- A plazmamembrán kitüremkedésével szabadulnak fel a sejtekből.
- A sejtek nyugalmi állapotában általában kismértékű a MV felszabadulás (166), míg a tumorsejtek esetében jelentős lehet (167).
- A MV-felszabadulás intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációemelkedéssel járó sejt felszíni receptoraktiváció, illetve apoptózis következménye (168, 169).
- Nagy mennyiségben termelnek MV-t a vérlemezkék, a vörösvértestek és az endothel sejtek (az irodalmi adatok többsége is ezekre vonatkozik.).
- MV-k által közvetített folyamatok tartozik:
  - a véralvadás elősegítése (170)
  - az IL-1 $\beta$  szekréció (171)
  - a tumoros transzformáció, a tumorok terjedésének elősegítése, illetve szerepük lehet az RA pathogenezisében (172-174)
  - az anya és magzat közti kommunikáció elősegítése (175)

- PS található a külső membránrétegben, de néhány tanulmányban leírtak olyan MV-eket, amelyek esetében a PS nem helyeződött át a külső membránrétegbe (176).
- Az izolációs és analitikai módszerei közé tartozik a differenciál-centrifugálás (177), az áramlási citometria, és az antigén-antitest kapcsolódáson alapuló módszerek (178).

#### **1.2.3.1.3. Apoptotikus testek**

- Az apoptotikus test elnevezés Kerr nevéhez fűződik (1972) (179). Az apoptózis kutatásában mérföldkönek tekinthető Robert Horvitz és mtsai munkája, amelyben a Nematoda *Caenorhabditis elegans* sejtjeinek leszármazási sorát vizsgálták (180, 181).
- Az apoptotikus testek 1 és 5  $\mu\text{m}$  közötti átmérőjűek. Ez nagyjából megfelel a vérlemezkék mérettartományának (182).
- Apoptózis során, membrán lefűződéssel keletkeznek
- PS externalizáció és a vezikulákon belül fragmentált DNS jelenléte jellemző (183)
- Funkciói:
  - horizontális DNS (184) és onkogén transzfer (185)
  - makrofágokon keresztüli T sejtjes epitópprezentáció elősegítése (186)
  - B sejtjes autoantigén-prezentáció (187)
  - immunszuppresszív hatás kiváltása (apoptotikus test bekebelezésén keresztül) (188)
- Az apoptotikus testek, az apoptózis hatásának tanulmányozására az irodalomban legtöbbször apoptotikus és más sejtek kokultúráit említik.

## EXTRACELLULÁRIS TÉR



**2. ábra:** A három fő EV típus, az exoszómák, MV-k és az apoptotikus testek keletkezési mechanizmusa. Az exoszómák nyugvó, vagy aktivált sejtekből a multivezikuláris test sejtmembránnal való összeolvadásával szabadulnak fel. A MV-eket és az apoptotikus testeket a plazmamembrán kitüremkedésével, aktivált, tumor, illetve apoptotikus sejtek bocsáthatják ki.

### 1.2.3.2. Biomarkerként alkalmazott extracelluláris vezikula típusok

Mivel a biológiai folyadékokban a folyamatosan termelődő EV-k kimutathatóak, érdekes kérdés a jövőbeli diagnosztikus, illetve prognosztikus felhasználásuk. A vérplazma és/vagy a vizelet eredetű exoszómák esetében leírták, hogy vizsgálatukkal tumor jelenlétére lehet következtetni (189, 190). A nagyobb, így az exoszómáknál könnyebben detektálható MV-k szintén számos ilyen irányú kutatás alapját képezik. Kiemelhető a vérben legnagyobb mennyiségben kimutatható, így legintenzívebben vizsgált két EV típus, az endothel és a vérlemezke eredetű MV-k jelentősége.

#### 1.2.3.2.1. Endothel eredetű mikrovezikulák (eMV)

Az endothel sejtekből felszabadulhatnak exoszómák, MV-k és apoptotikus testek egyaránt (162). Az eMV-k *in vitro* képződése lipopoliszaharid (LPS), citokin, reaktív oxigén gyökkel történő stimuláció hatására következett be (162). Áramlási citometriával

eMV markereket (CD54, CD62E, CD62P, CD31, CS106, CD105, CD144, CD146) alkalmazva szintjük meghatározható a humán vérben (162). Kísérletesen igazolták, hogy az eMV-k a gyulladás, az endotheliális funkciózavarok, sérülések fontos markerei (191-193).

#### **1.2.3.2.2. Vérlemezke eredetű mikrovetikulák (*platelet MV, pMV*)**

A vérplazmában keringő EV-k túlnyomó többsége pMV. Ezek a vezikulák elsősorban vérlemezke aktiváció során szabadulnak fel, de a legfrissebb kutatási eredmények szerint nagy részük inkább megakaryocita eredetű lehet (194). *In vitro* körülmények között a vérlemezkékből kollagén, trombin, illetve ADP hatására szabadulnak fel pMV-k. Áramlási citometriával CD41, CD42, CD61 és CD62 felszíni markerek alapján azonosíthatóak. Számos betegség esetében (szív-érrendszeri és autoimmun betegségekben) emelkedett pMV szint mutatható ki a szervezetben (183). A pMV-k foszfatidil-szerinen kívül szöveti fakort is expresszálnak a felszínükön. Az ezáltal magas trombinképző potenciállal rendelkező vezikuláris struktúrák ilyen módon is hozzájárulhatnak a szív-érrendszeri betegségek kialakulásához. RA esetében nemcsak a vérplazma pMV-k, hanem az SF-ből származó vezikulák szintje is emelkedett (172). Ez utóbbi EV-k IL-1 tartalmuk révén az RA pathomechanizmusában központi szerepet játszó synoviális fibroblasztokat aktiválni képesek.

A pMV-k felszínén számos olyan molekula megtalálható, amelyek elősegítetik a vezikulák endothel sejtekhez, leukocitákhoz és mátrixmolekulákhoz kötődését (195). Az így kötődő vezikulák GPIIb/IIIa molekulákat tudnak más sejteknek, köztük a neutrophil granulocytáknak átadni, hozzájárulva a sejtaktivációs folyamatok kiváltásához (196).

Betegség	Vezikula típus	EV rendszer változása a betegség hatására
SLE	pMV és eMV	Vérplazmában emelkedett pMV és eMV szint
APS	pMV és eMV	Vérplazmában emelkedett pMV és eMV szint
RA	pMV	Vérplazmában emelkedett pMV és AnnV+ MV szint. Synovialis folyadékban pMV szint
Szisztémás sklerosis	pMV, eMV	Vérplazmában emelkedett pMV és eMV szint
Vasculitis	pMV, eMV	Akut vasculitisben emelkedett pMV szint Szisztémás vasculitisben emelkedett pMV és eMV szintek
1-es típusú diabetes	pMV, eMV	Emelkedett eMV és pMV szintek Megnövekedett MV prokoagulációs aktivitás
SM	pMV, eMV	Emelkedett pMV és eMV szintek az aktív betegség fázisok alatt

**1. táblázat: Endothel és vérlemezke eredetű MV-k szerepe az autoimmun betegségekben (197)** A táblázatban alkalmazott rövidítések: SLE: szisztémás lupus erythematosus, APS: antifoszfolipid-szindróma, RA: rheumatoid arthritis, SM: sclerosis multiplex, pMV: vérlemezke mikrovezikulák, eMV: endothel eredetű mikrovezikulák

### 1.2.3.3. Az extracelluláris vezikulák vizsgálata

Az EV vizsgálata az alkalmazott módszertől függően történhet biológiai folyadékokból, sejtfelülűszóból, illetve vezikulapreparátumból.

#### 1.2.3.3.1. Az EV vizsgálatának „buktatói”

A vezikulapreparátumok készítése ultracentrifugálással valósítható meg. Az exoszómák esetében széles körben elfogadott módszer a szukrózgrádiens

ultracentrifugálás alkalmazása (163). Ugyanakkor az MV és az apoptotikus test preparátumok készítésénél nem áll rendelkezésünkre standard protokoll. Az irodalomban MV-ket tartalmazó üledéket leggyakrabban 18 000g 30 perces előcentrifugálási lépés után 100 000g 60 perces ultracentrifugálással állítják elő (198). Az apoptotikus testek esetében az ilyen témájú közlemények hiányoznak.

Az egyes vezikulapopulációk egymástól való elkülönítését nehezíti a különböző típusú vezikulák méretbeli átfedése. Exoszóma-specifikus markerekkel affinitásizolált vezikulák átmérője 100nm-nél kisebbnek bizonyult. A MV-ket tekintve az eddigi eredmények alapján viszont a 100nm-es határt ( $MV > 100\text{nm}$ ) kellő körültekintéssel kell értelmeznünk (199). Booth és mtsai munkájukban leírták, hogy a sejt plazmamembránjából 100nm és annál kisebb átmérőjű vezikulák is lefűződhetnek (200).

AZ EV izolálás kapcsán nem hagyható figyelmen kívül az alábbi néhány tényező:

- A differenciál-centrifugálási lépések alkalmazása (sejt és vérlemezke mentesítés) során a célpopulációba tartozó vezikulák számában is jelentős csökkenés következhet be (201).
- A minták vérlemezke-mentesítésére alkalmazott centrifugálási időt és fordulatszámot tekintve nem létezik konszenzus protokoll, így az irodalomban közölt adatok az eltérő metodikának köszönhetően nehezen összevethetőek.
- A vérlemezkek teljes eltávolítására 800nm-es filter alkalmazása ajánlott. Ugyanakkor a szűrési folyamat során a vezikulák fragmentálódhatnak, így a gravitációs szűrés javasolható (202).
- Differenciálcentrifugálással a populációk teljes elkülönítése a vezikulák átfedő mérettartománya miatt valószínűleg nem lehetséges. Ez alól kivételt képez a szukrózgrádiens ultracentrifugálással kiegészített exoszóma izolálási protokoll.

#### **1.2.3.3.3. Az EV-k méretének meghatározására alkalmazott módszerek**

Az EV-k méretének meghatározására számos módszer áll rendelkezésünkre, bár a vezikulák kis méretének köszönhetően többségük csak bizonyos korlátokkal alkalmazható.

Az áramlási citometria a legelterjedtebb, széleskörűen elérhető módszer. Komoly hátránya viszont, hogy csak 200nm-nél nagyobb átmérőjű struktúrák detektálására alkalmas (160). Az ennél kisebb struktúrákat a mérési háttérzajtól nem lehet



biztonsággal elkülöníteni. Számos korábbi tanulmányban a MV számot e tény figyelembe vétele nélkül hozták összefüggésbe egyes betegségekkel. Napjainkban az áramlási citometriás mérések standardizációjára való törekvés figyelhető meg, amely a jövőbeli diagnosztikus alkalmazás előfeltétele (203, 204). A diagnosztikus célú felhasználás tekintetében legintenzívebben vizsgált MV-k azonosítására korábban a vezikulák külső membránjában található PS-hez kötődő annexinV (AnnV) szolgált. Napjainkra azonban fény derült arra, hogy a vérben keringő vérlemezke eredetű vezikulák akár 80%-a is AnnV negatív lehet (176). Alternatív lehetőséget jelent a vezikuláknak PKH67 fluoreszcens, membránba beépülő festékkel való jelölése (205).

Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) használatával már a kisebb méretű vezikulatípusok is vizsgálhatóak. A TEM tanulmányokhoz a vezikulát tartalmazó folyadékok koncentrációja, fixálása, dehidratálása szükséges, amely folyamatok befolyásolhatják a vezikulák méretbeli eloszlását és morfológiáját. Példaként említhető, hogy a közelmúltban, a cryo-EM (fagyasztással fixáló) technika alkalmazásának elterjedésével kiderült, hogy az exoszómáknak tulajdonított jellegzetes „csésze-alak” csupán a fixálási folyamatokkal összefüggő melléktermékeknek tekinthető (163).

Atomerő mikroszkópiás (AFM) technikával a szilárd felszínhez kötött vezikulák 3D szerkezete rekonstruálható. Az AFM mérések során az EV-k magassága (z érték) érdekes módon jóval alacsonyabbnak mutatkozik a másik két térbeli kiterjedést jellemző paraméterhez (x, y) képest (177). Yuana és mtsai által felállított hipotézis szerint ez a membránvezikulák állandó térfogatának következménye. Nem zárható ki azonban az a lehetőség sem, hogy mérés során a struktúrák „letapogatására” használt AFM hegy deformálja a vezikulákat (165).

Az EV méretmeghatározásra alternatív módszert jelent az előbbieket mellett a dinamikus fényszórás mérés, valamint a fluoreszcens *Nanoparticle tracking analysis* (NTA) módszer. Az utóbbi polidiszperz rendszerekben is igen jól alkalmazható (206).

#### **1.2.3.3.4. Biológiai mintákból származó extracelluláris vezikula kimutatást befolyásoló preanalitikai tényezők**

A mintákban kimutatható MV számot számos preanalitikai tényező befolyásolhatja. A sejtek, különösen a vérlemezkék a különféle környezeti hatásokra igen érzékenyek, vezikula kibocsátással reagálhatnak, módosítva a minták eredeti MV számát.

Kimutatták, hogy mechanikai stressznek kitett vérlemezkék vezikulákat bocsátanak ki (201, 207). Vérlemezkéket tartalmazó plazmában mérhető MV szám a különböző tárolási idővel és hőmérséklettel, a hígításra használt puffer fajtájától függően változott (201). A fentiekből következően az MV szám diagnosztikus alkalmazásának előfeltétele a vizsgálat precíz standardizációja, kezdve a vérvételtől egészen az adatfeldolgozásig.

Az exoszómaszám preanalitikai tényezőktől függő alakulásáról jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre. Vizelet eredetű exoszómák vizsgálatakor írták le, hogy jelentős vezikulavesztéshez vezet a membránvezikulák Tamm-Horsfall proteinkomplexhez kötődése (208). Számos gazdaszervezetből származó fehérje kimutatható a virionok felszínén is (pl: MHCII), amely a szintén MHCII-t expresszáló, a vírusok mérettartományába eső exoszómák vizsgálatát nehezíti (209).

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

A doktori dolgozat célkitűzése az autoantitestek, T sejtek és EV-k, mint RA biomarkerek és patogenezisben érintett tényezők szerepének vizsgálata volt.

### **1. Természetes, glükózaminoglikán (GAG)-ellenes autoantitestek vizsgálata**

- 1.1. RA-ban betegségmarkerként alkalmazható GAG-ellenes autoantitestek azonosítása.
- 1.2. Az anti-GAG antitestek keresztreaktivitásának vizsgálata
- 1.3. RA-specifikus autoantitestek szénhidrát-felismerési mintázatának meghatározása.

### **2. A T sejtés antigénfelismerés vizsgálata BALB/c egérben**

- 2.1. Az immunodomináns proteoglikán T sejt epitóp (P70-84) citrullinációjának T sejtés válaszra kifejtett hatásának elemzése.
- 2.2. A citrullinációért felelős PAD enzimek génexpressziójának kimutatása a thymusban.
- 2.3. Epitópspecifikus T sejt receptor transzgénikus egerek peptidspecifikus poliklonális válaszának detektálása.

### **3. Az extracelluláris vezikulák vizsgálata**

- 3.1. A mikrovezikulák (MV) és a proteinkomplexek biofizikai paramétereinek vizsgálata
- 3.2. Thymus eredetű MV-k és apoptotikus testek proteomikai elemzése

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. EGÉRTÖRZSEK ÉS IMMUNIZÁCIÓS PROTOKOLLOK**

##### **3.1.1. Felhasznált egértörzsek**

A T sejttes választ vizsgáló egér kísérleteinkhez 12-16 hetes nőstény BALB/c, valamint az ATEGRVVRVNSAYQDK szekvenciára (P70-84) specifikus TCR transzgénikus (TCR-tg) egereket használtunk (210). A BALB/c törzset a Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében SPF (*specific patogen free*) körülmények között tenyésztettük (származási hely: Charles River Laboratoires, Kingston Colony). A TCR-tg állatokat a Rush University Medical Center-rel (Chicago, IL, USA) való együttműködés keretében alkalmaztuk.

##### **3.1.2. Peptid immunizáció**

A nőstény BALB/c egerek ATE peptid oltásakor a hátsó láb bokaízületébe, szubkután 5-25µg szintetikus peptidet oltottunk komplett Freund adjuvánszal (CFA, Sigma-Aldrich) együtt. Kontrollként azonos térfogatban PBS/CFA eleggyel immunizáltuk az állatokat. A nyirokcsomósejteket az oltást követő 9. napon izoláltuk, majd a T sejt reaktivitást ELISPOT kísérletben vizsgáltuk.

##### **3.1.3. Aggrekán arthritis indukció**

Aggrekán arthritis (PGIA) indukciót Hanyecz és mtsai által leírt módszer szerint végeztük (211). Az eljárást röviden összefoglalva BALB/c egereket háromszor (0., 21. és 41. napon), glikozidáz enzimmal emésztett humán PG-vel (aggrekánnal) oltottuk. Adjuvánsként dimetil-dioktadecil-ammónium-bromidot alkalmaztunk. A kontroll egerek esetében a PG-t PBS-sel helyettesítettük. Az immunizált állatok esetében a második, illetve a harmadik oltást követő 10-14. napon jelentkeztek az első arthritisre utaló tünetek. A nyirokcsomósejtek izolálása az első oltást követő 4. hónapban történt.

## 3.2. ANTIGÉNEK

### 3.2.1. Glikozidázzal emésztett aggregán

A glikozidázos enzimemésztést borjú (Sigma-Aldrich) és humán (újszülött porc eredetű) aggregánon végeztük a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának Engedélyével. A humán aggregánmonomerek izolációja a korábban leírtak szerint történt (212). Az emésztéskor az aggregánhoz 100 U/mg 0,15M citromsav-foszfát pufferben (pH=4,3)  $\beta$ -galaktozidázt (Sigma-Aldrich), illetve 240 U/mg 0,2M NaCl-ecetsav pufferben (pH=5,0) hialuronidázt adtunk (Sigma-Aldrich) 24 órán keresztül 37°C-on, proteáz inhibitorok jelenlétében (10mM EDTA, 2mM PMSF, 2mM jodoacetamid és 5  $\mu$ g/ml pepstatinA; Sigma-Aldrich). Az emésztett proteoglikánt felhasználásig -20°C-on tároltuk.

### 3.2.2. Szintetikus peptidek

A munkánk során vizsgáltuk a porcalkotó aggregán egy T sejt epitópot hordozó, BALB/c egérben arthritogén peptidszekvenciáját. A lineáris humán és egér peptid, valamint citrullinált változatainak szintézisét együttműködő partnereink végezték az Eötvös Lóránt Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén.

A szintézis során a szilárd fázisú metodológiához Rink Amide MBHA gyantán alapuló Fmoc/tBu stratégiát használtak. A folyamat során előállított „nyers termék” szemi-preparatív, reverz-fázisú, magas teljesítményű folyadék kromatográfiával (RP-HPLC, *reverse-phase high-performance liquid chromatography*) tisztították ki. A tisztított termékeket aminosav analízis, analitikai RP-HPLC és elektronspray ionizációs tömegspektrometriai technikákkal karakterizálták. A következő gyantákat és reagenseket használták a szintézishez:

A Rink Amide MBHA gyantát (0,69 mmol/g) és az  $N\alpha$ -fluorenil-metiloxi-karbonil-védett aminosav származékokat a Bachem-től (Bubendorf, Switzerland) vagy a NovaBiochem-től (Läufelfingen, Switzerland) rendelték. A scavenger-ek (tioanizol, 1, 2-etáneditiol, coupling reagensek (N,N'-diizopropil-karbdiiimid, 1-hidroxibenzotriazol, N-diisopropil-etilamin), és hasítási reagensek (piperidin, 1,8-diazabiciklo(5.4.0)-undek-7-én)) a Fluka (Buchs, Switzerland) termékei voltak. A szintézishez (N,N-dimetil-formamid, diklórmetán, N-metil-pirrolidon), és a tisztításhoz (dietiléter, acetonitril és

trifluór ecetsav) használt oldószerek a Reanal (Budapest, Hungary) cégtől származtak. A peptidok natív és citrullinált változatainak szekvenciáit és kódjait a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Humán	huATE-RR	ATEGRV RVNSAYQDK
	huATE-XR	ATEGCitV RVNSAYQDK
	huATE-RX	ATEGRV CItVNSAYQDK
	huATE-XX	ATEGCitV CItVNSAYQDK
Egér	mATE-R	ATEGQV RVNSIYQDK
	mATE-X	ATEGQV CItVNSIYQDK

**2. táblázat: A szintetikus peptidok szekvenciái:** az aggregán központi protein G1 doménjén található arthritogén, T sejt epitóp szekvencia humán és egér megfelelői, valamint citrullinált variánsai „Hu” rövidítés humán, „m” rövidítés egér aggregán peptidszekvencia eredetre utal. Az „Cit” kód az arginin (R) aminosav módosításával létrehozott citrullint jelöli.

### 3.3. HUMÁN MINTÁK

#### 3.2.1. A természetes autoantitestek vizsgálatához felhasznált minták

A természetes autoantitestek vizsgálatokor 66 RA-ban szenvedő beteg (átlag életkor: 62,5+/-9,13 év, 52 nő, 14 férfi) szérumát vizsgáltuk. Öt páciens esetében a szérum mellett synovialis folyadék (SF) mintákat is elemeztünk. A betegeket a Budai Irgalamsrendi Kórház Reumatológiai Ambulanciáján (I), valamint az Országos Rheumatológiai és Fizioterápiás Intézetben kezelték. A kontroll minták (átlagéletkor - átlageltérés: 59,7+/-11,6, 43 nő, 11 férfi) az Országos Traumatológiai Intézetből származtak, a 11 köldökzsínór vérmintát pedig a Semmelweis Egyetem I. számú Nőgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük.

A sejtmentesítés után (2000g 20 perc) az összes mintát felhasználásig -20°C-on tároltuk. A szérum mintákban meghatároztuk a RF, C-reaktív protein (CRP) és az anti-CCP ellenes antitest szinteket. A betegeket a betegség aktivitását jellemző DAS28

(*disease activity score of 28 joints*) érték alapján három csoportba soroltuk, és a későbbi statisztikai elemzéseket ezen beosztás figyelembe vételével végeztük el:

1. Alacsony betegségaktivitást mutató csoport ( $DAS28 \leq 3,2$ )
2. Közepes betegségaktivitást mutató csoport ( $3,2 < DAS28 < 5,1$ )
3. Magas betegségaktivitást mutató csoport ( $5,1 \leq DAS28$ )

### 3.2.2. A mikrovezikulák vizsgálatához felhasznált minták

A MV szeparálási technika vizsgálatához 5 egészséges donortól, 11 RA-ban és 10 osteoarthritisben (OA) szenvedő betegtől gyűjtöttünk vérplazmát. Az RA-s és az OA-s páciensek esetében 12-12 SF mintát használtunk fel. A 24 beteg a Semmelweis Egyetem Rheumatológiai Klinikáján, az Országos Rheumatológiai és Fizioterápiás Központban, valamint a Szegedi Tudományegyetem Ortopédiai Klinikáján állt kezelés alatt. A betegek paramétereit a 3. táblázatban foglaltuk össze. A SF és a vérplazma izolálásakor a mintákat 10 percen keresztül 250g-n, majd 20 percen keresztül 650g-n centrifugáltuk, majd felhasználásig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Minta típus	Betegség	Nők száma	Férfiak száma	Életkor években (átlag $\pm$ szórás)	Életkor tartomány (években)
Plazma	egészséges	4	1	38,2 $\pm$ 13,6	25-50
	RA	9	2	58,4 $\pm$ 14,7	35-75
	OA	10	0	61,8 $\pm$ 11,7	38-76
SF	RA	11	1	56,2 $\pm$ 15,4	25-74
	OA	10	2	61,7 $\pm$ 6,4	50-64

### 3. táblázat: Az MV-k vizsgálatához felhasznált RA-s és OA-s betegekből származó minták és a páciensek demográfiai adatai

Mindkét vizsgálatsorozat esetében a betegek megfeleltek az ACR (American Collage of Rheumatism) RA-ra vonatkozó kritériumrendszerének (213). A humán minták

felhasználhatóságára vonatkozó etikai engedéllyel rendelkezünk, a vizsgálatban részt vevő páciensek írásbeli beleegyező nyilatkozatot tettek.

### **3.4. IMMUNSEJTEK IN VITRO VIZSGÁLATA**

#### **3.4.1. Proliferációs esszé**

Az ATE szekvencia specifikus, naiv TCR-tg egerekből lépsejteket izoláltunk. A sejteket  $3 \times 10^5$ /200 $\mu$ l/lyuk denzitásban, 96 lyukú lemezekre helyeztük stimuláló ATE peptid jelenlétében, illetve peptid nélkül. Az alábbi antigén koncentrációkat alkalmaztuk: 1 és 5  $\mu$ g/ml huATE-RR, 1, 5 és 25  $\mu$ g/ml huATE-RX, -XR, -XX vagy 10 és 40  $\mu$ g/ml mATE-R, -X. 96 órás tenyésztést követően minden lyukhoz 0,5 $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]timidint adtunk. A radioaktivitást 14 órával később mértük. Az eredményeket stimulációs indexben (peptid stimulált lyukakban mért cpm érték/stimulálatlan lyukakban mért cpm érték) határoztuk meg.

#### **3.4.3. ELISPOT**

Az IFN $\gamma$  szekretáló nyirokcsomósejteket Mouse IFN $\gamma$  ELISPOT Ready-Set-Go Systems (eBioscience, Inc., San Diego, CA), valamint steril MultiScen<sup>TM</sup>-IP lemezek (Millipore Corporation) segítségével mutattuk ki a gyártó utasítási szerint. A lemezekhez 100 $\mu$ l primer antitestet adtunk lyukanként, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Ezt követően 200 $\mu$ l PBS-sel kétszer mostuk a lemezeket. Majd 200 $\mu$ l térfogatban, 5% FCS-t (Gibco) tartalmazó DMEM-ben,  $2 \times 10^5$  frissen izolált nyirokcsomósejtet helyeztünk a lyukakba, 15-3-0,6  $\mu$ g/ml szintetikus peptid jelenlétében, vagy anélkül. Ezután 36 órás inkubációs lépés következett (CO<sub>2</sub> inkubátorban, 37°C-on). Háromszor ELISPOT mosó pufferrel mostuk a lemezeket, majd 100 $\mu$ l biotinizált detektáló antitestet adtunk a lyukakhoz. 90 perces 37°C-on történő inkubáció és újabb mosási lépések után az ELISPOT rendszerhez torna peroxidázzal (HRP) konjugált sztreptavidint adtunk. A kötődést sötétben, 45 perces inkubációval segítettük elő. Az enzimreakciót a 100 $\mu$ l frissen preparált AEC szubsztrátoldat (3-amino-9-etilkarbazol, AEC staining kit, Sigma-Aldrich) hozzáadását követően, fél órás inkubáció után, desztillált vízzel állítottuk le. A lemezeket



kiszárítottuk, majd az spotok számát ImmunoScan™ ELISPOT reader (Cellular Technology Ltd. Cleveland, OH, USA) segítségével határoztuk meg.

#### 3.4.4. Génexpressziós vizsgálatok

Első lépésként BALB/c egerekből thymust, lépet és csontvelőt izoláltunk. A szövetek roncsolását követően vörösvértest lízist végeztünk, majd az így kapott sejtszuszpenziót kétszer PBS-ben mostuk.

A totál RNS izolálást RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) segítségével végeztük, a gyártó előírásai szerint. Az RNS integritást és koncentrációt spektrofotometriásan (Nanodrop ND-1000 spektrofotométer, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), UV 260/280 nm-es abszorpcióméréssel határoztuk meg.

A reverz transzkripció során 2µg totál RNS-t cDNS-sé írtunk át 45 perces 42°C-on (denaturáció), majd 5 perces 99°C-on (transzkripció) végzett inkubációval. A reakcióhoz 5mM MgCl<sub>2</sub>-t, 1mM dNTP-t, random hexamer primert, RNasin RN-áz gátlót és reverz transzkriptázt (Promega, Madison, WI, USA) használtunk 40µl végtérfogatban.

Az így átírt cDNS-ek felhasználásával real-time PCR-t végeztünk. A Taqman rendszeren alapuló realtime PCR vizsgálatokat AbiPrism® 7900 PCR készülékkel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a gyártó utasításait betartva végeztük. A következő gének expressziós szintjét vizsgáltuk Taqman Universal PCR Master Mix segítségével: *Padi2* (Mm00447020\_m1), *Padi4* (Mm00478087\_m1). Belső housekeeping kontrollként hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (*Hprt*) próbát (azonosító: Mm01545399\_m1) alkalmaztunk. A PCR reakciókat 96 lyukú lemezen végeztük. A realtime PCR-protokollt templát nélküli negatív kontrollok esetében is elvégeztük. Valamennyi mintából két paralellt mértünk. A kapott eredményeket komparatív CT ( $\Delta$ CT)-módszer segítségével értékeltük ki, az eredményt a megfelelő housekeeping mRNS-szintre vonatkoztatva.

### 3.5. ANTIGÉN-ANTITEST KÖLCSÖNHATÁSON ALAPULÓ VIZSGÁLATOK

#### 3.5.1. ELISA rendszerek

##### 3.5.1.1. Anti-GAG antitestek kimutatása CovaLink ELISA-val

A CovaLink ELISA segítségével a következő glükózaminoglikán (GAG)-ellenes természetes autoantitesteket vizsgáltuk: kondroitin-szulfát A (CSA), kondroitin-szulfát B (CSB), kondroitin-szulfát C (CSC), keratán-szulfát (KS), alacsony molekulásúlyú heparán-szulfát (HS), hialuronsav A (HA) (Sigma-Aldrich Ltd. St. Louis, MO). Mivel a szénhidrátok a polisztrén felszínhez gyengén kötődnek, módosított, úgynevezett CovaLink ELISA rendszert (Nunc, Wiesbaden, Germany) alkalmaztunk. Az antigéneket 1 µg/ml koncentrációban, 1% 1-(3-dimetilaminopropil)-3-ethylkarbodiimidben (Merck Whitehouse Station, NJ) oldottuk és juttattuk a lemezekre, amelyeket ezt követően 37°C-on 2 órát, majd szobahőmérsékleten, egy éjszakán át inkubáltunk. Két órás blokkolás után (1%-os PBS/BSA-Na azid) a szérum és SF mintákat 1:100 hígításban vittük a CovaLink lemezekre. Előhívó antitestként HRP-vel jelzett anti-humán IgM-t (1:50 000) és anti-humán IgG-t (1:30 000) használtunk. Orto-fenilén-diamin (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) és 0,33%-os hidrogén peroxid hozzáadását követően az optikai denzitás értékeket (OD) 492nm-en detektáltuk.

