

A CD8+ T-sejtek új homing markereinek vizsgálata experimentálisan indukált egér és humán akut graft versus host betegségben

Doktori tézisek

Lupsa Nikolett

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Pós Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Jakus Zoltán Péter, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Koncz Gábor, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Kárpáti Sarolta, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Erdélyi Dániel János, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2019.

1. Irodalmi háttér

Az akut graft versus host betegség (aGvHD) az allogén hematopoetikus őssejt-transzplantáció (aHSCT) leggyakoribb mellékhatása, amely magas mortalitási és morbiditási mutatókkal jellemezhető. A betegség kiváltásában számos faktor szerepet játszik, melyek közül kiemelt fontosságú a CD8+ citotoxikus T-sejteknek az aGvHD célszerveibe, kiemelten a bőrbe, a bélbe és a májba történő vándorlása, és az ott kiváltott szövetkárosító hatása.

Az irodalomban a CD8+ T-sejtes homing szempontjából legjobban leírt, de még ma sem teljesen ismert két szöveti target a bőr és a bélrendszer, melyek tehát az aGvHD által leginkább érintett célszervek is egyben. Mindkét szövet esetében rendelkezünk legalább egy bőr specifikus (kután limfocita-asszociált antigén, CLA) és legalább egy bél specifikus (integrin béta 7, ITGB7) markerrel, amely alapján elkülöníthetők és részletesen összehasonlíthatók a CD8+ T-sejt populációk.

Ez a véletlen egybeesés különösen alkalmassá teszi az aGvHD-t, mint modellt a CD8+ T-sejtek homingjának egy rendszerben való összehasonlító vizsgálatára, illetve új homing markerek felfedezésére.

2. Célkitűzések

PhD munkám során a kután és gasztrointesztinális homing-ot folytató CD8+ T-sejtek összehasonlító vizsgálatát, új és eddig ismeretlen markereinek azonosítását, és azok alapkutatósi, diagnosztikus illetve prognosztikus értékének felmérését végeztem egér aGvHD modellrendszerben és humán aGvHD-s páciensekben.

1. Első célkitűzésünk egy olyan új, minden eddiginél tisztább egér aGvHD modell kifejlesztése volt, amely robosztus, reprodukálható aGvHD-t vált ki, minden érintett célszervben, ugyanakkor a CD8+ T-sejtek aktivitása a rendszerben homogén, antigén-specifitása uniform, egyetlen, definiált miHA mismatch ellen kialakuló, egyetlen, definiált CD8+ T-sejt klón által kiváltott immunválaszban vizsgálható, és ezért a modell experimentálisan, immunológiaiilag tiszta rendszert alkot. Ezen túlmenően pedig a betegség kután és gasztrointesztinális manifesztációi jól összevethetőek egymással.
2. Másodszor a humán klinikai aGvHD-ban szenvedő betegek és egészséges önkéntesek vérmintáit vizsgálva célul tűztük ki olyan új, eddig még ismertlen humán homing markerek leírását és vizsgálatát, amelyek fontosak a CD8+ T-sejtek szövetspecifikus homingjában és/vagy az aGvHD-ban, illetve terápiás, prognosztikus és diagnosztikai szereppel is bírhatnak.

3. Módszerek

Egér modellkísérletekben használt módszerek

Felhasznált egértörzsek:

Teljes név	Továbbiakban használt rövid név	Transzgén módosítás lényege:
C57BL/6-Tg(CAG-OVA) 916Jen/J	Act-m/OVA	C57BL/6 egerek, melyek valamennyi testi sejtjükben kifejezik a csirke ovalbumint, illetve ennek 254-267 peptidjét (SIINFEKL) az egér MHC I Kb allél variánsán prezentálják
C57BL/6-Tg(TeraTcrb) 1100Mjb/J	OT-I	C57BL/6 egerek, melyek valamennyi CD8+ citotoxikus T-sejtjének T-sejt receptora az egér MHC I Kb allél variánsához kötött csirke ovalbumin 254-267 peptiddel (SIINFEKL) aktiválható
B6.SJL-Ptprca Pepcb /BoyJ	CD45.1	C57BL/6 egerek, melyek fehérvérsejtjei a törzsre egyébként jellemző CD45.2 protein helyett annak CD45.1 allélváltozatát fejezik ki, és ezáltal más szingén C57BL/6 gazdába transzferálva is nyomon követhetőek
C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J	UBC-GFP	C57BL/6 egerek, melyek sejtjei zölden fluoreszkálnak a humán ubiquitin C promoterhez kötött enhanced GFP kifejezése miatt, és ezáltal más szingén C57BL/6 gazdába transzferálva is nyomon követhetőek

