

Záró beszámoló az OTKA K101493 azonosítójú, „Investigating the role of ZAP-70 kinase in the pathogenesis of an autoimmune model of rheumatoid arthritis” [A ZAP-70 kináz szerepének vizsgálata egy rheumatoid arthritis modell patogenezisében] című pályázathoz
Futamidő: 2012.02.01-2017.01.31.

I. A ZAP-70 deficiens egerek beszerzése, tenyésztése és visszakeresztezése BALB/c genetikai háttérre.

1. Bár már 2012. márciusában megrendeltük, technikai okok miatt, a B6.129X1-Zap70^{tm1Weis}/J egerek csak 2012. július végén érkeztek meg Intézetünkbe a Jackson Laboratories-tól. Ennek oka röviden: ez az egértörzs csak krioprezervált formában volt elérhető és a „visszanyerés” min. 2 hónapot vesz igénybe. Ráadásul az első visszanyerés nem volt sikeres, ezért volt a jelentős csúszás. Az egerek tenyésztését azonnal megkezdjük, az első almok augusztus végén jöttek világra. A gyári ajánlásnak megfelelően farokvégből származó DNS-ből végezzük az egerek genotipizálását PCR technikával. Röviden: 3 primer segítségével elkülöníthetők a normál vad típusú (wt), illetve a mutáns allélt hordozó egerek, így a homo-, heterozigóta illetve wt egereket biztosan el tudjuk különíteni 2-3 hetes korukra.

2. Mivel a pályázatban a rhG1-indukált autoimmun arthritis modellt kívántuk használni, ami csak BALB/c egerekben váltható ki, ezért a fenti B6.129X1-Zap70^{tm1Weis}/J egereket először vissza kellett kereszteznünk. A fent részletezett ok miatt a visszakeresztezést csak 2012. szeptemberében tudtuk megkezdeni. Röviden: ZAP-70^{+/-} C57B6 hímeket pároztattunk BALB/c nőstényekkel, a született almokat a genotipizáló primerekkel szűrtük a ZAP-70 mutáns allél jelenlétére. A mutáns allélt hordozó F1,2,3...9 egereket 5-6 hetes korukban újból BALB/c egerekkel pároztattuk, majd hasonlóan jártunk el, mint fent. A visszakeresztezési folyamat 2014 szeptemberére befejeződött: elértük a 10. generációt (ami már ~100%-ban BALB/c-nek tekinthető) és az ebből származó heterozigóta egerekből tenyészpárokat hoztunk létre, amelyek biztosították a további kísérletekhez szükséges ZAP-70^{+/-} ill. ZAP-70^{-/-} BALB/c egereket.

II. A ZAP-70 deficiens egerek alapvető jellemzése, a különböző genotípusok összehasonlítása

Elvégeztük a ZAP-70^{-/-} (homozigóta), ZAP-70^{+/-} (heterozigóta) ill. ZAP-70^{-/-} (WT) egerek alapvető immunfenotipizálását (1. Táblázat).

1. Táblázat

A vér, perifériás és centrális nyirokszervek összetétele WT, ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerekben

Szövet	Genotípus	B sejt	T sejt	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
Vér	ZAP-70 ^{+/+}	49.0±0.9	42.9±1.3	59.3±2.1	38.2±2.3
	ZAP-70 ^{+/-}	60.8±4.5	32.8±4.6	62.0±4.0	35.7±3.4
	ZAP-70 ^{-/-}	76.3±7.0**	1.5±0.3**	2.5±0.7**	2.8±0.5**
Nycs.	ZAP-70 ^{+/+}	19.2±1.2	79.5±1.1	58.7±1.5	40.1±1.3
	ZAP-70 ^{+/-}	26.3±0.2*	69.4±0.1*	70.0±2.9*	28.9±3.0*
	ZAP-70 ^{-/-}	86.6±0.9**	6.3±0.2**	2.8±0.3**	5.4±0.1**
Lép	ZAP-70 ^{+/+}	42.8±2.7	48.2±2.0	56.4±2.3	38.4±2.0
	ZAP-70 ^{+/-}	64.2±2.9**	30.0±2.2**	63.8±2.7	32.4±2.5
	ZAP-70 ^{-/-}	91.6±1.0**	1.4±0.1**	0.5±0.0**	3.8±0.1**

Szövet	Genotípus	B sejt	T sejt	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
Thymus	ZAP-70 ^{+/+}	0.7±0.1	89.6±0.7	7.4±0.4	2.3±0.2
	ZAP-70 ^{+/-}	0.8±0.2	87.0±1.4	9.8±0.9	2.4±0.3
	ZAP-70 ^{-/-}	0.8±0.1	99.0±0.1**	0.1±0.0**	0.2±0.1*

A táblázatban összefoglaltuk az n=3 db WT ill. n=4-4 db ZAP-70^{+/-} vagy ZAP-70^{-/-} egér szöveteinek áramlási citometriás adatait. Az értékek átlagos százalékot ± SEM jelentenek. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jelöltük *P<0.05; **P<0.005.