A GAG-specifikus antitestkötődés-gátlási kísérleteknél a minták előinkubációja bakteriális peptidoglikánnal, gomba eredetű poliszahariddal (zimozánnal) és gyengén anionos gyantával történt.

##### 3.5.1.2. Össz IgM és IgG szintek meghatározása

Az RA-s páciensekből származó és az egészséges kontroll minták teljes IgG és IgM szintjeinek meghatározásához CovaLink ELISA rendszert alkalmaztunk. A standardsorhoz ismert koncentrációjú humán IgG és IgM immunglobulin preparátumokat használtunk.

##### 3.5.1.3. IL-2 ELISA

A P70-84 peptidepitóp-specifikus TCR-t hordozó 5/4 T sejt hibridóma peptidspecifikitásának teszteléséhez  $2 \times 10^4$  hibridóma sejtet tenyésztettünk együtt  $2 \times 10^5$  A20 myeloma (ATCC, Manassas, VA, USA) sejtvonallal, szintetikus peptidvariánsok

jelenlétében, 24 órán keresztül, 200µl 5% FCS tartalmú DMEM-ben (*Dulbecco's Eagle Medium*). A felülúszóból (100µl) IL-2 ELISA módszerrel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) meghatároztuk a hibridómák által termelt citokinszinteket. A módszer alkalmazása során végig a gyártó utasításait követtük. Az abszorbancia értékeket 492nm-en detektáltuk.

#### **3.5.1.4. Anti-komplement komponens 3 (C3) ELISA**

Az IK-k kimutatásában a standard módszerek közé tartozik a C3 protein jelenlétének igazolása ELISA módszerrel (214). A polisztrén lemezek alját 0,2 µg/lyuk anti-humán C3 antitesttel (Sigma-Aldrich) vontuk be. A humán SF mintákat 1:100 hígításban vittük fel. Detektáló antitestként HRP-vel konjugált anti-humán IgM-et, valamint anti-humán IgG-t (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk 1:50000, illetve 1:30000 hígításban. Az abszorbanciát az enzimszubsztrát OPD és a hidrogén peroxid lemezekhez adását követően, 492nm-en mértük.

#### **3.5.1.5. Anti-GAG antitestek kötődése glikozidáz-emésztett aggregánhoz**

Natív, illetve glikozidáz-emésztett borjú és humán aggregánt 0,2 µg/ml koncentrációban vittük fel az ELISA lemezekre (Nunc Maxisorp, Nunc, Wiesbaden, Germany), majd két órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A minták felvitele, a blokkolási lépés, primer és szekunder antitestek alkalmazása a 3.5.1.1. pontban leírtakkal megegyezően történt.

#### **3.5.1.6. Anti-CCP antitest-koncentráció meghatározása**

Az anti-CCP antitestek szintjét Immunoscan RA anti-CCP teszt kit (EURO-Diagnostica, Malmö, Sweden) segítségével határoztuk meg. A koncentrációkat U/ml-ben adtuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. Az 5,5 U/ml-es koncentrációt tekintettük az anti-CCP pozitivitás alsó határának.

#### **3.5.1.7. Reumafaktor kimutatása**

Az RA-s betegek és az egészséges kontrollok szérum IgM és IgG RF koncentrációinak meghatározásához AUTOSTATMII RF IgM és IgG kitet alkalmaztunk (Hycor Biomedical GmbH, Kassel, Germany).

### 3.5.1.8. C-reaktív protein (CRP) meghatározása

A humán minták CRP koncentrációit teljes spektrumú CRP turbidimetriás esszé segítségével határoztuk meg (Full Range CRP Turbidimetric assay, Randox Laboratoires Ltd. Crumlin, County Antrim, UK). A kiértékelést Olympus AU600 biokémiai analizátorral (Olympus Medical Systems, Europa GmbH, Hamburg, Germany) a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

### 3.5.2. Szénhidrát chip

A humán szérum és SF minták IgG molekuláit a gyártó utasításai szerint Alexa-350 festékkel jelzett anti-humán IgG-vel (Fab fragmentum) jelöltük. (Zenon Human IgG Labeling Kits, Molecular Probes Inc. Invitrogen, Carlsbad, CA) A jelölt IgG molekulákat szénhidrát chipre vittük fel (Glycominds Ltd., Lod, Israel), és a gyártó utasításainak megfelelő inkubációs idő és mosások után a fluoreszcenciát Perkin Elmer Victor II spektrofluoriméterrel mértük le.

### 3.5.3. Immunhisztokémia

A GAG-ellenes autoantitestek porc mátrixhoz kötődését immunhisztokémiával határoztuk meg. A normál, humán porcot kriosztátos metszés után (SuperFrost, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) alkohol és acetoneleegyében 5 percig fixáltuk. Az aspecifikus kötőhelyeket 5%-os BSA-val (*bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) 45 percig, nedves kamrában blokkoltuk. A metszeteket ezután PBS-sel mostuk és 1:25 arányban hígított RA-s szérummal, vagy pedig 2 és 4 mg/ml CSC-vel előinkubált szérummal 60 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Mosási lépéseket követően 1:100 hígításban FITC-jelölt anti-human immunoglobulint adtunk a metszetekhez, amelyeket ezután 45 percen keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltunk. Háromszor PBS-sel mostuk a mintákat, majd PBS és glicerin 1:1 arányú elegyével lefedtük a fedőlemezeket. A lefedést követően a metszetek elemzését Bio-Rad MRC 1024 konfokális lézermikroszkóppal (Nikon Instruments Inc. Melville, NY) végeztük el. A fluoreszcencia intenzitás normalizálása a negatív kontrollok figyelembevételével történt. (Ezek elhanyagolható háttér-fluoreszcenciát mutattak.)

### 3.5.4. Áramlási citometriás vizsgálatok

Az áramlási citometriás vizsgálataink során a mérésekhez és az adatok elemzéséhez minden esetben FACSCalibur áramlási citométert (BD Bioscience) és CellQuest programot (3.2 verzió, BD Bioscience) alkalmaztunk.

#### 3.5.4.1. Peptid-MHC kötődési vizsgálatok

A szintetikus ATE peptidek MHC kötődési vizsgálatához A20 myeloma sejtvonalat használtunk. Az A20 sejtek, a kísérleteinkben használt BALB/c egér törzs sejtjeinek megfelelően, szintén I-A<sup>d</sup> antigénprezentáló molekulákat expresszálnak. A sejtvonalat 5% FCS-t tartalmazó DMEM-ben, antibiotikum és antimikotikum (Sigma-Aldrich) jelenlétében tenyésztettük.

A vad típusú és a citrullinált peptidvariánsok MHC kötődésének összehasonlításához  $2 \times 10^5$  A20 sejtet inkubáltunk 60 percen keresztül, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében, 5, 10, 20 vagy 40 µg/ml humán (huATE-RR, -RX, -XR, -XX), illetve 1, 5, 25 µg/ml egér peptiddel (mATE-R, -X). Az így előkezelt sejtekhez 1,5 µg/ml biotinilált huATE-RR peptidet adtunk, majd 120 percen keresztül inkubáltuk 37°C-on. Az optimális kezelési koncentrációt előkísérletekben határoztuk meg. A mintákat ezt követően 1% BSA tartalmú PBS-sel mostuk, és 1:20 hígításban fikoeritrin (PE) konjugált sztreptavidinnel 1% BSA/PBS-ben festettük. Mosást követően áramlási citometriával határoztuk meg a kötődött biotinilált huATE-RR peptidek arányát.

#### 3.4.5.2. Immunkomplex és membránvezikula kimutatás

Az IK-k kimutatásához alkalmazott áramlási citometriás beállításokat és az MV detektálásra alkalmas mérési kapukat korábbi munkák alapján állítottuk be (172, 178, 215). Az adatgyűjtési mérettartomány meghatározásához különböző átmérőjű mikrogyöngyöket használtunk (4µm, 400nm (Invitrogen), 530nm (Spherotech), 100nm és 1µm (Sigma-Aldrich) átmérőjű gyöngyök). A kaput úgy állítottuk be, hogy az 1µm átmérőjű mikrogyöngyök a jobb felső sarokban jelenjenek meg. Az alsó mérési határt előkísérletekben meghatározott optimális jel/zaj arány elv alapján határoztuk meg. A háttérzaj csökkentése érdekében a mintákat 0,01µm pórusátmérőjű szűrőn (Millipore) átszűrte PBS-ben, illetve NaCl-ban hígítva (1:30) mértük. A MV kapun belül meghatároztuk a MV és IK preparátumok eseményszámát. A MV és IK kimutatáshoz az

alábbi fluoreszcensen jelölt antitesteket használtuk: AnnV-fluorescein izotiocianát (FITC), AnnV-PE, anti-CD41a-FITC, anti-CD42a-peridinin-klorofill fehérje, anti-CD68-FITC és anti-CD45-peridinin-klorofill fehérje-cianin 5.5 (Cy5.5) (valamennyi a BD Biosciences terméke), anti-humán IgM-FITC (1:150), anti-humán IgG-FITC (1:300, Sigma-Aldrich). Az AnnV festést 2,5mM Ca<sup>2+</sup> jelenlétében végeztük. A háttérzaj megállapításához ez utóbbi esetben 5mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) tartalmú 0,9%-os NaCl oldatot használtunk.

Az azonos térfogatú mintákról egységesen 30 másodpercig gyűjtöttünk adatokat. A fluoreszcencia-intenzitásnövekedést izotípuskontroll antitestek használatával korrigáltuk.

#### **3.6.2.4. Vezikuláris annexinV kimutatás**

A BALB/c egér thymus eredetű MV-khez és apoptotikus testekhez asszociált AnnV molekulák kimutatásához az IK-k és humán plazma eredetű membránvezikulák áramlási citometriás mérése során alkalmazott beállításokat használtuk. A mintákat 1:300 hígításban festettük anti-AnnV antitesttel (Sigma-Aldrich), 0,01µm-es szűrővel (Millipore) előszűrt PBS-ben. A 10 perces inkubáció után a vezikulákat újra kiülepítettük (20 500g 20 perc), majd szintén 1:300 hígításban FITC-el konjugált anti-nyúl immunglobulinnal (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 30 percig festettük. Mosási lépést követően áramlási citometriával az egyes mintákról 30 másodpercig gyűjtöttük az adatokat.

### **3.6. AZ EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁKKAL KAPCSOLATOS EGYÉB VIZSGÁLATOK**

#### **3.6.1. Extracelluláris vezikulák izolálása**

##### **3.6.1.1. Thymus eredetű mikrovezikula és apoptotikus test izoláció**

A thymuseredetű MV-k és apoptotikus testek tömegspektrometriás vizsgálatához 2 hetes BALB/c egér csecsemőmirigyeket izoláltunk. A szövetdarabokat 37°C-on 2 mg/ml koncentrációjú kollagenáz D-vel (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) fél órán keresztül emésztettük. A szuszpenzióból az egyedi sejteket az enzimreakció leállítása után, szobahőmérsékleten ismételt pipettázással, valamint

gravitációs szűréssel (pórusátmérő: 5 $\mu$ m; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) nyertük. Ezt követően 300g 10 perc centrifugálással kiülepítettük a sejteket, majd vörösvértestlízist végeztük. Az üledékhez 10 ml vörösvértest lízispuffert adtunk (0,15M NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KCO<sub>3</sub>, 0,1mM Na<sub>2</sub>EDTA desztillált vízben), majd egy perces inkubáció után 40ml PBS hozzáadásával állítottuk le a reakciót. A nem lizált sejtek kiülepítése és mosása után 1,4x10<sup>9</sup> thymussejtet helyeztünk a CELLLine bioreaktor alsó, sejttenyésztő kompartmentjébe (Integra Biosciences, Chur, Svájc). A sejteket 24 órán keresztül 15ml-es térfogatban, 10% vezikulamentes FCS-t (Gibco, NJ, USA), 400mM glutamint (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) és 4,5 g/l glükózt tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük. A bioreaktor felső kompartmentjébe 350ml szérumentes DMEM-et töltöttünk.

24 óra elteltével a thymussejteket eltávolítottuk a bioreaktor sejttenyésztő kompartmentjéből. A viabilitás ellenőrzése után (tripánkék, Sigma, AnnV-FITC festés, BD Biosciences) a sejteket 300g 20 perces centrifugálással ülepítettük ki. Az így nyert vezikulatartalmú sejtfelülúszót 5 $\mu$ m pórusátmérőjű szűrőn (Millipore), gravitáció segítségével, nyomás alkalmazása nélkül szűrtük át. Ezután az apoptotikus testek kiülepítése 2000g 20 perces centrifugálással történt. Majd 0,8  $\mu$ m-es (Millipore) gravitációs szűrést követően a filtrátumot 12 200g-vel 40 percen keresztül centrifugáltuk. Az így nyert MV mintákat, hasonlóan az apoptotikus testeket tartalmazó mintákhoz, kétszer mostuk PBS-ben. Az üledékhez 50 $\mu$ l desztillált vizet adtunk, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az esetlegesen jelenlévő fehérjekomplexek jelenlétét 0,05% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) lízis segítségével, áramlási citometriával zártuk ki.

### **3.6.1.2. Humán synoviális folyadék és vérplazma eredetű mikrovezikula izolálás**

Az SF mintákat 30 percen keresztül, 37°C-on, 10 U/ml birkahere hialuronidázzal (Sigma-Aldrich) emésztettük. A vérlemezkéket, sejtörmeléket és az apoptotikus testeket 3000g 10 perces centrifugálással kiülepítettük, majd a felülúszót 800nm-es szűrőt (Millipore) alkalmazva, gravitációsan szűrtük. Az MV-k izolálása ezt követően 20 500g-n, 60 percig tartó centrifugálással történt.

### **3.6.2. Az extracelluláris vezikulák vizsgálati módszerei**

#### **3.6.2.1. Mikroszkópos vizsgálatok**

##### **3.6.2.1.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia**

Az apoptotikus test és az MV preparátumaink tisztaságát, illetve a vezikulák morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkópiával ellenőriztük, a Központi Orvosi Kutatóintézetrel történő együttműködés keretében. A differenciálcentrifugálással kiülepített membránvezikulákat tartalmazó Eppendorf csövekből óvatosan eltávolítottuk a felülúszót, majd az üledéket 60 percen keresztül, szobahőmérsékleten fixáltuk 2%-os paraformaldehid és 2% glutáraldehid (0,01M PBS-ben oldva, pH=7,4) elegyében. Az utófixálást mosás (PBS) után, 1% OsO<sub>4</sub>-ban (Taab, Aldermaston, Berks, UK) 30 percig végeztük. Ezt követően a fixált mintákat desztillált vízben mostuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük. A mintákat 2%-os uranyl acetáttal (70%-os alkoholban) 30 percig kontrasztosítottuk, majd Taab 812 (Taab) gyantába ágyaztuk. 60 °C-on, egy éjszakán át tartó polimerizációt követően az ultravékony metszeteket HITACHI 7100 elektronmikroszkóppal analizáltuk. Az elektronmikroszkópos felvételeket Megaview II digitális kamera segítségével készítettük (Soft Imaging System, Munster, Germany).

##### **3.6.2.1.2. Immun-elektronmikroszkópia**

Immun-elektronmikroszkópia esetében a mintákat a fixálószer óvatos eltávolítását követően PBS-ben oldott 4%-os BSA-val blokkoltuk 60 percen keresztül, szobahőmérsékleten. Majd az üledéket egy éjszakán át 4°C-on, 1000-szeres hígítású HRP konjugált anti-humán IgG-vel, illetve anti-humán IgM-el inkubáltuk (Sigma-Aldrich). Mosási lépéseket követően az IK-k láthatóvá tételéhez 3,3-diaminobenzidint adtunk (Vector Laboratoires). Az ozmiumos utófixálási lépés előtt a mintákat 5 percen keresztül desztillált vízben mostuk. A dehidratálás, kontrasztzás és beágyzás az 3.6.2.1.1. pontban leírtakkal megegyező módon történt. A mintákról készült felvételeket ImageJ szoftver (ImageJ 1,42q Wayne Rasband) segítségével értékeltük.



### 3.6.2.1.3. Atomerő mikroszkópia

Az atomerő mikroszkópiás kísérleteket az MTA SZBK-val és az SZTE TTIK Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékkel való együttműködés keretében végeztük el. Az eljárás során kétsugaras interferencia módszert alkalmazva rácsokat készítettünk egy polikarbonáttal bevont Si szeletre forgótárcsás (*spin-coating*) technikával. Az így létrehozott rácsmintázatra helyeztük a humán vérplazmából és SF-ből izolált MV preparátumokat. Egy órás 37°C-on történő inkubáció után a lemezeket rázógéppel segítségével háromszor mostuk desztillált vízzel, majd szobahőmérsékleten hagytuk megszáradni.

Az IK tartalmú preparátumokat frissen hasított csillámpala felületen oszlattuk el, majd 30 perces száradási idő letelte után a lemezeket óvatosan desztillált vízzel mostuk, és szobahőmérsékleten újból szárítottuk. A különböző minták topográfiájának AFM-es vizsgálatát kopogtató üzemmódban végeztük el (PSIA, XE-100) speciális TM AFM tűk alkalmazásával (NSC15 típus, MikroMasch). A tű jellemzői a következők voltak: 10 nm-es névleges görbületi sugár, és 325 kHz rezonanciafrekvencia, illetve 40 N/m tipikus erőállandó. Mind a topográfiai, mind pedig az árnyékolt topográfiai felvételeket XEP1,5 (PSIA) szoftver segítségével jelenítettük meg. A képek feldolgozása XEI 1,6 (PSIA) szoftverrel, az úgynevezett „Sobel Edge Enhancement” módszer szerint történt.

### 3.6.2.1.4. Fluoreszcens mikroszkópia

Fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk az RA-s és OA-s SF mintákból izolált IK-kat. A mintákból differenciál-centrifugálással kiülepített IK tartalmú üledékhez 100µl PBS-ben, anti-humán IgM-FITC-et, illetve anti-humán IgG-FITC-et adtunk (1:50 hígításban). Húsz perces inkubáció után a megfestett IK-kat újra kiülepítettük (20 500g 60 perc), majd 4%-os paraformaldehides fixálás után tárgylemezre vittük. A fedőlemez rögzítése után a fluoreszcenciát Zeiss LSM 510 Meta pásztázó konfokális lézermikroszkóppal (Carl Zeiss) vizsgáltuk. 488nm-en Argon lézerrel gerjesztettük a festékeket, majd a fluoreszcenciát BP szűrőt alkalmazva 505-570nm között detektáltuk.

### 3.6.2.2. Dinamikus fényszórás elemzés (DLS)

A méréseket dióda-pumpált szilárdtest lézerrel működő ALV goniométerrel, 457,5nm-en végeztük (58 BLD 301 típus). A 90°-ban szóródott fény intenzitását

detektáltuk. Az autokorreláció számolásához a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében fejlesztett IBM PC alapú adat elemzési rendszert alkalmaztunk. A részecskeeloszlást a maximális entrópia módszer segítségével határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a különböző méretű részecskék miként befolyásolják az autokorrelációs függvényt. Az eljárás fizikai adottságai miatt már kisszámú nagyméretű részecske is torzíthatja a mérést, ezért a méreteloszlást nem a százalékos arányokkal, hanem a pontosabb eredményt adó autokorrelációs együtthatóval jellemeztük. A méretmeghatározáskor a részecskéket szabályos gömböknek tekintettük.

### **3.6.2.3. Az extracelluláris vezikulák és az immunkomplexek elkülönítése**

#### **3.6.2.3.1. Természetes immunkomplex izolálás**

RA-ban szenvedő betegek SF mintáiból IK-kat izoláltunk. 2ml sejtmentes mintát vittünk fel anti-humán IgG és anti-humán IgM agaróz oszlopra, 0,01M Na-foszfát és 0,15M NaCl oldat (pH=7) jelenlétében. Két órás, szobahőmérsékleten történő inkubáció után az oszlopokat a mintafelviteli térfogat ötvenszeresével mostuk. A kötődött fehérjéket 4M MgCl<sub>2</sub> pufferrel (pH=5,5) eluáltuk, majd az így nyert IK-kat egy éjszakán át PBS-ben dializáltuk. A mintákat ezt követően a következő fluorescens festékekkel konjugált antitestekkel inkubáltuk: anti-humán IgG-FITC (Sigma), anti-humán IgM-FITC (Sigma-Aldrich) valamint AnnV-FITC (BD Biosciences).

#### **3.6.2.3.2.2. Mesterséges immunkomplex előállítás**

Antigén és antigénspecifikus antitestek különböző arányú keverékével mesterséges IK-kat állítottunk elő. Antigénként humán laktoferrint és ovalbumint, egér IgM-et (HFPG-847 hybridóma terméke) illetve antitestként anti-humán laktoferrint-t, anti-humán ovalbumint és anti-egér IgM-FITC-et (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk. Az antigéneket a megfelelő antitestekkel 50µl térfogatban, változó arányban (1: 10 000-10 000: 1) inkubáltuk. Majd a térfogatot 300µl-re egészítettük ki, és az így kapott mintákat áramlási citometriával, DLS-sel és AFM-mel elemeztük.

A biotin-sztreptavidin komplexek vizsgálatához biotinilált anti-egér IgM antitestet (Sigma-Aldrich) és streptavidin-PE-t (PE, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) különböző arányban kevertünk össze.

### 3.6.2.3.3. Mikrovezikulák és immunkomplexek detergens lízise

Az IK és MV tartalmú mintákhoz az alábbi detergenset különböző koncentrációban adtuk: Triton-X-100, Tween 20, SDS és Igepal-CA630 (valamennyi a Sigma-Aldrich terméke), sejtlízis puffer. (BD Biosciences). Ezt követően a mintákat áramlási citometriával és DLS módszerrel vizsgáltuk. TEM esetében a detergens és a minták összekeverése után centrifugálási lépés következett (20 500g, 60 perc). A mikroszkópos elemzést 2%-os paraformaldehid és 2% glutáraldehid (0,01M PBS-ben oldva, pH=7,4) elegyében fixálás után végeztük el.

### 3.6.2.4. Tömegspektrometriás elemzés

A tömegspektrometriás méréseket Központi Kémiai Kutatóintézetrel való együttműködés keretében végeztük. Az izolált vezikulákat (MV fehérjetartalom: 0,42-6,96 $\mu$ g, apoptotikus test fehérjetartalom: 6,56-14,4 $\mu$ g) ismételt fagyasztási és olvasztási ciklusokkal tártuk fel. A fagyasztás során a mintákat 30 másodpercig folyékony nitrogénben tároltuk, majd vízfürdőben, 10 perces szonikálással olvasztottuk fel. Ötszöri ismétlés után a hatodik és hetedik fagyasztás -20°C-on 60 percen keresztül történt. Belső standardként 8 $\mu$ l mintához 2pmol beta-laktoglobulint (Sigma) adtuk. A minták fehérjetartalmának feldolgozása a következőképpen történt: A redukcióhoz 10 $\mu$ l mintához (8 $\mu$ l vezikula + 2pmol beta-laktoglobulin 2 $\mu$ l térfogatban) 1,5 $\mu$ l 0,2% RapiGest SF (Waters, Milford, MA, USA) és 0,5 $\mu$ l 200mM ditiotreitolt (Sigma) oldatot adtuk, majd a mintákat 60°C-on, 30 percen keresztül inkubáltuk. Ezt követően 5 $\mu$ l 200mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-al és 0,5 $\mu$ l 200mM iodoacetammiddal sötétben 30 percen keresztül alkiláltuk a mintákat. A tripszines emésztést 37°C-on, 90 percen keresztül, 4pmol tripszin (Sigma) oldattal végeztük. A reakciót 2 $\mu$ l hangyasavval állítottuk le (30perc 37°C). 17 000g 10 perc centrifugálás után a vezikulapopulációk fehérjetartalmát tömegspektrometriával vizsgáltuk az alábbiak szerint:

A méréseket UPLC rendszerrel (nanoAcquity, Waters) kiegészített Q-TOF Premier tömegspektrométerrel (Waters) végeztük. A tripszines peptideket tartalmazó oldatot Symmetry C18 oszlopon (180  $\mu$ m x 20 mm, Waters) tisztítottuk, majd a peptideket tartalmazó elegyből a peptidszeparáció fordítottfázisú analitikai oszlopon történt (C18, 75  $\mu$ m x 150 mm, 1,7  $\mu$ m átmérőjű BEH partikulumok, Waters). Az elúcióhoz 150

percig, percenként 400nl folyadékáramot alkalmaztunk. Eluáló oldatként emelkedő koncentrációban (10-40%), 0,1%-os hangyasavban oldott acetonitril oldatokat használtunk.

Az adatokat a tömegspektrometriás mérés során 4 másodperces ciklusonként DDA (*data dependent acquisition mode*) üzemmódban gyűjtöttük, a feldolgozás pedig ProteinLynx Global Server v2.3 (Waters) segítségével történt. Az összes minta vizsgálatához Mascot (Matrix Science, London, UK, v2.2) és X! Tandem (The GPM, thegpm.org, 2007.01.01.1 verzió) szoftvert használtunk. Az adatok X! Tandem és Mascot segítségével történő elemzése során SwissProt\_51,6 adatbázist (taxon: *Mus musculus*) alkalmaztunk, a tripszines emésztést figyelembe véve. A fehérje meghatározáskor csak egy hasítási termék hiányzását tekintettük megengedettnek. A peptid és protein meghatározás validálásához Scaffold programot használtunk (Scaffold 3\_00\_07, Proteome Software Inc., Portland, OR). Egy peptid jelenlétét akkor tekintettük elfogadottnak, ha a Peptide Prophet algoritmust használva ennek valószínűsége 95%, fehérje esetében pedig 99,0% feletti volt, valamint az utóbbi esetében legalább 2 fehérjealkotó peptidet sikerült kimutatni.

### 3.7. STATISZTIKAI ELEMZÉS

A későbbiekben bemutatott adatok, eredmények statisztikai feldolgozását a STATISTICA 7.1 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA) és SPSS (LEAD Technologies, Charlotte, NC, USA) szoftvercsomag segítségével végeztük el.

A GAG-ellenes antitest vizsgálatok során a következő statisztikai analíziseket hajtottuk végre: Az ELISA eredmények értékelése során egy háromparaméteres logisztikus görbét hoztunk létre az adatok kalibrálásának céljából, majd az ismeretlen GAG-ellenes antitest-koncentrációkat a kalibrációs görbe alapján határoztuk meg. A betegek szérumának a kontroll és köldökzsínór szérummal való összehasonlításához háromfaktoros varianciaanalízist végeztünk (*Three-Factor One Way ANOVA*).

A statisztikai tesztek elvégzése előtt normalitási vizsgálatot hajtottunk végre. A mintacsoportok közötti különbségeket 0,05-ös hibaküszöb alatti p-értékek esetén tekintettük szignifikánsnak.

Abban a munkánkban, amelyben a citrullináció szerepét vizsgáltuk a T sejt felismerésben, a kapott eredményeket ANOVA analízis, valamint t próba segítségével értékeltük ki.

A membránvezikulák kimutatási problémáival foglalkozó munkánk során az RA-s és OA-s minták elemzéséhez Mann-Whitney tesztet végeztünk. Korreláció analízishez Spearman tesztet használtunk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A GLÜKÓZAMINOGLIKÁN-ELLENES TERMÉSZETES AUTOANTITESTEK VIZSGÁLATA RHEUMATOID ARTHRITISBEN

#### 4.1.1. GAG-ellenes antitestek kimutatása szérumból

A 4. táblázatban foglaltuk össze az újszülöttek, RA-s betegek és az egészséges felnőtt kontrollok szérumból kimutatott GAG-ellenes antitestek koncentrációit. A köldökzsinórvérben mind az IgM, mind pedig az IgG anti-GAG antitestek szintje igen alacsonynak bizonyult, sőt, bizonyos esetekben a detektálási küszöböt sem érte el. Ezzel ellentétben a felnőtt egészséges kontrollok és az RA-s betegek esetében jelentős GAG-ellenes antitestszinteket detektáltunk. Ezen antitestek szintje az RA-s betegek szérumban szignifikánsan emelkedettnek bizonyult ( $F=110,70$ ;  $DF=1,77$ ;  $p<0,001$ ) (F-statisztika; DF: szabadsági fok, *degree of freedom*). Háromszor-négyszer magasabb átlag- antitestkoncentrációt mutattunk ki a betegekben a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ez az erősen szignifikáns eredmény ( $F=30,17$ ;  $DF=1,11$ ;  $p<0,001$ ) nemcsak az antigéntől bizonyult függetlennek, hanem az antitest típusától is.

Az RA-s betegcsoportban az anti-CSC és az össz IgM szint aránya  $4,68\% \pm 3,15\%$ -nak (tartomány: 0,17-21,33%), míg az anti-CSC és össz IgG aránya  $0,83 \pm 0,73\%$ -nak (tartomány: 0,1-14,29%) bizonyult. A kontroll csoportban ugyanezen arányok  $6,59 \pm 3,03\%$  (1,77-22,97%),  $1,57 \pm 1,36\%$  (tartomány: 0,13-20,58%) voltak.