OT-I → Act-mOVA aGvHD modell

A recipiens Act-mOVA egerek aHSCT-je 11Gy teljes test besugárzást követően, ketamine-xylazin altatásban, retroorbitális injektálással történt OT-I, OT-I/CD45.1 vagy OT-I/UBC-GFP donortól származó 3×10^6 csontvelői és

$1,5 \times 10^7$ lép sejt transzplantációjával. A transzplantációt követően naponta monitoroztuk az aGvHD tüneteinek megjelenését, úgymint az állatok súlyvesztését, apátiáját és szőrzet változását, majd a transzplantációt követő 4. napon CO_2 -belégeztetéses eutanáziát hajtottunk végre.

Hisztológia

Az állatokat a transzplantáció napján (0. nap), illetve a medián túlélés napján, tehát a transzplantációt követő 4. napon áldoztuk fel, és az állatok bőrét, tüdejét, vékonybelét és máját használtuk fel. A szerveket formalinnal fixáltuk és paraffinba ágyasztuk, majd $5 \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket hematoxylin és eosin festésnek vetettük alá. A metszetekről készült felvételeket Nikon Diaphot TMD inverz mikroszkóppal készítettük, 10x objektívvel. A szövettant két független patológus értékelte.

ELISA

A vizsgálatokhoz a transzplantáció 0. napján a graftból illetve a transzplantációt követő 4. napon a recipiens Act-mOVA állat perifériás véréből, tüdejéből, vékonybeléből és májából izoláltunk CD45.1/OT-I CD8⁺ T-sejteket. Az így kinyert T-sejteket 10^4 - 10^5 sejt/well sűrűségben, 96 lyukú plate-re helyeztük, 10% FBS, 1% Glutamin tartalmú RPMI 1640 médiumban, majd 48 órán keresztül, $+37^\circ\text{C}$ -os termosztátban, 5% CO_2 atmoszférában tartottuk fent őket. A felülúszót Granzim B ELISA kit segítségével, a gyártói utasításoknak megfelelően vizsgáltuk. Az eredményeket Multiskan MS ELISA reader segítségével olvastuk le, és a sejtszámra normalizáltuk.

TREC assay

Kontrollként a 0. napi graft CD45.1/OT-I CD8+ T-sejteket használtuk, majd a BMT+4. napi OVA állat perifériás véréből, tüdejéből, vékonybeléből és májából izoláltunk CD45.1/OT-I CD8+ T-sejteket. A genomiális DNS-t NucleoSpin Blood kit segítségével izoláltuk, majd a TREC-számot Q-PCR segítségével mértük le. Az amplifikációhoz Platinum Quantitative PCR Super Mix kitet, egy Applied Biosystems 7900 HT RT PCR gépet, és az alábbi protokollt használtuk: +95°C 10 perc, majd +95°C 15 másodperc, +95°C 1 perc, összesen 45x ismételve. A referencia az Applied Biosystems TaqMan Transferrin Copy Number Reference Assay volt. Az eredményeket az összehasonlító CT ($\Delta\Delta CT$) módszerrel értelmeztük.

Áramlási citometria

A vizsgálatok során az alábbi ellenanyagokat és az ellenanyagoknak megfelelő izotípus kontrollokat és viabilitási festéket használtuk: CD8 β PE-Cy7, CD45.1 FITC, granzim B FITC, IFN gamma FITC, LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit. Az intracelluláris jelölésekhez pedig a Cytofix/Cytoperm kitet használtuk. A méréseket FACS Calibur áramlási citométerrel végeztük, az adatokat FlowJo szoftverrel értékeltük.