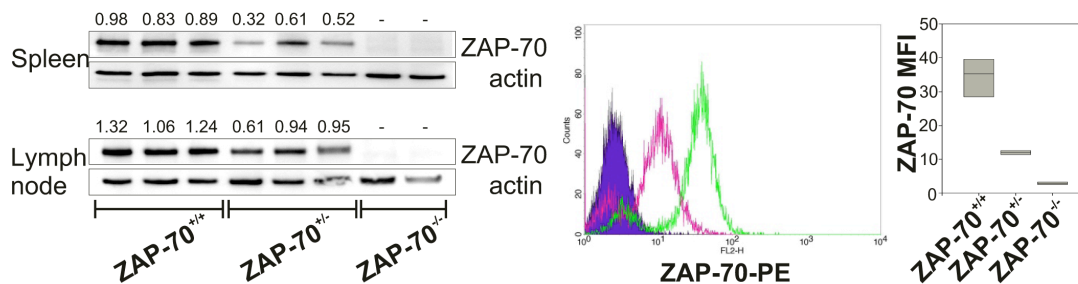
Röviden:

1. A homozigóta ZAP-70 hiányos egerekben a T sejtek fejlődése zavart szenved: a thymusban a CD4⁺CD8⁺ kettősen pozitív (DP) thymocyták nem képesek érett CD4⁺ vagy CD8⁺ egyszeresen pozitív (SP) sejtekké differenciálódni. Ennek megfelelően a thymocyták közel 99%-a DP sejt, a SP sejtek teljes hiánya mellett. Emellett a thymus szöveti szerkezete is károsodott: a normális cortex/medulla megoszlás helyett a medulla szinte teljes hiányát láttuk EpCam-1/Ly51 markerek felhasználásával.
2. Áramlási citometriás méréseink szerint a homozigóta ZAP-70 hiányos egerekben nincsenek T sejtek a vérben és a lépben, a nyirokcsomókban viszont található néhány százaléknyi T sejt (CD3 festést használva). Ezen eredményeink összhangban vannak egy korábbi munkával, ahol kimutatták, hogy a

nyirokcsomóban található T sejtek ezekben az egerekben $\gamma\delta$ T sejtek (Kadlecek et al., J Immunol 1998; 161:4688-4694.), amit a későbbiekben mi is meg tudtunk erősíteni.

- Érdekes módon, és eddig tudomásunk szerint mások által le nem közölt eredményünk, hogy a ZAP-70^{+/-} egerekben is találhatóak sejttözetélteli különbségek: csökkent T sejt és fokozott B sejt arányt találtunk a vérben, nyirokcsomókban és a lépben, emelkedett CD4⁺ T sejt aránnyal. A thymusban szintén megfigyeltük a CD4⁺ T sejt arány növekedését. Ennek pontos magyarázatát egyelőre nem tudjuk.

Megvizsgáltuk továbbá a ZAP-70 expressziót ZAP-70^{+/+}, ZAP-70^{+/-} ill. ZAP-70^{-/-} egerekben (1. ábra). Mind Western-blottal mind áramlási citometriával megerősítettük, hogy ZAP-70 expressziója kb. a normál kontrol 30-50%-a heterozigóta egerekben (1. ábra).



1. ábra A ZAP-70 expresszió összehasonlítása ZAP-70^{+/+}, ZAP-70^{+/-} ill. ZAP-70^{-/-} egerekben. Az ábrán reprezentatív Western-blot és áramlási citometriás eredményeket mutatunk be.

III. A homozigóta ZAP-70 deficiens egerek T sejt immundeficienciájának helyreállítása

A T sejtek teljes hiányának következtében a ZAP-70^{-/-} homozigóták immundeficiensek, ami miatt a konvencionális (nem SPF) körülmények között történő tenyésztés során viszonylag korán: 6-8 hetes korukban elpusztulnak. Mivel a pályázatban ZAP-70^{-/-} alapon terveztünk létrehozni különféle ZAP-70 konstrukciókat expresszáló transzgenikus egereket, ezért kulcsfontosságú volt, hogy a homozigótákat ivarérett korukig tenyészteni tudjuk.

Ezért adoptív transzfer segítségével rekonstituáltunk homozigóta ZAP-70^{-/-} egereket WT ZAP-70^{+/+} testvéreikből származó sejtekkel. Kétféle transzfer technikát alkalmaztunk: thymus sejtekkel illetve csontvelő sejtekkel, mindkét esetben sikerült létrehozni olyan stabil kimérizmust, melynek során a T sejtek termelődése visszatért. Ez áramlási citometriával igazolható volt mind a vérből, mind egyéb nyirokszervekből, továbbá fontos funkcionális bizonyíték a transzferek sikerességére, hogy ezeknek az egereknek az élettartama szignifikánsan megnőtt a homozigóta ZAP-70^{-/-} kontrollokéhoz viszonyítva.

