

A ZAP-70 kináz hiányának vizsgálata *in vivo* T-sejt
aktivációban, differenciációban és autoimmun arthritis
kialakulásában

PhD DOLGOZAT



Kugyelka Réka, MSc

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Pécsi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Boldizsár Ferenc, egyetemi docens

Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1 Bevezetés	8
1.1 A ZAP-70 molekula jellemzése	8
1.2 A T-sejtek fejlődése	9
1.3 A ZAP-70 molekula szerepe a T-sejtek fejlődésében	14
1.3.1 ZAP-70 hiányos egértörzsek	15
1.3.2 A ZAP-70 hiány helyreállítása	16
1.4 TcR jelátvitel	17
1.5 Apoptózis	22
1.6 Rheumatoid arthritis	25
1.6.1 A rheumatoid arthritis állatmodelljei	25
2 Célkitűzések	27
3 Anyagok és módszerek	28
3.1 Kísérleti állatok	28
3.2 Timocita transzfer	28
3.3 Áramlási citometria	29
3.4 Immunfluoreszcens festés	30
3.5 T-sejt izolálás és <i>in vitro</i> aktiváció	31
3.6 Western blot	32
3.7 Arthritis indukció	33
3.8 <i>In vivo</i> biolumineszcens vizsgálatok	33
3.9 Intracelluláris citokin mérés	34
3.10 <i>In vitro</i> lépsejtkultúra	34
3.11 Proliferáció	34
3.12 Citokin ELISA mérések	34
3.13 Statisztikai módszerek	35
4 Eredmények	36
4.1 A ZAP-70 knockout egér modell jellemzése	36
4.1.1 ZAP-70 expresszió ZAP-70 hiányos egerekben	36
4.1.2 A másodlagos nyirokszervek sejttözetétele	37
4.1.3 Szövettan	39
4.1.4 T-sejt aktiváció és apoptózis	45
4.2 T-sejt rekonstitúció ZAP-70 ^{-/-} egerekben	47
4.2.1 Az adoptív timocita transzfer korai kinetikája	49
4.2.2 A tímuszban lezajló korai változások vizsgálata	50
4.2.3 GFP-transzgént expresszáló timociták transzfere	53
4.2.4 A timociták peritoneumból való homingjának vizsgálata	55
4.2.5 Funkcionális tesztek	57
4.3 Rekombináns humán G1-indukált arthritis (GIA) vizsgálata részleges ZAP-70 hiányos egerekben	58
4.3.1 Az autoimmun arthritis klinikai képe	58
4.3.2 Antigén-specifikus proliferáció, citokin- és autoantitest termelés	60
4.3.3 Helper T-sejt alcsoportok meghatározása intracelluláris citokin termelés mérésével	61
4.3.4 A T-sejt aktiváció és apoptózis mintázat változásai autoimmun arthritisben és ZAP-70 részleges hiányában	62
5 Új eredmények	68

6	Megbeszélés	69
6.1	ZAP-70 deficiencia hatása az immunfenotípusra, a T-sejt aktivációra és - apoptózisra	69
6.2	A T-sejtes immundeficiencia korrekciója timocita transzferrel.....	71
6.3	A T-sejt aktiváció/apoptózis jelátviteli útvonalak változásai autoimmun arthritis modellben	74
7	Köszönetnyilvánítás	82
8	Referenciák	83
9	Saját publikációk.....	106
10	Melléklet	108