Transzkriptom analízis

A vizsgálathoz CD45.1/OT-I CD8+ T-sejtekből, RNeasy Plus Micro Kit segítségével total RNS-t izoláltunk. Mintánként 3000pg totál RNS lett reverz transzkripcióval átírva, majd az így kapott cDNS Arcturus RiboAmp PLUS kit segítségével két körben került amplifikációra, majd Cy3 labeling kit segítségével jelölve. A minták ezt követően 4x44K egér teljes

genom microarrayhez lettek hibridizálva és Agilent Microarray Scannerrel szkennelve. A nyers adatokat Feature Extraction szoftver segítségével nyertük ki, majd GeneSpring szoftverrel analizáltuk. Az adatokat először kvantilis normalizáltuk, majd az alapvonalat a minták mediánjánál húztuk meg. Majd főkomponens analízist végeztünk. Csak azok a gének maradhattak a továbbiakban a listán, amelyek nagyobb, mint 2x fold change értéket mutattak a 0. napi és 4. napi minták összevetése során, egyutas ANOVA és Benjamini-Hochberg korrekció elvégzését követően. A szignifikancia érték $p < 0,05$ volt. Ezután Tukey páros analízist végeztünk, $p < 0,05$ szinten, hogy megtaláljuk azokat az eltérő módon expresszálódó géneket, amelyek megugorják a szelekciós kritériumot legalább a lehetséges négy páros összehasonlítás egyikében. Ezt követően GSEA analízist végeztünk. A heatmap-eket a BRB Array Tool szoftver Heatmap Viewer funkciójával készítettük. A Mikroarray nyers adatokat GEO adatbázisba töltöttük fel (GSE79083).

Humán kísérletekben használt módszerek

Vérminták

A vérminták begyűjtése a Dél-Pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Hematológiai és Össejt-transzplantációs Osztályával való együttműködés keretein belül történt. Összesen 40 allo-HSCT-n átesett beteg került bevonásra a következő elrendezésben:

- Olyan betegek, akiknél a transzplantációt követő 100. napig nem alakult ki aGvHD (kontroll, $n=10$)
- Olyan betegek, akiknél után aGvHD alakult ki ($n=10$)

- Olyan betegek, akiknél gasztrointesztinális aGvHD alakult ki (n=10)
- Olyan betegek, akiknél kután és gasztrointesztinális aGvHD együttesen, egyidejűleg alakult ki (n=10)

Az aHSCTs betegek mellett egyéb, főként validálási célú kísérletekhez aHSCT-n át nem esett egészséges önkéntes véradóktól is gyűjtöttünk mintákat. A mintagyűjtés során ACD-A és EDTA csöveket használtunk.

Egyéb szövetminták

A humán, a patológusok által betegségmentesnek nyilvánított bőr-és bél biopsziák a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikával illetve az Uzsoki Kórházzal való együttműködés keretében, a Klinika és a Kórház beteg anyagából kerültek beszerzésre.

Perifériás vér mononuklális sejtek (PBMC) izolálása

A vérmintákat a vérvétel és az izolálás között szobahőmérsékleten tároltuk, az izolálást Ficoll-os sűrűség gradiens centrifugálással végeztük, majd -190°C-os folyékony nitrogén gőzben tároltuk.

FACS szortolás

BD FACS Aria III szorter és a FACSDiva szoftver segítségével három különböző CD8⁺ T-sejt szubpopulációt különítettünk el három-irányú egyidejű szortolás segítségével.

- Bőr-irányú homingot mutató CD8⁺ T-sejtek (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/CLA+)
- Bél-irányú homingot mutató CD8⁺ T-sejtek (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/ITGβ7+)

- Sem bőr-, sem bél-irányú homingot mutató, referencia CD8⁺ T-sejtek (Ly/LIVE/DEAD⁻/CD8^β⁺/ITG^β7-/CLA⁻)

A szortoláshoz 90% HBSS w/o, 10% FBS szort puffert használtunk. A sejtek viabilitása > 95% volt, és a szortolt T-sejteket közvetlenül lízis pufferbe (RLT Plus lysis puffer) izoláltuk, amelyben további felhasználásig -80°C-on tároltuk őket.