Mivel a WT thymocytá transzferrel stabil kimérizmust sikerült jó hatékonysággal elérnünk reprodukálható módon ZAP-70^{-/-} recipiensekben, és az intraperitoneális beadási útvonal sem megszokott ilyen típusú vizsgálatokban, ezért további vizsgálatokat végeztünk a T sejt rekonstitúció pontosabb mechanizmusának megismerésére, habár ez nem szerepelt az eredeti munkatervben.

Eredményeink alapján az intraperitoneális thymocytá transzfer után a donor thymocyták az omentumban található milky spotokon keresztül hagyják el a peritoneumot, majd a thymusba vándorolnak.

A thymusban a donor-eredetű CD4⁺CD8⁻ kettős negatív thymocyták helyreállítják a T sejt-képzést és a ZAP-70 knockout egerekre jellemző abnormális thymus morfológiát. A thymocytá transzfer után a transzferált egerek thymusában a medulla területe megnőtt a ZAP-70 knockout egerek medullájához képest, ezzel egyidőben egyszeresen pozitív thymocyták jelentek meg a thymusban.

Ezt követően, az újonnan fejlődött, donor-eredetű, egyszeresen pozitív $\alpha\beta$ T sejtek megjelennek a vérben és a perifériás nyirokszervekben (inguinális-, axilláris-, mesenterialis nyirokcsomók, lép, Peyer plakk), ahol rendezett T sejt zónákat alkotnak. A létrehozott kimérizmus stabil, mivel a donor-eredetű sejtek a transzferált ZAP-70^{-/-} egerekben a transzfert követően 8 hónappal is kimutathatók voltak.

A III. fejezetben leírt eredményeinket közlésre beküldtük az International Immunology folyóiratnak.

IV. Rekombináns humán G1 (rhG1)-indukált arthritis beállítása

A projekt során sikerült megfelelő mennyiségű rekombináns humán (rh) G1 antigént termelnünk. Röviden: a külföldi kollaborációs partnerunktől, Prof. Dr. Glant Tibortól (Rush University Medical Center) származó rhG1 termelő CHO sejtek felüliszójából tisztítottuk a rhG1 antigént protein G oszlopon. A termelt antigén minőségét először Western-blot-on ellenőriztük, majd a szokásos protokoll szerint BALB/c egereket immunizáltunk vele DDA adjuváns jelenlétében (Glant et al. Arthritis Rheum 2011, 63(5):1312-21.). Az általunk termelt rhG1 által kiváltott arthritis (GIA) klinikai képe (súlyosság, kezdet, gyakoriság) mindenben megfelelt a korábban ebben a modellben tapasztalt eredményeknek, azaz sikerült az arthritis modell megszilárdítása Intézetünkben.

V. Az Lck promoter klónozása és a ZAP-70 különböző pontmutációit hordozó konstrukciók előállítása és lentivirális tesztelése

Pályázatunkban olyan ZAP-70 transzgen egerek előállítását tűztük ki célul, amelyekben a ZAP-70 konstrukciókat T sejt specifikus promoter hajtja, amivel T sejt specifikus Tg fehérje expressziót kívántunk elérni. Ezért a projekt első évében megkezdtük a proximális és disztális Lck promoter klónozását. Röviden: a 5'-CGATCGATCGGCAGAATAGACTGCGGAGGTGG-3' és 5'-GCGGATCCGCAAATTCACACACGGCCCCTGAGC-3' ill. 5'-CGATCGATCGCCATGCCCTGAGATGACATGGGAATTG-3' és 5'-GCGGATCCGCCTGCAGCCGTCTGCTATCAGGC-3' primerekkel lymphocita genomialis DNS-ből történt a 686 és 693 bp hosszú proximális (Lck1) ill. distális (Lck2) promoterek amplifikálása.