Rövidítések jegyzéke

ACD	accidental cell death (véletlen sejthalál)
ACPA	<u>anti</u> - <u>citrullinated</u> <u>protein</u> <u>antibody</u> (citrullinált fehérjék elleni antitest)
ADAP	adhesion and degranulation-promoting adapter protein
AIF	apoptosis inducing factor (apoptózist indukáló faktor)
AHR	aryl hydrocarbon receptor (aromás szénhidrogén receptor)
AIRE	<u>auto</u> <u>immune</u> <u>regulator</u>
AP-1	activator protein-1
Apaf-1	apoptosis protease-activating factor
APC	allophycocyanin
B-ALL	B-sejtes akut limfoblasztos leukémia
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
BM	csontvelő
BSA	bovine serum albumin (borjú szérum albumin)
Cbl	Casitas B-lineage Lymphoma
CCP	cyclic citrullinated protein (ciklikusan citrullinált peptid)
CD	cluster of differentiation
CFA	complete Freund's adjuvant (komplett Freund adjuváns)
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CIA	collagen-induced arthritis (kollagén-indukált artritis)
CLL	krónikus limfoid leukémia
CLP	common lymphoid progenitor (közös limfoid progenitor)
CMJ	cortico-medullary junction (kortiko-medulláris junkció)
cTEC	kortikális tímusz epitheliális sejt
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DAB	diaminobenzidin
DAG	diacilglicerin
DD	death domain
DDA	dimetil-dioktadecil-ammónium bromid
DISC	death-inducing signaling complex

DN	CD4 ⁻ CD8 ⁻ kettős negatív (double negative)
DP	CD4 ⁺ CD8 ⁺ kettős pozitív (double positive)
EF1 α	elongation factor 1 α
EndoG	endonukleáz G
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
ETP	early thymus progenitor (korai tímusz progenitor)
FADD	Fas-associated death domain
FasR	Fas receptor
FITC	fluoreszcein izotiocianát
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
GATA3	GATA binding protein 3
GFP	green fluorescent protein (zöld fluoreszcens protein)
GIA	rhG1-induced arthritis (rhG1-indukált arthritis)
GPI	glucose phosphate isomerase (glükóz foszfát izomeráz)
GTP	guanozin-trifoszfát
HSC	hematopoietic stem cell (hematopoetikus őssejt)
ICAM	intercellular cell adhesion molecule (intracelluláris sejtadhéziós molekula)
IFN	interferon
Ig	immunglobulin
IL-	interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif (immunreceptor tirozin alapú aktivációs motívum)
Itk	IL-2-induced tyrosine kinase (IL-2-indukált tirozin kináz)
iv.	intravénás
ip.	intraperitoneális
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate (inozitol-trifoszfát)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminális kináz)
LAT	linker of activated T cells
Lck	leukocyte specific protein kinase (leukocita-specifikus protein kináz)
LFA	leukocyte function antigen (leukocita-funkciós-antigén)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogén aktivált protein kináz)
MHC	major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MOMP	mitochondrial outer membrane pore

MPP	multipotent progenitor (multipotent progenitor)
mTEC	medulláris tímusz epitheliális sejt
NFAT	nuclear factor of activated T-cells (aktivált T-sejtek nukleáris faktora)
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nck	non-catalytic tyrosine kinase
PAGE	polyakrilamid gél elektroforézis
PALS	periarteriolar lymphatic sheet (periarterioláris limfatikus hüvely)
PBS	phosphate buffered saline (foszfát pufferelt sóoldat)
PD-1	programmed cell death protein 1
PDK	phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PE	phycoerythrin
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKC	protein kinase C (protein kináz C)
PLC	phospholipase C (foszfolipáz C)
PSGL-1	P-selectin ligand 1 (P-szelektin ligand-1)
RA	rheumatoid arthritis
Rap1	Ras-proximate 1
Ras	rat sarcoma
RCD	regulated cell death (szabályozott sejthalál)
RF	rheuma faktor
rhG1	rekombináns humán G1
Runx	Runt-related transcription factor
S1PR	sphingosine-1-phosphate receptors (szfingozin-1-foszfát-receptor)
SCF	stem cell factor (őssejt faktor)
SCID	severe combined immunodeficiency (súlyos kombinált immunhiány)
SDS	sodium dodecyl sulfate (nátrium dodecil szulfát)
SEM	standard error of mean
SH2	Src 2 homology
SLP-76	cytoplasmic SH2 domain–containing leukocyte protein of 76 kDa
SMAC komplex)	supramolecular activation complex (szupramolekuláris aktivációs komplex)
SP	CD4 ⁺ vagy CD8 ⁺ egyszeresen pozitív (single positive)