Transzkriptom analízis

A szortolt mintákból totál RNS-t izoláltunk, RNeasy Plus Micro Kit segítségével, amely integritását és mennyiségét Bioanalyzer 2100 készülékkel és RNA 6000 Pico Kit és chip segítségével ellenőriztük. Mintánként 3000pg totál RNS-t, Arcturus RiboAmp HS Plus, két körös amplifikáló kit segítségével amplifikáltuk. Az így kinyert 5-30ng amplifikált cRNS tisztaságát és mennyiségét ellenőriztük, majd Cy3 labeling kit segítségével jelöltük. A mintákat humán GE 4x44K v2 teljes genom microarrayekhez hibridizáltuk, majd egy Agilent Microarray Scanner segítségével szkenneltük. A nyers adatokhoz Feature Extraction szoftver (Agilent) segítségével jutottunk. Az elemzést BRB-Array Tools szoftver segítségével történt. Az adatokat először kvantilis normalizáltuk, majd a további analízisből minden olyan gént kizártunk, amelyek átlagos szignálintenzitása $\log_2=1$ alatti volt. Ez után kétutas ismétléses ANOVA-át és Benjamini-Hochberg korrekciót használtunk (FDR <0.01). A microarray nyers adatokat GEO adatbázisba töltöttük fel (GSE65045).

Q-PCR

A CD8⁺ T-sejtekből először totál RNS-t izoláltunk majd reverz transzkripciót hajtottunk végre. TaqMan próbával és

HGPRT kontrollal elemeztük a vizsgált gének expresszióját a különböző T-sejt szubpopulációkban, illetve a különböző betegcsoportokban. A PCR reakciókat 7900HT Fast Real Time PCR készüléken, 2xSensifast Probe HI-ROX master mix segítségével végeztük. Az eredményeket az összehasonlító CT ($\Delta\Delta CT$) módszerrel számoltuk ki.

Áramlási citometria

Számos kísérletünkben alkalmaztunk áramlási citometriát, melyhez a vizsgált CD8⁺ T-sejteket a következő ellenanyagokkal festettük: CLA-FITC, IFN- γ -FITC, Integrin β 7-PE, PI16-PE, CCR10-PE, CCR4-PE, CCR8-PE, CD8 β -APC, CD8 β -PECy7, CD3-APC, CD59-FITC, CD14 PerCP-Cy5.5, CD56-APC, granzim-B-FITC, CD69-FITC, CD127-FITC, CD25-PerCP-eFluor710, CD45RO PerCP-eFluor710, PI16-APC. A sejteket festés előtt minden esetben az ellenanyagnak megfelelő szérummal blokkoltuk. Az ellenanyagokat a protokolljuk szerint és a megfelelő izotípus kontrollal összevetésben alkalmaztuk. Intracelluláris jelölés esetén a sejtek átjárhatóságát Fixation/Permeabilization Solution alkalmazásával biztosítottuk, szekretált intracelluláris fehérjék esetén pedig ezt megelőzően az endoplazmatikus retikulumból a Golgi irányába zajló fehérje transzportot pedig Brefeldin-A használatával gátoltuk. A méréseket FACS Calibur készüléken, az adatok elemzését pedig FlowJo v10.1 szoftver segítségével végeztük.

Immuncitokémia

A CD8 β ⁺ T-sejteket festés előtt egér és patkány szérummal blokkoltuk, majd CLA-FITC, PI16-PE és CD8 β -APC ellenanyagokkal jelöltük. Az APC jelet anti-APC-biotin és Streptavidin-APC használatával erősítettük. A sejteket

citofugáltak és DAPI festéket tartalmazó Fluoroshield fixáló fedőréteggel vontuk be. A mintákat fénytől védve over night, szobahőmérsékleten szárítottuk, majd FV500 konfokális pásztázó mikroszkóppal, 60X nagyításban vizsgáltuk. Az elkészült képeket ImageJ v1.8.0_112 szoftver segítségével elemeztük.