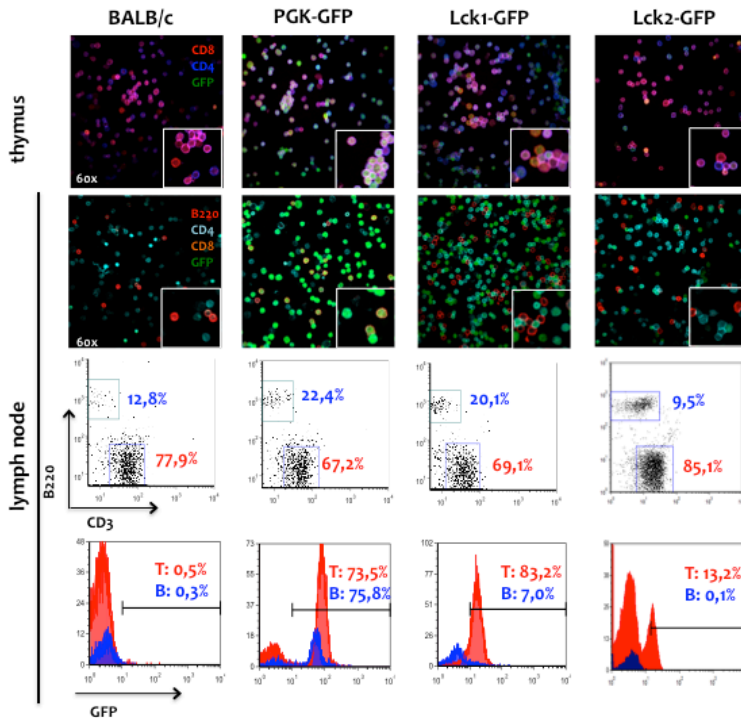
A terméket első lépésben TA vektorba klónoztuk, majd a tervünk szerint ClaI és BamHI restriktációs enzim hasítás után klónoztuk volna be az EF-1 promoter helyére a pWPTS plazmid konstrukcióba. Ez utóbbi lépés azonban jelentős késedelmet szenvedett (csak 2013 végére lett meg) a klónozásban szükséges kompetens baktérium törzsekkel fellépő gondok miatt. *A probléma megoldására beszerzésre került egy új kompetens E. Coli törzs a New England Biolabs-tól.* Így végül sikerült létrehozni a lentivirus termeléshez szükséges végleges plazmid konstrukciókat. A promoter szekvenciáját ellenőriztük.

A fenti klónozási gondok mellett sajnos technikai problémák miatt a lentivirusok készítése 2 évig nem sikerült. Ennek megoldására lecseréltük az összes vírus termeléshez szükséges plazmidunkat ill. a csomagoló sejteket is. Ennek hatására 2014-ben sikerült újra LV-t termelnünk.

A fentiekre való tekintettel, mivel 2013-ban a pályázatunk több kulcs lépése is késedelmet szenvedett, ezért kérelmeztük a pályázat futamidejének 1 éves meghosszabbítását, amit Prof. Dr. Acsády László, az OTKA Élettudományi Kollégium Elnöke engedélyezett is. A 2013-ra vállalt feladatokból sajnos több csak a későbbi évekre csúszott át, illetve emiatt bizonyos részfeleletek megvalósítása nem is sikerült a futamidő lezárásával ld. a későbbiekben (ezek azonban folyamatban vannak).

VI. Lck-GFP transzgen egerek létrehozása

A fenti késedelmek miatt csak 2015 őszén tudtuk megkezdeni a transzgenikus egerek előállítását a gödöllői Biotechnológiai Központban Dr. Bender Balázs segítségével. A technikai megközelítésünk tesztelésére, ill. az Lck promoterek *in vivo* aktivitásának tesztelésére, előkísérletként 2015 őszén/telén először olyan transzgen BALB/c egereket állítottunk elő, amelyekben az Lck promoterek irányítása alatt GFP reporter fehérje expresszálódik. A transzgenézis jó hatékonysággal (az egerek több mint 50%-ban igazolható génbevitel) sikerült, a transzgent az egerek átörököítették, és a transzgen egerekben a GFP fehérje T sejt specifikus módon expresszálódik (2. ábra). Ez egyben igazolta a promoterek megfelelő *in vivo* működését is, amit csontvelő-kiméra rendszerben csak később tudtunk igazolni (ld. VII. rész).



2. ábra Lck1- és Lck2-GFP egerek jellemzése. 2 új BALB/c GFP transzgenikus egértörzset hoztunk létre lentivirális transzgenézissel. Az Lck1 promoter főleg a thymocytákban aktív, de a periférián is működik, míg az Lck2 promoter a thymusban inaktív, csak perifériás T sejtekben működik. A felső paneleken látható citopreparátumokat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az alsó panelek az áramlási citometriás eredményeket mutatják. Összehasonlításként a korábban szintén Gödöllőn készült ubikviter PGK promoter által irányított GFP Tg egeret használtunk, míg az első oszlopban negatív kontrol BALB/c egér látható.

Ezen egereket tovább tenyésztettük, és az Lck1-GFP-BALB/c ill. Lck2-GFP-BALB/c transzgenikus egértörzs megszilárdítása megtörtént. Ezek az új transzgenikus egértörzsek ugyan nem voltak betervezve az eredeti munkatervbe, de segítségükkel az eredetileg tervezett csontvelői kiméra

kísérletek alternatívájaként tesztelni tudtuk a promotereink megfelelő *in vivo* működését valamint a lentivirális transzgen bevitelt; továbbá értékes modellek lehet további munkánkhoz. A két új Tg egértörzs teljes körű jellemzése jelenleg zajlik, amely eredményeket egy önálló publikációban szeretnénk leközzölni a közeli jövőben.

