

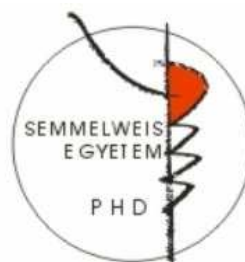
Biomarkerek (autoreaktív antitestek, T sejtek és extracelluláris vezikulák) vizsgálata rheumatoid arthritisben

Doktori tézisek

Misják Petra

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok 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

2013

Bevezetés

A rheumatoid arthritis (RA) a felnőtt lakosság körülbelül 1%-át érintő, krónikus ízületi gyulladással járó, szisztémás autoimmun betegség. A megfelelő kezelés hiányában súlyos ízületi deformitásokhoz és mozgáskorlátozottsághoz vezető betegség esetében kiemelkedő fontosságú a korai terápia, amely megkezdéséhez elengedhetetlen az RA patomechanizmusában szerepet játszó biomarkerek és patogenetikai tényezők ismerete. Munkánk során célunk az volt, hogy e tényezők közül kiemelve a természetes autoantitesteket, T sejttes epitóp citrullinációt és az újonnan felfedezett extracelluláris vezikulák szerepét vizsgáljuk az RA patomechanizmusában.

A természetes autoantitestek a szérumban jelen lévő IgM, IgG és IgA izotípusú, polireaktív, alacsony affinitással jellemezhető immunglobulinok, amelyeket jelen ismereteink szerint a B1 B sejtek termelnek. Igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre RA-ban a szénhidrát specifikus természetes autoantitestek szerepére vonatkozóan annak ellenére, hogy a porc alapállományának jelentős hányadát alkotják glükózaminoglikánok. A szénhidrát specifikus autoantitestek autoimmunitás kialakulásában betöltött szerepét mutatja, hogy az RA egyik egér modelljében, az aggregált arthritisben az immunválasz kiváltásához elengedhetetlen lépés a porcalkotó aggregált molekula kondroitin szulfát (CS) láncainak enzimatisz emésztése, amelyek így erőteljes B sejttes választ indukálnak. A doktori dolgozatomban bemutatott kísérleteinkben a természetes szénhidrát specifikus autoantitestek közül a glükózaminoglikán (GAG) ellenes autoantitesteket vizsgáltuk RA-ban.

Az autoantitestek mellett az epitóp citrullináció RA patomechanizmusában betöltött fontos szerepét mutatja, hogy a diagnosztikumban elsődleges szerepet betöltő ciklikus citrullinált protein ellenes autoantitestek gyakran már évtizedekkel kimutathatóak a tünetek megjelenése előtt. A citrullin az arginin poszttranszlációs modifikációjával létrejövő nem esszenciális aminosav. A folyamatot a Ca^{2+} függő peptidil-arginin deimináz (PAD) enzim katalizálja, amelynek öt, különböző szöveti expresszióval jellemezhető izoformája ismert. Ezek közül a PAD2 és PAD4 jelenlétét az RA-s synovialis membránban és a synovialis folyadék sejtjeiben is igazolták.

Bár a citrullinált autoantitestek termelése a B sejtekhez köthető, számos humán és állatmodelleket alkalmazó kísérleti rendszerből származó adat támasztja alá a B sejtek mellett a T sejtek fontos szerepét az RA patomechanizmusában. Így érdekes kérdést jelent az epitóp citrullináció T sejtés antigén felismerésben játszott szerepének a vizsgálata. Munkám második részében az aggregán arthritisben, az RA egy állatkísérletes modelljében egy immunodomináns T sejt epitóp citrullinációjának T sejtés válasza kifejtett hatását elemeztük.