Antitest ( $\mu\text{g/ml}$ )	Köldökzsinórvér szérum (n=11) Átlag $\pm$ SEM	Kontroll szérum (n=55) Átlag $\pm$ SEM	RA-s beteg szérum (n=66) Átlag $\pm$ SEM
<b>Anti-CSA IgM</b>	1,63 $\pm$ 0,3	750,95 $\pm$ 343,1	1225,27 $\pm$ 354,2
<b>Anti-CSB IgM</b>	1,36 $\pm$ 0,2	608 $\pm$ 302,3	1300,61 $\pm$ 389,2
<b>Anti-CSC IgM</b>	1,73 $\pm$ 0,4	673,7 $\pm$ 305,7	1964,34 $\pm$ 461,7
<b>Anti-KS IgM</b>	1,63 $\pm$ 0,2	275,11 $\pm$ 184,5	836,87 $\pm$ 321,3
<b>Anti-HS IgM</b>	2,27 $\pm$ 0,4	1115,91 $\pm$ 383	2605,36 $\pm$ 516,6
<b>Anti-HA IgM</b>	1,27 $\pm$ 0,2	4,32 $\pm$ 0,9	14,18 $\pm$ 4,5
<b>Anti-CSA IgG</b>	1,54 $\pm$ 0,4	203,09 $\pm$ 89,1	872,79 $\pm$ 310,7
<b>Anti-CSB IgG</b>	1,77 $\pm$ 0,8	508,07 $\pm$ 215,9	1551,62 $\pm$ 417,2
<b>Anti-CSC IgG</b>	1,27 $\pm$ 0,1	241,53 $\pm$ 176,3	717,86 $\pm$ 273,3
<b>Anti-KS IgG</b>	4,91 $\pm$ 4,3	1871,63 $\pm$ 481,1	2704,11 $\pm$ 525,2
<b>Anti-HS IgG</b>	4,05 $\pm$ 3,8	1066,59 $\pm$ 326,7	2689,71 $\pm$ 515,8
<b>Anti-HA IgG</b>	1,09 $\pm$ 0,2	960,93 $\pm$ 365,3	1227,82 $\pm$ 379,3

**4. táblázat: Szérum anti-GAG antitest-koncentrációk.** A táblázatban alkalmazott rövidítések: CSA, kondroitin-szulfát A; CSB, kondroitin-szulfát B; CSC, kondroitin-szulfát C; KS, keratán-szulfát, HS, heparán-szulfát; HA, hialuronsav

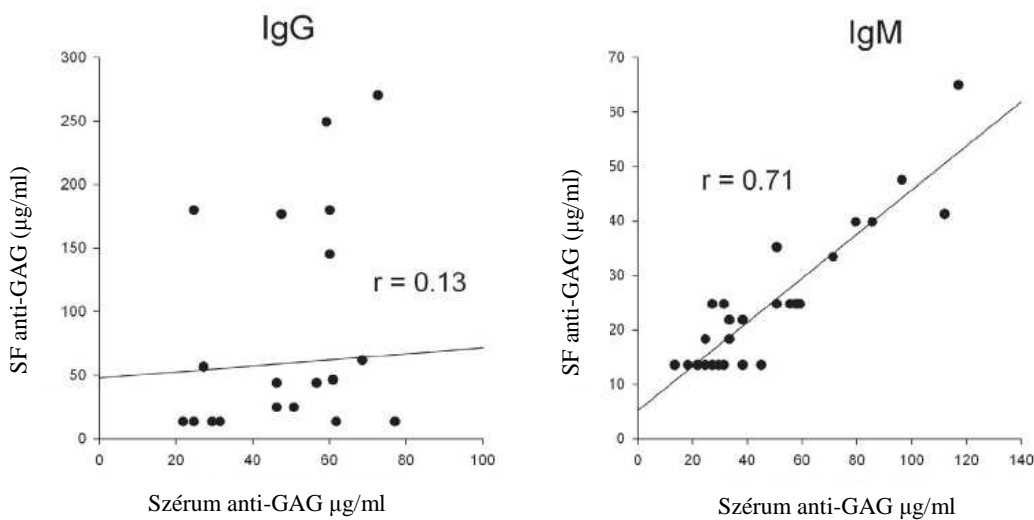
#### 4.1.2. A synoviális folyadék anti-GAG antitest-koncentrációja

Vizsgálataink során a szérumban az anti-GAG antitestek koncentrációját szignifikánsan magasabbnak találtuk, mint az SF-ban ( $p < 0,001$ ). Hasonlóan szignifikáns pozitív összefüggést mutattunk ki a szérum és az SF IgM izotípusú antitest-koncentrációi között (korrelációs együttható ( $r$ )=0,71,  $p < 0,001$ ). Ugyanakkor az IgG antitestek esetében nem sikerült korrelációt kimutatnunk ( $r=0,13$ )(3. ábra).

Az SF és szérum anti-GAG IgM antitest arányok az 5. táblázatban bemutatott módon alakultak.

	SF és szérum anti-GAG IgM antitest arányok (Átlag±SEM)	SF és szérum IgG anti-GAG antites arányok (Átlag±SEM)
anti-CSA	0,15 ± 0,04	4,22 ± 6,5
anti-CSB	0,23 ± 0,06	1,75 ± 2,34
anti-CSC	0,37 ± 0,19	19,4 ± 30,84
anti-KS	0,25 ± 0,1	4,34 ± 6,46
anti-HS	0,26 ± 0,13	8,10 ± 9,40
anti-HA	0,75 ± 0,3	1,32 ± 1,63

5. táblázat: RA-s SF és szérum eredetű anti-GAG IgM és IgG antitest arányok (n =5)



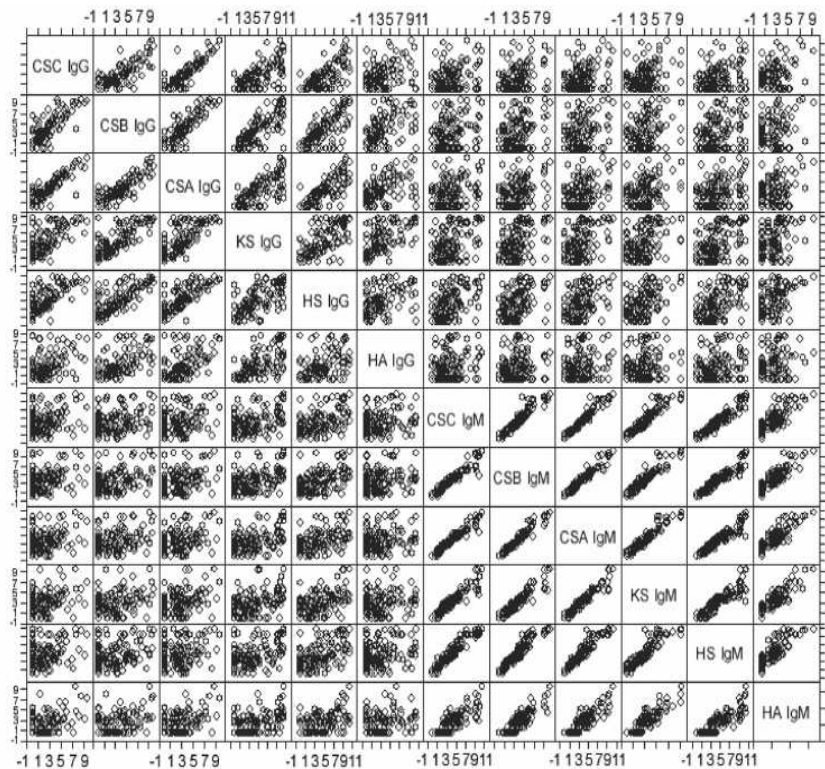
3. ábra: Az RA-s szérum és a SF anti-GAG szintjeinek korrelációs vizsgálata. Erős szignifikáns korrelációt találtunk az RA-s betegek szérum és SF anti-GAG IgM szintjei között. Ugyanakkor nem mutattunk ki hasonló összefüggést a szérum és SF anti-GAG IgG szintjei között. (*r*: korrelációs együttható, SF: synovialis folyadék, GAG: glükózaminoglikán)

#### 4.1.3. Anti-GAG antitest szint, mint betegség-aktivitási marker

Az előző pontokban összefoglalt eredményeink alapján az anti-GAG antitestek RA-ban ígéretes potenciális biomarker-molekuláknak bizonyultak. További kísérleteink



célja annak eldöntése volt, hogy a szénhidrátellenes antitestek koncentrációjának változása összefüggésbe hozható-e a betegség aktivitásával. A kérdés megválaszolásához az eddigi vizsgálataink során homogénnek tekintett RA betegcsoportot a betegségaktivitást jellemző DAS28 érték alapján alcsoportokra osztottuk. Az alcsoportok anti-GAG koncentrációinak elemzése során a különböző specifitású antitestcsoportok között pozitív korrelációt mutattunk ki, amely különösen erős volt az IgM anti-GAG antitestszintek között ( $r > 0,8$ ; 4. ábra). Így indokoltá vált olyan anti-GAG antitest(ek) kiválasztása, amely(ek) koncentrációváltozása hordozza az összes általunk vizsgált (12 féle) antitestre jellemző összes biológiai információt.



**4. ábra RA-s szérumból eredő anti-GAG IgM és IgG antitestkoncentrációk korrelációanalízise** Az ábrán látható mátrixban tüntettük fel az egyes anti-GAG antitesttípusok koncentrációjának ( $\mu\text{g/ml}$ ) logaritmusát, egymás függvényében. Kiemelten erős pozitív korrelációt mutattunk ki az IgM izotípusú anti-GAG antitestek között. ( $r > 0,86$ )

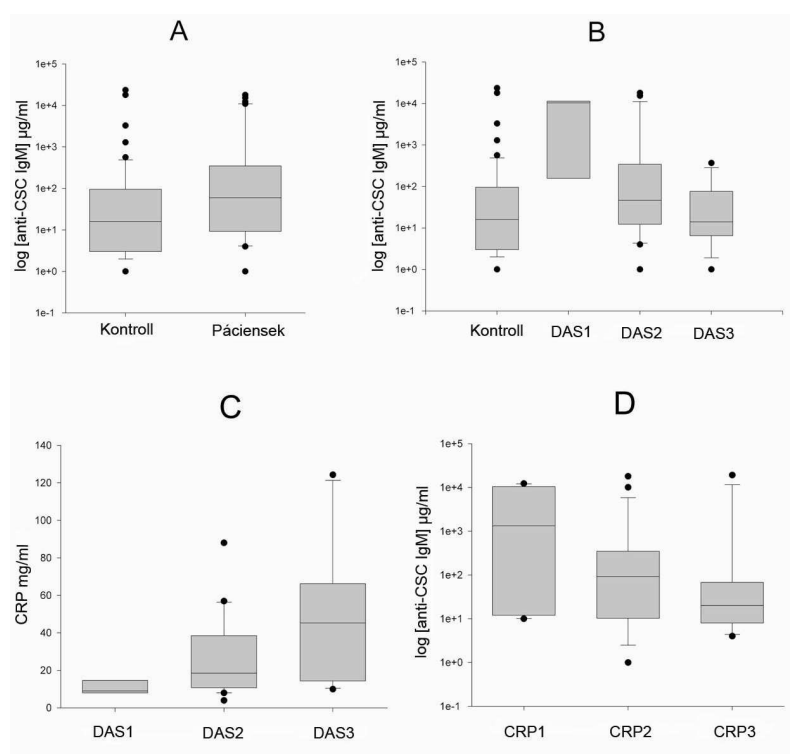
Első lépésként „stepwise” logisztikai regresszió segítségével öt anti-GAG molekulát jelöltünk ki, mint potenciális betegség-aktivitási markert: az anti-KS IgG-t, anti-HS

IgG-t, anti-CSC IgM-t, anti-CSB IgM-t és az anti-HA IgM-t. A statisztikai analízis befejező lépése után a feltételeknek már csak egyetlen antitesttípus, az anti-CSC IgM felelt meg.

A hipotézisünket, mely szerint az anti-CSC IgM szintekkel az egész adathalmaz változásai jellemezhetőek, más statisztikai eljárással is megerősítettük (ANOVA, Tukey's post hoc teszt, 5/a ábra). Az RA-s mintákban a kontroll mintákhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedettnek találtuk az anti-CSC IgM koncentrációját ( $F=6,17$ ,  $DF=1,93$ ,  $p<0,02$ ; 5/a ábra). Az RA aktivitása alapján összeállított alcsoportokat is figyelembe véve, azon páciensek esetében bizonyult az anti-CSC IgM szint emelkedettnek a kontroll csoporthoz és az aktív RA-s alcsoportokhoz képest, amelyeknél a DAS érték kisebbnek bizonyult 3,2-nél, azaz a betegség aktivitása alacsony volt (ANOVA,  $p<0,05$ ). A kontroll csoport és az aktív betegek anti-CSC értékei között nem találtunk szignifikáns eltérést (5/b ábra).

A DAS értékek mellett megvizsgáltuk az anti-CSC koncentrációk összefüggését a betegség-aktivitás követésére klinikumban is alkalmazott CRP proteinszintekkel. A CRP koncentrációk a várt módon, a betegség aktivitásának függvényében változtak ( $F=4,64$ ,  $DF=2,34$ ,  $p<0,02$ ; 5/c ábra). További elemzéshez a betegeket a CRP értékeik alapján hasonló egyszámú „alacsony”, „közepes” és „magas” értékű csoportokba soroltuk. Inverz korreláció állt fenn az anti-CSC és CRP szintek között, de szignifikáns különbséget csak az „alacsony” és „közepes” CRP koncentrációval jellemezhető csoportok esetén mutattunk ki ( $F=3,65$ ,  $DF=2,45$ ,  $p<0,05$ ; 5/d ábra).

Új eredményeink fényében összehasonlítottuk az összes anti-GAG antitest szintet a kontroll és a DAS értékek szerint csoportosított RA-s betegek között. Háromutas (3 Way) ANOVA modell alkalmazásával erősen szignifikáns különbséget mutattunk ki az „alacsony” ( $F=3,65$ ,  $DF=2,45$ ,  $p<0,001$ ; 5. ábra) és a „közepes” ( $F=33,35$ ,  $DF=1,91$ ) DAS értékű csoportok között, de nem találtunk különbséget a kontrollcsoport és a „magas” DAS értékű ( $>5,1$ ) betegcsoport között ( $F=0,22$ ,  $DF=1,79$ ).



**5. ábra Anti-CSC antitest-koncentráció, RA és betegség-aktivitási markerek**

**korrelációs analízise (A):** Anti-CSC IgM koncentráció a kontroll- és a betegcsoportban.

Az antitestkoncentrációt ( $\mu\text{g/ml}$ ) logaritmikusan ábrázoltuk. A szürke téglalapokon belüli vízszintes vonal jelöli a medián értékeket. A téglalapok alsó és felső határa a 25 és 75%-os kvartiliseket jelzi. A függőleges vonalak végeivel a maximum és a minimum értékeket jelöltük, a kiugró értékeket pontokkal ábrázoltuk. A kontroll ( $n=55$ ) és az RA-s ( $n=66$ ) minták között szignifikáns különbséget mutattunk ki ( $p < 0,02$ , F teszt).

**(B):** Az anti-CSC IgM koncentráció ( $\mu\text{g/ml}$ ) logaritmus a kontroll és a DAS28 értékek alapján osztályozott RA-s betegcsoportokban. A DAS1 ( $n=6$ ) csoportba tartozó páciensek IgM koncentrációit szignifikánsan magasabbnak találtuk ( $p < 0,05$ , Tukey's post hoc teszt) a kontroll és a (DAS)2 ( $n=12$ ), valamint a (DAS)3 ( $n=18$ ) csoportba tartozókénál. Az eredmény alapján az anti-CSC IgM antitestszinteket betegség-aktivitási markerként jellemezhetjük.

**(C):** A DAS28 érték alapján csoportosított betegek CRP ( $\text{mg/ml}$ ) vizsgálata. A CRP szintek szignifikáns különbözősége a DAS1 és 3 csoportok között állt fenn ( $p < 0,05$ , Tukey's poszt hoc teszt).

(D) Anti-CSC IgM koncentráció ( $\mu\text{g/ml}$ ) a kontroll és a CRP szintek alapján három csoportba ( $n_1=17$ ,  $n_2=16$ ,  $n_3=16$ ) sorolt RA-s betegekben. Az antitestkoncentráció a CRP szint növekedésével csökkenő tendenciát mutatott. Az anti-CSC szintek az "alacsony" és „magas” CRP értékkel jellemezhető csoportokban tértek el szignifikánsan ( $p<0,05$ , Tukey's post hoc teszt).

#### 4.1.4. A reumafaktor és az anti-GAG antitestek kapcsolata

Munkánk során a vártnak megfelelően emelkedettnek találtuk az RA-s beteg eredetű szérumban IgM és IgG izotípusú RF koncentrációkat a kontrollcsoporttal összehasonlítva. Az irodalmi adatoknak megfelelően ez a különbség erősen szignifikáns volt (páratlan t-teszt,  $p<0,001$ ). A betegekben mért anti-GAG és anti-CCP antitestszintekkel, vörösvértest-süllyedési és CRP értékekkel való összevetést követően az anti-CSC IgM és RF koncentrációk között találtuk a legerősebb korrelációt ( $r_{\text{IgG RF-anti-CSC IgM}}=0,384$ ,  $r_{\text{IgM RF-anti-CSC IgM}}=0,388$ ).

#### 4.1.5. Az anti-CCP és az anti-CSC IgM antitestszintek közötti összefüggés

Az RA-ban prognosztikus és diagnosztikus biomarkerekként szolgáló anti-CCP szintek vizsgálatakor más irodalmi adatokkal összehangban (216) nem találtunk összefüggést az anti-CCP és DAS28 értékek között (ANOVA,  $F=1,24$ ,  $DF=2,34$ , NS). Hasonlóan nem találtunk korrelációt az anti-CCP és anti-CSC-IgM koncentrációk között sem ( $r=0,08$ , NS).

#### 4.1.6. Anti-GAG antitestek keresztreaktivitásának vizsgálata

A szérumban anti-GAG antitestek keresztreaktivitásának vizsgálatakor az antitestek kötődését *in vitro* különböző GAG molekulákkal, peptidoglikánokkal valamint gomba poliszacharidokkal gátoltuk. Az antitestkötődést jelentősen gátolta számos GAG molekula, illetve a *B. subtilis* peptidoglikán. A szérumban antigénkötődés (GAG) az alábbi mértékben volt gátolható 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  és 50  $\mu\text{g/ml}$  *B. subtilis* peptidoglikánnal: az RA-s szérumban IgM kötődése 3,1%, 23%, 32,3%-ban, az RA-s szérumban IgG kötődése 9,3%, 20,6%, 39,4%-ban, a kontroll szérumban IgM kötődése 1,4%, 9,7%, 12,5%-ban, a kontroll szérumban IgG kötődése 22,1%, 22,1%, 33,8%-ban. Hasonlóan a peptidoglikánhoz, a zimoszán (gomba eredetű poliszacharid) alkalmazásával is magas

gátlási arányokat tudtunk kimutatni. Az anti-CSA antitestek kötődését a zimozán (0,5 µg/ml, 5 µg/ml és 50 µg/ml) 2,9, 10,7 és 36,4%-ban, anti-CSB antitestek kötődést 11,8, 19,7 és 40,5 %-ban, anti-CSC antitestek kötődést 12,6, 17,5 és 48,3 %-ban, anti-KS antitest kötődést 11, 23,5 és 50,6%-ban, anti-HS antitest kötődést 4,5, 11,7 és 22,2%-ban valamint anti-HA antitest kötődést 15, 20,7 és 33%-ban gátolta.

#### **4.1.7. Anti-GAG antitest kötődési gátlás anionos gyantával**

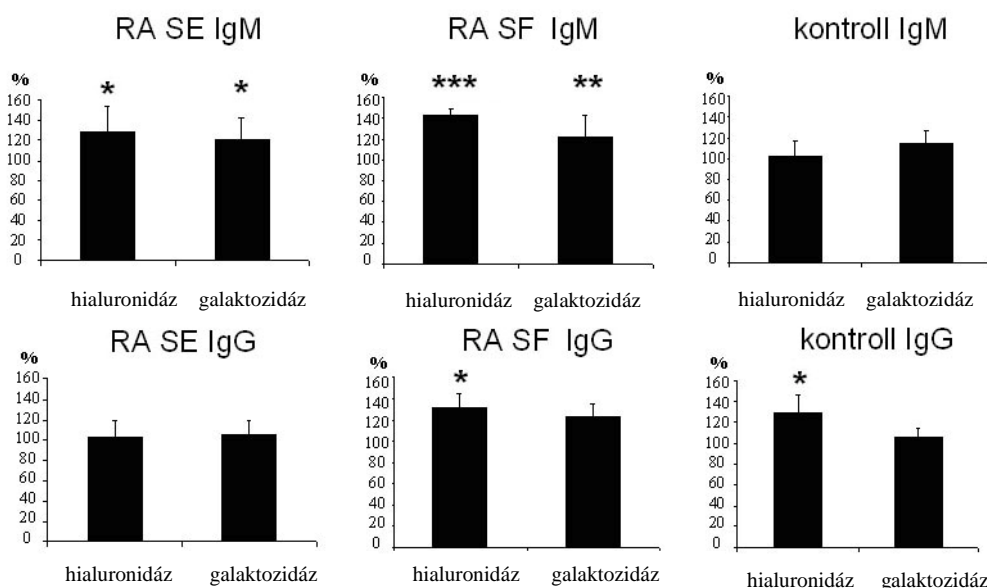
Az anti-GAG antitestek kötődési kapacitásának drasztikus csökkenését észleltük az antitestek gyengén anionos töltésű gyantával történő előinkubációjakor. Az RA-s szérum IgM antitestjeinek CSA, CSB, CSC, KS, HS és HA molekulákhoz való kötődését a fent említett kezeléssel megközelítőleg a felére tudtuk csökkenteni (CSA: 58,98% ± 0,88%, CSB: 59,56% ± 1,53%, CSC: 60,77 ± 2,17, KS: 59,93% ± 0,14%, HS: 64,80% ± 1,76%, HA: 45,95% ± 181,42%). A leggyengébb gátlást a legalacsonyabb negatív töltéssel rendelkező HA esetében, míg a legerősebb gátlást a legmagasabb negatív össztöltéssel rendelkező molekula, a HS esetében észleltük. A gyanta alkalmazásával az IgG izotípusú anti-CSA, -CSB, -CSC, -KS, -HS és -HA molekulák kötődését egyaránt sikerült gátolnunk (70,85 ± 0,05%, 58,57% ± 1,57, 61,84% ± 0,6%, 64,49% ± 1,19%, 63,25% ± 2,1%, 62,60% ± 0,66%).

#### **4.1.8. Az anti-GAG antitestek kötődése glikozidáz-emésztett humán porc aggregánhoz**

Irodalmi adatok szerint a glikozidáz enzimek aktivitása gyulladáshoz vezető körülmények között emelkedett lehet (217). Az RA-s autoimmun gyulladás egyik potenciális célantigénjét, a humán porc aggregánt különböző glikozidáz enzimekkel emésztettük, majd az így előkezelt mintákban vizsgáltuk a szérum és SF antitestek kötődési képességét (6. ábra). Elsőként hialuronidáz emésztést alkalmaztunk, mely hatására a szérum IgM antitest-reaktivitás 28%-kal ( $p < 0,05$ ), a SF IgM antitest-reaktivitás 22%-kal nőtt ( $p < 0,001$ ). Hasonló reaktivitásnövekedést mutattunk ki  $\beta$ -galaktozidázos emésztés hatására is. A szérum IgM 21%-kal ( $p < 0,05$ ), SF IgM 22%-kal ( $p < 0,01$ ) kötődött jobban a glikozidázzal emésztett aggregánhoz.

Ezzel ellentétben egyik glikozidázos kezelés sem eredményezte a kontroll szérum eredetű IgM antitestek kötődésének fokozódását. Az IgG izotípusú ellenanyagok közül

egyedül a SF IgG esetében mutattunk ki hialuronidáz emésztést követően emelkedett reaktivitást (31%,  $p < 0,05$ ). Ugyanakkor a kontroll mintákból származó IgM antitestekkel ellentétben, a kontroll mintákból izolált IgG antitestek esetében a kötődést emelkedettnek találtuk hialuronidáz emésztést követően (28%,  $p < 0,05$ ). Ezt a különbséget nem észleltük  $\beta$ -galaktozidáz emésztés után.



**6. ábra:** Az anti-GAG antitestek kötődése glikozidázzal emésztett humán porc aggregánhoz. Az emésztetlen, natív aggregánnal szembeni antitest-felismerést tekintettük 100%-nak. Legerősebb reaktivitásnövekedést az RA-s szérum és a SF IgM molekulái mutattak a hialuronidáz és  $\beta$ -galaktozidáz emésztett aggregánnal szemben.

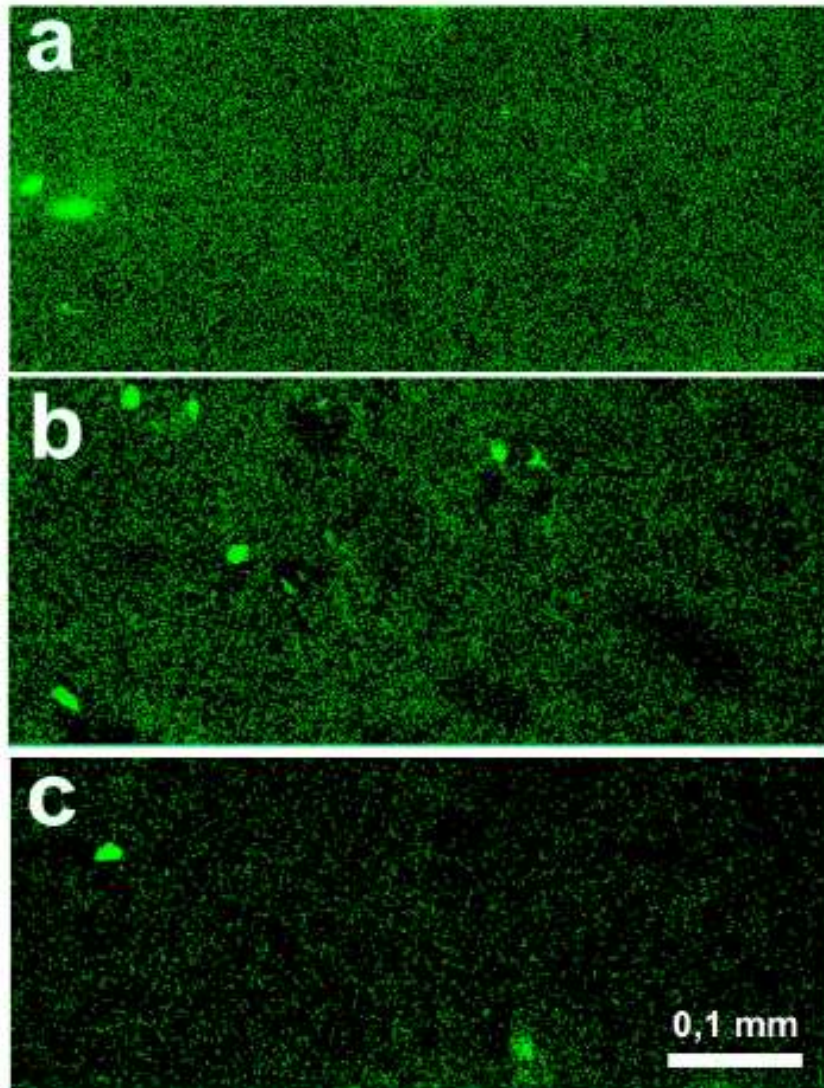
\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

#### 4.1.9. Szérum és SF antitestek szénhidrát-felismerési mintázatának vizsgálata

Az egyéni szénhidrát-felismerési mintázatok elemzéséhez Glycochip rendszert alkalmaztunk. A vizsgálat során 5 RA-s szérum, 5 RA-s SF és 5 egészséges kontroll szérum mintáit teszteltük. Annak ellenére, hogy néhány szénhidráttal szemben (Gal(a), Man(a), GlcA, Gal(b1-3), [GlcNAc(b1-6)]GalNAc(a)), emelkedett reaktivitást mutattunk ki az RA-s mintákban, nem sikerült RA-specifikus szénhidrát-felismerési mintázatot találnunk.

#### 4.1.10. Szénhidrát-specifikus antitestek kötődése a porcmátrixhoz

Végül az anti-GAG antitestek hyalinporc-mátrixhoz való kötődését vizsgáltuk. A szérum eredetű antitestek kötődését immunhisztokémiai eljárással jellemeztük (7/a. ábra). Az antitestek kötődését CSC-tal történő előinkubációjával, koncentrációfüggő módon gátolni tudtuk (7/b,c ábra).



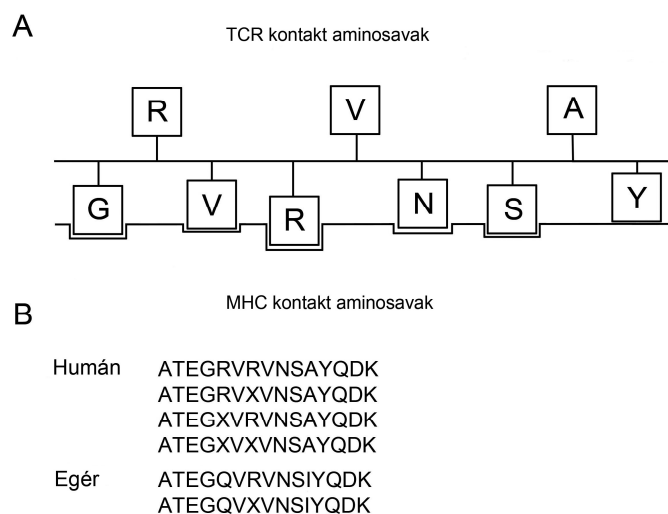
#### 7. ábra: Anti-GAG molekulák kötődése a hyalinporc extracelluláris állományához

*Az immunfluoreszcens technikával, 100x-os nagyítással készült képek az RA-s szérum eredetű antitestek humán porchoz való kötődését mutatják (a). A reaktivitás csökkenthetőnek bizonyult a szérum minták CSC-vel történt előinkubációjával: (b) 2 mg/ml inhibitor koncentráció, (c): 4 mg/ml inhibitor koncentráció.*

## 4.2. A CITRULLINÁCIÓ T SEJTÉS ANTIGÉN FELISMERÉSRE GYAKOROLT HATÁSA

### 4.2.1. A különböző helyen citrullinált humán ATE peptidok által kiváltott T sejtés válasz

A T sejtés válasz vizsgálatához BALB/c egereket szubkután oltottunk humán aggregáttal vagy pedig az immundomináns ATE peptiddel, illetve annak különböző pozíciókban citrullinált humán és egér változataival. A humán epitóp (P70-84) MHC-vel és TCR-rel kapcsolatot létesítő aminosavai a 8/a ábrán láthatóak. A p2-es pozíciójű arginin a TCR-rel létesít kapcsolatot, a p4-es pozíciójű pedig MHC-horgony funkciót tölt be (218). Kísérleteinkhez a humán szekvencia esetében a vad típusú, két arginint tartalmazó peptid mellett annak különböző pozícióban citrullinált szintetikus peptidváltozatait alkalmaztunk. A szekvencia egér megfelelője egyetlen pozícióban (p4) tartalmaz citrullinra cserélhető arginint (8/b ábra).