VII. Az Lck-ZAP-70 konstrukciók *in vivo* tesztelése csontvelő kiméra rendszerben

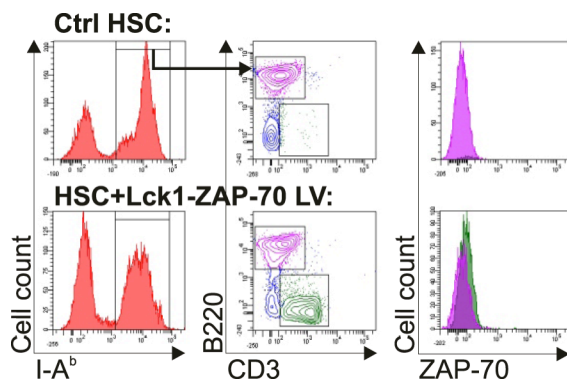
Pályázatunkban vállaltuk a különféle Lck-ZAP-70 konstrukciók *in vivo* tesztelését csontvelő kiméra rendszerben. Ennek megkezdésére, a fenti okokból késedelmet szenvedő LV termelés miatt, csak a kutatás 3. évében került sor.

Röviden: 3-4 hetes ZAP-70^{-/-} C57B6 donor egerek csontvelőjéből hemopoetikus őssejteket tisztítottunk a lineage⁺ sejtek depléciójával, majd az izolált sejteket *in vitro* 24 órán keresztül rekombináns SCF, Flt3L és TPO citokin koktéllal stimuláltuk. A stimuláció után a sejtekre 100x töménységű LV felülúszókat tettünk 24 órára. A 3-4 hetes BALB/c recipiens egereket a transzfer előtt 2x6Gy szubletális irradációval készítettük elő, majd a 2. irradációt követően kb. 4 órával órával farkok vénába adtuk be a donor sejteket (~50000 sejt/recipiens).

4 héttel a transzfert követően vérvétellel vizsgáltuk a kimérisztust, majd további 4-6 héttel később fejeztük be a kísérleteket a recipiens feláldozásával. A kísérletek végén izoláltuk a nyiroksomókat, lépét, thymust, hogy a kimérisztust vizsgálni tudjuk. Mivel a donor sejtek C57B6 genetikai háttérből jöttek, ezért az MHC haplotípus (I-A^b) alapján biztosan azonosítani tudtuk a donor eredetű sejteket.

Sajnos a transzfer kísérleteink során elég jelentős mortalitást tapasztaltunk (50-60%). Ennek oka valószínűleg a viszonylag alacsony donor sejttség lehetett. Mivel LV transzfecciót hajtottunk végre a transzgen konstrukciók bevitelére, ezért a megfelelően magas MOI érték eléréséhez ezt a sejtstet találtuk megfelelőnek saját előkísérletek, irodalmi adatok, ill. más kutatócsoportokkal történt konzultációk alapján. A sejtstet növelésével javult ugyan a túlélés, de gyakorlatilag nem történt transzgen beépülés.

A sikeres transzgen beépülést a donor eredetű I-A^b T sejtek megjelenése jelezte a periférián. Fontos, hogy a kontrol ZAP-70^{-/-} egér HSC-vel transzferált recipiensekben soha nem találtunk donor eredetű T sejtet. Az ismételt próbálkozásaink ellenére ezen kísérleteinkből csak annyit tudtunk levonni, hogy habár a transzgen beépülése T sejt specifikus ZAP-70 expressziót hozott létre a recipiensekben, de sajnos a transzfecció hatékonysága összességében nagyon alacsony volt (~10-20%). Ez összhangban van irodalmi adatokkal melyek szintén azt mutatják, hogy az egér csontvelői őssejtet LV transzfecciója csak alacsony határfokkal működik.



3. ábra ZAP-70 transzgén bevitelle csontvelői őssejtekbe. Az ábrán két egér reprezentatív áramlási citometriás eredményeit mutatjuk be. A ZAP-70^{-/-} C57B6 donor eredetű sejteket I-A^b pozitivitásuk alapján különítettük el a recipiens BALB/c saját (I-A^d) sejtjeitől (bal oldali hisztogramok), majd ezeknek a sejteknek vizsgáltuk a CD3 (zöld) / B220 (lila) megoszlását (T sejt/B sejt megoszlás)(középső kontúr plotok). Végül intracelluláris festéssel mértük a ZAP-70 expressziót a T- (zöld) ill. B sejtokban (lila) (jobb oldali hisztogramok).

A fenti okok miatt, a különböző Y-F pontmutációkat hordozó ZAP-70 konstrukcióink közötti különbségeket eddig még nem tudtuk pontosan jellemezni, mivel egyszer