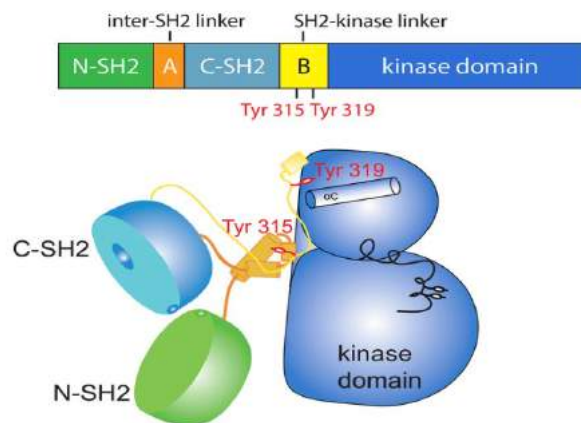
Sts-1	suppressor of T-cell receptor signaling-1
Syk	spleen tyrosine kinase (lép tirozin kináz)
TcR	T-sejt receptor
ThPOK	Th Inducing POZ-Kruppel Factor
TGF- β	transforming growth factor β (transzformáló növekedési faktor β)
TNF- α	tumor necrosis factor α (tumor nekrosis faktor α)
TNFR	tumor necrosis factor receptor (tumor nekrosis faktor receptor)
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
WT	wild type (vad-típus)
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZAP-70	zeta-chain associated protein of 70kDa (zéta-lánc-asszociált 70 kDa fehérje)

1 Bevezetés

1.1 A ZAP-70 molekula jellemzése

A zéta-lánc-asszociált 70 kDa fehérjét (ZAP-70) először Chan és munkatársai írták le T-sejt receptoron keresztül stimulált Jurkat sejtekben [1]. Fiziológiás körülmények között T-sejtek [2] és NK-sejtek [3] expresszálják, azonban krónikus limfoid leukémiában (CLL) [4] és B-sejtes akut limfoblasztos leukémiában (B-ALL) [5] B-sejtek egy alcsoportjában is leírták. Újabb eredmények szerint a ZAP-70 normál körülmények között is expresszálódik éretlen és érett B-sejtekben egyaránt [6], azonban az expresszió szintje töredéke a T-sejtekének, így sem a B-sejtek érése, sem aktivációja nem szenved zavart a ZAP-70 hiányában [7].

A ZAP-70 a Syk (lép tirozin kináz/spleen tyrosine kinase) protein kináz fehérjecsald tagja [8], két Src homológia 2 (SH2) doménből és egy C-terminális kináz doménből épül fel. Az SH2 tandemet az interdomén A választja el egymástól, míg a kináz domén és a C-terminális SH2 domén között az interdomén B található [2] (1. ábra). Az SH2 domén egy konzervált, szekvencia-specifikus foszfortirozin-kötő domén különféle jelátviteli molekulákban [9], a ZAP-70 esetében a CD3 ζ -láncán található foszforilált ITAM-okhoz (immunoreceptor tirozin alapú aktivációs motívum/immunoreceptor tyrosine-based activation motif) való kapcsolódást biztosítja [2,10].



1. ábra A ZAP-70 kináz szerkezete

A ZAP-70 tirozin kináz két Src homológia 2 (SH2) doménből (N-SH2: zöld és C-SH2: szürkés-kék) és egy kináz doménből (kinase domain: kék) épül fel, melyeket az interdomén A (inter-SH2 linker: narancssárga) és az interdomén B (SH2-kinase linker: sárga) választja el egymástól. (kép átvéve: [11])