Végül doktori dolgozatom harmadik részében az extracelluláris vezikulákkal (EV), mint új típusú betegség biomarkerekkel kapcsolatos eredményeinket mutatom be. A sejtek közötti kommunikációban fontos szerepet betöltő képleteket kettős foszfolipid membrán határolja és a sejtekből nyugalmi állapotban, aktiváció illetve apoptózis során szabadulnak fel. Az EV-knek számos csoportja különíthető el, amelyek közül a három legismertebb típus az exoszómák, mikrovezikulák (MV) és az apoptotikus testek csoportja. Az exoszómák a sejtekből a multivezikuláris testek sejtmembránnal egyesülése révén szabadulnak fel, átmérőjük 50 és 100nm közötti. A mikrovezikulák ennél nagyobb átmérővel rendelkező struktúrák (100-1000nm), amelyek az exoszómákkal ellentétben a plazmamembrán kitüremkedésével keletkeznek. Az apoptotikus testek átmérője 1-5 μ m, és apoptózis során fűződnek le a sejtmembránból. A sejtekből folyamatosan felszabaduló EV-k jelenléte számos biológiai folyadékban (pl. synovialis folyadék, vérplazma, vizelet) kimutatható. Jövőbeli esetleges biomarkerként való alkalmazhatóságukat jelzi, hogy egyes autoimmun megbetegedések során, illetve egyes daganattípusokban számuk emelkedett. Vizsgálataink során biológiai folyadékból származó (RA-s vérplazma és synovialis folyadék, illetve osteoartristises (OA) vérplazma és synovialis folyadék eredetű) MV-k és a detektálást nehezítő proteinkomplexek biofizikai paramétereit hasonlítottuk össze, illetve BALB/c thymus eredetű MV-k és apoptotikus testek proteomikai elemzését végeztük el.

Célkitűzések

A doktori dolgozat célkitűzése az autoantitestek, T sejtek és EV-k, mint RA biomarkerek és patogenetikai 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. Az epitópspecifikus T sejt receptor transzgénikus egerek peptidspecifikus poliklonális válaszána detektálása.

3. Az extracelluláris vezikulák vizsgálata

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

Módszerek

Egértörzsek és immunizációs protokollok

A T sejtés választ vizsgáló egér kísérleteinkhez 12-16 hetes nőstény BALB/c, valamint az ATEGRVRSAYQDK szekvenciára (P70-84, ATE peptid) specifikus TCR transzgénikus (TCR-tg) egereket használtunk. A TCR-tg állatokat a Rush University Medical Center-rel (Chicago, IL, USA) való együttműködés keretében alkalmaztuk.

Peptid immunizáció

A nőstény BALB/c egerek ATE peptid oltásakor a hátsó láb bokaízületébe, szubkután 5-25 μ g szintetikus peptidet oltottunk komplett Freud adjuvánssal (CFA, Sigma) együtt. Kontrollként azonos térfogatban PBS/CFA elegyet alkalmaztunk. A nyirokcsomósejteket az oltást követő 9. napon izoláltuk, majd a T sejt reaktivitást ELISPOT kísérletben vizsgáltuk.

Aggrekán arthritis indukció

Aggrekán arthritis (PGIA, *proteoglycan induced arthritis*) indukció során BALB/c egereket háromszor (0., 21. és 41. napon), glikozidáz enzimmel emésztett humán aggrekánnal oltottuk. Adjuvánsként dimetil-dioktadecil-ammónium-bromidot alkalmaztunk. A nyirokcsomósejtek izolálása az első oltást követő 4. hónap után történt.

Antigének

Glikozidázzal emésztett aggrekán

A glikozidázos enzimemésztést borjú (Sigma) és humán (újszülött porc eredetű) aggrekánon végeztük. Az emésztéskor az aggrekánhoz 100 U/mg 0,15M citromsav-foszfát pufferben (pH=4,3) β -galaktozidázt (Sigma), illetve 240 U/mg 0,2M NaCl-ecetsav pufferben (pH=5,0) hialuronidázt adtunk (Sigma) 24 órán keresztül 37°C-on, proteáz inhibitorok jelenlétében.

Szintetikus peptidek

A porcalkotó aggrekán T sejt epitópot hordozó, arthritogén peptidszekvenciájának egér, humán illetve citrullinált változatainak szintézisét együttműködő partnereink végezték az Eötvös Lóránt Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén.