Immunhisztokémia

Az egészséges humán bőr biopsziákból nyert, formalin-fixált és paraffinba ágyazott mintákból származó 5µm-es vastagságú metszeteken először antigén feltárást végeztünk. A feltárást nátrium-citrát pufferrel (pH=6) 105°C-on, 30 percig végeztük. Ezt követően a metszeteket 10% FBS-el blokkoltuk, majd jelöltük. A jelölést CLA-FITC (1:10), CD8β (1:50) és P116 (1:100) ellenanyagokkal végeztük. A direkt CLA jelölés mellett az indirekt jelöléshez a CD8β esetén anti-egér IgG eFluor570 (1:100), míg a P116 esetén anti-nyúl IgG-APC másodlagos ellenanyagokat használtunk. Az elkészült metszeteket FV500 konfokális pásztázó mikroszkóppal, 20X nagyításban vizsgáltuk majd a képeket ImageJ v1.8.0_112 szoftver segítségével elemeztük.

GPI horgony emésztés

A szortolt CD8β+ T-sejteket 1xPBS-ben mostuk, majd 1x10⁶ sejt/500ul sejt koncentráció mellett különböző koncentrációjú *B. cereus* PI-PLC-re exponáltuk, megfelelő kezeletlen kontrollok mellett. A kezelést szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül végeztük. A mintákat anti-humán CD59 FITC (pozitív kontroll), CD8 APC (negatív kontroll), illetve a vizsgálni kívánt P116 PE ellenanyaggal jelöltük. A mérésre FACS Calibur áramlási citométert használtunk.

1,25-dihydroxivitamin D3 és retinsav kezelés

A CD8 β + T-sejteket 7 x 10⁵ sejt/well sűrűségben, teljes médiumban (RPMI 1640, 10% human AB szérum, 1% glutamin, 1% penicillin/sztreptomycin) 24 lyukú plate-re helyeztük, majd két napig 2,5ng/ml rekombináns humán IL-12 jelenléte mellett, 1:3 sejt:bead arányban alkalmazott CD3/CD28 Dynabeadekkel aktiváltuk. Az aktivációt követően a CD8 β + T-sejt kultúrákat 12,5 ng/ml rekombináns humán IL-2-vel egészítettük ki, majd három aliquotra osztottuk. Az első párhuzamos 10⁻⁸M retinsav, a második 10⁻⁸M 1,25-dihydroxivitamin D3, míg a harmadik, a kontrollként szolgáló CD8 β + T-sejt kultúra csak oldószer/segédanyag, azaz 0,1% etanol kezelést kapott. Az aktivációt követő 10. napig a kultúrákat kétnaponta két részre osztottuk. Az első fél új médiumot kapott az összes kezelésre alkalmazott hatóanyag friss kiegészítésével és további fenntartásra került, míg a kultúra másik fele áramlási citometriás analízisnek lett alávetve.

PI-16 Pulldown assay, és a lekötött proteázok azonosítása

Először egészséges bőr biopsziákat gyűjtöttünk, melyekből protein lizátumokat képeztünk. Ennek érdekében a bőr biopsziákat kimetszésük után elsőként azonnal Halt™ Protease inhibitor koktéllal kiegészített ProteoJet Mammalian Cell lízis reagensbe helyeztük, majd 30 percig 4°C-on inkubáltuk. Ezt követően a szubkután zsírt eltávolítottuk, majd a mintákat steril szikével 1-3mm nagyságú darabokra vágtuk. Végül Diax 100 homogenizátorral homogenizáltuk, majd az oldhatatlan sejtörmelékot és csapadékot centrifugálással eltávolítottuk, majd -80°C-on tároltuk. A bőr lizátumon elvégzett, a PI16-ot mint csalit alkalmazó pulldown assay elvégzéséhez első lépésben a 10 μ g mennyiségű, GST taggelt, humán