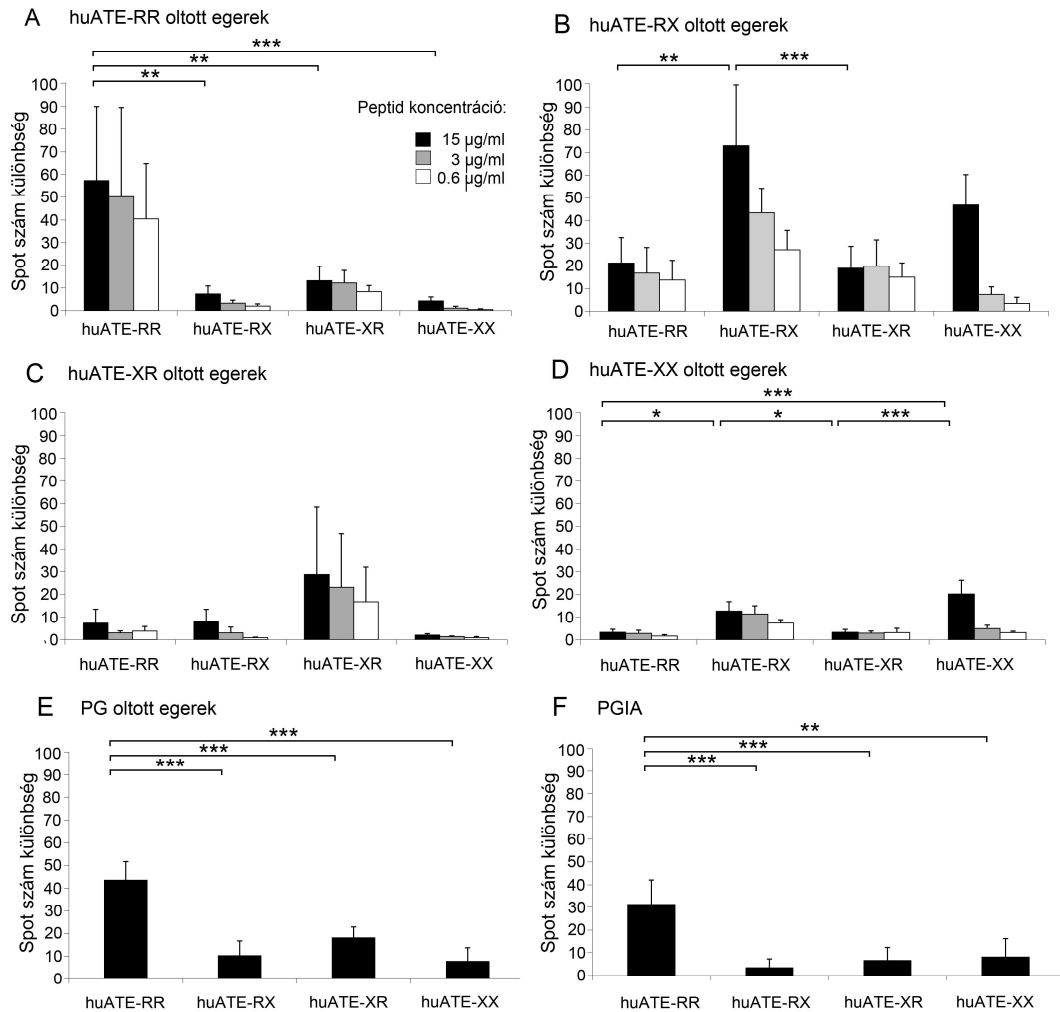


**8. ábra: Humán és egér szintetikus peptidszekvenciák.** (A) Humán ATE peptidepitóp korábban azonosított funkciójú aminosavai (B) A kísérletekben használt peptidszekvenciák. X=citrullin

A peptiddel immunizált állatokból származó, nyirokcsomó-eredetű T sejtek aktivációját *in vitro* peptidrestimulációval végeztük, és IFN $\gamma$ -termelés kimutatásával, ELISPOT rendszerben vizsgáltuk. A poliklonális T sejt válasz mértékét jelentősen



befolyásolta a citrullináció peptiden belüli helye (9. ábra). A legnagyobb mértékű választ a vad típusú (huATE-RR) peptiddel immunizált egerekből származó nyirokcsomósejtek adták, míg a különböző helyen citrullinált peptidekkel immunizált egerekből származó sejtek jóval alacsonyabb választ adtak (9. ábra).

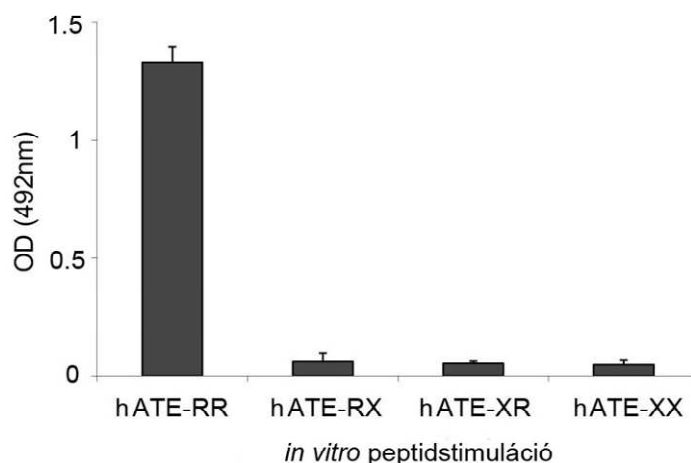


**9. ábra: Peptiddel immunizált állatok (n=6) nyirokcsomósejtjeinek IFN $\gamma$  termelése *in vitro* peptidrestimuláció hatására** A nyirokcsomósejteket az immunizálást követő 9. napon izoláltuk. Az *in vitro* peptidstimuláció után ELISPOT rendszerben határoztuk meg az IFN $\gamma$  termelő sejtek számát. Az immunizáló antigének a következők voltak: (A) huATE-RR, (B) huATE-RX, (C) huATE-XR, (D) huATE-XX. Az (E) ábrán az aggregánnal egyszer immunizált, (F) ábrán a hiperimmunizált, aggregán arthritises

állatokra vonatkozó adatok láthatók. Az *y* tengelyen a peptiddel stimulált és a stimulálatlan IFN $\gamma$  termelő sejtek lyukankénti számának különbségét tüntettük fel. Az *x* tengelyen a stimuláló peptidek láthatók. Az oszlopok a különböző koncentrációjú peptiddel történt stimulációt jelölik (fekete: 15 $\mu$ g/ml; szürke: 3 $\mu$ g/ml; fehér: 0,6 $\mu$ g/ml). A statisztikai elemzés (egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt) eredményét a legmagasabb koncentrációk esetében jelöltük. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

#### 4.2.2. Az 5/4E8 T sejtés hybridoma peptidspecifitásának tesztelése

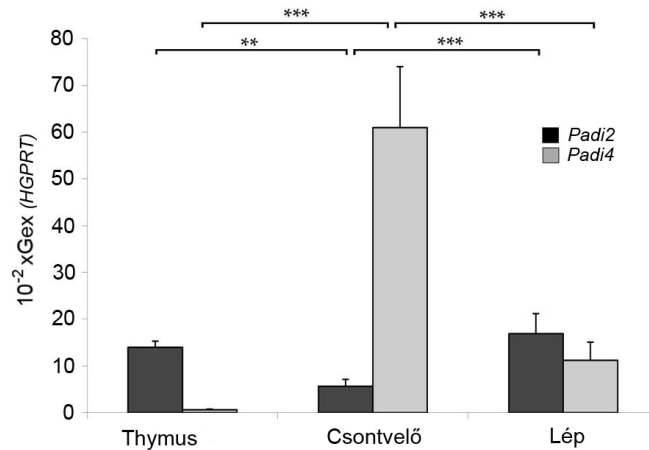
Munkánk folytatásaként a citrullináció szerepét egyedi T sejt klón esetében, az 5/4 E8 (P70-84 epitópspecifikus TCR-t hordozó) T sejtés hybridoma segítségével is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint IL-2 termelés egyedül a vad típusú, citrullinálatlan peptidszekvenciával történő *in vitro* stimuláció hatására volt észlelhető (10. ábra).



**10. ábra:** 5/4 E8 T sejtés hybridoma peptidspecifitásának *in vitro* tesztelése: A P70-84 epitópspecifikus T sejt receptort hordozó 5/4 E8 T<sub>H1</sub> hybridoma peptidspecifitását antigénprezentációs esszével, A20 myeloma sejtek felhasználásával, az IL-2 termelés ELISA rendszerben való kimutatásával végeztük el. A grafikonon az *x* tengelyen a stimuláló peptideket, *y* tengelyen pedig a megfelelő optikai denzitás értékeket tüntettük fel. A grafikonon három független kísérlet eredményeit tüntettük fel.

#### 4.2.2. *Padi* génexpresszió kimutatása egér thymusban

A citrullinációért felelős *Pad2* és *Pad4* enzimeket kódoló gének (*Padi2*, *Padi4*) expresszióját BALB/c egér nyirokszerveiben: a thymusban, a lépben és a csontvelőben vizsgáltuk. Eredményeink szerint a *Padi2* génexpresszió kimutatható volt a thymusban és a lépben, illetve kisebb mértékben a csontvelőben is (11. ábra). Ezzel ellentétben a legkifejezettebb *Padi4* génexpressziót a csontvelőben detektáltuk. Ennél szignifikánsan alacsonyabb expressziót észleltünk a lépben, a thymusban pedig ugyanek a génnek a kifejeződése nem volt kimutatható.



**11. ábra: *Pad* izoenzimek relatív génexpressziója.** A *Pad* enzimeket kódoló *Padi* gének expresszióját 4 hetes BALB/c egerekből izolált thymus, lép és csontvelő eredetű sejtekben vizsgáltuk (n=6). A fekete színnel jelzett oszlopok jelölik a *Padi2*, a szürke oszlopok pedig a *Padi4* expressziót. A relatív génexpressziós értékek a *Hprt* gén expressziójára vonatkoznak. \*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*: p<0,001 (egyutas ANOVA, Tukey post hoc teszt)

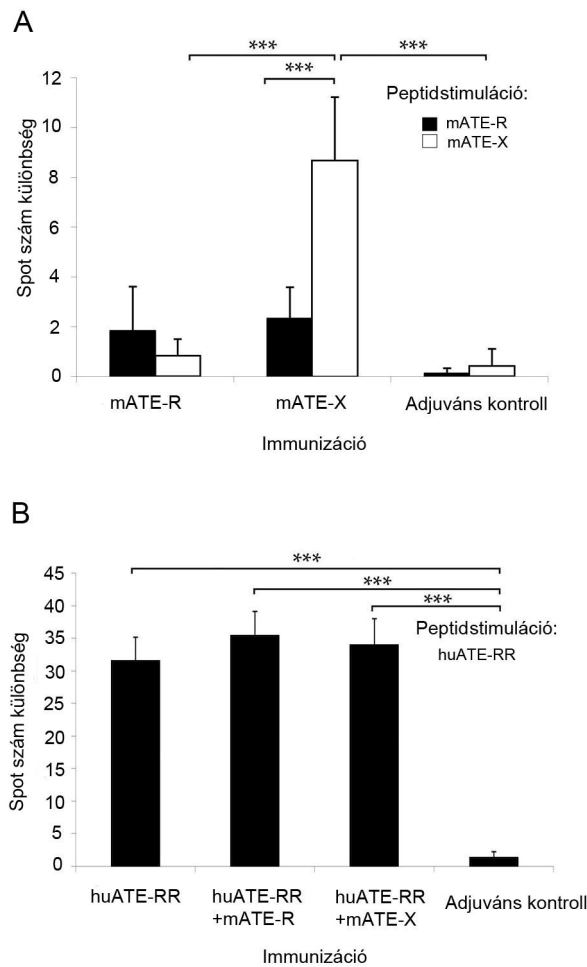
#### 4.2.3. A saját (egér) porc aggregán-eredetű peptidekkel szembeni T sejt válasz

Miután kimutattuk, hogy a saját peptidek citrullinációjához szükséges *Padi* gének expresszálódnak az egér thymusban, megvizsgáltuk, hogyan reagálnak a nyirokcsomó-eredetű T sejtek a saját, vad típusú ATE szekvenciával és annak citrullinált változatával történő stimulációra. A peptidekkel végzett immunizálást és *in vitro* restimulációt

követően az IFN $\gamma$ -termelő sejtek száma igen alacsonynak adódott (12/a ábra). Érdekes módon az mATE-X immunizált egerekből származó sejtek vizsgálatokor az mATE-X peptiddel történő restimuláció hatásra szignifikánsan magasabb választ kaptunk a vad típusú (mATE-R) peptiddel összehasonlítva.

A citokintermelő sejtek alacsony számát magyarázhatja az autoantigén peptidek hatására esetlegesen *in vivo* indukálódó T<sub>reg</sub> válasz. Ezért következő lépésként a huATE-RR, illetve mATE-R vagy mATE-X együttes oltásának hatását elemeztük a T sejtveszély alakulására. Feltételezésünk szerint, amennyiben a peptidoltás hatására epitópspecifikus T<sub>reg</sub> sejtek aktiválódnak, akkor ezek a sejtek várhatóan csökkentik az immundomináns huATE peptid által kiváltott immunválaszt.

Az egereket szubkután immunizáltuk a peptidpárokkal (huATE-RR/mATE-X; huATE-RR/mATE-R) illetve külön a huATE peptiddel. ELISPOT rendszerben az 12/b ábrán látható módon a peptidkombinációval történő együttes immunizáció hatására nem tapasztaltunk csökkenést a peptidspecifikus IFN $\gamma$ -termelő sejtek számában. A fentieket erősíti meg az az itt be nem mutatott eredményünk, hogy az oltás hatására sem a nyirokcsomók sejttségében, sem pedig a CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> nyirokcsomósejtek számában nem történt változás.

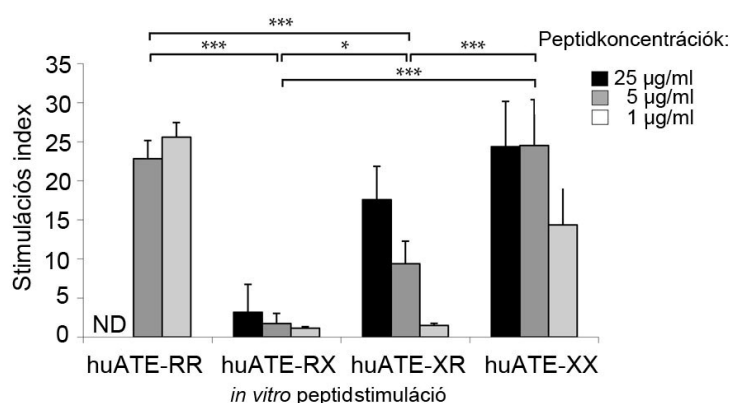


**12. ábra: Saját peptiddel immunizált állatok nyirokcsomósejtjeinek IFN $\gamma$  válasza** A BALB/c egerek ( $n=6$ ) saját peptiddel történt immunizációját követő 9. napon a nyirokcsomósejtek IFN $\gamma$  válaszát ELISPOT rendszerben vizsgáltuk. (A): Egér ATE peptiddel (mATE-R/mATE-X és adjuvánssal) oltott egerekből izolált sejteket 15  $\mu\text{g/ml}$  mATE-R vagy mATE-X peptiddel restimuláltunk in vitro. (B): Humán ATE-RR peptiddel illetve peptidkombinációval oltott egerek nyirokcsomósejtjeit 15  $\mu\text{g/ml}$  huATE-RR peptiddel restimuláltuk. Az y tengelyen jelölt értékek a stimulált és stimulálatlan IFN $\gamma$ -termelő sejtek számának különbségét mutatják. Az x tengelyen az immunizáló peptideket illetve peptidkombinációkat tüntettük fel. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  (egyutas ANOVA, Tukey post hoc teszt)

#### 4.2.5. A P70-84 specifikus TCR-tg egér eredetű lépsejtek proliferatív válasza peptidstimuláció hatására

A humán ATE peptid szekvenciára (P70-84) specifikus TCR-tg egerek lépsejtjeinek reaktivitását [<sup>3</sup>H]timidin beépülésen alapuló proliferációs esszé segítségével vizsgáltuk a különböző humán és egér peptidvariánsokkal szemben. A TCR-tg egértörzs egyedeiben a CD4+ T sejtek 90%-a hordozza a P70-84 specifikus TCR-t (219).

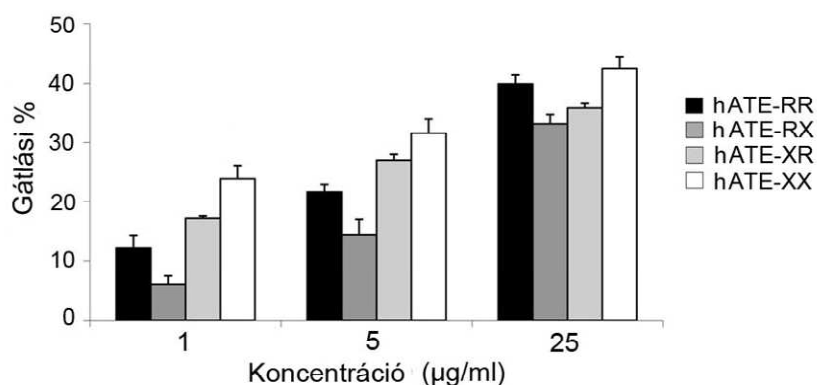
A tg egerek lépsejtjei a vártak megfelelő módon erősen proliferáltak a huATE-RR peptiddel történt stimuláció hatására (13. ábra). Eltérő mértékű poliklonális T sejt aktivációt mértünk a többi peptidvariánssal szemben. A humán peptidváltozatok közül a huATE-RX peptiddel történt stimuláció eredményezte a legalacsonyabb, míg a huATE-XX peptiddel végzett stimuláció a legnagyobb mértékű lépsejt proliferációt. Ezzel ellentétben sem a vad típusú, sem pedig a módosított egér peptid nem idézett elő lépsejt-proliferációt (be nem mutatott adat).



**13. ábra: TCR-tg egér eredetű lépsejtek proliferációs válasza** Az egerek (n=6) lépsejtjeit különböző koncentrációban ATE peptidváltozatokkal inkubáltuk. A sejtek proliferációs válaszát [<sup>3</sup>H]timidin beépülés mérésével követtük. A stimulációs indexet a peptiddel stimulált sejtek és a stimulálatlan sejtek [<sup>3</sup>H]timidin beépülésének hányadosaként definiáltuk. ND=nem meghatározott. A huATE-RR peptid esetében a legmagasabb stimulációs koncentrációt nem alkalmaztuk, mivel ez a sejtek aktiváció indukálta halálához vezetett (210). Az alkalmazott szintetikus peptidkoncentrációk a következők voltak: 25µg/ml (fekete oszlop), 5µg/ml (szürke oszlop), 1µg/ml (fehér oszlop). \*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001 (egyutas ANOVA, Tukey post hoc teszt)

#### 4.2.6. A szintetikus peptidek MHC-kötődésének vizsgálata

Végül elemeztük a különböző szintetikus peptidvariánsok MHC-kötődési képességét. A proliferációs kísérletsorozat során kapott adatokkal összhangban a huATE-RX peptid mutatta a legalacsonyabb, a huATE-XX variáns pedig a legmagasabb MHC-kötődési tendenciát (a legalacsonyabb illetve a legnagyobb biotinilált huATE-RR kötődés gátlás kiváltásával, 14. ábra). Az egér szekvenciák tesztelésekor mindkét variáns (mATE-R, mATE-X) esetében hasonlóan igen alacsony MHC-kötődést detektáltunk (be nem bemutatott adat).



**14. ábra:** A szintetikus peptidvariánsok MHC kötődése A biotinilált humán huATE-RR peptid I-A<sup>d</sup> kötődését áramlási citometriával vizsgáltuk. Az A20 myeloma sejteket különböző koncentrációjú citrullinált peptidekkel előinkubáltuk (1, 5 és 25 µg/ml). A gátlási % értéket a gátló peptid nélkül, csak a huATE-RR-t tartalmazó mintákban mért (maximális) fluoreszcencia arányában fejeztük ki. A különböző színű oszlopok a különböző peptidstimulációt jelölik. (fekete: hu-ATE-RR, sötétszürke: huATE-RX, szürke: huATE-XR, fehér: huATE-XX) Az ábrán három független kísérlet reprezentatív eredményeit mutatjuk be.

### 4.3. MV-K ÉS PROTEINKOMPLEXEK BIOFIZIKAI PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA

#### 4.3.1. MV mérettartomány meghatározás

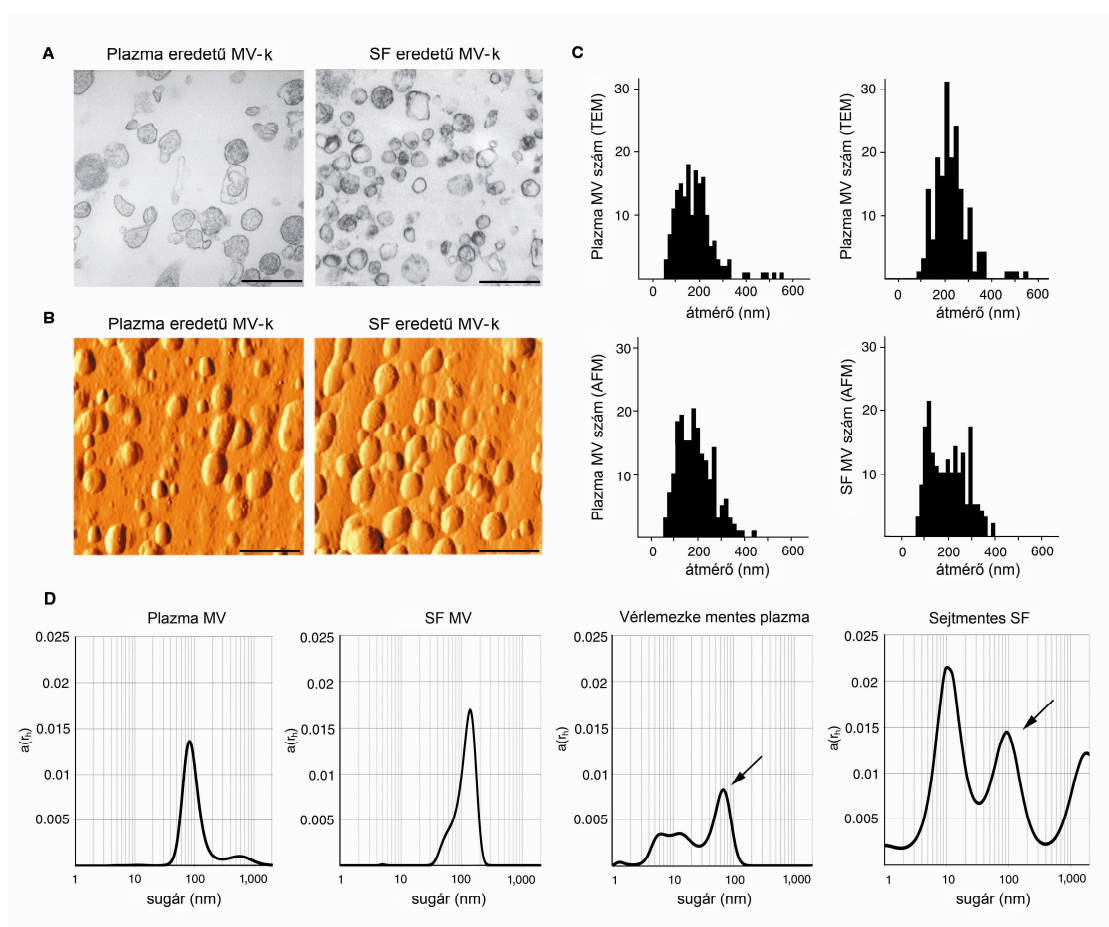
Biológiai mintákból származó EV-k vizsgálata, és méreteloszlásuk meghatározása céljából TEM, AFM és DLS módszereket alkalmaztunk. Az izolált vezikulák többnyire közepesen elektron-denz, kerek átmetszetű struktúráknak bizonyultak (15/a,b ábra). ImageJ program (1.42q verzió) segítségével 180 db vérplazma eredetű vezikuláris struktúra figyelembe vételével, az átlagos vezikulaméret TEM és AFM alapján  $182 \pm 92$  nm-nek adódott (átlagos méret  $\pm$  szórás). Az RA-s SF minták esetében a következő átlagos átmérőértékeket állapítottuk meg az:  $234 \pm 92$  nm (TEM), illetve  $181 \pm 71$  nm (AFM) (15/c ábra).

A TEM és AFM módszerek alkalmazásakor a minták vizsgálata kiülepített, fixált formában lehetséges, így nem kerülhetők meg olyan mintaelőkészítési lépések, amelyek esetlegesen befolyásolhatják az általunk mérni kívánt paramétereket. Ezért mérési eredményeinket egy harmadik módszer segítségével is ellenőriztük. Az MV-k vizsgálatát szuszpenzióban is lehetővé tevő DLS használatával a kontroll szérumból eredetű mintákban  $176 \pm 20$  nm, RA-s SF minták esetén  $176 \pm 30$  nm-t átlagátmérőt állapítottunk meg (15/d ábra).

A vezikulapreparátumok előállításakor használt centrifugálási és szűrési lépések szintén hatással lehetnek a detektálható MV mérettartományra. A fenti lépések vizsgálatára trombocitamentes plazmát és sejtmentes SF-et izoláltunk. Az így előállított mintákban található MV-k átlagátmérőjét is meghatároztuk DLS módszerrel, majd összehasonlítottuk a MV preparátumok esetén nyert adatokkal. A mérés eredménye a 15/d ábrán bemutatott 1.-4. diagrammokon látható. A minták 160-180nm-es átmérőnek megfelelő, körülbelül 80-90nm-es sugárértékeknél megjelenő csúcsokkal jellemezhetőek. A natív mintákban kimutatható volt egy kisebb átmérővel rendelkező vezikulapopuláció is (15/d ábra, 3. és 4. diagramm), amelyet a preparátumok esetében nem észleltünk (15/d ábra, 1. és 2. diagramm).

Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy TEM, AFM és DLS módszer segítségével egybeeső átlagátmérő értékeket kaptunk. Az általunk vizsgált biológiai mintákban a vezikula mérettartomány átmérője a 80 és 400 nm-es határok között mozgott.





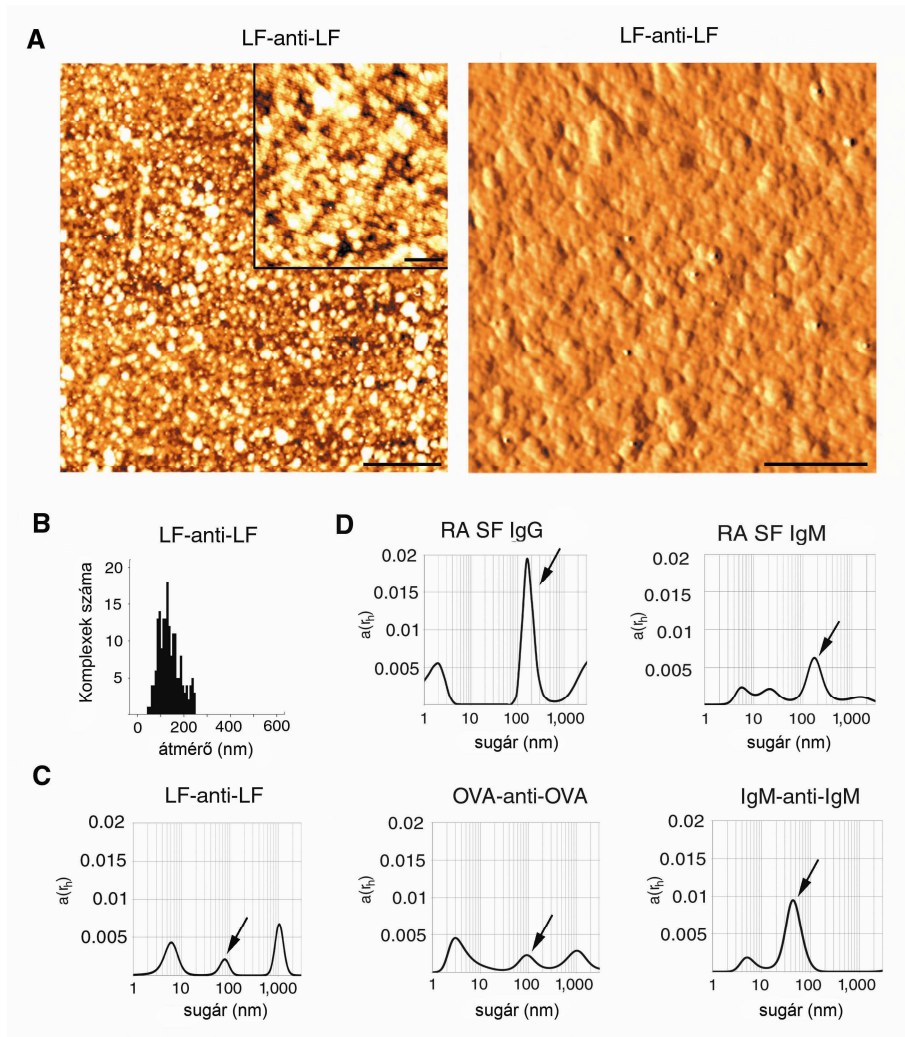
**15. ábra: MV méretmeghatározás (A):** Kontroll vérplazmából és az RA-s SF-ből izolált MV preparátum TEM képe. A bemutatott nagyítás az eredeti 50 000-szerese. Az ábrákon 500 nm-es méretskálát tüntettünk fel. **(B):** Kontroll plazma és RA-s SF eredetű, differenciál-centrifugálással izolált MV preparátumokról készült AFM felvételek topografikus ábrázolásmód alkalmazásával. **(C):** MV méreteloszlás,  $n=180$  mind a négy hisztogramm esetében. **(D):** Differenciál-centrifugálással izolált és natív minták DLS analízise. Az  $x$  tengelyeken logaritmikus skálát alkalmaztunk. Az  $y$  tengelyeken az autokorrelációs koefficiens-t tüntettük fel. A nyilak jelölik a natív minták esetében azokat a csúcsokat, amelyek a MV preparátumokban is megtalálhatók.

#### 4.3.2. Immunkomplexek méretének meghatározása

Az IK-k méretének meghatározásához DLS és AFM módszerekkel mesterségesen létrehozott, illetve biológiai mintákból izolált IK-at vizsgáltunk. A laktoferrin-anti-laktoferrin komplexek AFM analízisekor a felvételeken szabálytalan partikulumokként

megjelenő komplexek az 50-250nm-es mérettartományba estek. A partikulák átlagos átmérője  $138 \pm 46$  nm volt ( $n=180$ ) (16/a,b ábra). Ugyanezen minta DLS elemzésekor 12, 160 és 2000 nm átmérőket (6, 80, 1000nm-es sugárnak megfelelő) jelölő pontoknál mutattunk ki csúcsokat (16/c ábra). Az ovalbumin-anti-ovalbumin, valamint IgM/anti-IgM 1:1 arányú komplexeinél az átmérő értékek a következőképpen alakultak: 6, 180, 2000nm (a sugár értékében kifejezve 3, 90 és 1000nm); 8, 90nm (a sugár értékében kifejezve 4 és 45nm) (16/c ábra). Mindhárom mesterségesen előállított IK típus vizsgálatakor 10nm-nél kisebb átmérőjű tartományban is kimutattunk csúcsokat, ezek feltehetően a szolubilis IK-knak feleltek meg. Eredményeink alapján a nem szolubilis IK-k átmérője a 100-200nm-ig terjedő tartományban átfed a MV-k mérettartományával. Az 1000nm feletti csúcsok feltehetően az IK precipitációnak következtében jöhettek létre.