Humán minták

A vizsgálatainkhoz az Országos Rheumatológiai és Fizioterápiás Intézet, a Budai Irgalmasrendi Kórház, a Szegedi Ortopédiai Klinika, az Országos Traumatológiai Intézet és a Semmelweis Egyetem Rheumatológiai Klinikájának humán mintáit használtuk.

Immunsejtek in vitro vizsgálata

Proliferációs assay

ATE peptid specifikus TCR-transzgen állatok lépsejtjeit $33 \times 10^5 / 200 \mu\text{l/well}$ denzitásban 96 lyukú lemezekre helyeztük. A stimulációs peptidkoncentrációk a következők voltak: 1 és 5 $\mu\text{g/ml}$ huATE-RR, 1, 5 és 25 $\mu\text{g/ml}$ huATE-RX, -XR, -XX vagy 10 és 40 $\mu\text{g/ml}$ mATE-R, -X. 96 órás inkubációt követően [^3H]timidine-t adtunk a sejtekhez, majd a radioaktivitást 14 órával később mértük.

ELISPOT

Az IFN γ szekretáló nyirokcsomósejteket Mouse IFN γ ELISPOT Ready-Set-Go Systems (eBioscience), valamint steril MultiSceenTM-IP lemezek (Millipore Corporation) segítségével mutattuk ki, a gyártó utasításait követve.

Génexpressziós vizsgálatok

A BALB/c thymus, csontvelő és lép mintákból RNeasy® Mini Kit (Qiagen) segítségével totál RNS izoláltunk. A preparált RNS-t random primerekkel (Promega) cDNS-sé írtuk át. A TaqMan rendszeren alapuló kvantitatív realtime PCR vizsgálatok az AbiPrism® 7000 PCR készüléken (Applied Biosystems) történtek. Az alábbi gének expresszióját vizsgáltuk: *Padi2* (Mm00447020_m1), *Padi4* (Mm00478087_m1), *Hprt* (Mm01545399_m1).

Antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló vizsgálatok

Anti-GAG antitestek kimutatása CovaLink ELISA-val

A természetes autoantitestek kimutatásához CovaLink ELISA rendszerben kondroitin-szulfát A, B és C, keratán-szulfát, heparán-szulfát, hialuronsav (Sigma), illetve natív és glikozidáz emésztett emberi és borjú aggregán antigéneket 1 $\mu\text{g/well}$ koncentrációban, a szérum és synoviális folyadék (SF) mintákat 1:100 hígításban, a HRP-konjugált anti-humán IgM és IgG (Sigma) szekunder antitesteket 1:50000 és 1:30000 hígításban használtuk.

IL-2 ELISA

A P70-84 (huATE-RR) peptidepitóp-specifikus TCR-t hordozó 5/4 T sejttes hybridóma peptidspecifitásának teszteléséhez 2×10^4 hybridóma sejtet tenyésztettünk együtt 2×10^5 A20 myeloma sejtvonallal, szintetikus peptidvariánsok jelenlétében, 24 órán keresztül. A felülúszóból IL-2 ELISA módszerrel (R&D Systems) meghatároztuk a hibridómák által termelt citokinszinteket.

Anti-komplement komponens 3 (C3) ELISA

A poliszitirén lemezek alját 0,2 µg/well anti-humán C3 antitesttel (Sigma) vontuk be, majd a humán SF mintákat 1:100 hígításban vittük fel. Detektáló antitestként anti-humán IgM-HRP-t, és anti-humán IgG-HRP-t (Sigma) alkalmaztunk.

Anti-CCP antitest-koncentráció meghatározása

Az anti-CCP antitestek szintjét Immunoscan RA anti-CCP teszt kit (EURO-Diagnostica) segítségével határoztuk meg.

Reumafaktor kimutatása (RF)

Az RA-s betegek és egészséges kontrollok szérum IgM és IgG RF koncentrációinak meghatározásához AUTOSTATTMII RF IgM és IgG kitet alkalmaztunk (Hycor Biomedical GmbH).