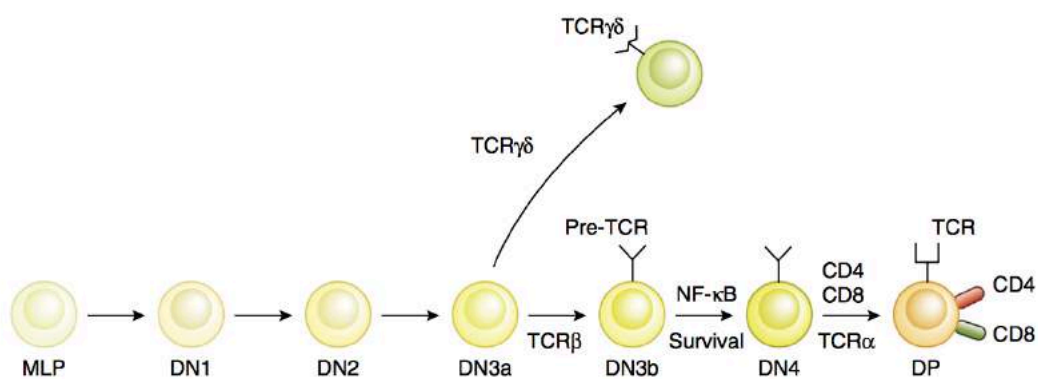
A ZAP-70 nélkülözhetetlen mind a T-sejtek éréséhez, mind az aktivációjukhoz [8,12]. Hiányában a timociták érése a tímuszban megáll a kettős pozitív ($CD4^+CD8^+$) stádiumban, melynek eredményeképp nincsenek érett T-sejtek a másodlagos nyirokszervekben [13]. A molekula expressziójának hiányában, vagy funkcióvesztésének következtében emberben a súlyos kombinált immundeficiencia (SCID) egy formája alakul ki [14], melynek jellemzője, hogy a betegek nem rendelkeznek $CD8^+$ T-sejtekkel, a $CD4^+$ T-sejtek száma normális, sőt néhány esetben emelkedett, azonban ezek a $CD4^+$ sejtek nem működőképesek [15–18]. Az irodalomban eddig közölt, emberi ZAP-70 mutációval összefüggésbe hozott esettanulmányokat Au-Yeung és munkatársai foglalták össze [19].

1.2 A T-sejtek fejlődése

A T-sejtek érése és szelekciója a tímuszban lejátszódó dinamikus folyamat, mely során a timociták a tímuszban változatos mikro környezetekben vándorolnak [20]. A T-sejtek érése a csontvelőben kezdődik meg, a csontvelői hematopoetikus őssejtekből (HSC) származnak a később tímuszt kolonizáló sejtek, melyek lehetnek multipotens progenitorok (MPP) [21,22], közös limfoid progenitorok (CLP) [23,24], illetve T-sejt irányba már elköteleződött progenitorok is [25]. A csontvelő elhagyását követően a progenitorok a véráramba kerülnek [26,27], majd onnan jelenlegi ismereteink szerint két módon juthatnak a tímuszba: korai embrionális korban, a tímusz vaszkularizációja előtt érrendszertől független (vaszkulátúra-independens) útvonalon, a késői embrionális-, illetve posztnatális korban érhalózáttól függő (vaszkulátúra-dependens) módon [20,28]. Az érhalózáttól független kolonizációnál a tímusz stroma sejtjei által termelt kemoattraktáns anyagok vonzzák a limfoid progenitorokat a tímusz parenchymába. A folyamat kemokin-kemokin receptor mediált, a fetális tímusz stroma sejtjei többek között CCL21 és CCL25 kemokineket expresszálnak [29], mely kötődik a progenitorokon található CCR7 (CCL21 receptora) és CCR9 (CCL25 receptora) kemokin receptorokhoz [30,31].