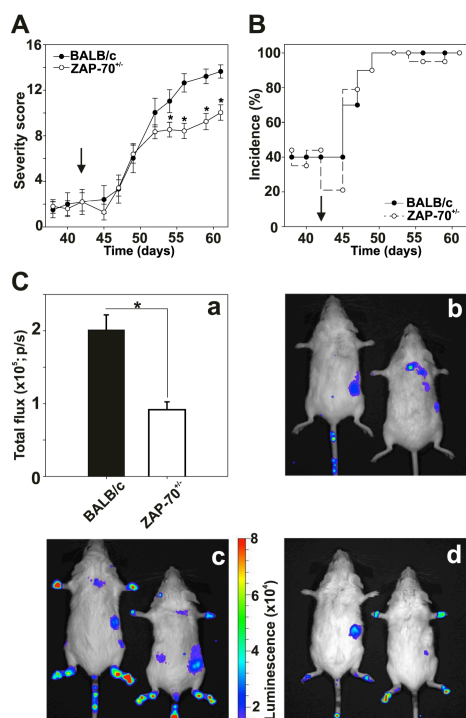
sem maradt egy-egy kísérleti csoportban megfelelő számú recipiens egér az összehasonlításukhoz. Az azonban reprodukálható volt, hogy azokban a kimérékben, ahol transzgén beépülés történt, ott minden esetben csak a T sejtek expresszálták a ZAP-70-et. Ez, tudomásunk szerint eddig ilyen kísérleti rendszerben még senkinek sem sikerült. Korábbi munkákban a ZAP-70^{-/-} egerek csontvelői sejtjeiben csak ubikviter promotor irányítása alatt korrigálták sikerrel a ZAP-70 expressziót, ami viszont így ektópiás módon expresszáldott B sejtekbe és myeloid sejtekben is (Otsu et al. Blood, 100(4): 1248-1256, 2002). Tervezzük ezen kísérleteink folytatását és további optimalizálását, valamint az eredményekből publikáció összeállítását.

VIII. rhG1 indukált arthritis vizsgálata ZAP-70^{+/-} egerekben (az ebben a fejezetben részletezett eredményekből jelenleg készítünk elő egy közleményt az Arthritis and Rheumatology szakfolyóiratba)

A ZAP-70 knock-out egerek visszakeresztezése után teszteltük, hogy valóban kiváltható-e bennük a

GIA. Elsősorban a ZAP-70^{+/-} egerekre voltunk kíváncsiak, mivel a ZAP-70^{-/-} egerekben egyáltalán nincsenek T sejtek, amik alapvetően fontosak a GIA kialakulásához (Glant et al. ARTH RHEUM/AR C RES 63: (5) 1312-1321, 2011) ezért tehát a homozigótákban valószínűleg egyáltalán nem alakul ki a betegség.

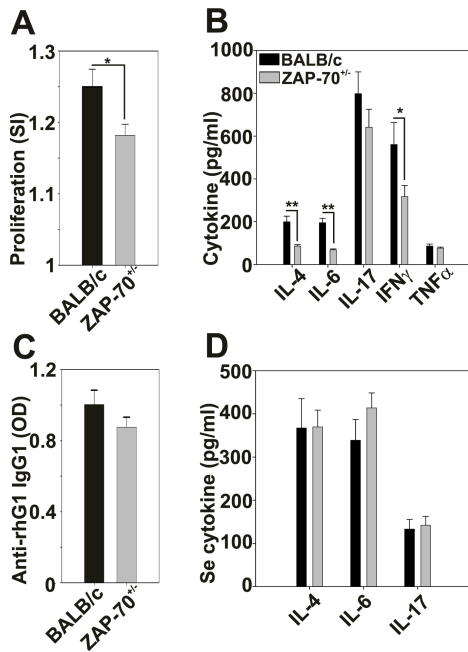
Habár a ZAP-70^{+/-} egerek 100%-ban arthritisesek lettek (4. B ábra), de csökkent az ízületi gyulladás súlyossága a normál BALB/c egerekhez viszonyítva (4. A ábra). A klinikai tünetek pontosos értékelését *in vivo* gyulladás képalkotással is megerősítettük (4. C ábra).



4. ábra rhG1-indukált arthritis ZAP-70^{+/-} egerekben. **A:** Az arthritis súlyosságát klinikailag pontosos módszerrel értékeltük. Az ábrán az egyes egerek mindegyik végtagjára adott összegzett pontok átlaga ± SEM értéke látható. A statisztikailag szignifikáns