rekombináns PI16 fehérjét a protein glutation-mentesítése érdekében dializáltunk egy Slide-A-Lyzer dialízis kazetta segítségével. Az így megtisztított PI16 fehérjét a GST Protein Interaction Pull-Down Kit segítségével glutation-kapcsolt agaróz beadekhez kötöttük. Végül a pull-down assay során 100µg bőr fehérje lizátumból a beadhez kötött PI16, mint csali segítségével a hozzá kapcsolódó bőr proteineket kötöttük le, a folyamatot a gyártói utasításoknak megfelelően végezve. Az aspecifikus kötődés mértékének felmérésére kontrollként üres, PI16-ot nem hordozó beadeket használtunk. Ezt követően a specifikusan lekött proteázok azonosítása érdekében a pulldown, azaz specifikusan lekött, és az átfolyó, nem köttő fehérjefrakciókat vetettük össze a PI16-ot hordozó és nem hordozó gyöngyök használata során. Ehhez az egyes frakciókat a Proteome Profiler™ Human Protease Array Kit segítségével vetettük össze. A proteáz array használata a gyártói utasításoknak megfelelően zajlott. A kiértékelés a FluorChem Alphaview szoftver segítségével történt.

4. Eredmények

OT-I → OVA akut GvHD modell

Munkánk során elsőként egy olyan új, az irodalomban még le nem írt, egér aGvHD modell felállításán dolgoztunk, amely a CD8+ T sejtek bőrbe és bélbe zajló homingját képes egy tiszta rendszerben, egyetlen antigénre adott, egyidejű T sejtés válaszok keretében összehasonlítani. A modell alapját két kereskedelmi forgalomban elérhető egértörzs, a C57BL/6 OT-I és a C57BL/6 Act-mOVA törzsek adták. A modellben a recipiens és donor állat az MHC-, és egy kivételével minden minor antigén szintjén azonos, azonban egyetlen, pontosan ismert minor antigén (OVA) tekintetében különbözik

egymástól. A donorból (OT-I) származó transzplantált, transzgén TCR-t hordozó CD8⁺ T-sejtek a recipiens állat minden testi sejtjén felismerik ezt a minor antigént, egészen pontosan a csirke ovalbumin SIINFEKL peptidjét, mely a H2^{Kb} MHC I-molekulán kerül prezentációra. A rendszer így a klinikumban teljes HLA egyezés mellett végrehajtott, ún. MUD aHSCT-nek egy speciális, különösen tiszta, egyetlen, pontosan definiált minor antigén eltérésre korlátozott modelljeként fogható fel.

Az e két törzs felhasználásával végrehajtott egér experimentális HSCT-ben a donor OT-I CD8⁺ T-sejtek a transzplantációt követő 4-7. napon belül 100%-ban letális aGvHD-t okoztak a recipiens Act-mOVA egerekben. Váratlan módon azonban bár az aGvHD kiterjedt a bélrendszerre, a májra, és a tüdőre, a bőr nem mutatott CD8⁺ T sejt infiltrációt, klonális expanziót, illetve aGvHDs szövetkárosodást sem.

A különböző szervekből visszanyert miHA-specifikus CD8⁺ T-sejtek microarray vizsgálata során a vékonybél esetében azok a gének, amelyek a gyors klonális expanzióhoz szükségesek, kevésbé intenzíven íródtak át, mint az aGvHD bármely más célszervében, amely arra utal, hogy a modell valóban alkalmas lehet különböző szervi T-sejtek összehasonlító fenotípzálására. Sajnos azonban az aGvHD bőrben történő manifesztációjának elmaradása miatt a CD8⁺ T-sejtek bőr és bél specifikus homing összehasonlító vizsgálata nem valósult meg. A modellünk így egy már korábban leírásra került, csak kután aGvHD manifesztációt mutató rendszer, a K14-OVA modell kiegészítő modelljeként használható fel.