Az RA-s SF-ből izolált, természetes IK-k mérettartományát DLS módszerrel szintén meghatároztuk (16/d ábra). Az IgG tartalmú IK-k 4, 210, és 2000nm átmérőnél (a sugár értékében kifejezve 2, 105 és 1000 nm-nél), míg az IgM tartalmúak 12, 40 és 2100nm átmérőértéknél (a sugár értékében kifejezve 6, 20, 105, 1050nm értékénél) adtak jelet. A nem szolubilis IK-knak megfelelő, közepes átmérővel jellemezhető frakció a természetes IK esetében is átfedett a MV-k mérettartományával.

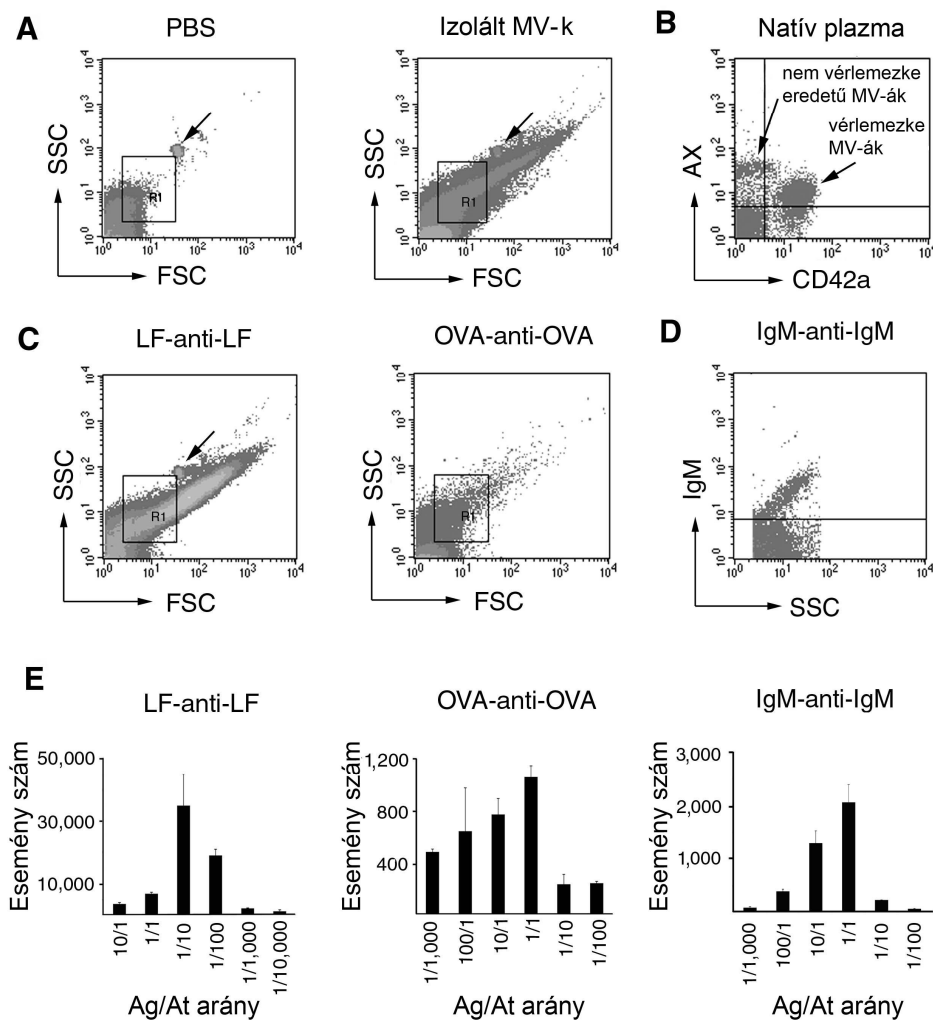


**16. ábra: IK méretmeghatározás. (A):** Laktoferrin-anti-laktoferrin (LF-anti-LF) mesterséges IK-ról készült topografikus (bal panel) és árnyékolt topografikus (jobb panel) AFM képek. A bal panelen a skála  $1\mu\text{m}$ -nek, a nagyított területen  $250\text{nm}$ -nek, a jobb oldali panel esetében pedig  $250\text{nm}$ -nek felel meg. **(B):** A hisztogramok a fehérje komplexek méreteloszlását mutatják AFM alapján **(C):** LF-anti-LF, ovalbumin-anti-ovalbumin (OVA-anti-OVA) és IgM-anti-IgM IK-k DLS analízise. **(D):** RA-s SF eredetű IK-ek DLS képe. A nyilak azokra a csúcsokra mutatnak, amelyek átfednek a MV preparátumokéval (15. ábra). Az  $x$  tengelyen az értékeket logaritmus skálán ábrázoltuk,  $y$  tengelyen az autokorrelációs koefficiens mutatjuk.

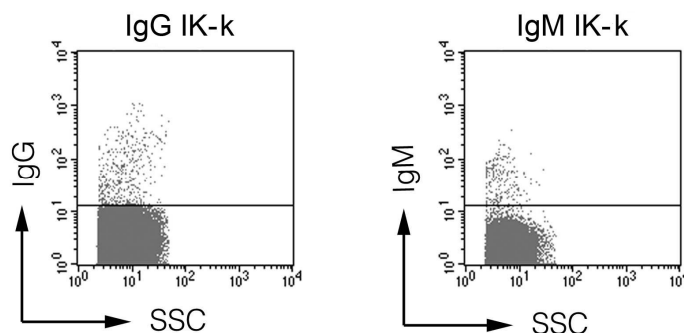
### 4.3.3. Immunkomplexek kimutatása áramlási citometriával

DLS, AFM és TEM segítségével kimutattuk, hogy a biológiai mintákban jelen lehetnek a MV-vel azonos fényszórású, átfedő mérettartományba eső IK-k. Következő lépésként arra kerestünk választ, hogy az MV-k vizsgálata során széleskörben alkalmazott áramlási citometriás mérési eredményeket hogyan befolyásolja a fehérjekomplexek jelenléte. Kísérleteinkben az általánosan használt MV-kapukon belül határoztuk meg az események számát. A MV detektálására a vezikulák AnnV kötődését (externalizált PS kimutatást), illetve az anti-CD42 (vérlemezske eredetű MV marker) fluoreszcens festést alkalmaztunk. Elsőként a mesterséges IK-kat vizsgáltuk. A 17/c ábrán jól látható, hogy a festetlen IK-k a MV kapun belül igen erős jelet adtak. Erős fluoreszcens jelet detektáltunk ugyanitt az IK-k fluoreszcens jelölésekor. (anti-egér IgM-FITC alkalmazásakor; 17/d ábra). Az MV kapun belül mérhető események száma az IK különböző antigén-antitest arányai esetén a 17/e ábrának megfelelő módon változott.

A természetes IK-k vizsgálata során a preparátumok fluoreszcensen jelölt anti-humán IgM illetve anti-humán IgG festése után az előzőekkel megegyező eredményeket kaptunk (18. ábra).



**17. ábra: MV kapun belüli IK kimutatás áramlási citometriával** (A) A plotokon a PBS eredetű mérési háttérzaj látható. A nyilak az 1µm-es kalibrációs gyöngyöket jelölik. R1 jelzi az MV kaput. (B) Normál vérplazma AnnV-FITC és CD42a-FITC pozitív eseményei. A ploton két különböző festődésű MV populáció figyelhető meg: egy AnnV-/CD42+ populáció (vérlemezke eredetű MV-k) és egy AnnV+/CD42- populáció (nem vérlemezke eredetű MV-k). (C) LF-anti-LF IK-k (antigén és antitest 1:10 arányú keveréke) és OVA-anti-OVA IK-ek (1:1) áramlási citometriás fényszórási képe. A nyilak az 1µm-es kalibrációs gyöngyöket jelölik. R1: MV kapu. (D): IgM-anti-egér IgM-FITC (1:1) IK-k fluoreszcencia intenzitás értékei. Az eseményeket az R1 kapun belül ábráztuk. (E): A hisztogramok az IK-k képződését mutatják különböző antigén-antitest arány alkalmazása esetén. Az y tengely az R1 MV kapun belüli eseményeket mutatja.



**18. ábra:** Az RA-s SF minta eredetű IK-k áramlási citometriás képe. Az eseményeket a MV kapun belül ábrázoltuk. Felhasznált antitestek: anti-humán IgG-FITC, anti-humán IgM-FITC.

#### 4.3.4. Az IK-k hatása az extracelluláris vezikulák áramlási citometriás mérésére

##### 4.3.4.1. A kimutatási módszer fejlesztése

A biológiai mintákban egyidejűleg jelenlévő MV-k és IK-k vizsgálatára és megkülönböztetésére elsőként fejlesztettünk ki egy könnyen használható, egyszerű módszert. Az eljárás lényege, hogy a lipid kettősréteggel körülvett extracelluláris vezikulák detergenssel lizálhatók, míg az IK-k kevésbé érzékenyek a detergens általi lízisre. Így áramlási citometriás méréskor az alacsony koncentrációban alkalmazott detergens hatására az MV-eket jelölő események a detergens kezelést követően eltűnnek, míg az IK-akat jelölőek nem változnak. Különböző koncentrációjú detergens hatását vizsgáltuk (pl. Triton X-100, Igepal-CA630, Tween-20, SDS (*sodium dodecyl sulphate*)). Triton-X-100 (0,05%) alkalmazásakor a MV-eket jelölő csaknem összes AnnV+ vagy CD41a+ esemény eltűnt (19/a ábra). Hasonló eredményt kaptunk anti-CD42a festék használata során is. Többféle Triton-X-100 koncentrációt alkalmazva, mint az a 18. ábrán látható, a MV kapun belül észlelhető jelek hozzávetőlegesen azonos detergenskoncentráció mellett szűntek meg. Mivel az anti-CD41 és az anti-CD42 antitestek különböző mechanizmus szerint kötődnek a célmolekulákhoz, valószínűtlen, hogy az eseményszám jelentős csökkenése az antitestkötődés triton általi gátlásának volt köszönhető. Az IK-k festése esetében a mintákban 0,05%-os Triton X-100 kezelés

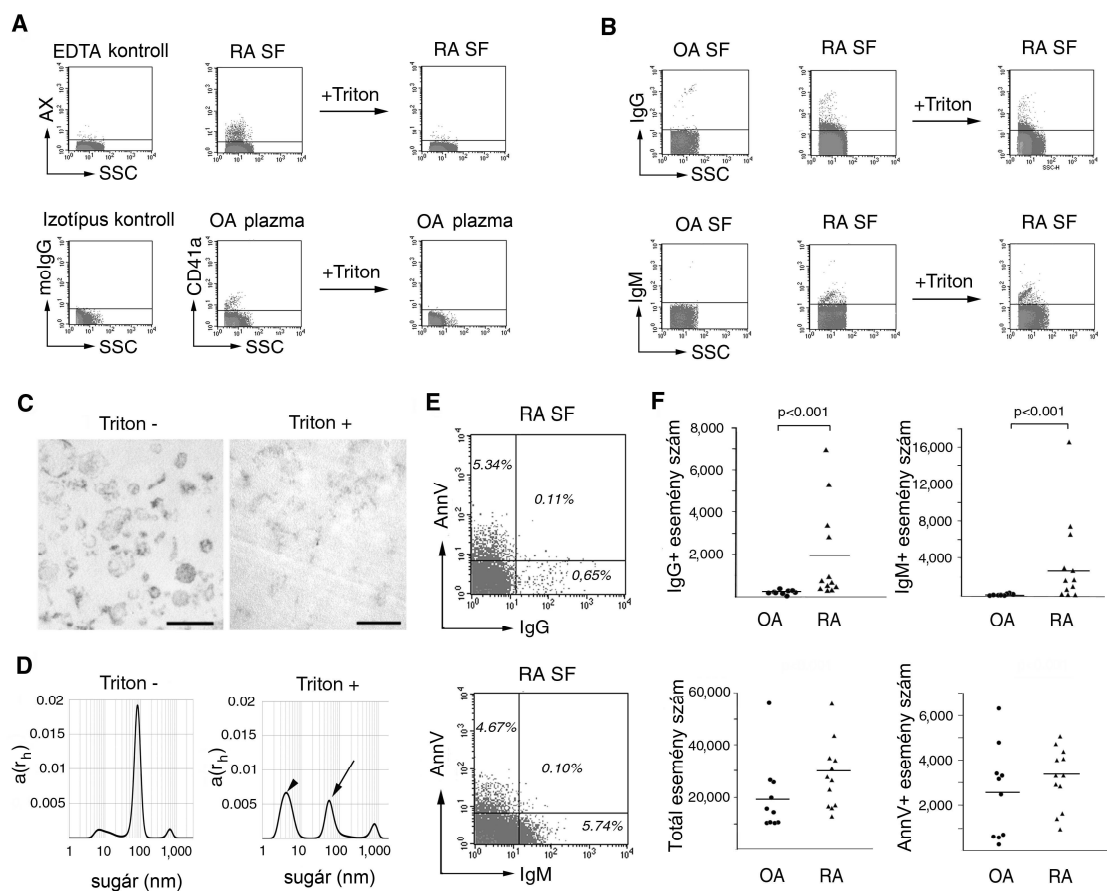
ellenére is jelentős festődést tapasztaltunk (19/b ábra). TEM módszerrel készített felvételekkel bizonyítottuk, hogy Triton-X hatására a MV-k lízise valóban végbement. (19/c ábra). A Triton-kezelés után a mintában csak membránfragmentumokat sikerült kimutatnunk. A detergenssel kezelt minták DLS elemzése során az MV-k tartományában alacsonyabb jelet észleltünk. Ugyanakkor a kisebb mérettartományban, 20nm átmérő alatt (sugár értékben: 10nm) észlelhető csúcs valószínűleg a Triton-X-100 hatására fragmentálódott MV populációnak felel meg (19/d ábra). Az IK minták esetében DLS vizsgálat során sem tapasztaltuk a jelek számottevő változását detergenskezelés hatására.

#### **4.3.4.2. IK-k MV felszíni kötődésének vizsgálata**

Az IK-kat tartalmazó SF mintákat anti-humán IgM-FITC-el és AnnV-PE-nel inkubáltuk. Minimális kettős festődést tapasztaltunk, amely azt mutatja, hogy az IK-k és a MV-k elkülönülve voltak jelen az RA-s SF mintában. Az immun-elektronmikroszkópos felvételek megerősítették ezt a hipotézist (19/e ábra).

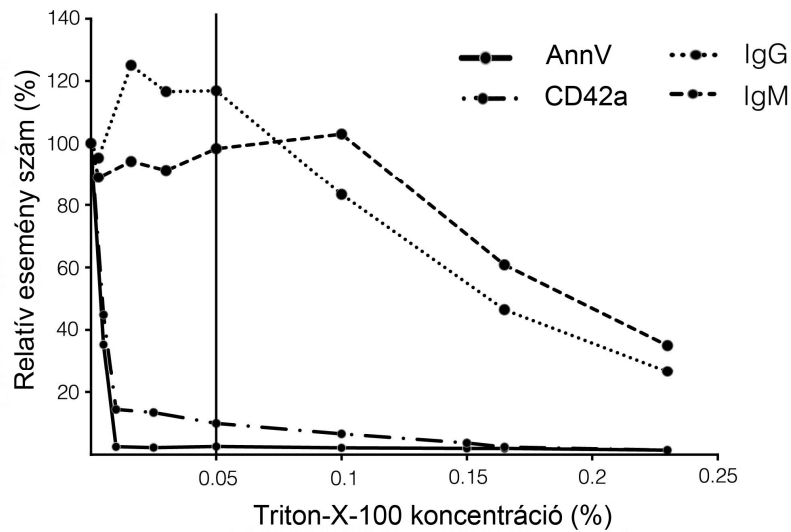
#### **4.3.4.3. Az immunkomplexek jelenlétének hatása a rutin áramlási citometriás MV fenotípezálásra**

RA-s és OA-s betegek hígított vérplazmáját és SF mintáit anti-humán IgG-FITC-el és anti-humán IgM-FITC-el festettük. A plazmaminták csak kismértékben festődtek, ugyanakkor az RA-s SF minták esetében az OA-s SF mintákkal összehasonlítva kiemelkedően magas IgG és IgM pozitivitást mutattunk ki (19/f ábra). Az IgG illetve az IgM események száma 0,05%-os Triton X-100 lízis hatására sem változott számottevően.



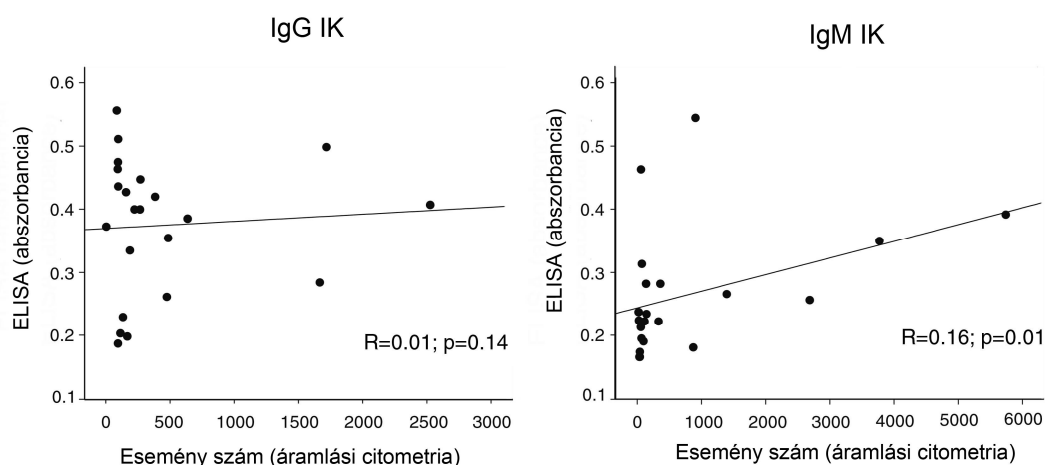
**19. ábra: MV és IK tartalmú minták FACS analízise (A):** RA-s és OA-s plazma MV-k AnnV-FITC illetve CD41a-FITC festődése 0,05%-os Triton-X-100 lízis előtt és után. Bemutatjuk az AnnV festéshez használt EDTA puffer háttérét, valamint a festések kontrolljaként anti-egér izotípus kontroll antitestek alkalmazása esetében nyert képet. Az RA-s és OA-s SF mintákat anti-IgG-FITC-el vagy anti-IgM-FITC-el festettük, majd detergenslízist végeztünk. Az összes plot a MV kapun belüli eseményeket mutatja. (C): TEM felvételek MV preparátumról 0,05%-os Triton-X-100-el kezelés előtt és után. Nagyítás: eredeti felvétel  $\times 20\,000$ . A skála = 400nm. (D): MV preparátum DLS analízise detergenskezelés előtt és után. Az x tengelyt logaritmikus skálára állítottuk, az y tengelyen az autokorrelációs értékek találhatóak. (E): RA-s SF AnnV-PE és anti-IgG-FITC vagy anti-IgM-FITC ( $n=3$ ) FACS festése. A dot ploton az R1 kapun belüli eseményeket jelenítettük meg. (F): MV kapun belüli IgG+, IgM+, AnnV+ és összeseményszám RA-s és OA-s SF mintákban. A vízszintes vonalak az átlagértékeket jelzik. A p értékeket Mann-Whitney teszt alapján állapítottuk meg ( $n=21$ ).





**20. ábra:** Triton-X-100 detergens hatására az áramlási citometriás mérés során az MV kapuban megjelenő események száma a MV-ket és IK-t tartalmazó mintákban. Az y tengelyen a detergenst nem tartalmazó mintához viszonyított relatív eseményszámot tüntettük fel. Az X tengelyen a detergenskoncentrációk láthatóak. A vertikális vonal azt a Triton-X-100 koncentrációt jelöli, amelyet a továbbiakban a vizsgálataink során alkalmaztunk.

Az SF mintákban a proteinkomplexek jelenlétét konvencionális IK detektáló módszerrel, ELISA rendszerben, C3 komplement fehérje ellenes antitest alkalmazásával is megerősítettük. Az áramlási citometriával és ELISA segítségével mért IgM tartalmú IK-kra vonatkozó adatokat összehasonlítva erős pozitív korrelációt kaptunk (egymintás Spearman korreláció,  $n=22$ ,  $\bar{r}=0,48$ ,  $p<0,01$ ; 21. ábra). Az IgG tartalmú IK-k esetében valószínűleg a mintáknak a detektáló antitesthez kötődő IgG RF tartalma miatt nem tudtunk ilyen összefüggést kimutatni.



**21. ábra:** *Korreláció az IK-k áramlási citometriával és ELISA-val történő kimutatása során nyert eredmények között (n=22). Alkalmazott antitestek: anti-humán IgG-FITC, anti-humán IgG-HRP, illetve anti-humán IgM-FITC, anti-humán IgM-HRP. A p értékeket Spearman korrelációs vizsgálattal számoltuk.*

#### 43.4.5. Magas IK tartalmú mintákban a MV szám kvantitatív meghatározása

Áramlási citometriás mérést alkalmazva a magas IK tartalmú mintákban igen jelentékeny lehet az IK-k jelenlétének tulajdonítható álpozitivitás. OA-s és RA-s SF mintákat elemeztünk annak érdekében, hogy megállapítsuk, milyen mértékben befolyásolhatja ez a jelenség a mérési eredményt. A MV kapu összeseményszáma vizsgálataink szerint korrelált az AnnV-, IgG-, és IgM-pozitív események számával (6. táblázat). Az OA-s mintákban mért összeseményszám és az AnnV pozitív eseményszám között erős pozitív összefüggést mutattunk ki. Fontos kiemelni, hogy ugyanakkor az RA-s SF mintákban az összeseményszám nem is korrelált az AnnV pozitív (azaz MV) események számával, ugyanakkor együtt mozgott az IK-k eseményszámával. Kísérleteink alapján kimondható, hogy az RA-s SF mintákban az összeseményszám nagyobb mértékben függött az IK eseményszámától, mint a MV számtól.

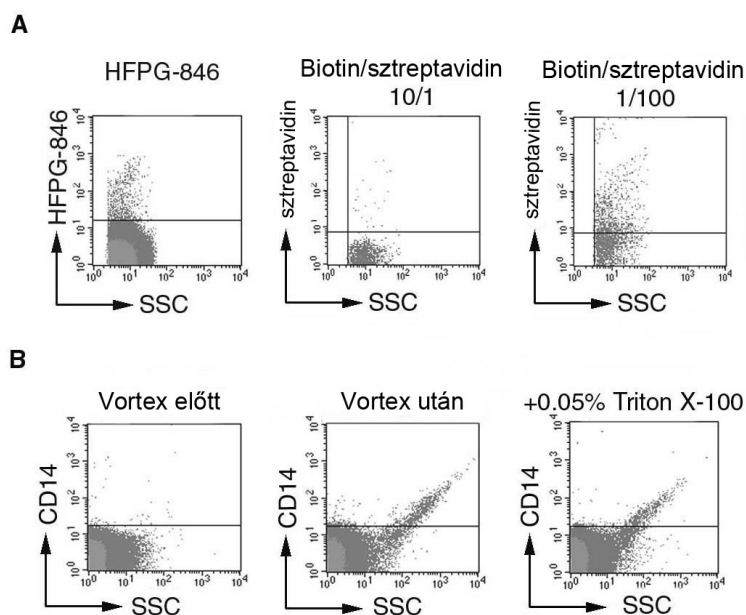
Így ha csak az összeseményszámot vesszük figyelembe az IK-kat is tartalmazó biológiai minták MV tartalmának áramlási citometriás vizsgálatok, félrevezető eredményt kaphatunk.

Össz- eseményszám	AnnV <sup>+</sup> események	IgG <sup>+</sup> események	IgM <sup>+</sup> események	AnnV <sup>+</sup> +IgG <sup>+</sup> +IgM <sup>+</sup> események
RA+OA	0,634*	0,716†	0,515*	0,848†
OA	0,883*	0,383	-0,510	0,867*
RA	0,154	0,930†	0,720*	0,748*

**6. táblázat: Biológiai minták (n=21) áramlási citometriás mérése során megállapított összeseményszám és AnnV+/IgG+/IgM+ eseményszám korrelációjának vizsgálata** A táblázatban megjelenített értékek Spearman teszt korrelációs koefficienseit jelölik. \* $p < 0,01$ ; † $p < 0,001$

#### 4.3.5.6. Áramlási citometriás festés során a MV kapun belüli észlelhető álpozitív események

A biológiai mintákban előforduló IK-kon kívül az indirekt immunfestési eljárás során alkalmazott primer és szekunder antitestek is képesek olyan mesterséges IK-kat létrehozni, amelyek zavarhatják a MV detektálást (22. ábra). A sztreptavidin és a biotinizált antitestek is létrehozhatnak nagyméretű fehérjekomplexeket. Sőt, az antitestek maguk is aggregálódhatnak (22/a ábra). A fehérjeaggregátumok képződését több tényező segítheti elő, így a pH, a koncentráció, a hőmérséklet, az ionerősség és a fizikai hatások. Ez utóbbit kiemelve kimutattuk, hogy az áramlási citometriás mérés során 30 másodperces intenzív keverés hatására a fluoreszcensen jelzett anti-humán CD41 (BD Biosciences) PBS-ben oldva és normál vérplazmában is új, detergensrezisztens jelek megjelenését indukálta az MV kapun belül (22/b ábra).

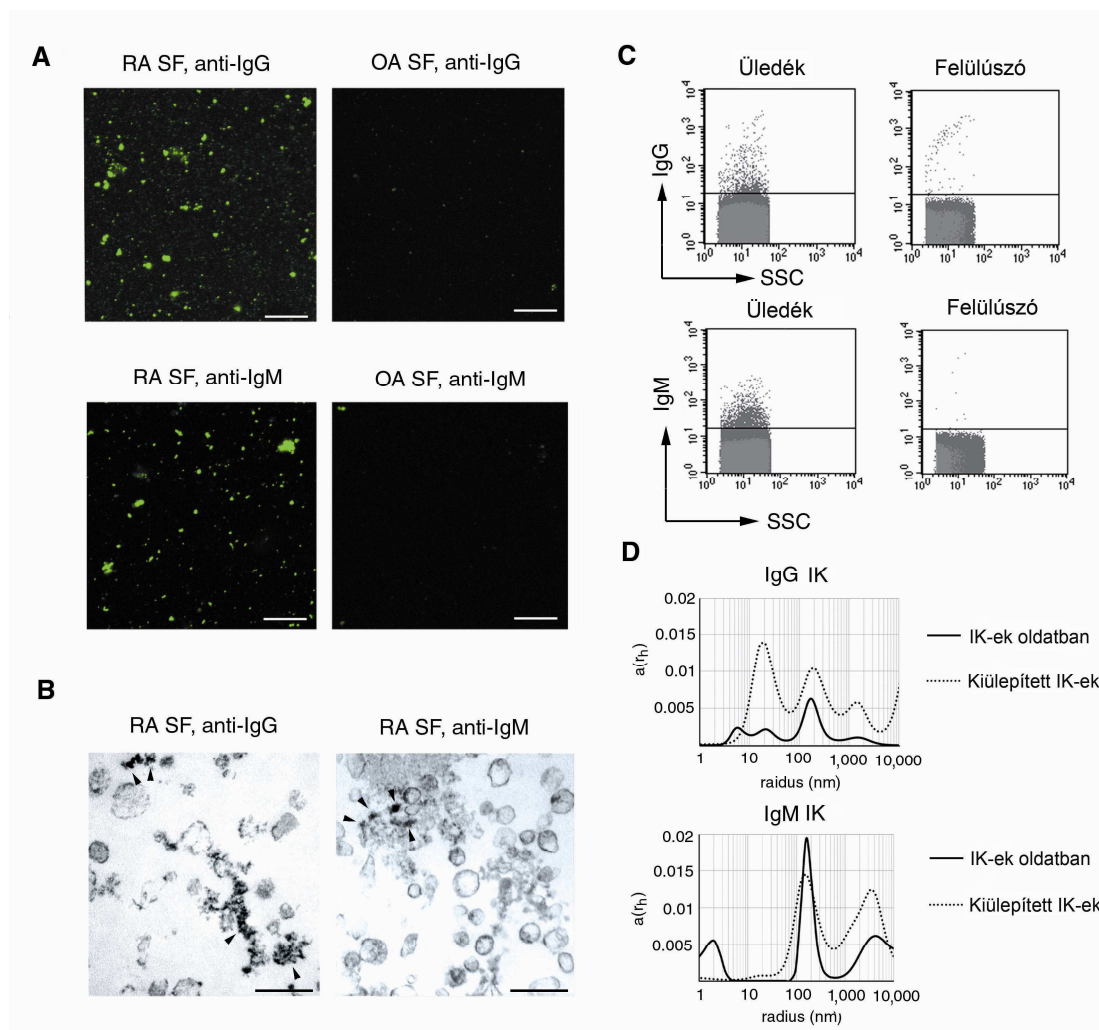


**22. ábra: IK-k, biotinilált antitest-streptavidin-PE komplexek, antitest-aggregátumok által létrehozott pozitív események a MV kapun belül (A): az anti-HFGP-846 és anti-egér IgGAM antitestek végkoncentrációja 0,4  $\mu\text{g/ml}$  és 0,3  $\mu\text{g/ml}$  volt. A biotin/streptavidin komplex esetében az események száma a két komponens arányának megfelelően változott. A biotinilált anti-egér IgM-et és streptavidin-PE-t 1 $\mu\text{l}$ /0,1 $\mu\text{l}$  és 0,01  $\mu\text{l}$ /1 $\mu\text{l}$  arányban vizsgáltuk. Az eseményeket a MV kapun belül tüntettük fel. (B): 5 $\mu\text{l}$  anti-CD41-PE-nel festett, hígított vérplazmában mérhető eseményszámok intenzív keverés és 0,05%-os Triton-X-100 kezelés után. Az ábrán az összeseményszámot ábrázoltuk.**

#### 4.3.4.7. Az MV preparátumokat IK-k szennyezhetik

Az előbbieken bemutattuk, hogy a biológiai mintákban található IK-k jelentősen befolyásolhatják az MV-kre vonatkozó áramlási citometriás eredményeket. Következő kérdésünk az volt, az IK-k jelen vannak-e a biológiai mintákból jelenleg általánosan alkalmazott eljárásokkal izolált MV preparátumokban (220, 221). A kérdés megválaszolása érdekében OA-s és RA-s SF mintákból MV-eket izoláltunk (20 500g 60 perc ultracentrifugálással), majd a preparátumot anti-humán IgM-FITC-el illetve anti-humán IgG-FITC-el inkubáltuk. A festődést fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Az RA-s SF mintából származó MV preparátum esetében jóval erősebb fluoreszcenciát észleltünk, mint az OA-s minta esetében (23/a ábra). Az áramlási citometriás

eredményeink fényében feltételeztük, hogy a fokozott festődés az RA-s SF mintákban nagyobb mennyiségben jelenlévő IK-knak köszönhető. Az MV-k felszínéhez kötődő anti-humán IgM és anti-humán IgG jelenlétét kizárták azon immun-elektronmikroszkópos felvételeink, amelyeken az intakt MV-k felszínén nem volt kimutatható antitestek kötődése (23/b ábra). A 23/b ábrán látható immunpozitív amorf struktúrák feltehetőleg az MV-vel együtt kiülepedett IK-knak felelnek meg. DLS és áramlási citometriás módszerrel szintén alátámasztottuk az előbbieket: a 20 500g üledékben kimutatható volt az IK-k jelenléte (23/c, d ábra).