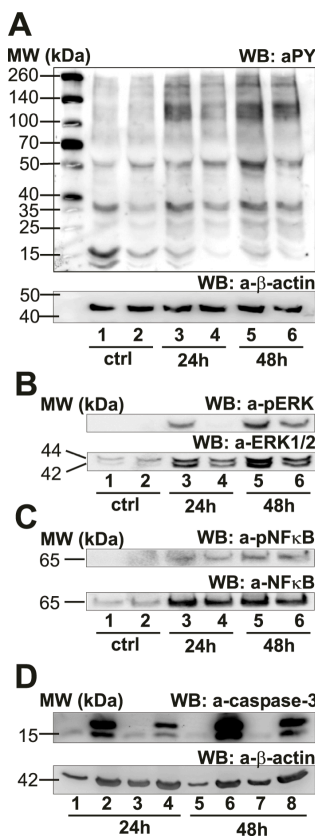
különbségeket jelöltük (P<0.05). Nyíllal jelöltük az utolsó immunizálás idejét (42. nap). **B:** Az arthritis incidenciájának összehasonlítása ZAP-70^{+/-} és BALB/c egerekben. Nyíllal jelöltük az utolsó immunizálás idejét (42. nap). **C:** A végtag ízületek gyulladásának *in vivo* képalkotó vizsgálata. **a:** A képalkotó vizsgálat kvantitatív analízise. Az ábrán a kísérletben részt vevő n=19 db ZAP-70^{+/-} és n=10 db BALB/c egér lumineszcencia átlag ± SEM adatait mutatjuk be. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jelöltük (P<0.05). Az ábrán látható reprezentatív képek egészséges kontrol **(b)**, arthritises BALB/c **(c)** ill. ZAP-70^{+/-} **(d)** egerekből származnak.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy a klinikai kép különbségeit magyarázhatják-e az rhG1 specifikus immunválasz esetleges eltérései heterozigóta egerekben (5. ábra). *In vitro* lépsejt kultúrákban csökkent proliferációt (5. A ábra) és csökkent IL-4, IL-6, IL-17 és IFN γ termelést mértünk (5. B ábra). A szérumban kis mértékben csökkent anti-G1 antitest termelést (5. C ábra) és változatlan IL-4, IL-6 és IL-17 termelést találtunk (5. D ábra).



5. ábra rhG1 ellenes immunválasz ZAP-70^{+/-} egerekben. **A:** *In vitro*, az rhG1-indukált proliferációs választ lépsejt kultúrában festék konverziós teszttel vizsgáltuk. Az ábrán n=19 db ZAP-70^{+/-} és n=10 db BALB/c egerből izolált lépsejt kultúra átlag stimulációs index (SI; stimulált \pm SEM) adatait mutatjuk be. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jelöltük (P<0.05). **B:** *In vitro*, az rhG1-indukált citokin termelést sandwich ELISA módszerrel vizsgáltuk. Az ábrán n=19 db ZAP-70^{+/-} és n=10 db BALB/c egerből izolált lépsejt kultúra felülészóinak átlag \pm SEM citokin koncentráció adatait mutatjuk be. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jelöltük (P<0.05). **C:** A szérumok anti-rhG1 antitest titerét (OD₄₉₂) egyszerű indirekt ELISA módszerrel mértük. Az ábrán n=19 db ZAP-70^{+/-} és n=10 db BALB/c eger szérum átlag OD \pm SEM adatait mutatjuk be. **D:** A szérumok citokin koncentrációját sandwich ELISA módszerrel mértük. Az ábrán n=19 db ZAP-70^{+/-} és n=10 db BALB/c eger szérum citokin koncentráció átlag \pm SEM adatait mutatjuk be.

Végül, mivel korábban összefüggést találtunk a TcR jelerősség, az aktiváció-indukált T sejt apoptózis és a GIA súlyossága között (Olasz et al., Clin Exp Immunol 167(2):346-355, 2012 és Hanyecz et al. Biomed Res Int 2014), ezért megvizsgáltuk, a ZAP-70^{+/-} egerek T sejtjeinek aktivációs és apoptózis választát. *In vitro*,



6. ábra Jelátvételi változások ZAP-70^{+/-} egerek T sejtjeiben. T sejtet izoláltunk ZAP-70^{+/-} és BALB/c egerek lépéből, majd in vitro aktiváltuk CD3/CD28 tartalmú beadokkal 24 ill. 48 órán át. Végül a sejteket begyűjtöttük és Western-blot analízist végeztünk. **A:** ZAP-70^{+/-} és BALB/c egerek stimulált T sejtjeinek foszfortirozin mintázata (felső panel). Töltési kontrollként a blottot anti-aktin antitesttel is előhívtuk (alsó panel). **B:** ERK foszforiláció vizsgálata (felső panel). Töltési kontrollként a blottot anti-ERK1/2 antitesttel is előhívtuk (alsó panel). **C:** NF κ B foszforiláció vizsgálata (felső panel). Töltési kontrollként a blottot anti-NF κ B antitesttel is előhívtuk (alsó panel). **A-C:** minták: 1: BALB/c kontrol; 2: ZAP-70^{+/-} kontrol; 3: BALB/c 24h aktiváció; 4: ZAP-70^{+/-} 24h aktiváció; 5: BALB/c 48h aktiváció; 6: ZAP-70^{+/-} 48h aktiváció. **D:** Aktív (hasított) kaszpáz-3 kimutatása (felső panel). Töltési kontrollként a blottot anti-aktin antitesttel is előhívtuk (alsó panel). Minták: 1, 5: BALB/c nem stimulált kontrol; 3, 7: ZAP-70^{+/-} nem stimulált kontrol; 2: BALB/c 24h aktiváció; 4: ZAP-70^{+/-} 24h aktiváció; 6: BALB/c 48h aktiváció; 8: ZAP-70^{+/-} 48h aktiváció.