A posztnatális tímuszba a kortikomedulláris junkción (CMJ) keresztül jutnak a limfoid progenitorok [32], a sejtek bejutását a tímusz endothél sejtjein jelen lévő P-szelektin és a progenitorokon expresszált P-szelektin ligand (PSGL-1) interakciója szabályozza [33]. A kolonizáció periodikusan történik, transzplantációs kísérletek alapján a tímusz niche-k 10-14 naponta érik el a maximális befogadóképességüket [34],

mely megegyezik egy korai tímusz progenitor (ETP) átlagos élettartamával, illetve a transzplantált timociták CMJ-ben tartózkodásának időtartamával [35]. Ahogy egy ETP elkezd a differenciációt és a migrációt, hely szabadul fel a niche-ben egy új tímusz kolonizáló sejt befogadására. Ebben a pro-T-sejt fázisban a timociták legfőbb fenotípusos markerei a c-kit (CD117), mely az őssejt-faktor (SCF) receptora, a CD44 (hialuronsav-receptor), mely a progenitorok tímuszba történő migrációját segíti elő, illetve a CD25, az IL-2 receptora [20,36]. Az ETP sejtek (c-kit^{hi} CD44⁺CD25⁻) DN2a (c-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁺), majd DN2b (c-kit^{lo} CD44⁺ CD25⁺) fejlődési stádiumot érnek el [37]. A timociták ekkor CD4⁻ és CD8⁻ kettős negatívak (DN), fejlődésük a T-sejt receptortól független [36]. A DN timociták elhagyják a CMJ-t és a kortexbe vándorolnak, ahol kortikális tímusz epithél sejtekből (cTEC) származó interleukin (IL)-7 [38] és Notch-Delta [39] szignálok elősegítik a timociták proliferációját és megerősítik a T-sejt irányú elköteleződést [20,40]. A tímusz stroma sejtek megfelelő mikrokörnyezetet biztosítanak a fejlődő timociták éréséhez, de ezzel párhuzamosan a timociták is hozzájárulnak a tímusz epithél prekurzorok érett cTEC-té történő differenciációjához [41,42]. Ezen kooperáció eredményeként a timociták és az őket körülvevő cTEC érése szinkronizáltan zajlik le [43].



2. ábra Korai T-sejt fejlődés a tímuszban

A csontvelőből érkező prekurzorok (MLP: multipotens-lymphoid progenitor/multipotens limfoid progenitor) a tímuszba megérkezve először CD4⁻CD8⁻ kettős negatív (DN) fejlődési stádiumba lépnek. A DN3 stádiumban zajlik le a β-szelekció: azok a sejtek, melyekben a DN2 stádiumban megkezdődött és sikeresen lezajlott a TcRγ és TcRδ láncok átrendeződése, γδ T-sejt irányba köteleződnek el, és feltételezhetően elhagyják a tímuszt, míg a pre-TcR-t (TcRβ-lánc + pre-TcR α-lánc) expresszáló sejtek αβ T-sejt irányba folytatják a differenciációt. A TcR α-lánc sikeres átrendeződése után (survival: túlélés) az αβ TcR expresszálódik a sejtfelszínen és a sejtek elérik a CD4⁺CD8⁺ kettős pozitív (DP) fejlődési stádiumot. (átvéve és szerkesztve: [44])

A DN2 timociták tovább vándorolnak a szubkapszuláris zónába, közben DN3 ($CD4^- CD8^- CD25^+ CD44^-$) stádiumú timocitákká érnek [32,45]. A T-sejt receptor (TcR) gének átrendeződése ekkor zajlik le: a TcR γ és TcR δ gének átrendeződése már a DN2 stádiumban megkezdődik, míg a TcR β csak a DN3 stádiumban [46]. Ilyenkor következik be az úgynevezett β -szelekció: ha a TcR β gén átrendeződése sikeres, a TcR β fehérje a sejt felszínén expresszálódik, majd a pre-TcR α -láncsal összekapcsolódva pre-TcR komplexet alkot [47].

Az $\alpha\beta$ és $\gamma\delta$ T-sejt irányú elköteleződés közti választás ekkor játszódik le: a kvantitatív jelerősség modell szerint az erős $\gamma\delta$ TcR-szignál $\gamma\delta$ T-sejtek kialakulásához vezet, míg egy gyenge Notch és pre-TcR-szignál az $\alpha\beta$ T-sejtek kialakulásának kedvez [48,49].