CD8⁺ T-sejt homing markerek vizsgálata humán mintákon

Munkánk második részében mi bizonyítottuk elsőként humán mintákon, hogy a PI16 a humán bőrbe vándorló, nem naiv CLA+/CD8+/CD45RO+ T-sejtek jellegzetessége, ám kifejeződése nem teljes, a bőrbe vándorló T-sejt alkategóriákon belül változatos, és főleg a nyugvó sejtekre jellemző.

A PI16 elsődlegesen ezen sejtek plazmamembránjában, mégpedig GPI horgonyzás segítségével lokalizálódik, és megjelenése az aGvHD szervi érintettségétől, az a GvHD-től, sőt még az aHSCT-től is független, azaz egy meglepően általános, a bőr-hominghoz igen erősen asszociált, eddig ismeretlen markerről van szó.

Szabályozását tekintve azt tapasztaltuk, hogy a PI16 megjelenése feltehetően független bármilyen eddig ismert, DC-indukálta illetve szervi, epitheliális eredetű homing programozó szignáltól, másrészt egyértelműen bizonyítottuk azt is, hogy a PI16 sejtfelszíni fennmaradása a bőrbe vándorló, nyugvó CD8+ T-sejten addig tart, amíg az reaktiválódik, és effektor CD8+ T-sejtté nem érik.

A PI16 funkcióját tekintve az általunk elvégzett vizsgálatok alátámasztották az egér kísérletekből származó eredményeket, miszerint a PI16 a humán CD8+ T-sejtek esetén a katepszin K részleges inhibitoraként hat, a nanomoláris tartományban. Mindez számos érdekes spekulációra ad lehetőséget a CD8+ T-sejtek bőrben betöltött funkciójának tekintetében, mint például, hogy a gyulladásos válaszokban aktiválódó T-sejtek vajon felfüggeszthetik-e a gyulladásos folyamathoz szükséges proteázok gátlását, azaz befolyásolhatják-e a lokális mátrix remodellingjét. Azonban e kérdés egyértelmű tisztázásához további vizsgálatokra, a PI16 pontosabb megismerésére, s ehhez pedig mindenekelőtt a fehérje egyetlen meglévő

funkcionális doménjének, a rejtélyes, és gyakorlatilag teljesen ismeretlen CAP doménnek a megismerésére lesz szükség.

5. Következtetések

OT-I → OVA akut GvHD modell

1. A munka első felében sikeresen állítottunk be és validáltunk egy új, TCR-módosított, egyetlen miHA antigénre való reakción alapuló, egér experimentális aGvHD modellt.
2. Modellünk a humán aHSCT-k nagy részére jellemző MUD transzplantációt, reprodukálja, így a hagyományos modellek többségéhez képest jobban prezentálja a klinikai körülményeket
3. A modell a recipiens állatok körében 100% letalitással, nagyon jól reprodukálható módon, 4-5 napon belül váltotta ki az aGvHD-t, a legkülönbözőbb perifériális célszervekben, azonban egy aGvHD célszerv a bőr látványos kivételével.
4. A kután aGvHD kialakulásának elmaradása esetleg azzal magyarázható, hogy míg a többi szerv esetén a transzplantációt követő 4-5. napon kialakult az aGvHD, addig a bőr esetében ehhez a kisszámú elérhető OVA-prezentáló APC miatt sokkal több időre lett volna szükség. Más szóval: lehetséges, hogy az Act-mOVA modellben egyszerűen nem volt elég idő a bőr tünetek megjelenésére az állatoknak az egyéb, a bőrnél sokkal inkább létfontosságú és sokkal erőteljesebben károsodó aGvHDs célszervek diszfunkcionalitása okozta pusztulásáig.
5. Az általunk létrehozott modellrendszer hatékony, komplementer kiegészítés lehet egy már leírt, szintén

egyetlen miHA mismatch-en alapuló, szintén TCR módosított aGvHD modellnek (K14-OVA), mely kizárólag a bőrben okoz aGvHD kialakulást, míg saját modellünk rendkívül jól prezentálja az aGvHD által leginkább érintett összes további szervet, így a bélrendszert, a májat és a tüdőt.