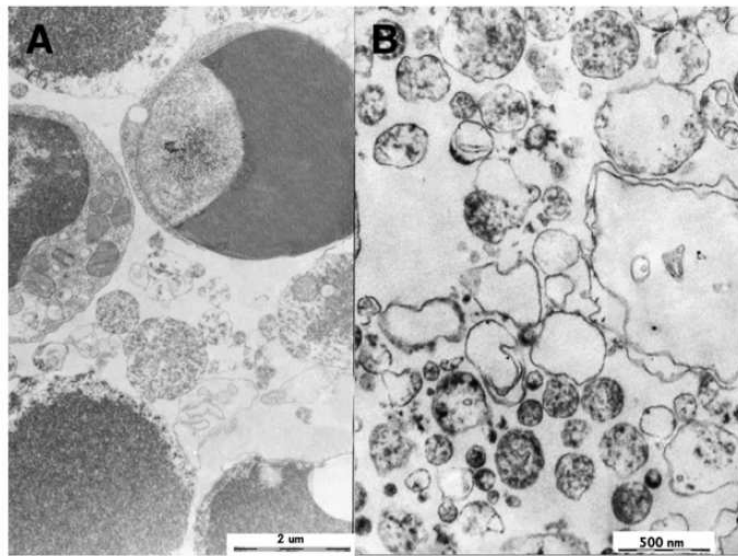
**23. ábra:** *Izolált MV preparátum IK tartalmának vizsgálata (A): OA-s vagy RA-s SF mintákból 20 500g-vel kiülepített, anti-humán IgG-FITC-el illetve anti-humán IgM-FITC-el festett MV-k fluoreszcens mikroszkópos képe. (B): RA-s SF-ből izolált 20 500g-*

*n* izolált üledék immun-elektronmikroszkópos képe. Felhasznált detektáló antitestek: anti-humán IgG-HRP, anti-humán IgM-HRP. A nyilak a jelölődött részletekre mutatnak. (C): IK-k áramlási citometriás kimutatása az üledékből és a felülúszóból. (D): RA-s SF-ből izolált IgG illetve IgM tartalmú IK-k DLS analízise. Az *x* tengelyen logaritmikus skálát alkalmaztunk, *y* tengelyen az autokorrelációs együtthatót tüntettük fel.

#### **4.4. THYMUS EREDETŰ MIKROVEZIKULÁK TÖMEGSPEKTROMETRIÁS ELEMZÉSE**

##### **4.4.1. Thymus eredetű MV-k és apoptotikus testek együttes izolálása**

Munkánk során egér thymusból többlépcsős differenciál-centrifugálási és szűrési eljárással egyidejűleg állítottunk elő MV és apoptotikus test preparátumokat. Az apoptotikus testekről készült transzmissziós elektronmikroszkópos képen megfigyelhető a vezikulatípusra jellemző kondenzált kromatin jelenléte (24/a ábra). Az apoptotikus test preparátum membránvezikulái az 500nm-5 $\mu$ m-ig terjedő mérettartományba estek. Ezzel ellentétben az MV-k 200-800nm méretű, megközelítőleg kerek, illetve szabálytalan átmetszetű struktúráknak bizonyultak (24/b ábra). Az TEM-es képek alapján mindkét típusú vezikulapreparátum ép, és a várt mérettartományba eső membránvezikula populációkat tartalmazott.

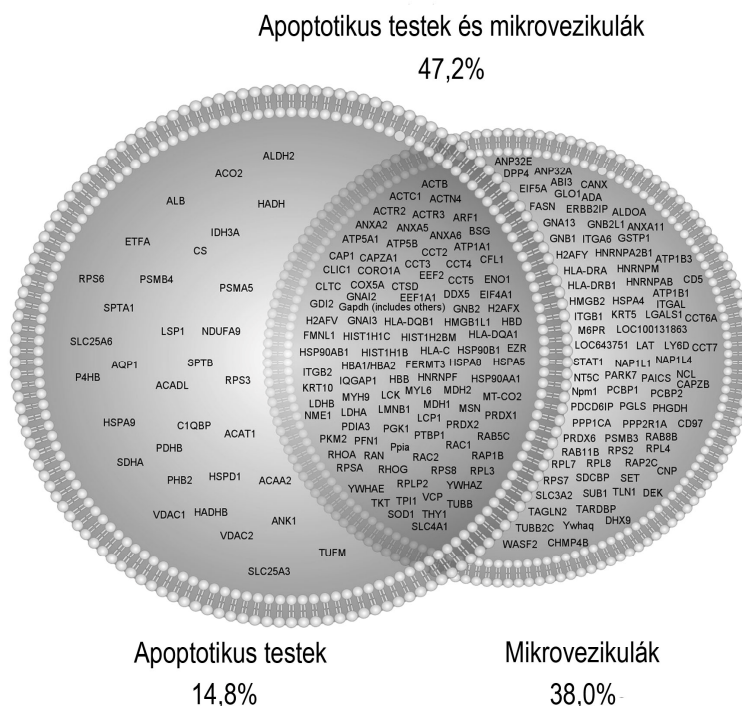


**24. ábra:** Egér thymusból izolált apoptotikus testekről és mikrovezikulákról készült TEM felvételek. (A): Apoptotikus test preparátum, kondenzált kromatinállományt tartalmazó membránvezikulákkal. (B): 200-800nm-es mérettartományba eső MV-ák.

#### 4.4.2. A mikrovezikulák és apoptotikus testek fehérjetartalmának meghatározása

Az MV és apoptotikus test preparátumokból származó, tripszinnel emésztett peptideket nanoLC-MS/MS segítségével elemeztük Raijmakers és mtsai által leírt kritériumokat alkalmazva (222). Akkor tekintettük egy fehérje jelenlétét igazoltnak, ha a tömegspektrometriás elemzéssel legalább két, adott fehérje eredetű peptidfragmentumot egyidejűleg sikerült kimutatnunk.

A fent leírt módszerrel az apoptotikus testekben 142-, az MV-kben pedig 195-féle fehérjét írtunk le. A populációspecifikus és a mindkét vezikulapopulációban egyaránt megtalálható fehérjekomponenseket a 25. ábrán foglaltuk össze. Meglepően magasnak bizonyult a mindkét vezikulapopulációban egyaránt megtalálható fehérjék aránya (47%). Ennél kissé alacsonyabb volt a csak MV-kben található fehérjék aránya (38%), míg az apoptotikus testekre specifikus proteinek a kimutatott fehérjéknek mindössze 15%-át tették ki.

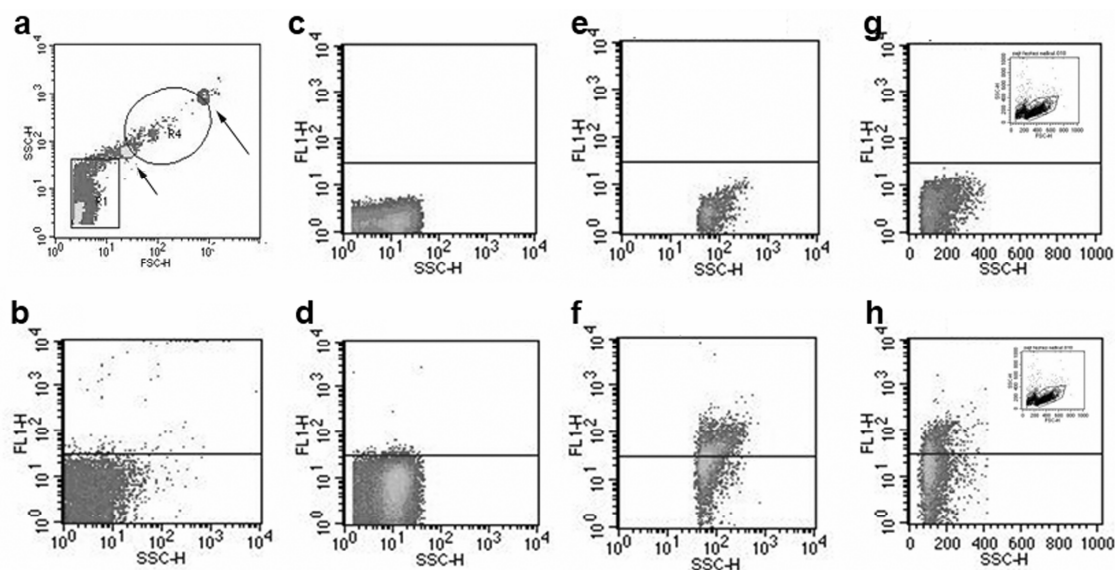


**25. ábra: Egér thymus eredetű apoptotikus testekben és MV-kben tömegspektrometriával azonosított fehérjék.** Az összes azonosított fehérje 14,8%-a bizonyult apoptotikus test, 38%-a pedig MV specifikusnak. A mindkét populációban megtalálható fehérjék aránya 47,2% volt. A fehérjék elnevezésének rövidítése a SwissProt-UniProt adatbázis által alkalmazott rövidítéseknek felel meg.

#### 4.4.3. Vezikulákkal asszociált annexinV kimutatása áramlási citometriával

Tömegspektrometriás fehérjemeghatározás segítségével mind a MV-kben, mind pedig az apoptotikus test preparátumokban azonosítottuk az AnnV proteint (26. ábra). A fehérje jelenlétének megerősítésére áramlási citometriás méréseket végeztünk anti-AnnV antitest segítségével. A tömegspektrometriás adatokat megerősítve mindkét vezikulapopuláció esetén kimutattuk az AnnV jelenlétét. Az apoptotikus testek és a thymocyták felszínén magasabb, míg a MV-k felszínén az előbbi kettővel összehasonlítva alacsonyabb AnnV jelölődést észleltünk.





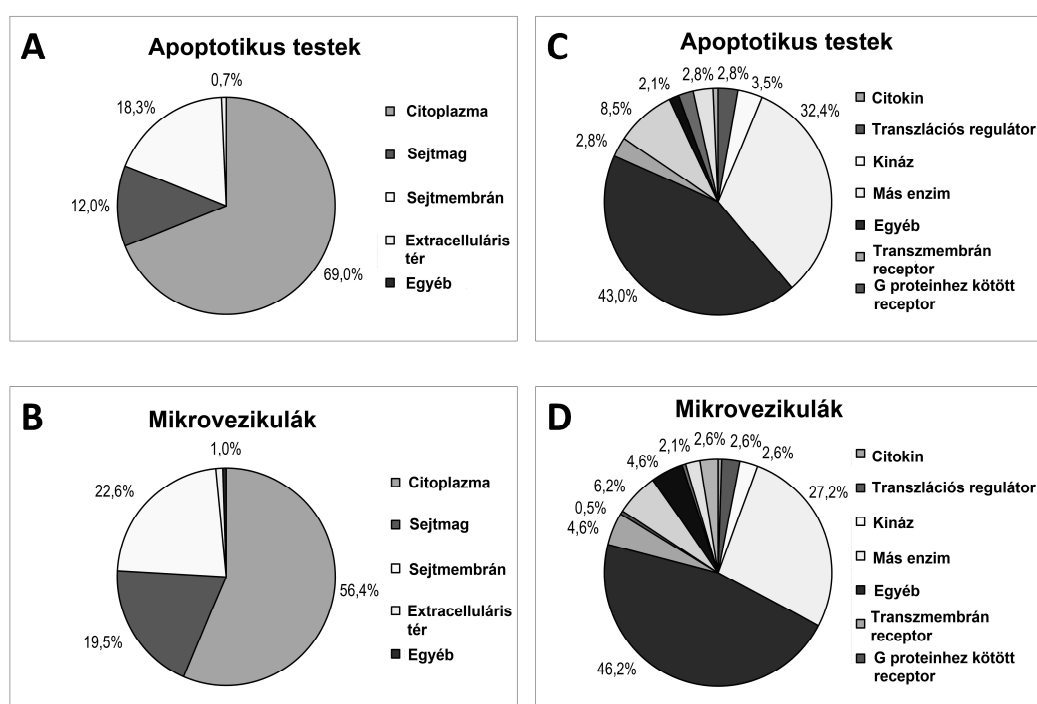
**26. ábra: Thymocyták, MV-k és apoptotikus testek áramlási citometriás analízise (A):** A MV-kre és apoptotikus testekre vonatkozó mérési kapukat 1 és 4  $\mu\text{m}$ -es kalibrációs gyöngyök segítségével állítottuk be. **(B):** Háttér fluoreszcencia inzenzítás: vezikulát nem tartalmazó minta (PBS) festése anti-AnnV és anti-nyúl-FITC festékekkel. **(C):** festetlen MV **(E):** festetlen apoptotikus test **(G):** festetlen thymocyták. **(D, F, H):** anti-AnnV és anti-nyúl-FITC jelölt MV-k, apoptotikus testek, illetve thymocyták. A sejtek vizsgálatakor a konvencionálisan használt mérési beállításokat alkalmaztuk.

#### 4.4.5. Vezikuláris fehérjék csoportosítása lokalizáció és funkció szerint

A vezikuláris fehérjetartalom elemzésének következő lépéseként megvizsgáltuk az extracelluláris vezikula populációkban kimutatott proteinek sejten belüli lokalizációját. Eredményeink szerint az apoptotikus testekben a citoplazmatikus és a membránfehérjék aránya 3,82-nek, MV-kben 2,47-nek adódott. Ez utóbbi alacsonyabb érték feltehetően a MV-k mérethez viszonyított nagyobb membránfelszínének köszönhető. A fehérjék celluláris lokalizációját, illetve a különböző kompartmentumokban detektált proteinek arányát a 27/a,b ábrán foglaltuk össze.

A funkcióra vonatkozó analízis során az általunk kimutatott fehérjék között találtunk enzimeket (köztük kinázokat, peptidázokat), transzportereket, citokineket, ioncsatorna proteineket, transzkripciós, translációs regulátorokat és transzmembrán receptorokat is

(27/c, d ábra). Mindkét vezikulapopulációban kimutattunk citoszkeletális fehérjéket (pl. aktin, tubulin), citoszkeleton-asszociált fehérjéket (ezrin, kofilin-1, moezin), sejanyagcserében szerepet játszó proteineket (GAPDH,  $\alpha$ -enoláz, almasav dehidrogenáz, tejsav dehidrogenáz A és B), valamint dajkafehérjéket (T komplex fehérje alegység, hsp 90). Ez utóbbi molekulákat korábban már exoszómák esetében is leírták (223-225), így elképzelhető, hogy e fehérjék a különböző vezikulatípusok közös alkotórészei.



**27. ábra: Apoptotikus testekkel és mikrovezikulákkal asszociált fehérjék sejten belüli lokalizációja és funkcionális megoszlása**

Meglepő módon nemcsak az apoptotikus testekben, hanem a MV-kben is többféle hisztontípust mutattunk ki. A hisztoneredetű peptidek száma alapján meghatároztuk a valószínűsíthető relatív fehérjemennyiségeket: apoptotikus testek esetében ez 20,3%-nak, MV-k esetében 6,1%-nak adódott. Az azonosított hisztonokat hiszton fehérjecsaládokba sorolva a 7. táblázatban mutatjuk be.

	Apoptotikus test	MV
Fehérje családok	%	%
Hiszton	20,3	6,1
Hiszton H1	1,8	0,6
Hiszton H2A	5,4	1,2
Hiszton H2B	5,2	1,6
Hiszton H3	3,9	1,5
Hiszton H4	4,0	1,1

**7. táblázat:** *Thymus* eredetű apoptotikus testekben és MV-kben azonosított hiszton fehérjék relatív mennyisége.

#### 4.4.6. Mikrovezikuláris fehérjék funkciójának vizsgálata Ingenuity útvonalelemzéssel

Ingenuity útvonalelemzéssel meghatároztuk azokat a fő biológiai funkciócsoportokat, amelyekbe a vezikuláris fehérjék többségét besorolhattuk (8. táblázat). Számos olyan fehérjét találtunk, amely összefüggésbe hozható a Rho által szabályozott, aktin alapú sejtmotilitási útvonalakkal, az apoptózissal és a különböző jelátviteli kaszkádokkal.

Sejt funkció	p-érték	Fehérjék száma
Sejtmozgás	6,40E-18 – 7,14E-03	51
Sejthalál	9,97E-12 – 8,15E-03	58
Szignalizációs útvonalak	3,61E-10 – 7,34E-03	33
Sejt anyagcsere	8,54E-09 – 5,20E-03	38

Szignalizációs útvonal	p-érték	Fehérjék száma
Leukocita extravazáció	2,61E-11	15
Rho szabályozott aktin alapú sejtmotilitás	8,52E-11	11
Aktin alapú citoskeleton szignalizáció	1,58E-10	15

**8. táblázat:** *Thymus sejtekből izolált MV-k fehérjéihez köthető biológiai funkciók. Az MV-kből kimutatott fehérjékhez köthető funkciókat Ingenuity útvonalelemzéssel határoztuk meg.*

#### **4.4.7. Az általunk azonosított mikrovezikuláris és apoptotikus test fehérjék összevetése az Exocarta adatbázisban található fehérjékkel**

Az általunk azonosított fehérjéket munkánk során összevetettük az Exocarta adatbázissal (Exocarta Database 2.2), amely az irodalomban leírt exoszómális fehérjéket foglalja magába. Számos olyan proteint mutattunk ki a két vezikulatípusban, amelyeket az adatbázisban nem találtunk meg: munkánk során 25 apoptotikus test, 45 mikrovezikuláris, és 32 mindkét populációban jelen lévő új fehérjét azonosítottunk.

## 5. MEGBESZÉLÉS

Az RA rendkívül összetett patomechanizmussal jellemezhető, szisztémás autoimmun megbetegedés. Kialakulásának pontos mechanizmusa máig feltáratlan annak ellenére, hogy a betegséggel kapcsolatos ismereteink az utóbbi évtizedekben egyre gyorsuló ütemben bővülnek. Számos irodalmi adat utal a természetes autoantitestek, EV-k és a T sejtek szerepére a betegség kialakításában, ugyanakkor az általuk szabályozott folyamatokra vonatkozó tudásunk korántsem teljes. Munkánk során az immunitás e biomarkerként is alkalmazható komponenseit vizsgáltuk RA-ban.

**I.** A szénhidrát-specifikus antitestek létezése szervezetünkben évtizedek óta ismert tény. Példaként említhetjük a legjobban ismert szénhidrát-specifikus antitestek közé tartozó, a vércsoport-antigéneket felismerő immunoglobulinokat, amelyek leírása Karl Landsteinernevéhez fűződik (226). Az autoimmun betegségekben játszott szerepükre 1998-ban Adderson és mtsai munkája hívta fel a figyelmet. Kimutatták, hogy a rheumás lázban szenvedő páciensekből származó lymphocyták többek között N-acetyl-b-D-glükózaminnal erősen keresztreakáló anti-miozin antitesteket termelnek (227). Az ízületi hyalinporc és SF nagy mennyiségű szénhidrátot (HA, CS és KS) tartalmaz. Krónikus arthritises gyulladáson alapuló folyamatok során a porc degradálódik, amelynek következménye -többek között- a fenti szénhidrát-komponensek felszabadulása az ízületi porc alapállományából, ezáltal hozzáférhetővé válva az immunrendszer számára (228, 229). Meglepő módon a szénhidrátellenes antitestek RA-ban betöltött szerepére vonatkozóan igen kevés az irodalmi adat.

Munkánk során RA-ban a szénhidrátellenes autoantitestek közül a GAG-ellenes immunoglobulinokat vizsgáltuk. Eredményeink szerint a GAG-ellenes antitestek nagy mennyiségben voltak jelen a felnőtt populációban, míg újszülöttek esetében teljesen hiányoztak. Ez a jelenség, valamint a GAG molekulák ismétlődő alegységeket tartalmazó jellegzetes szerkezete arra utal, hogy e molekulák a T sejt independens (TI) antigének közé sorolhatók (230, 231). Mindemellett valószínűsíthető, hogy az általunk kimutatott autoantitestek forrása a 2-es típusú T sejt independens választ (TI2) kiváltó antigénnel reagáló B1 B sejt populáció lehet.

Érdekes módon az IgM és IgG izotípusú autoantitestek szérumkoncentrációi között pozitív összefüggést detektáltunk. A kérdést tovább vizsgálva az immunreaktivásra vonatkozó vizsgálataink során azt találtuk, hogy az általunk vizsgált autoantitestek a különböző GAG molekulákkal jelentős keresztreakciót mutatnak, amely az IgM és IgG molekulák természetes autoantitest jellegére utal. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a szérumkoncentrációk közötti pozitív összefüggés sokkal kevésbé volt kifejezett az IgG izotípusú autoantitestek esetében. A két GAG-ellenes antitest-populáció között (IgG és IgM) kimutatott különbség az IgG izotípusú fehérjék eltérő eredetére utalhat. A vizsgált IgG populáció létrejöttében fontos szerepet tölthetnek be az izotípusváltást elősegítő T sejtek. Ezt a hipotézist erősíti meg a GAG felismerésre képes T sejtek jelenléte az RA-ban szenvedő páciensekben és az arthritis állatmodellekben (232). A közelmúlt eredményei tükrében a T sejtek mellett felvetődik a neutrophil granulocyták szerepe a klasszikusan T sejt independensnek (TI) tartott antigénnel szembeni B sejt válasz kialakításában (233). Azonban a fentiekben ismertetett kísérleteink idejében ezek az újabb adatok még nem álltak rendelkezésünkre.

Az RA szérum minták GAG-specifikus autoantitest tartalmát az egészségesekből származó kontroll mintákkal összevetve az anti-GAG IgM és bizonyos anti-GAG IgG antitestek szintjének emelkedését észleltük. Az autoantitestek nemcsak a perifériás keringésben és a SF-ban voltak jelen, hanem egyben képesek voltak kötődni a porc alapállományához is. A szérumban és a SF-ben jelen lévő GAG-specifikus antitestek arányát vizsgálva az IgM antitestek esetében az IgG-hez viszonyítva kisebb értéket kaptunk. Azaz IgM esetében az SF-ben mértünk kisebb koncentrációértékeket a szérummal összehasonlítva, IgG esetében pedig éppen fordítva. Ez az eredmény ellene szól annak, hogy a szénhidrát-specifikus IgM autoantitestek lokálisan, a synoviális membránban keletkeznének. Ugyanakkor feltételezhető, hogy RA-ban az autoantitest-szintekben mért emelkedés a gyulladás következtében a porcból nagy mennyiségben felszabaduló GAG molekulák jelenlétében aktiválódott B1b limfocitáknak köszönhető. Ezt támasztja alá az az irodalomban leírt korábbi megfigyelés, amely szerint míg a B1a (CD5+) B sejtek folyamatosan alacsony aktivitást mutatnak, addig a TI2 antigén válaszáért felelős B1b (CD5-) B sejtek aktivációs foka stimuláció hatására jelentősen növekedhet (234, 235).

Következő lépésként azt elemeztük, hogy az anti-GAG antitest-koncentrációk változásai összefüggésbe hozhatók-e a betegség aktivitásával. Többlépcsős statisztikai elemzést végezve megállapítottuk, hogy a CSC-specifikus IgM antitest szintek és az RA aktivitása között erős inverz korreláció volt kimutatható. Hasonló összefüggést mutattunk ki az ismert betegségaktivitás-marker fehérje, a CRP és az anti-CSC IgM koncentrációk között. Így az anti-CSC IgM szint az RA aktivitási markerének tekinthető. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az anti-GAG szintek csökkenése az RA aktív fázisában annak tulajdonítható, hogy az antitestek a fokozódó gyulladásos folyamatok során a porcból egyre nagyobb mennyiségben felszabaduló GAG molekulákhoz kötődnek, és ennek köszönhetően a perifériás vérben kimutatható szabad autoantitest szint csökken.

Az újszülöttekben a GAG-ellenes antitestek hiánya, illetve a felnőttekben kimutatott autoantitestek erősen keresztreaktív jellege miatt felmerül a lehetőség, hogy az antitest-termelés kiváltásában szerepe lehet a környezeti mikrobiális szénhidrátoknak és glikozilált antigéneknek. Vizsgálataink szerint az anti-GAG immunoglobulinok valóban felismerték a bakteriális peptidoglikánokat és a gomba poliszaharidot, a zimoszánt. Az antitestek mikrobiális szenzitizációs eredetének lehetősége segíthet értelmezni a szénhidrátellenes autoantitestek hiányát újszülöttekben, valamint utalhat a fertőző ágensek RA kialakulásában betöltött szerepére.

A kérdést tovább vizsgálva, a szérumeredetű antitestek glikozidázokkal emésztett aggregátum molekulákkal szembeni immunreaktivitását jellemeztük. Az aggregátum a hyalinporc egyik fő makromolekulája, és nagyszámú GAG-oldallánccal rendelkezik. Enzimatis emésztés hatására az antitest-reaktivitás szignifikánsan nagyobbak bizonyult mind  $\beta$ -galaktozidáz, mind pedig hialuronidáz esetében. A hialuronidáz a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* vagy *Clostridium perfringens* virulencia faktoraként ismert (236-238), míg a  $\beta$ -galaktozidáz expresszióját kimutatták többek között a széleskörben előforduló *Escherichia coli*ban (239). Elképzelhető, hogy fertőzés hatására, a fertőző ágensek glikozidáz enzimjeinek köszönhetően, a szervezetben szénhidrát neoepitópok jöhetnek létre. Ugyanakkor az immunrendszer antigénfelismerése szempontjából nemcsak az egyes GAG molekulák jelenléte lehet döntő: a saját/idegen antigén megkülönböztetésében fontos szerepet játszhat a sejtfelszíni szénhidrátmintázat (83).

Mivel a glikozidázok - eredményeink szerint - megváltoztathatják a proteoglikánok szerkezetét, hasonló hatást fejthetnek ki mind az alapállományban, mind a sejtfelszíni proteoglikán molekulák esetében, tehát alapvetően megváltoztathatják a szöveti glikozilációs mintázatot. Szénhidrát array-t alkalmazva megkíséreltük meghatározni a szérum és SF IgG autoantitestek szénhidrát-antigénfelismerési mintázatát RA-s beteg és egészséges kontroll mintákban. Ugyan a kísérlet során nem tudtunk betegség-specifikus antigén-felismerési mintázatot meghatározni, de ennek oka lehetett az a technikai nehézség, hogy az aktuálisan elérhető szénhidrát array-k nem rendelkeztek a szükséges komplexitással.

Érdekes módon, a magas anti-GAG antitest szintek kevésbé súlyos RA megjelenési formával asszociálnak. Lehetséges magyarázatot jelenthet, hogy a természetes anti-GAG antitestek védő funkciót látnak el a saját molekulák immunrendszert aktiváló hatásával szemben. Hozzáköthetnek a degradálódó porcból felszabaduló szénhidrát-tartalmú molekulakomplexekhez, így gátolva azok kötődését az olyan aktiváló receptorokhoz, mint például a Toll-like receptorok (TLR). Mind a HA és HS molekula fragmentumok, mind pedig a proteoglikánok ismert TLR ligandok (83). A GAG-epitópok immunrendszer előli „elrejtésével” a természetes autoantitestek hozzájárulhatnak az autoimmun folyamatok kialakulásának megelőzéséhez.

**II.** Az autoimmun megbetegedésekben a B sejtek mellett a T sejtek fontosságára számos adat utal (240). A B sejtek által termelt természetes autoantitestek elemzését követően, munkánk folytatásaként, a citrullinációnak (az RA-val ismert módon összefüggő poszttranszlációs fehérjemódosulásnak) a T sejttes válaszra gyakorolt hatását vizsgáltuk PGIA állatmodellben. Számos jel mutat arra, hogy a RA-hoz vezető immunreguláció-zavar és immuntolerancia-hiány már évekkel/évtizedekkel a klinikai tünetek megjelenése előtt kialakulhat a szervezetben. A betegségre specifikus anti-CCP autoantitestek megjelenése a humán betegségben (241) és PGIA-ban (242) gyakran évekkel megelőzi a diagnózist, rámutatva a citrullinációnak az RA kialakulásában betöltött alapvető szerepére.

Kísérleteinkben elsőként azt vizsgáltuk, hogy a citrullinációért felelős Pad2 és Pad4 enzimeket kódoló gének expressziója kimutatható-e a PGIA-ra érzékeny BALB/c egerek nyirokszerveiben. A két gén expressziós mintázata a különböző szervekben



jelentősen eltért. Érdekes kérdést jelenthet a két Pad izoenzim szubsztrát preferenciájának összehasonlítása. Eltérés esetében elképzelhető, hogy a thymusban és a csontvelőben más-más peptidrepertoár citrullinálódik. Az eltérően módosított autoantigén-készletből származó peptidek eltérően befolyásolhatják a thymusban zajló T sejt, és a csontvelői B sejt szelekciós mechanizmusokat. Ennek köszönhetően a periférián az antigénfelismerés szempontjából egymásnak nem teljes egészében megfeleltethető autoantigén-specifitással jellemezhető lymphocytapopulációk lehetnek jelen.

A következőekben a T sejt felismerés molekuláris elemzése céljából kísérleteinket egy korábban részletesen jellemzett modellrendszerben folytattuk. Kiválasztottunk egy betegségben releváns immundomináns, arginintartalmú porc aggregátum T sejt epitópot (huATE-RR), majd annak különböző citrullinált változatait állítottuk elő szintetikusán. A vad típusú és citrullinált peptidek hatását a PGIA-ra genetikai hajlamot mutató BALB/c, és a huATE-RR-specifikus TCR-tg egértörzsekben vizsgáltuk. Kísérleteink során a perifériás T sejt repertoárban citrullinált epitópokat is felismerő T sejteket mutattunk ki. Ez alapján is valószínűsíthető, hogy a thymusban zajló poszttranszlációs módosulások hatással lehetnek a perifériás T sejt repertoár kialakítására.