IX. Y-F pontmutáns ZAP-70 transzgenikus egerek létrehozása

A végleges LV konstrukciókkal (2. táblázat) 2016 januárjában tudtuk megkezdeni a transzgenikus egerek létrehozását a gödöllői Biotechnológiai Központban Dr. Bender Balázs segítségével. Röviden: ZAP-70^{-/-} BALB/c egereket gyűjtöttünk, majd ezek pároztatása után az 1 napos ZAP-70^{-/-} zigótákat kimostuk és a transzgenek beviteléhez előzetesen ultracentrifugálással ~1000x töményített LV oldatot injektáltunk a perivitellinális térbe (Kvell et al. Transgenic Res 2010;19:105-112). Az így előkezelt zigótákat álvemhes CD1 anyákba ültettük. A megszületett egereket farok DNS-ből genotipizáltuk, majd vérvétellel választottuk

ki azokat a Tg founder egyedeket, amikben T sejteket tudtunk detektálni. A T sejtek jelenléte a vérben a Tg beépülését jelezte, hiszen ahogy már említettük, a ZAP-70^{-/-} egerekben nincs T sejt.

2. táblázat Y-F pontmutáns ZAP-70 transzgenikus egerek

Konstrukció neve	Promoter	ZAP-70 pontmutáció	Megszületett egerek	T sejt	Founder
Lck1-WT-ZAP-70	Lck1	-	10*	4	-
Lck1-F126-ZAP-70	Lck1	Y126>F126	21*	5	2
Lck1-F492-ZAP-70	Lck1	Y492>F492	8*	3	1
Lck1-F493-ZAP-70	Lck1	Y493>F493	6*+21 [#]	0	?

A táblázatban összefoglaltuk a transzgen egerek előállításának legfontosabb adatait. Születési idő: *2016.02.25.-05.04.; [#]2016.10.02.-10.15.

A foundereket egy lépésben visszakeresztettük ZAP-70^{-/-} BALB/c egerekbe, majd a Tg-t hordozó, T sejtekkel rendelkező F1 állatokból hoztunk létre tenyészpárokat. Már a transzgen állatok létrehozása során megfigyelhető volt, hogy a ZAP-70^{-/-} BALB/c homozigóta állatok sokkal rosszabbul szaporíthatóak, mint a normál egerek. Ritkábban esnek teherbe és jóval kevesebb az ellésekben az utódok száma. Ennek pontos okát nem ismerjük, de elvileg a ZAP-70 közvetlenül nem játszik szerepet a szaporodásban. Ez a jelenség mind a transzgenikusok létrehozását, mind pedig a founderek visszakeresztését megnehezítette. Ráadásul nem egy esetben a founderek nem szaporodtak ill. 1 esetben nem öröközték át a transzgent. Emiatt pl. a WT-ZAP-70 konstrukcióval nem sikerült megszilárdítanunk transzgen egértörzset.

Különösen érdekes az **Lck1-F493-ZAP-70 konstrukció**. Két körben összesen 27 db olyan eger született, amit ezzel a konstrukcióval transzfektáltunk, de egyetlen esetben sem sikerült a periférián T sejteket kimutatnunk. Érdekes módon, a második körben, azonban találtunk 3 db olyan egyedat, amelyekben genom szinten sikerült a transzgen beépülését PCR-al igazolnunk. Ezekben az egerekbe tehát beépült a transzgen, de egyelőre úgy tűnik, hogy nem funkcionál. Ennek több oka is lehet: egyrészt a lentivirális transzgen bevitel véletlenszerű beépüléshez vezet, ami azt is jelenti, hogy a beépült gén a genomban szuppressálódhat. Másrészt, funkcionálisan a F493-as mutáció a ZAP-70 molekula gátolt működését okozza (Szabó et al., *Int Immunol* 24: (2) 79-87, 2012). Elképzelhető, hogy a konstrukció azért sem okoz sikeres T sejt helyreállítást, mert maga a ZAP-70 inaktív. Ennek tisztázására még további munka szükséges.

Tekintettel a transzgen konstrukciók késedelmes előállítására, a ZAP-70 pontmutációit tartalmazó transzgen egerek jellemzését még nem tudtuk elvégezni, jelenleg zajlik az F126-ZAP-70 és a F492-ZAP-70 Tg egértörzsek megszilárdítása ill. szaporítása. A közeli jövőben remélhetőleg már rendelkezni fogunk megfelelő számú Tg egerrel ahhoz, hogy a munkaterv ezen részét is befejezhessük.

X. Publikációk

A projekt ideje alatt 3 előadást, 9 posztert mutattunk be szakmai konferenciákon, 2 összefoglaló közleményünk jelent meg a témában. Jelenleg egy kéziratunk elbírálás alatt van az *International Immunology* folyóiratnál, egy másik pedig előkészítés alatt van az *Arthritis and Rheumatology*-ba való beküldésre (ld. VIII fejezet).

Fentiek alapján kérem a beszámoló szíves elbírálását és elfogadását.

Köszönettel:

Boldizsár Ferenc
Vezető kutató