C-reaktív protein (CRP) meghatározása

A humán minták CRP koncentrációit teljes spektrumú CRP turbidimetriás esszé segítségével határoztuk meg (Randox Laboratoires Ltd.). A kiértékelést Olympus AU600 biokémiai analizátorral (Olympus Medical Systems) végeztük.

Szénhidrát chip

A humán szérum és SF minták IgG molekuláit Alexa-350 festékkel jelzett anti-humán IgG-vel jelöltük. (Zenon Human IgG Labeling Kits, Molecular Probes Inc. Invitrogen) A jelölt IgG molekulákat szénhidrát chipre vittük fel (Glycominds Ltd.), a fluoreszcenciát Perkin Elmer Victor II spektrofluoriméterrel mértük le.

Immunhisztokémia

A normál felnőtt porc metszeteket az RA-s szérum 1:25 hígításával, majd anti-humán Ig-FITC antitesttel (Sigma) inkubáltuk és Bio-Rad MRC 1024 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

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.

Peptid-MHC kötődési vizsgálatok

A vad típusú és a citrullinált peptidvariánsok MHC kötődésének összehasonlításához 2×10^5 A20 sejtet inkubáltunk 60 percen keresztül 5, 10, 20 vagy 40 $\mu\text{g/ml}$ humán illetve 1, 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ egér peptidekkel. Majd a sejtekhez 1,5 $\mu\text{g/ml}$ biotinizált huATE-RR peptidet adtunk, 120 percen keresztül 37°C-on inkubálva. Blokkolási lépést követően a mintákat 1:20 hígításban fikoeritrin (PE) konjugált sztreptavidinnel 1% BSA/PBS-ben festettük.

Immunkomplex és membránvezikula kimutatás

A MV kapun belül az MV és IK preparátumok eseményszám meghatározásához az alábbi 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) (BD Biosciences), anti-humán IgM-FITC (1:150), anti-humán IgG-FITC (1:300, Sigma).

Vezikuláris annexin V kimutatás

Az MV-eket és apoptotikus testeket tartalmazó mintákat 1:300 hígításban festettük anti-AnnV antitesttel (Sigma). A vezikulák kiülepítése után (20 500g 20 perc) a mintákat 1:300 hígításban FITC-el konjugált anti-nyúl immunglobulinnal (Becton Dickinson) 30 percig festettük.

Az extracelluláris vezikulákkal kapcsolatos egyéb vizsgálatok

Thymus eredetű mikrovezikula és apoptotikus test izoláció

A thymus eredetű MV-k és apoptotikus testek tömegspektrometriás vizsgálatához 2 hetes BALB/c egér csecsemőmirigy sejteket izoláltunk. $1,4 \times 10^9$ thymussejtet helyeztünk CELLline bioreaktorba (Integra Biosciences). 24 óra elteltével a thymussejteket eltávolítottuk a bioreaktor sejtenyésző kompartmentjéből. A sejteket 300g 20 perces centrifugálással ülepítettük ki. Az így nyert vezikula tartalmú sejtfeülűsöt 5 μm pórusátmérőjű szűrőn (Millipore), gravitáció segítségével, nyomás alkalmazása nélkül szűrtük át. Ezután az apoptotikus testek kiülepítése 2000g 20

perces centrifugálással történt. Majd 0,8 μm -es (Millipore) gravitációs szűrést követően a filtrátumot 12 200g-vel 40 percen keresztül centrifugáltuk.

Humán synoviális folyadék és vérplazma eredetű mikrovezikula izolálás

Az SF mintákat 30 percen keresztül, 37°C-on, 10 U/ml birkahere hialuronidázzal (Sigma) emésztettük. A vérlemezkéket, sejtörmelékét 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.

Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az apoptotikus test és az MV preparátumaink tisztaságát és a vezikulák morfológiáját HITACHI 7100 elektronmikroszkóppal analizáltuk.