6. A modell lehetőséget nyújt a különböző szervekben elhelyezkedő, illetve oda bevándorló CD8+ T-sejtek szövetspecifikus követésére, visszanyerésére, és fenotípezésére az aGvHD folyamata során, és így lehetővé teszi a betegség mechanizmusának mélyebb megértését, illetve némi módosítással alkalmas a cross prezentáció, illetve akár a graft versus leukémia (GvL) hatás vizsgálatára is.

CD8+ T-sejt homing markerek vizsgálata humán mintákon

1. Megállapítottuk, hogy a peptidáz inhibitor 16, a bőrbe vándorló nem naiv, nyugvó, CD8+/CLA+/CD45RO+ T-sejteken expresszálódott, alapkutatási szempontból fontos új, bőr irányú homing biomarkere a CD8+ T-sejteknek.
2. A PI16 klinikai értéke feltehetően csekély, lévén nem kapcsolódik egyik aGvHD szervi manifesztáció kialakulásához sem.
3. Ebben a kutatási szakaszban az aGvHD végső soron, mint egy modell rendszer került felhasználásra, mely lehetővé tette a bőrbe, illetve a bélbe vándorló CD8+ T-sejtek egyébként nehezen kivitelezhető, párhuzamos vizsgálatát és markereinek karakterizálását.

4. A PI16 a T-sejtek kizárólagossága, mely membrán kötött formában és GPI horgonyzáson keresztül kapcsolódik ezen sejtek plazmamembránjába.
5. A PI16 expressziója egészséges bőrben, a bőr nyugalmi, *steady state* állapotában, *in situ* is fennmarad.
6. Reaktiváció hatására a PI16 gyors, transzkripciós leszabályozódása történik.
7. A PI16 szabályozása a bőrbe vándorló CD8+T-sejteken függetlennek bizonyult minden olyan ismert, irodalomban leírt faktortól, amelyek szerepet játszanak más bőr-homing markerek megjelenésében, és különösen, illetve egyértelműen független azoktól, amelyek fontosak a CLA befolyásolásában.
8. A PI16 funkcióját tekintve a katepszin K részleges inhibitora.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

- Barbara Érsek*, **Nikolett Lupsa***, Andor Horváth, András Bencsik, Eszter Lajkó, Pálma Silló, Ádám Oszvald, Zoltán Wiener, Péter Reményi, Gábor Mikala, Tamás Masszi, Edit I Buzás, Zoltán Pós (2018) Skin-homing CD8+ T cells preferentially express GPI anchored peptidase inhibitor 16, an inhibitor of cathepsin K
European Journal of Immunology, DOI 10.1002/eji.201847552
(*megosztott első szerzők)
IF: 5,788

- **Nikolett Lupsa**, Barbara Érsek, Péter Pócza, Anett Tóth, Andor Horváth, Viktor Molnár, Bence Bagita, András Bencsik, Hargita Hegyesi, András Matolcsy, Edit I. Buzás, Zoltán Pócs (2016) Unique patterns of CD8+ T-cell-mediated organ damage in the Act-mOVA/OT-I model of acute graft-versus-host disease Cellular and Molecular Life Sciences, DOI 10.1007/s00018-016-2237-7
IF: 4,695

Az értekezéshez fel nem használt közlemények:

- Wit, J., Sarup, P., **Lupsa, N.**, Malte, H., Frydenberg, J., Loeschcke, V. (2013) Longevity for free? Increased reproduction with limited trade-offs in *Drosophila melanogaster* selected for increased life span Exp Gerontol, DOI 10.1016/j.exger.2013.01.008
IF: 3,529
- Királyhidi Panna, Marton Nikolett, Baricza Eszter, Molnár Eszter, Badari Noémi, **Lupsa Nikolett**, Buzás Edit, Nagy György (2018) Egérmodellek a rheumatoid arthritisben Immunológiai Szemle, X. évfolyam 4. szám, 2018
- **Lupsa Nikolett** (2016) Támadás a befogadó szervezet ellen Élet és tudomány, 2016/25

Összesített impakt faktor: **14,012**