A T sejt felismerés feltétele, hogy a peptidbemutató MHC molekulák segítségével történjen. Érdekes kérdést jelent a peptiden belül különböző helyeken történő citrullináció hatásának vizsgálata a peptidek MHC kötődésének szempontjából. A citrullináció eredményeink szerint pozíciófüggő módon csökkentette vagy növelte a peptidepitópok kötődését az MHC molekulákhoz. A kísérleteinkben alkalmazott huATE-RX peptid (mely esetében a citrullináció az MHC horgonypozícióban történt) mutatta a leggyengébb MHC-kötődést, míg a legerősebbet a huATE-XX, amely esetében a TCR-rel kapcsolatot létesítő aminosav is citrullinált volt. Ez utóbbi jelenségre magyarázatot jelenthet az MHC molekula peptidkötő zsebében fellépő „register shift” mechanizmus (243, 244).

Az arthritogén fajidegen (humán) peptidszekvenciák mellett vizsgáltuk a megfelelő saját (egér) szekvenciák immunogenitását is. A saját peptiddel történt immunizáció nem meglepő módon jóval kisebb mértékű primer immunválaszt indukált, mint a fajidegen, humán szekvencia. Ugyanakkor a natív és citrullinált saját peptidvariánst (mATE-R és mATE-X) összehasonlítva elmondható, hogy a citrullinált változat, az mATE-X

szignifikánsan nagyobb immunválaszt váltott ki naív egérbe oltva. Ez arra utalhat, hogy bizonyos citrullinált epitópspecifikus T sejt klónok elkerülhetik a centrális tolerancia mechanizmus révén történő eliminációt. Ugyanakkor sem a PGIA-ban szenvedő, sem a TCR-tg állatokban nem tapasztaltuk a citrullinált ATE peptidek megkülönböztetett felismerését a vad típusú peptiddel összehasonlítva. Mindez az ellen szól, hogy a fenti állatmodellben az ATE szekvencia citrullinációja kulcsszerepet játszik az arthritis kialakításában. Ennek ellenére az a jelenség, hogy a citrullinált saját epitóp a vad típushoz képest erősebb autoimmun válasz kiváltására képes, felhívja a figyelmet a citrullináció a T sejt epitóp immunogenitást befolyásoló szerepére. Eredményeink alapján a jövőben a citrullinációt érdemes lenne a T sejt epitóptérképezést célzó munkák során is figyelembe venni. Citrullinált fajidegen/saját peptid szekvenciákból álló könyvtárak létrehozásával meghatározható lenne a T sejt epitóphierarchia és az a szekvencia, amely bizonyos RA-s folyamatokban a patológiás T sejt válasz kiváltásáért felelős lehet.

**III.** A disszertáció harmadik részében bemutatott munka az EV-k témakörében született. Napjainkban robbanásszerűen nő azon közlemények száma, amelyek az intracelluláris kommunikáció ezen újonnan felfedezett részvevőinek, az EV-knek és különböző betegségeknek a lehetséges kapcsolatát kutatják. Számos tanulmány tárgyat képezik olyan vizsgálatok, amelyek a MV (korábbi nevén mikropartikula) szám változásait biomarkerként különböző betegségekkel hozzák összefüggésbe. Az elsősorban áramlási citometriás méréseket alkalmazó munkákban leírt MV-kre vonatkozó információkat saját eredményeink alapján igen körültekintően érdemes mérlegelni.

Az MV-k tulajdonságainak elemzéséhez alapvetően két út áll rendelkezésünkre. Az egyik a mintából való kiülepítés, a másik pedig az eredeti biológiai közegben történő vizsgálat. Munkánkban mindkét megközelítés alkalmazásával, különféle módszerekkel elemeztük a humán vérplazma és SF eredetű MV-k méreteloszlását. A biológiai mintákból izolált MV preparátumok vizsgálatakor a TEM, AFM és DLS analízis eredményeképpen igen hasonló eredményeket kaptunk. A plazma és az SF mintákban a MV-k átlagátmérője 80 és 400nm közöttinek adódott. Mivel ezt az eredményt az MV

preparátumok felhasználásával kaptuk, következő lépésként a natív mintákban DLS segítségével mérhető MV átlagátmérőt állapítottuk meg.

A biológiai folyadékokban a preparátumokból származó adatokkal összevetve enyhén alacsonyabb átlagátmérőket észleltünk, amely valószínűleg a MV izolálás során alkalmazott centrifugálási lépések következménye lehetett. A natív mintákban kimutattunk egy, az izolátumokból hiányzó, 100nm-nél alacsonyabb átlagátmérővel jellemezhető populációt. A kisméretű képletek megfelelhetnek exoszómáknak, lipoproteineknek illetve kisebb fehérjekomplexeknek. A lipoproteinek átlagátmérője az irodalom szerint LDL (*low-density lipoprotein*) esetén 25-27nm (245), HDL (*high density lipoprotein*) esetében 10nm (246), ugyanakkor a trigliceridben gazdag partikulumoké 40-80nm közötti (247). Mivel a MV-k átlagátmérője saját eredményeink és más irodalmi adatok szerint is ennél magasabb tartományba esik (202), a lipoproteinek a MV-ék mérését valószínűleg nem zavarják.

Munkánk folytatásaként a biológiai mintákban gyakran jelenlévő IK-k méreteloszlását határoztuk meg. A DLS és AFM módszerekkel kapott eredményeink szerint a közepes méretű, oldhatatlan IK-k átmérője nagymértékű átfedést mutatott a MV-kével. Ezt az eredményünket megerősítik azok az IK méretre vonatkozó munkák is, amelyekben az átmérő 400-440 nm-nek adódott (248, 249). Áramlási citometria és DLS alkalmazásával megállapítottuk, hogy az oldhatatlan IK-k fényszóródási tulajdonságaik alapján sem különíthetők el a MV populációtól. Ezzel ellentétben az oldódó IK-k illetve a precipitátumok a MV-k mérettartományától messze, vagy a jóval alacsonyabb, vagy pedig a jóval magasabb átmérő tartományba estek.

Mivel a különböző betegségekben a MV-k vizsgálata az eddigiekben nagyrészt áramlási citometriával történt, az IK-k zavaró jelenléte a biológiai mintákban végzett méréseket komolyan befolyásolhatta. Példaként említhető egy közelmúltban megjelent közlemény, amelyben a szerzők RA SF-ből származó MV-k felszínén IgM-t, IgG-t, komplement proteinek, szérum amiloid proteint és CRP-t mutattak ki (250). Áramlási citometria segítségével, AnnV festés alkalmazása nélkül megállapították, hogy a SF-ből származó vezikula preparátumokban emelkedett a MV szám, valamint a vezikulákkal asszociált IgM, IgG, C1q, C3, C4, CRP és szérum amiloid protein szint a kontroll mintákkal összehasonlítva. Az összes említett fehérje ismert komponense az IK-knak (251), amely alapján elképzelhető, hogy a munka során nem MV-eket, hanem IK-kat

detektáltak. Hasonlóképpen, egy közelmúltban megjelent, SLE-s betegek plazmájában MV-eket vizsgáló munka sem vetette fel annak a lehetőségét, hogy a betegségre jellemző IK-k MV-szerű jelet adhatnak áramlási citometriás mérések során (252).

Munkánk során kifejlesztettünk egy egyszerű módszert az IK-k és MV-k egymástól való egyszerű és gyors elkülönítésére. Detergens lízist alkalmazva a két populációból származó fényszóródási jelek egymástól jól elkülöníthetők, az IK-k detergenssel szembeni kisebb érzékenységének köszönhetően. Módszerünket a közelmúltban egy, a Blood folyóiratba érkezett „Letter to the Editor” univerzálisan alkalmazandó kontrollnak javasolja az áramlási citometriás mérésekhez (253).

Az áramlási citometriás MV mérések során további megzavaró, MV-szerű jeleket idézhet elő az alkalmazott antitestek, reagensek komplexképző hatása, aggregációja. Ez elsősorban indirekt immunfluoreszcens jelölés, illetve avidin-biotin komplexek alkalmazása esetében vezethet a MV kapun belül az eseményszám MV-független emelkedéséhez.

Az előbbieket mellett kimutattuk, hogy az IK-k és MV-k méretének egyezése nemcsak az áramlási citometriás méréseket érinti, hanem egyben az MV preparátumok tisztaságát is megkérdőjelezi. Mind a mesterséges, mind pedig a biológiai mintákból izolált IK-k szennyezhetik az ultracentrifugálással előállított MV preparátumokat. Az IK-k jelenléte jól ismert módon az immunrendszer nagyfokú aktivációját eredményezheti. Az IK-kkal szennyezett MV preparátumokkal végzett funkcionális tanulmányok eredménye ezért igen félrevezető lehet. Megoldást jelenthet a MV-k AnnV vagy más sejtfelszíni marker alapján történő affinitásizolálása (163, 254).

A fentieket összegezve, munkánk elsőként hívta fel a figyelmet arra, hogy a biológiai mintákban esetenként jelenlévő IK-k és az immunfluoreszcens jelölés során alkalmazott antitestekből létrejövő IK-k jelentősen befolyásolhatják/zavarhatják a MV-k mérését. Kísérleteink nagymértékben hozzájárultak az MV-k esetleges jövőbeli betegség-specifikus biomarkerként való alkalmazását zavaró analitikai tényezők feltárásához és kiküszöböléséhez.

**IV.** A thymus az autoimmunitás kialakulását megakadályozó centrális immuntolerancia kialakulásának egyik fő színtere. A centrális tolerancia kialakulásában az EV-k (a szöveti antigének ektopiás expresszióját mutató sejtek által termelt, MHC

molekulákat is hordozó, önmagukban is antigénbemutatóra képes szubcelluláris képletek (197) feltehetőleg igen fontosak lehetnek, azonban erre vonatkozóan nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok. A fentiek miatt munkánk során egér thymuseredetű MV-k és apoptotikus testek proteomikai elemzését tűztük ki célul. Az exoszómákkal ellentétben a MV-k és az apoptotikus testek fehérjetartalmára vonatkozóan kevés irodalmi adat érhető el. Mivel a thymusban bemutatott saját peptidek ismert módon alapvető szerepet játszanak a T sejt szelekciós folyamatok irányításában, felvetődött, hogy a thymus MV-k és apoptotikus testek a szelekciós mechanizmusban részt vevő peptidek szélesebb körű megjelenését segíthetik elő. Kísérletes munkánk során nem detektáltunk sem a MV-kkel, sem pedig az apoptotikus testekkel asszociált, jellegzetesen thymuson kívüli szöveti expresszióval jellemezhető fehérjét. Ez azonban nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy ezek az ektópiásan expresszáló fehérjék igen kis koncentrációban mégis jelen voltak a vezikulákban, de a mennyiségük nem haladta meg a tömegspektrometria detektálási küszöbét. Ugyanakkor a thymocytá eredetű vezikulákban számos fehérjét azonosítottunk, amelyek lehetővé tehetik a membrán vezikulák thymusban lejátszódó folyamatokban való részvételének jobb megértését.

Az azonosított proteinek egyik csoportja humán autoimmun betegségekben azonosított autoantigénként ismert. Mind a thymus eredetű MV-k, mind pedig az apoptotikus testek tartalmaztak  $\alpha$ -enolázt. A többek között glikolízisben fontos szerepet játszó fehérjéről ismert, hogy autoimmun felismerése (különösen citrullinált formában) szerepet játszhat az RA-ban (82, 255). Emellett a thymuseredetű vezikulákban azonosítottuk az atherosclerosisban autoantigénként megjelenő hősokk fehérjék jelenlétét is (256, 257). A további autoantigének közé sorolhatjuk a szintén mindkét vezikula populációban kimutatott hiszton proteineket (H1-H4). A nukleoszóma fő komponenseiként a DNS-kötő fehérjéket jelenleg az SLE fő autoantigénjeiként ismerjük (258). A különböző autoimmun betegségekkel összefüggésbe hozható autoantigének jelenléte a thymusvezikulákban kiemelten érdekes jelenség. A vezikuláris fehérjetartalom alapján elképzelhető, hogy az EV-k szerepet játszhatnak a centrális toleranciát kialakító folyamatokban, amelyben létrejövő defektusok a patológias autoimmunitás kialakításához vezethetnek.

Az apoptotikus testekben a hisztonfehérjék jelenléte - figyelembe véve a vezikulák keletkezési mechanizmusát - nem meglepő. A tömegspektrometriás elemzés eredményeképpen azonban nemcsak az apoptotikus testekben, hanem a MV populációban is nagy mennyiségben mutattunk ki hisztonokat. A hisztonfehérjék jelenlétét figyelembe véve valószínű, hogy a thymuseredetű MV-k nagy része szintén apoptotikus folyamatok során jön létre.

Az ismert autoantigének mellett a vezikulákban sikerült számos szabályozó folyamatban és jelátviteli útvonalban szerepet játszó fehérjét azonosítanunk. Példaként néhány fontosabbat emelünk ki a következőkben.

Kimutattuk az E2F transzkripciós faktor fehérjét a vezikulákban. A transzkripciós faktor család tagjai részt vesznek a sejtciklus szabályozásában, az emlős sejtek DNS szintézisében, tumorigenezisben, apoptotikus és a sejt differenciációs folyamatokban (259). További a thymusvezikulákban azonosított szabályozó fehérjék közé tartozik az Lck, a galektin-1 és a kalmodulin. A tirozin kinázok közé tartozó Lck a T sejtek TCR által közvetített jelátviteli folyamataiban alapvető fontosságú, így szerepe a T sejt szelektív mechanizmusokban számottevő. A galektin-1 az apoptózis indukciójában, T sejtek esetében a sejtthál szabályozásában játszik szerepet (260, 261). A kalmodulin a  $Ca^{2+}$  kötő proteinek közé sorolható, amelyek számos folyamatot szabályoznak, köztük a lymphocita aktivációt és érést. Az azonosított további molekulák közé tartoznak az antigénbemutató sejt és T sejtek között létrejövő kapcsolatban érintett sejt felszíni proteinek is. A MHCI, MHCII, CD5 és CD97 molekulák jelenlétét kimutattuk MV-ben, míg a CD45 jelenlétét mindkét vezikula populációban igazoltuk.

Az előzőekben röviden jellemzett molekulák vezikuláris lokalizációja az EV-knek a T sejt differenciációs és antigénfelismerési folyamatokban betöltött esetleges funkciójára utalhatnak. A thymusban igen intenzíven zajlik apoptózis (262), amely egyben extracelluláris vezikulák nagy mennyiségben való keletkezéséhez vezethet. Így ezek a struktúrák nagyban hozzájárulhatnak a thymus belső mikrokozmoszában lejátszódó mechanizmusok módosításához, szabályozásához.

Végül a vezikulákban kimutatott fehérjékből összeállított adatbázis segítségével útvonalelemzést végeztünk. Számos vezikuláris, a sejtek aktin alapú mozgási folyamataiban szerepet játszó fehérjét azonosítottunk. Ide sorolható a kis GTPáz fehérjék közé tartozó RhoA, amely a MV-kben és apoptotikus testekben egyaránt jelen

volt. Crespin és mtsai kimutatták, hogy a fehérjéhez köthető Rac1/Cdc42/PAK útvonal az aktin újraszerveződését irányítja, amely szükséges a vérlemezke MV felszabaduláshoz (263). A Cdc42/Rac1/Rho útvonal elemeinek vezikuláris jelenléte utalhat a thymocyta eredetű vezikulák keletkezési mechanizmusára.

A fentiek mellett számos olyan fehérjét azonosítottunk a vezikulákban, melyek a leukocyták érfalon való átjutását szabályozzák. A korábban említett RhoA molekuláról ismert, hogy fiziológiás körülmények között az endothelréteg által kialakított barrier integritásának megőrzésében játszik szerepet. Az endothelsejtek trombin hatására bekövetkező aktivációjakor ugyanakkor szerepe ezzel éppen ellentétes: az endotheliális barrier funkció károsodásához járul hozzá. A thymus epithelréteg és annak integritása a vér-thymus gát, illetve a thymus megfelelő működésének alapfeltétele. Ezek alapján valószínűleg a RhoA fehérje további feladatai közé tartozhat a transzendotheliális thymocyta transzport lehetővé tétele és szabályozása.

Eredményeink szerint a vezikuláknak szerepük lehet a thymus homeosztázisának fenntartásában, de a pontos mechanizmus feltárására (a fentebb említett mechanizmusokhoz hasonlóan) még további kísérletek szükségesek.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

### 1. Glükózaminoglikán (GAG)-ellenes természetes autoantitestek vizsgálata rheumatoid arthritisben (RA)

A betegségben eredményeink alapján a szérum és a synoviális folyadék anti-GAG természetes autoantitestek szintje emelkedett. A szénhidrátellenes antitestek közül az anti-kondroitin szulfát C (anti-CSC) antitestek szérumkoncentrációja, illetve az RA betegség-aktivitása között inverz korrelációt találtunk. Így eredményeink alapján az anti-CSC antitest-koncentrációt betegség-aktivitási biomarkernek tekinthetjük.

### 2. A peptidcitrullináció szerepe a T sejtek általi antigén-felismerésben

Munkánk során az RA egy egérmodelljében, az aggregán arthritisben (PGIA) vizsgáltuk a peptidcitrullináció T sejt felismerésre kifejtett hatását. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy egy adott immunodomináns, aggregán eredetű T sejt epitópszekvencia (P70-84), és ennek citrullinált változatai jelentős IFN $\gamma$ -választ indukáltak peptiddel immunizált mind a BALB/c, mind a peptidepitóp-specifikus T sejt receptor transzgenikus egerekben. Kimutattuk, hogy az egér thymusban és egyéb nyirokszervekben egyaránt expresszálódnak a citrullinációért felelős ezimeket kódoló *Padi2* és *Padi4* gének, felvetve a poszttranszlációs módosítás lehetséges hatását a T és B sejt szelekciós mechanizmusokra. A perifériás T sejt válasz vizsgálatokor azt találtuk, hogy a citrullinált saját (egér) peptidváltozat szignifikánsan erősebb választ váltott ki a vad típusúval összehasonlítva. Így eredményeink alapján feltételezzük, hogy a citrullináció jelentősen befolyásolhatja a kialakuló T sejt választ.

### 3. A sejteredetű mikrovezikulák (MV) és proteinkomplexek biofizikai paramétereinek vizsgálata

Számos áramlási citometriás vizsgálat írt le összefüggést a biológiai mintákban jelenlévő extracelluláris vezikulák száma és a különböző betegségtípusok között. Eredményeink felhívják a figyelmet a vezikulaszám meghatározását befolyásoló analitikai tényezőkre. Kimutattuk, hogy a mintákban jelenlévő immunkomplexek és az áramlási citometria során alkalmazott antitestek által képzett antitest-aggregátumok jelentősen befolyásolhatják a mérési eredményeket. Kifejlesztettünk egy egyszerű, az



áramlási citometriás vizsgálatok során széleskörben alkalmazható módszert a MV-k és fehérjekomplexek elkülönítésére. Eredményeink elősegíthetik a membrán vezikulák biomarkerként való alkalmazása esetében elengedhetetlen módszertani standardizációt.

#### **4. A thymuseredetű MV-k és apoptotikus testek proteomikai elemzése BALB/c egérben**

Az MV-k és apoptotikus testek fehérje-összetételének elemzését célzó munkánkban nagyfokú hasonlóságot mutattunk ki a thymuseredetű MV-k és az apoptotikus testek fehérjetartalmában. Számos, általunk azonosított fehérje jelenléte arra utal, hogy a két vezikulatípus a thymusban elsősorban apoptózis során keletkezhet. Eredményeink alapján valószínűsíthetjük, hogy mind az MV-knek, mind pedig az apoptotikus testeknek összetett szerepük lehet az immunológiai folyamatok, így végső soron a thymus működésének szabályozásában.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A rheumatoid arthritis (RA) patomechanizmusában a T és B sejtek egyaránt fontos szerepet töltenek be. Munkánk során RA-s páciensek esetében emelkedett glükózaminoglikán (GAG)-ellenes autoantitest-szinteket mértünk, és bizonyítottuk, hogy e természetes autoantitestek kötődnek a humán porc alapállományához. Az anti-GAG antitestek közül a kondroitin szulfát C (CSC)-ellenes IgM immunglobulinról igazoltuk, hogy szintje a betegség aktivitásával fordított arányosságot mutat, így az anti-CSC autoantitestek betegségaktivitás-specifikus biomarkereknek tekinthetőek.

Számos irodalmi adat utal a B sejtek mellett a T sejtek szerepére az RA kialakításában. Vizsgálataink során elemeztük a peptidcitullináció hatását a T sejtes antigénfelismerésre. Kimutattuk, hogy aggregált arthritis modellben és T sejt receptor transzgenikus egerekben a T sejtek képesek a különböző pozícióban citrullinált peptidok megkülönböztetésére. Eredményeink szerint a BALB/c egér thymusban, lépben és csontvelőben kifejeződnek a citrullinációért felelős izoenzimeket kódoló *Padi* gének. A periférián a citrullinált saját epitóp a vad típusú variánsal összehasonlítva szignifikánsan magasabb IFN $\gamma$ -termelő T sejt választ indukált, bizonyítva a citrullináció fontos szerepét a T sejt felismerési folyamatokban.

Harmadik biomarker kategóriaként az extracelluláris vezikulákat vizsgáltuk. A humán synoviális folyadék eredetű mikrovezikulák (MV) vizsgálata kapcsán bizonyítottuk, hogy az MV-k és a fehérjekomplexek számos biofizikai paraméterüket tekintve megegyeznek. A vezikulák áramlási citometriás mérését megnehezítő tényezők jelenlétének kizárására detergenslízist alkalmazó módszert fejlesztettünk ki.

Az MV-k vizsgálatára széleskörben alkalmazott áramlási citometriás mérési eljárás továbbfejlesztése mellett vizsgáltuk, hogy szerepet játszhatnak-e a centrális tolerancia kialakításában a thymuseredetű MV-k és apoptotikus testek. A proteomikai vizsgálat számos korábban autoantigénként azonosított fehérje (pl.  $\alpha$ -enoláz, hősokk fehérjék) jelenlétét igazolta a vizsgált vezikulapopulációkban. Eredményeink arra utalnak, hogy a thymocytá eredetű extracelluláris vezikulapopulációk fontos szerepet tölthetnek be a thymus működésének szabályozásában, és szerepet játszhatnak az autoantigénnel szembeni tolerancia kialakításában.

## 8. SUMMARY

Increasing number of evidences support the hypothesis that both T and B cells play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). In our work we showed that the levels of glycosaminoglycan (GAG) autoantibodies were increased in the sera and synovial fluid samples of patients with RA. Moreover, these anti-GAG antibodies were reactive to the matrix of human articular cartilage. Among the anti-GAG antibodies, anti-CSC IgM levels showed a clear inverse correlation with the activity of the disease. Our results suggest that the level of anti-CSC antibodies is a disease-state biomarker in RA, and may serve as an inexpensive diagnostic tool in the future.

Besides B cells, T lymphocytes are also known to have an instrumental role in the development of RA. In our study we studied the effect of peptide citrullination on antigen recognition by T cells. In aggrecan arthritis (an animal model of RA) and in T cell receptor transgenic mice we found that peptides citrullinated in different positions, are distinguished by lymph node T cells. Assessing immune tissues, we found that *Padi* genes which encode for the isoenzymes responsible for citrullination are expressed in the thymus, spleen and bone marrow of BALB/c mice. In the periphery we measured an increased IFN $\gamma$  T cell response to the citrullinated self-epitope compared to the uncitrullinated self determinant, suggesting that certain citrullinated self-epitope-specific T cells may escape central tolerance induction.

As the third potential biomarker category, we assessed extracellular membrane vesicles. We showed that microvesicles (MVs) derived from human synovial fluid shared several biophysical parameters with protein complexes. To distinguish the flow cytometry signals representing MVs and protein complexes, we have developed a simple new method based on detergent lysis.

We also tested whether MVs and apoptotic bodies could play a key role in the central T cell selection processes. Assessing the protein composition of thymocyte vesicle populations we have detected several proteins previously implicated as autoantigens in human autoimmun diseases (e.g. alpha-enolase, heat shock proteins). Our data may shed light on the possible novel role of membrane vesicles maintaining thymus homeostasis and regulating central selection processes.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. **Turesson C**, Matteson EL. Vasculitis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2009, 21: 35-40
2. **Seldin MF**, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999, 42: 1071-9
3. **MacGregor AJ**, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 30-7
4. **van der Woude D**, Houwing-Duistermaat JJ, Toes RE, Huizinga TW, Thomson W, Worthington J, van der Helm-van Mil AH, de Vries RR. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009, 60: 916-23
5. **Raychaudhuri S**. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010, 22: 109-18
6. **Michou L**, Teixeira VH, Pierlot C, Lasbleiz S, Bardin T, Dieude P, Prum B, Cornelis F, Petit-Teixeira E. Associations between genetic factors, tobacco smoking and autoantibodies in familial and sporadic rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008, 67: 466-70
7. **Klareskog L**, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Ronnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapaa-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 38-46
8. **van der Helm-van Mil AH**, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 425-32
9. **Pryor WA**, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1993, 686: 12-27

10. **Makrygiannakis D**, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L, Catrina AI. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* 2008, 67: 1488-92
11. **Verpoort KN**, Jol-van der Zijde CM, Papendrecht-van der Voort EA, Ioan-Facsinay A, Drijfhout JW, van Tol MJ, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE. Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 3799-808
12. **Carty SM**, Snowden N, Silman AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2004, 63 Suppl 2: ii46-ii9
13. **Zhang X**, Pacheco-Tena C, Inman RD. Microbe hunting in the joints. *Arthritis Rheum* 2003, 49: 479-82
14. **McGraw WT**, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun* 1999, 67: 3248-56
15. **Rosenstein ED**, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004, 28: 311-8
16. **Farhat SC**, Silva CA, Orione MA, Campos LM, Sallum AM, Braga AL. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmun Rev* 2011, 11: 14-21
17. **Mewar D**, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother* 2006, 60: 648-55
18. **Houssien DA**, Jonsson T, Davies E, Scott DL. Clinical significance of IgA rheumatoid factor subclasses in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997, 24: 2119-22
19. **Waalder E**. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS* 2007, 115: 422-38; discussion 39

20. **Nielen MM**, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 380-6
21. **Rantapaa-Dahlqvist S**, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 2741-9
22. **Lindqvist E**, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64: 196-201
23. **Borretzen M**, Chapman C, Natvig JB, Thompson KM. Differences in mutational patterns between rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line gene usage. *Eur J Immunol* 1997, 27: 735-41
24. **Mantovani L**, Wilder RL, Casali P. Human rheumatoid B-1a (CD5+ B) cells make somatically hypermutated high affinity IgM rheumatoid factors. *J Immunol* 1993, 151: 473-88
25. **Edwards JC**, Cambridge G. Rheumatoid arthritis: the predictable effect of small immune complexes in which antibody is also antigen. *Br J Rheumatol* 1998, 37: 126-30
26. **Brown PB**, Nardella FA, Mannik M. Human complement activation by self-associated IgG rheumatoid factors. *Arthritis Rheum* 1982, 25: 1101-7
27. **Nakayama-Hamada M**, Suzuki A, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 327: 192-200
28. **Inagaki M**, Takahara H, Nishi Y, Sugawara K, Sato C. Ca<sup>2+</sup>-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J Biol Chem* 1989, 264: 18119-27

29. **Vossenaar ER**, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003, 25: 1106-18
30. **De Rycke L**, Nicholas AP, Cantaert T, Kruithof E, Echols JD, Vandekerckhove B, Veys EM, De Keyser F, Baeten D. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2005, 52: 2323-30
31. **Foulquier C**, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Mechin MC, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M, Serre G. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 3541-53
32. **Vossenaar ER**. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2004, 63: 373-81
33. **Kinloch A**, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, Moyes D, Taylor PC, Venables PJ. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005, 7: R1421-9
34. **Kinloch A**, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, Saxne T, Malmstrom V, Venables PJ. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 2287-95
35. **Gyorgy B**, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38: 1662-77
36. **Kizawa K**, Takahara H, Troxler H, Kleinert P, Mochida U, Heizmann CW. Specific citrullination causes assembly of a globular S100A3 homotetramer: a putative Ca<sup>2+</sup> modulator matures human hair cuticle. *J Biol Chem* 2008, 283: 5004-13
37. **Proost P**, Loos T, Mortier A, Schutyser E, Gouwy M, Noppen S, Dillen C, Ronsse I, Conings R, Struyf S, Opdenakker G, Maudgal PC, Van Damme J.

- Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *J Exp Med* 2008, 205: 2085-97
38. **Loos T**, Mortier A, Gouwy M, Ronsse I, Put W, Lenaerts JP, Van Damme J, Proost P. Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation. *Blood* 2008, 112: 2648-56
  39. **Nakayama-Hamada M**, Suzuki A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. Citrullinated fibrinogen inhibits thrombin-catalysed fibrin polymerization. *J Biochem* 2008, 144: 393-8
  40. **Okumura N**, Haneishi A, Terasawa F. Citrullinated fibrinogen shows defects in FPA and FPB release and fibrin polymerization catalyzed by thrombin. *Clin Chim Acta* 2009, 401: 119-23
  41. **Weinberg JB**, Phippen AM, Greenberg CS. Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991, 34: 996-1005
  42. **Borders CL, Jr.**, Broadwater JA, Bekeny PA, Salmon JE, Lee AS, Eldridge AM, Pett VB. A structural role for arginine in proteins: multiple hydrogen bonds to backbone carbonyl oxygens. *Protein Sci* 1994, 3: 541-8
  43. **Harauz G**, Musse AA. A tale of two citrullines--structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochem Res* 2007, 32: 137-58
  44. **Pritzker LB**, Joshi S, Harauz G, Moscarello MA. Deimination of myelin basic protein. 2. Effect of methylation of MBP on its deimination by peptidylarginine deiminase. *Biochemistry* 2000, 39: 5382-8
  45. **Wegner N**, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M, Venables PJ. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010, 233: 34-54
  46. **Nienhuis RL**, Mandema E. A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis* 1964, 23: 302-5
  47. **Young BJ**, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979, 2: 97-9



48. **Sebbag M**, Moinard N, Auger I, Clavel C, Arnaud J, Nogueira L, Roudier J, Serre G. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol* 2006, 36: 2250-63
49. **Hoet RM**, Boerbooms AM, Arends M, Ruiters DJ, van Venrooij WJ. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis* 1991, 50: 611-8
50. **Girbal-Neuhausser E**, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessiere C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999, 162: 585-94
51. **Schellekens GA**, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 155-63
52. **Schellekens GA**, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998, 101: 273-81
53. **van Venrooij WJ**, Zendman AJ. Anti-CCP2 antibodies: an overview and perspective of the diagnostic abilities of this serological marker for early rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008, 34: 36-9
54. **Kroot EJ**, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, van de Putte LB, van Rijswijk MH, van Venrooij WJ, van Riel PL. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 1831-5
55. **Vencovsky J**, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterova J, Pesakova V, Ruzickova S. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003, 62: 427-30

56. **Baeten D**, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, Veys EM, De Keyser F. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 2255-62
57. **Masson-Bessiere C**, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001, 166: 4177-84
58. **Matsuo K**, Xiang Y, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Noyori K, Nishioka K, Saito T, Kato T. Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res Ther* 2006, 8: R175
59. **Vander Cruyssen B**, Cantaert T, Nogueira L, Clavel C, De Rycke L, Dendoven A, Sebag M, Deforce D, Vincent C, Elewaut D, Serre G, De Keyser F. Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Res Ther* 2006, 8: R122
60. **Clavel C**, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, Serre G. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 678-88
61. **Zhao X**, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, Tomooka BH, Gregersen PK, Robinson WH. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008, 10: R94
62. **van Venrooij WJ**, Pruijn GJ. An important step towards completing the rheumatoid arthritis cycle. *Arthritis Res Ther* 2008, 10: 117
63. **Despres N**, Boire G, Lopez-Longo FJ, Menard HA. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994, 21: 1027-33
64. **Goldbach-Mansky R**, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, Rosen A, Zhang C, Menard HA, Zhou ZJ, Palosuo T, Van Venrooij

- WJ, Wilder RL, Klippel JH, Schumacher HR, Jr., El-Gabalawy HS. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000, 2: 236-43
65. **Asaga H**, Yamada M, Senshu T.. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 243: 641-6
  66. **Bang H**, Egerer K, Gaudiard A, Luthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, Berg W, Feist E, Burmester GR. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 2503-11
  67. **Mathsson L**, Mullazehi M, Wick MC, Sjoberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, Ronnelid J. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 36-45
  68. **Ursun J**, Nielen MM, van Schaardenburg D, van der Horst AR, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, Hamann D. Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study. *Arthritis Res Ther* 2008, 10: R12
  69. **Luime JJ**, Colin EM, Hazes JM, Lubberts E. Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review. *Ann Rheum Dis* 2010, 69: 337-44
  70. **Burkhardt H**, Sehnert B, Bockermann R, Engstrom A, Kalden JR, Holmdahl R. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2005, 35: 1643-52
  71. **Snir O**, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Lundeberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmstrom V. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis* 2009, 68: 736-43

72. **Cook AD**, Rowley MJ, Mackay IR, Gough A, Emery P. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression. *Arthritis Rheum* 1996, 39: 1720-7
73. **Choi EK**, Gatenby PA, McGill NW, Bateman JF, Cole WG, York JR. Autoantibodies to type II collagen: occurrence in rheumatoid arthritis, other arthritides, autoimmune connective tissue diseases, and chronic inflammatory syndromes. *Ann Rheum Dis* 1988, 47: 313-22
74. **Wegner N**, Wait R, Venables PJ. Evolutionarily conserved antigens in autoimmune disease: implications for an infective aetiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41: 390-7
75. **Pancholi V**. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001, 58: 902-20
76. **Kolberg J**, Aase A, Bergmann S, Herstad TK, Rodal G, Frank R, Rohde M, Hammerschmidt S. Streptococcus pneumoniae enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiology* 2006, 152: 1307-17
77. **Yavlovich A**, Rechnitzer H, Rottem S. Alpha-enolase resides on the cell surface of Mycoplasma fermentans and binds plasminogen. *Infect Immun* 2007, 75: 5716-9
78. **Agarwal S**, Kulshreshtha P, Bambah Mukku D, Bhatnagar R. alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of Bacillus anthracis. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1784: 986-94
79. **Fox D**, Smulian AG. Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen Pneumocystis carinii. *Med Mycol* 2001, 39: 495-507
80. **Mundodi V**, Kucknoor AS, Alderete JF. Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of Trichomonas vaginalis. *Infect Immun* 2008, 76: 523-31
81. **Vanegas G**, Quinones W, Carrasco-Lopez C, Concepcion JL, Albericio F, Avilan L. Enolase as a plasminogen binding protein in Leishmania mexicana. *Parasitol Res* 2007, 101: 1511-6
82. **Lundberg K**, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for

- rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 3009-19
83. **Buzas EI**, Gyorgy B, Pasztoi M, Jelinek I, Falus A, Gabius HJ. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. *Autoimmunity* 2006, 39: 691-704
  84. **Cohen IR**, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1991, 12: 105-10
  85. **Poletaev A**, Osipenko L. General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). *Autoimmun Rev* 2003, 2: 264-71
  86. **Quintana FJ**, Buzas E, Prohaszka Z, Biro A, Kocsis J, Fust G, Falus A, Cohen IR. Knock-out of the histidine decarboxylase gene modifies the repertoire of natural autoantibodies. *J Autoimmun* 2004, 22: 297-305
  87. **Glant TT**, Buzas EI, Finnegan A, Negroiu G, Cs-Szabo G, Mikecz K. Critical roles of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation. *J Immunol* 1998, 160: 3812-9
  88. **Polgar A**. Elevated levels of synovial fluid antibodies reactive with the small proteoglycans biglycan and decorin in patients with rheumatoid arthritis or other joint diseases. *Rheumatology* 2003, 42: 522-7
  89. **Van Boxel JA**, Paget SA. Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes. *N Engl J Med* 1975, 293: 517-20
  90. **Raza K**, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 2005, 7: R784-95
  91. **Mauri C**, Chu CQ, Woodrow D, Mori L, Londei M. Treatment of a newly established transgenic model of chronic arthritis with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody. *J Immunol* 1997, 159: 5032-41
  92. **Doncarli A**, Stasiuk LM, Fournier C, Abehsira-Amar O. Conversion in vivo from an early dominant Th0/Th1 response to a Th2 phenotype during the development of collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1997, 27: 1451-8
  93. **Yoshino S**, Cleland LG. Depletion of alpha/beta T cells by a monoclonal antibody against the alpha/beta T cell receptor suppresses established adjuvant

- arthritis, but not established collagen-induced arthritis in rats. *J Exp Med* 1992, 175: 907-15
94. **Chu CQ**, Londei M. Induction of Th2 cytokines and control of collagen-induced arthritis by nondepleting anti-CD4 Abs. *J Immunol* 1996, 157: 2685-9
  95. **Kadowaki KM**, Matsuno H, Tsuji H, Tunru I. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol* 1994, 97: 212-8
  96. **Mikecz K**, Glant TT, Buzas E, Poole AR. Proteoglycan-induced polyarthritis and spondylitis adoptively transferred to naive (nonimmunized) BALB/c mice. *Arthritis Rheum* 1990, 33: 866-76
  97. **Matsumoto I**, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 1999, 286: 1732-5
  98. **Kyburz D**, Corr M. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003, 25: 79-90
  99. **Sakaguchi N**, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003, 426: 454-60
  100. **Yoshitomi H**, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, Hirota K, Tanaka S, Nomura T, Miki I, Gordon S, Akira S, Nakamura T, Sakaguchi S. A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 2005, 201: 949-60
  101. **Tanaka S**, Maeda S, Hashimoto M, Fujimori C, Ito Y, Teradaira S, Hirota K, Yoshitomi H, Katakai T, Shimizu A, Nomura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J Immunol* 2010, 185: 2295-305
  102. **Rankin AL**, Reed AJ, Oh S, Cozzo Picca C, Guay HM, Larkin J, 3rd, Panarey L, Aitken MK, Koeberlein B, Lipsky PE, Tomaszewski JE, Naji A, Caton AJ. CD4+ T cells recognizing a single self-peptide expressed by APCs induce spontaneous autoimmune arthritis. *J Immunol* 2008, 180: 833-41

103. **Sarkar S**, Cooney LA, White P, Dunlop DB, Endres J, Jorns JM, Wasco MJ, Fox DA. Regulation of pathogenic IL-17 responses in collagen-induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4. *Arthritis Res Ther* 2009, 11: R158
104. **Frey O**, Mitera T, Kelchtermans H, Schurgers E, Kamradt T, Matthys P. Ameliorated course of glucose-6-phosphate isomerase (G6PI)-induced arthritis in IFN-gamma receptor knockout mice exposes an arthritis-promoting role of IFN-gamma. *J Autoimmun* 2011, 36: 161-9
105. **Mauri C**, Williams RO, Walmsley M, Feldmann M. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1996, 26: 1511-8
106. **Okamoto Y**, Gotoh Y, Tokui H, Mizuno A, Kobayashi Y, Nishida M. Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT assay. *J Interferon Cytokine Res* 2000, 20: 55-61
107. **Boissier MC**, Chiochia G, Bessis N, Hajnal J, Garotta G, Nicoletti F, Fournier C. Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1995, 25: 1184-90
108. **Kusaba M**, Honda J, Fukuda T, Oizumi K. Analysis of type 1 and type 2 T cells in synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998, 25: 1466-71
109. **Nanki T**, Lipsky PE. Cytokine, activation marker, and chemokine receptor expression by individual CD4(+) memory T cells in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Res* 2000, 2: 415-23
110. **Morita Y**, Yamamura M, Kawashima M, Harada S, Tsuji K, Shibuya K, Maruyama K, Makino H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998, 41: 1669-76
111. **Yamaguchi Y**, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol* 2007, 179: 7128-36

112. **Nakae S**, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003, 171: 6173-7
113. **Lubberts E**, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, van den Berg WB. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 650-9
114. **Doodes PD**, Cao Y, Hamel KM, Wang Y, Farkas B, Iwakura Y, Finnegan A. Development of proteoglycan-induced arthritis is independent of IL-17. *J Immunol* 2008, 181: 329-37
115. **Doodes PD**, Cao Y, Hamel KM, Wang Y, Rodeghero RL, Mikecz K, Glant TT, Iwakura Y, Finnegan A. IFN-gamma regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis. *J Immunol* 2010, 184: 1552-9
116. **Hirota K**, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2007, 204: 41-7
117. **Hot A**, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Ann Rheum Dis* 2011, 70: 727-32
118. **Lubberts E**, Joosten LA, Chabaud M, van Den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-De Roo CJ, Richards CD, Miossec P, van Den Berg WB. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest* 2000, 105: 1697-710
119. **Horsfall AC**, Butler DM, Marinova L, Warden PJ, Williams RO, Maini RN, Feldmann M. Suppression of collagen-induced arthritis by continuous administration of IL-4. *J Immunol* 1997, 159: 5687-96
120. **Joosten LA**, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegard D, van den Berg WB. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res* 1999, 1: 81-91



121. **Kang I**, Lee WW, Lee Y. Modulation of collagen-induced arthritis by IL-4 and dexamethasone: the synergistic effect of IL-4 and dexamethasone on the resolution of CIA. *Immunopharmacology* 2000, 49: 317-24
122. **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: 5383-90
123. **Yoshino S**, Yoshino J. Enhancement of T-cell-mediated arthritis in mice by treatment with a monoclonal antibody against interleukin-4. *Cell Immunol* 1998, 185: 153-7
124. **van Roon JA**, Bijlsma JW. Th2 mediated regulation in RA and the spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 2002, 61: 951-4
125. **Verhoef CM**, van Roon JA, Vianen ME, Bruijnzeel-Koomen CA, Lafeber FP, Bijlsma JW. Mutual antagonism of rheumatoid arthritis and hay fever; a role for type 1/type 2 T cell balance. *Ann Rheum Dis* 1998, 57: 275-80
126. **Gonzalez-Rey E**, Chorny A, Varela N, O'Valle F, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 531-43
127. **Morgan ME**, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, de Vries RR, Toes RE. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2005, 52: 2212-21
128. **Kelchtermans H**, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, Billiau A, Leclercq G, Matthys P. Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther* 2005, 7: R402-15
129. **Brunkow ME**, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001, 27: 68-73

130. **Nguyen LT**, Jacobs J, Mathis D, Benoist C. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 509-20
131. **Monte K**, Wilson C, Shih FF. Increased number and function of FoxP3 regulatory T cells during experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 3730-41
132. **Ehrenstein MR**, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004, 200: 277-85
133. **Buckner JH**. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010, 10: 849-59
134. **Ehinger M**, Vestberg M, Johansson AC, Johannesson M, Svensson A, Holmdahl R. Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis. *Immunology* 2001, 103: 291-300
135. **Tada Y**, Ho A, Koh DR, Mak TW. Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1996, 156: 4520-6
136. **Banerjee S**, Webber C, Poole AR. The induction of arthritis in mice by the cartilage proteoglycan aggrecan: roles of CD4+ and CD8+ T cells. *Cell Immunol* 1992, 144: 347-57
137. **Kang YM**. CD8 T Cells Are Required for the Formation of Ectopic Germinal Centers in Rheumatoid Synovitis. *Journal of Experimental Medicine* 2002, 195: 1325-36
138. **Goronzy JJ**, Weyand CM. Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2003, 5: 225-34
139. **Colmegna I**, Diaz-Borjon A, Fujii H, Schaefer L, Goronzy JJ, Weyand CM. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 990-1000

140. **Koetz K**, Bryl E, Spickschen K, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 9203-8
141. **Hazenber MD**, Borghans JA, de Boer RJ, Miedema F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 2003, 4: 97-9
142. **Hazenber MD**, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, Coutinho RA, Lange JM, Rinke de Wit TF, Tsegaye A, van Dongen JJ, Hamann D, de Boer RJ, Miedema F. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med* 2000, 6: 1036-42
143. **van den Dool C**, de Boer RJ. The effects of age, thymectomy, and HIV Infection on alpha and beta TCR excision circles in naive T cells. *J Immunol* 2006, 177: 4391-401
144. **Goronzy JJ**, Weyand CM. T cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 2005, 17: 468-75
145. **Fujii H**, Shao L, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106: 4360-5
146. **Shao L**, Fujii H, Colmegna I, Oishi H, Goronzy JJ, Weyand CM. Deficiency of the DNA repair enzyme ATM in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2009, 206: 1435-49
147. **Goronzy JJ**, Weyand CM. Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. *Trends Immunol* 2001, 22: 251-5
148. **Sawai H**, Park YW, Roberson J, Imai T, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell costimulation by fractalkine-expressing synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005, 52: 1392-401
149. **Sawai H**, Park YW, He X, Goronzy JJ, Weyand CM. Fractalkine mediates T cell-dependent proliferation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 3215-25
150. **Singh K**, Colmegna I, He X, Weyand CM, Goronzy JJ. Synoviocyte stimulation by the LFA-1-intercellular adhesion molecule-2-Ezrin-Akt pathway in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2008, 180: 1971-8

151. **Goronzy JJ**, Henel G, Sawai H, Singh K, Lee EB, Pryshchep S, Weyand CM. Costimulatory pathways in rheumatoid synovitis and T-cell senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1062: 182-94
152. **Singh K**, Deshpande P, Pryshchep S, Colmegna I, Liarski V, Weyand CM, Goronzy JJ. ERK-dependent T cell receptor threshold calibration in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2009, 183: 8258-67
153. **They C**, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009, 9: 581-93
154. **Trams EG**, Lauter CJ, Salem N, Jr., Heine U. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981, 645: 63-70
155. **Hurley JH**, Boura E, Carlson LA, Rozycki B. Membrane budding. *Cell* 2010, 143: 875-87
156. **Al-Nedawi K**, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008, 10: 619-24
157. **Izquierdo-Useros N**, Naranjo-Gomez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borrás FE, Puertas MC, Connor JH, Fernandez-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 2009, 113: 2732-41
158. **Raposo G**, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-72
159. **Valadi H**, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007, 9: 654-9
160. **Chaput N**, They C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol* 2011, 33: 419-40
161. **Mathivanan S**, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010, 73: 1907-20
162. **Dignat-George F**, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31: 27-33

163. **Thery C**, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006, Chapter 3: Unit 3 22
164. **Chargaff E**, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 1946, 166: 189-97
165. **Gyorgy B**, Modos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzas EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 2011, 117: e39-48
166. **Cocucci E**, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009, 19: 43-51
167. **Smalley DM**, Sheman NE, Nelson K, Theodorescu D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res* 2008, 7: 2088-96
168. **Baroni M**, Pizzirani C, Pinotti M, Ferrari D, Adinolfi E, Calzavarini S, Caruso P, Bernardi F, Di Virgilio F. Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J* 2007, 21: 1926-33
169. **Kahner BN**, Dorsam RT, Kunapuli SP. Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front Biosci* 2008, 13: 433-9
170. **Leroyer AS**, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med* 2008, 263: 528-37
171. **MacKenzie A**, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001, 15: 825-35
172. **Boilard E**, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010, 327: 580-3
173. **Distler JH**, Jungel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, 3rd, Gay RE, Michel BA, Fontana A, Gay S, Pisetsky DS, Distler O. The induction of matrix

- metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 2892-7
174. **Jungel A**, Distler O, Schulze-Horsel U, Huber LC, Ha HR, Simmen B, Kalden JR, Pisetsky DS, Gay S, Distler JH.. Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 3564-74
175. **Pap E**, Pallinger E, Falus A, Kiss AA, Kittel A, Kovacs P, Buzas EI. T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta* 2008, 29: 826-32
176. **Connor DE**, Exner T, Ma DD, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 2010, 103: 1044-52
177. **Yuana Y**, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Garcia Rodriguez P, Bertina RM, Osanto S. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost* 2010, 8: 315-23
178. **Sellam J**, Proulle V, Jungel A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 2009, 11: R156
179. **Kerr JF**, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26: 239-57
180. **Sulston JE**, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1977, 56: 110-56
181. **Fixsen W**, Sternberg P, Ellis H, Horvitz R. Genes that affect cell fates during the development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1985, 50: 99-104
182. **Hristov M**, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004, 104: 2761-6

183. **Beyer C**, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010, 6: 21-9
184. **Holmgren L**, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999, 93: 3956-63
185. **Bergsmedh A**, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 6407-11
186. **Bellone M**, Iezzi G, Rovere P, Galati G, Ronchetti A, Protti MP, Davoust J, Rugarli C, Manfredi AA. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 1997, 159: 5391-9
187. **Cocca BA**, Cline AM, Radic MZ. Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens. *J Immunol* 2002, 169: 159-66
188. **Savill J**, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 965-75
189. **Taylor DD**, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008, 110: 13-21
190. **Skog J**, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008, 10: 1470-6
191. **Werner N**, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26: 112-6
192. **Esposito K**, Ciotola M, Schisano B, Gualdiero R, Sardelli L, Misso L, Giannetti G, Giugliano D. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 3676-9
193. **Amabile N**, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16: 3381-8

194. **Flaumenhaft R**, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE, Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 2009, 113: 1112-21
195. **Li X**, Cong H. Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome. *Tex Heart Inst J* 2009, 36: 134-9
196. **Salanova B**, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC, Kettritz R. Beta2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF-kappaB activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 2007, 282: 27960-9
197. **Gyorgy B**, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011, 68: 2667-88
198. **Dignat-George F**, Freyssinet JM, Key NS. Centrifugation is a crucial step impacting microparticle measurement. *Platelets* 2009, 20: 225-6; author reply 7-8
199. **Chen C**, Skog J, Hsu CH, Lessard RT, Balaj L, Wurdinger T, Carter BS, Breakefield XO, Toner M, Irimia D. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* 2010, 10: 505-11
200. **Booth AM**, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, Gould SJ. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 2006, 172: 923-35
201. **Rubin O**, Crettaz D, Tissot JD, Lion N. Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics. *Talanta* 2010, 82: 1-8
202. **Lawrie AS**, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 2009, 96: 206-12
203. **Robert S**, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 2009, 7: 190-7



204. **Lacroix R**, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F. 2010. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost* 8: 2571-4
205. **Cerri C**, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol* 2006, 177: 1975-80
206. **van der Pol E**, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 2010, 8: 2596-607
207. **Miyazaki Y**, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996, 88: 3456-64
208. **Fernandez-Llama P**, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int* 2010, 77: 736-42
209. **Cantin R**, Diou J, Belanger D, Tremblay AM, Gilbert C. Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods* 2008, 338: 21-30
210. **Berlo SE**, van Kooten PJ, Ten Brink CB, Hauet-Broere F, Oosterwegel MA, Glant TT, Van Eden W, Broeren CP. Naive transgenic T cells expressing cartilage proteoglycan-specific TCR induce arthritis upon in vivo activation. *J Autoimmun* 2005, 25: 172-80
211. **Bartels EM**, Falbe Watjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis* 2011, 2011: 741071
212. **Glant TT**, Mikecz K, Poole AR. Monoclonal antibodies to different protein-related epitopes of human articular cartilage proteoglycans. *Biochem J* 1986, 234: 31-41

213. **Arnett FC**, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-24
214. **Stanilova SA**, Slavov ES. Comparative study of circulating immune complexes quantity detection by three assays--CIF-ELISA, C1q-ELISA and anti-C3 ELISA. *J Immunol Methods* 2001, 253: 13-21
215. **Aras O**, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004, 103: 4545-53
216. **Morozzi G**, Fabbroni M, Bellisai F, Cucini S, Simpatico A, Galeazzi M. Low serum level of COMP, a cartilage turnover marker, predicts rapid and high ACR70 response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007, 26: 1335-8
217. **Ortutay Z**, Polgar A, Gomor B, Geher P, Lakatos T, Glant TT, Gay RE, Gay S, Pallinger E, Farkas C, Farkas E, Tothfalusi L, Kocsis K, Falus A, Buzas EI. Synovial fluid exoglycosidases are predictors of rheumatoid arthritis and are effective in cartilage glycosaminoglycan depletion. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 2163-72
218. **Buzas EI**, Vegvari A, Murad YM, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. T-cell recognition of differentially tolerated epitopes of cartilage proteoglycan aggrecan in arthritis. *Cell Immunol* 2005, 235: 98-108
219. **Boldizsar F**, Kis-Toth K, Tarjanyi O, Olasz K, Hegyi A, Mikecz K, Glant TT. Impaired activation-induced cell death promotes spontaneous arthritis in antigen (cartilage proteoglycan)-specific T cell receptor-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2010, 62: 2984-94
220. **Leroyer AS**, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Leseche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A, Boulanger CM. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008, 52: 1302-11

221. **Jy W**, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004, 2: 1842-51
222. **Raijmakers R**, Berkers CR, de Jong A, Ovaa H, Heck AJ, Mohammed S. Automated online sequential isotope labeling for protein quantitation applied to proteasome tissue-specific diversity. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7: 1755-62
223. **Hegmans JP**, Bard MP, Hemmes A, Luider TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol* 2004, 164: 1807-15
224. **Wubbolts R**, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003, 278: 10963-72
225. **Conde-Vancells J**, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM, Falcon-Perez JM. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 2008, 7: 5157-66
226. **Landsteiner K**. 2001. [Agglutination phenomena of normal human blood]. *Wien Klin Wochenschr* 113: 768-9
227. **Adderson EE**, Shikhman AR, Ward KE, Cunningham MW. Molecular analysis of polyreactive monoclonal antibodies from rheumatic carditis: human anti-N-acetylglucosamine/anti-myosin antibody V region genes. *J Immunol* 1998, 161: 2020-31
228. **Majeed M**, McQueen F, Yeoman S, McLean L. Relationship between serum hyaluronic acid level and disease activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004, 63: 1166-8
229. **Pothacharoen P**, Teekachunhatean S, Louthrenoo W, Yingsung W, Ong-Chai S, Hardingham T, Kongtawelert P. Raised chondroitin sulfate epitopes and

- hyaluronan in serum from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, 14: 299-301
230. **Landers CD**, Chelvarajan RL, Bondada S. The role of B cells and accessory cells in the neonatal response to TI-2 antigens. *Immunol Res* 2005, 31: 25-36
231. **Rijkers GT**, Sanders EA, Breukels MA, Zegers BJ. Infant B cell responses to polysaccharide determinants. *Vaccine* 1998, 16: 1396-400
232. **Wang JY**, Roehrl MH. Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 14362-7
233. **Tangye SG**, Brink R. 2012. A helping hand from neutrophils in T cell-independent antibody responses? *Nat Immunol* 13: 111-3
234. **Nakiri Y**, Minowa K, Suzuki J, Mitsuo A, Amano H, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. 2007. Expression of CD22 on peripheral B cells in patients with rheumatoid arthritis: relation to CD5-positive B cells. *Clin Rheumatol* 26: 1721-3
235. **Montecino-Rodriguez E**, Dorshkind K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol* 2006, 27: 428-33
236. **Parisi JT**. Significance of chromogenic variants in studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1966, 92: 589-91
237. **Starr CR**, Engleberg NC. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus. *Infect Immun* 2006, 74: 40-8
238. **Shimizu T**, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 996-1001
239. **Matthews BW**. The structure of *E. coli* beta-galactosidase. *C R Biol* 2005, 328: 549-56
240. **Cope AP**, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007, 25: S4-11
241. **Vincent C**, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity* 2005, 38: 17-24
242. **Glant TT**, Radacs M, Nagyeri G, Olasz K, Laszlo A, Boldizsar F, Hegyi A, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human

- proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011, 63: 1312-21
243. **Li Y**, Li H, Martin R, Mariuzza RA. Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins. *J Mol Biol* 2000, 304: 177-88
244. **Anderton SM**, Wraith DC. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 487-98
245. **Tsukamoto H**, Takei I, Ishii K, Watanabe K. Simplified method for the diameter sizing of serum low-density lipoprotein using polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42: 1009-12
246. **Cavigliolo G**, Shao B, Geier EG, Ren G, Heinecke JW, Oda MN. The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. *Biochemistry* 2008, 47: 4770-9
247. **Lu S**, Yao Y, Cheng X, Mitchell S, Leng S, Meng S, Gallagher JW, Shelness GS, Morris GS, Mahan J, Frase S, Mansbach CM, Weinberg RB, Black DD. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem* 2006, 281: 3473-83
248. **Khlebtsov BN**, Burygin GL, Matora LY, Shchyogolev SY, Khlebtsov NG. A method for studying insoluble immune complexes. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1670: 199-207
249. **Gorgani NN**, Easterbrook-Smith SB, Altin JG. The formation of insoluble immune complexes between ovalbumin and anti-ovalbumin IgG occurs in at least two distinct phases dependent on reactant concentration and ionic strength. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1317: 45-54
250. **Biro E**, Nieuwland R, Tak PP, Pronk LM, Schaap MC, Sturk A, Hack CE. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis* 2007, 66: 1085-92
251. **Brown MR**, Anderson BE. Receptor-ligand interactions between serum amyloid P component and model soluble immune complexes. *J Immunol* 1993, 151: 2087-95

252. **Ullal AJ**, Reich CF, 3rd, Clowse M, Criscione-Schreiber LG, Tochacek M, Monestier M, Pisetsky DS. Microparticles as antigenic targets of antibodies to DNA and nucleosomes in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2011, 36: 173-80
253. **Williams JC**, Mackman N. MPs or ICs? *Blood* 2011, 117: 1101-2
254. **Bianco F**, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Moller T, Matteoli M, Verderio C. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol* 2005, 174: 7268-77
255. **Goeb V**, Thomas-L'Otellier M, Daveau R, Charlionet R, Fardellone P, Le Loet X, Tron F, Gilbert D, Vittecoq O. Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Res Ther* 2009, 11: R38
256. **Routsias JG**, Tzioufas AG. The role of chaperone proteins in autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1088: 52-64
257. **Businaro R**, Profumo E, Tagliani A, Buttari B, Leone S, D'Amati G, Ippoliti F, Leopizzi M, D'Arcangelo D, Capoano R, Fumagalli L, Salvati B, Rigano R. Heat-shock protein 90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009, 207: 74-83
258. **Koutouzov S**, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2004, 30: 529-58
259. **Chen HZ**, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 785-97
260. **Hernandez JD**, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. *J Immunol* 2006, 177: 5328-36
261. **Perillo NL**, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995, 378: 736-9
262. **Chao DT**, Korsmeyer SJ. BCL-XL-regulated apoptosis in T cell development. *Int Immunol* 1997, 9: 1375-84

263. **Crespin M**, Vidal C, Picard F, Lacombe C, Fontenay M. Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009, 20: 63-70

## 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények listája:

Turiák L\*, Misják P\*, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel A, Falus A, Buzás EI, Vékey K. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics* 2011, 74(10): 2025-33 **IF: 4,878**

\*: **contributed equally**

Misják P, Bősze Sz, Horváti K, Pásztói M, Pálóczi K, Holub MCs, Szakács F, Aradi B, Bence Gy, Szabó TG, Nagy Gy, Glant TT, Mikecz K, Falus A, Buzás EI. The role of citrullination of an immunodominant proteoglycan (PG) aggrecan T cell epitope in BALB/c mice with PG-induced arthritis. *Immunology Letters*, 2013, 152 (1): 25-31  
**IF: 2,526**

György B, Tóthfalusi L, Nagy Gy, Pásztói M, Géher P, Lőrinc Z, Polgár A, Rojkovics B, Ujfalussy I, Poór Gy, Pócza P, Wiener Z, Misják P, Koncz A, Falus A, Buzás EI. Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008, 10(5):R110 **IF: 4,485**

György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 2011, 117(4):e39-48 **IF: 9.898**

György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011, 68(16): 2667-88  
**IF: 6,570**

**A Ph.D értekezés témájában megjelent közlemények impakt faktora: 28,357**



**A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények listája:**

Pasztói M, Sodar B, Misjak P, Paloczi K, Kittel Á, Tóth K, Wellinger K, Geher P, Nagy Gy, Lakatos T, Falus A, Buzas EI. The recently identified hexosaminidase D enzyme substantially contributes to the elevated hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis.

*Immunology Letters* 2013, 149: (1-2) 71-76 **IF: 2,526**

**Kumulatív impakt faktor: 30,883**

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik a doktori dolgozatommal kapcsolatos munkámban segítettek:

Dr. Falus András Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy a doktori dolgozatomhoz szükséges kísérleteket a Genetikai-, Sejt és Immunbiológiai Intézetben végezzem el, és aki munkámat mindvégig figyelemmel kísérte.

Dr Buzás Edit Professzorasszonynak, témavezetőmnek, a munkámban való kitartó támogatásáért, hogy bármilyen kérdéssel bizalommal fordulhattam hozzá. Lelkiismeretes irányításáért, amely során megismerkedhettem a tudományos gondolkodásmóddal, a kutatómunka alapjaival.

Dr. Szente-Pásztói Máriának, mindazért a szakmai és baráti segítségért, amelyet az elmúlt években tőle kaptam.

Pálóczi Krisztinának a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért.

A Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet és az MTA-SE Molekuláris Immunológiai Kutatócsoport összes dolgozójának, hogy barátsággal és szeretettel vettek körül.

Férjemnek, Bagi Tamásnak, hogy mindvégig türelmesen mellettem állt.

Végül, de nem utolsósorban családomnak, hogy kutatói pályám során mindvégig bátorítottak és támogattak.