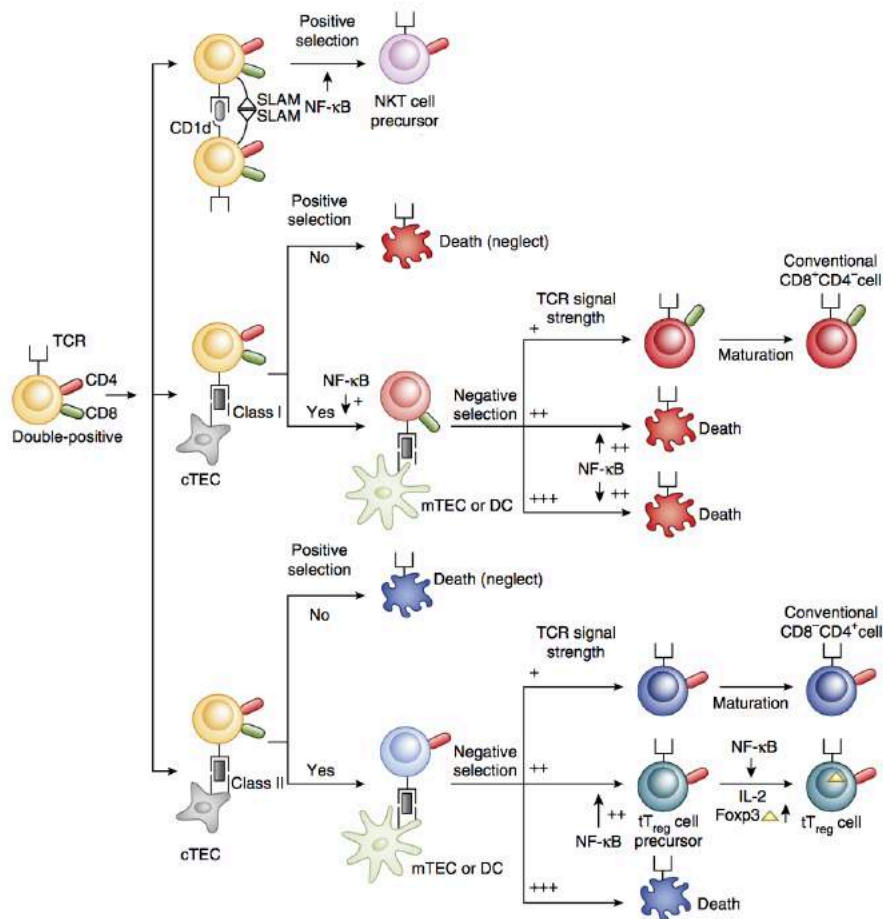
A DN4 sejteket a CD25 expresszió megszűnése jellemzi ($CD4^- CD8^- CD25^- CD44^-$), ekkor kezdődik meg a TcR α gén átrendeződése, a sikeres folyamat eredményeképpen az $\alpha\beta$ TcR heterodimer átveszi a pre-TcR helyét a sejt felszínén [50]. Az $\alpha\beta$ TcR-t expresszáló timociták felszínén megjelenik a CD4 és a CD8 koreceptor, az így kialakult $CD4^+ CD8^+$ kettős pozitív (DP) timociták elkezdnek a tímusz centrális része, a medulla felé haladni [20].

A DP timociták TcR és CD5 expressziójuk alapján további alcsoportokra oszthatók, preszelekción (DP1; $CD5^{lo} CD3^{lo}$), korai (DP2; $CD5^{hi} CD3^{int}$), illetve késői szelekciós (DP3; $CD5^{int} CD3^{hi}$) timocitákra [51]. A $CD4^+$ egyszeresen pozitív (SP) timociták a DP2 timocitákból differenciálódnak, a $CD8^+$ SP timociták viszont a DP3 fejlődési stádiumon is keresztül mennek, ez magyarázza, hogy míg a $CD4^+$ SP timociták már 48 órával a szelekció megkezdése után megjelennek, a $CD8^+$ SP timociták csak a szelekció után 96 órával mutathatók ki [35,51].