Immun-elektronmikroszkópia

Az immunkomplexek (IK-k) láthatóvá tételéhez a mintákat anti-humán IgG-vel, illetve anti-humán IgM-el inkubáltuk, majd pedig HITACHI 7100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Atomerő mikroszkópia

Az atomerő mikroszkópiás kísérleteket az MTA SZBK-val és az SZTE TTIK Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékkal való együttműködés keretében végeztük el.

Fluoreszcens mikroszkópia

RA-s és OA-s SF mintákból izolált IK-kat Zeiss LSM 510 Meta pásztázó konfokális lézermikroszkóppal (Carl Zeiss) vizsgáltuk.

Dinamikus fényszórás elemzés

A minták elemzését a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében való együttműködés keretében végeztük el.

Természetes immunkomplex izolálás

RA-ban szenvedő betegek SF sejtmentes mintáiból anti-humán IgG és anti-humán IgM agaróz oszlop segítségével izoláltunk IK-kat.

Mesterséges immunkomplex előállítása

A mesterséges immunkomplexek előállításakor antigénként humán laktoferrint, ovalbumint és egér IgM-et (HFPG-847 hybridóma terméke) illetve antitestként anti-

humán laktoferrin-t, anti-humán ovalbumint és anti-egér IgM-FITC-et (Sigma) alkalmaztunk, változó arányban összekeverve.

Mikrovezikulák és immunkomplexek detergens lízise

Az IK és MV tartalmú mintákhoz az alábbi detergenset különböző koncentrációban adtuk: Triton-X-100, Tween 20, SDS (*sodium dodecyl sulphate*) és Igepal-CA630 (Sigma), sejtlízis puffer. (BD Biosciences).

Tömegspektrometriás elemzés

A tömegspektrometriás méréseket Központi Kémiai Kutatóintézzettel való együttműködés keretében végeztük.

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 köldökzsinór 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.

Eredmények

Munkánk során a szénhidrátellenes autoantitestek közül a GAG-ellenes immunglobulinokat vizsgáltuk. Az újszülöttekből hiányzó, vagy kismértékben jelen lévő GAG-ellenes autoantitesteket a felnőtt populációban nagy mennyiségben mutattuk ki. Érdekes módon, az RA-s betegek esetében az IgM izotípusú és bizonyos IgG izotípusú anti-GAG antitestek szintje a kontroll csoporttal összehasonlítva emelkedettnek bizonyult. Az autoantitestek kötődtek a porc alapállományához is. Következő lépésként azt elemeztük, hogy az anti-GAG antitest-koncentrációk változásai összefüggésbe hozhatóak-e a betegség aktivitásával. Többlépcsős statisztikai elemzést végezve megállapítottuk, hogy a kondroitin szulfát C (CSC)-specifikus IgM antitest szintek és az RA aktivitását jellemző DAS28 értékek között erős fordított korreláció mutatható ki. 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 betegségaktivitási markerének tekinthető. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az anti-GAG szintek csökkenése az RA aktív fázisában annak tulajdonítható, hogy az antitestek a fokozódó gyulladás során a porcból egyre nagyobb mennyiségben felszabaduló GAG molekulákhoz kötődnek, amely jelenség egyúttal az anti-GAG antitestek csökkent synovialis folyadék koncentrációjához vezet.

Az autoimmun megbetegedésekben az autoantitesteket termelő B sejtek mellett a T sejtek fontosságára is számos irodalmi adat utal. A B sejtek által termelt természetes autoantitestek elemzését követően munkánk folytatásaként a citrullinációknak (az RA-val ismert módon összefüggő poszttranszlációs fehérjemódosulásnak) a T sejt válasza gyakorolt hatását vizsgáltuk PGIA állatmodellben. Kísérleteinkben elsőként azt vizsgáltuk, hogy a citrullinációt katalizáló Pad2 és Pad4 enzimeket kódoló gének expressziója kimutatható-e az aggregán artritisre (PGIA) érzékeny BALB/c egerek nyirokszerveiben. A két gén expressziós mintázata a különböző szervekben jelentősen eltért, amely felveti annak lehetőségét, hogy eltérő szubsztrátpreferencia esetében a thymusban és a csonvelőben 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. A következőekben a T sejt felismerés molekuláris elemzése céljából kísérleteinket egy korábban részletesen jellemzett modellrendszerben (aggrekán arthritis, PGIA) folytattuk. Kiválasztottunk egy betegségben releváns immunodomináns, arginin tartalmú porc aggrekán T sejt epitópot (huATE-RR), majd annak különböző citrullinált változatait állítottuk elő szintetikusán. A vad típusú és a 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. 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 peptidvariáns (mATE-R és mATE-X) által kiváltott választ 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 és a periférián hozzájárulhatnak az autoimmun betegségek kialakulásához.

A disszertáció harmadik részében bemutatott munka az EV-k témakörében született. Munkánkban arra kerestünk választ, hogy a biológiai folyadékokban az MV-k mellett jelen lévő proteinkomplexek hogyan befolyásolják az MV-kre vonatkozó mérési eredményeket. Megvizsgáltuk a biológiai mintákban gyakran jelen lévő immunkomplexek (IK-k méreteloszlását). Áramlási citometria és DLS alkalmazásával megállapítottuk, hogy az oldhatatlan IK-k fényszóródási tulajdonságaik alapján sem különíthetők el az MV populációtól. Továbbá, a mintákban egyidejűleg jelen lévő MV-k és IK-k elkülönítésére kifejlesztettünk egy egyszerű, gyors, új módszert. Detergens lízist alkalmazva a két populációból származó fényszóródási jelek egymástól jól elkülöníthetőek az IK-k detergenssel szembeni kisebb érzékenységének köszönhetően.

A doktori dolgozatom utolsó részében egér thymus eredetű MV-k és apoptotikus testek proteomikai elemzését végeztük el. A thymocita 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 α -enolázt, hősokk fehérjéket illetve hisztonproteineket (H1-H4). Az apoptotikus testekben a hisztonfehérjék jelenléte - figyelembe véve a vezikulák keletkezési mechanizmusát - nem meglepő. A tömegspektrometriás elemzés eredményeképpen azonban nemcsak az apoptotikus testekben, hanem az 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. Eredményeink szerint a vezikuláknak szerepük lehet a thymus homeosztázisának fenntartásában, de a pontos mechanizmus feltárására még további kísérletek szükségesek.

Következtetések

1. A természetes autoantitestekre vonatkozó munkánk felhívja a figyelmet a glükózaminoglikán (GAG)-ellenes természetes autoantitestek rheumatoid arthritrisben (RA) betöltött fontos szerepére. 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 disszertáció második felében az RA egy egérmodelljében, az aggregán arthritrisben (PGIA) vizsgáltuk a peptidcitrullináció T sejt felismerésre kifejtett hatását. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy egy adott immunodomináns, aggregán

eredetű T sejt epitópszekvencia (P70-84/huATE), és ennek citrullinált változatai jelentős IFN γ -választ indukáltak a peptiddel immunizált BALB/c és a peptidepitópspecifikus T sejt receptor transzgénikus 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 vizsgálatakor 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. 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, áramlási citometriás vizsgálatok során széleskörben alkalmazható módszert a MV-k és fehérjekomplexek elkülönítésére.

4. Az MV-k és apoptotikus testek fehérje-összetételének elemzését célzó munkánkban nagyfokú hasonlóságot mutattunk ki a thymuseredetű MV-k és 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 komplex szerepük lehet az immunológiai folyamatok, így végső soron a thymus működésének szabályozásában.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája:

1. 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. közlésre elfogadva.)

2. 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

3. György B, Tótfalusi 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 glucoseaminoglycans in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008, 10(5):R110 IF: 4,485

4. 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

5. 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

Egyéb közlemények listája:

Pasztói M, Sodar B, Misják P, Paloczi K, Kittel A, Toth K, Wellinger K, Geher P, Nagy Gy, Lakatos T, Falus A, Buzas EI: The recently identified hexoseaminidase D

enzyme substantially contributes to the elevated hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis, Immunology Letters, 2011, 68: (12): 2667-2688, IF: 2,526

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. Sente-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.