A DP timociták szigorú szelekciós lépéseken mennek keresztül. A pozitív szelekció során azok a DP timociták, amelyek $\alpha\beta$ TcR-a felismeri a cTEC sejteken expresszált saját antigént bemutató fő hisztokompatibilitási komplexet (major histocompatibility complex, MHC), a TcR-n keresztül túlélési szignálokat kapnak és tovább differenciálódnak [42,52]. A pozitív szelekció eredményeként SP timociták jönnek létre, az MHC I-t felismerő timociták a CD8 irányba, az MHC II-t felismerő timociták a CD4 irányba köteleződnek el [53]. Azok a DP timociták, amelyek TcR-a nem ismeri fel a saját peptid-MHC komplexet, nem élnek túl a szelekciót, apoptózissal elpusztulnak („death by neglect”), ezen sejtek aránya akár 90% is lehet [35,54].

A pozitív szelekció során a fejlődő timociták kemokin-dependens módon (váltás a kortikális CXCL12–CXCR interakcióról CCL21/19–CCR7 interakcióra) a medullába vándorolnak [55]. A szelekciót követően MHC-restrikciótól függetlenül a timociták ideiglenesen downregulálják a CD8 expresszióját ($CD4^+ CD8^{lo}$) [56], majd a saját peptid-MHC-komplexet (pMHC) felismerő TcR komplexen keresztüli jelátvitel erősségétől és időtartamától függően [57] $CD4^+$ SP, illetve $CD8^+$ SP sejtekké érnek [58]. A pMHC I–TcR jel aktiválja a Runx3 fehérje expresszióját, amely a CD8 gén reaktivációját és a CD4 gén csendesítését idézi elő [59], így $CD8^+$ SP thymocytát eredményez, ezzel ellentétben egy pMHC II–TcR jel ThPok expresszióhoz vezet, ami a Runx3 gátlásával [60] $CD4^+$ SP fenotípus megjelenéséhez vezet [58]. A medullában zajlik le az autoreaktív timociták negatív szelekciója, ez lényegében a centrális tolerancia kialakítása a tímuszban [61]. A negatív szelekcióban a tímusz medulláris epithél sejtek (mTEC) játszanak fontos szerepet [42]. Az Autoimmune Regulator (AIRE) [62] és Fzf2 [63] transzkripciós faktorok hatására különböző szöveti antigének expresszálódnak a mTEC sejtekben, ezáltal a lehető legváltozatosabb szöveti (saját) antigéneket mutatják be az MHC-n keresztül a fejlődő timocitáknak [64,65]. Az autoimmunitás elkerülése érdekében a saját antigéneket nagy affinitással felismerő timociták klonális delécióval eliminálódnak [55], azonban vannak olyan sejtpopulációk, amelyek az úgynevezett agonista szelekcióval annak ellenére túlélnek a negatív szelekciót, hogy felismernek saját antigéneket [66]. Ide tartoznak a természetes regulatórikus T-sejtek (tTreg) [67], a természetes IL-17-termelő T-helper sejtek (tTh17) [68], az invariáns NKT-sejtek (iNKT) [69], és a természetes, $CD8\alpha^+$ intraepitheliális limfociták (tIEL) [70].

Az érett, szelekciót túlélő timociták a perivaszkuláris téren keresztül jutnak a tímuszból a vérkeringésbe [28], a folyamatban az érett SP timociták felszínén expresszáló, G-protein kapcsolt receptor családba tartozó szfingozin-1-foszfát-receptoron (S1PR) keresztüli jelátvitel kiemelt fontosságú [71]. A tímuszban lezajló érési és szelekciós folyamatok eredményeként egerekben naponta csupán a timociták kb. 1%-a ($1-4 \times 10^6$ érett $CD4^+$ vagy $CD8^+$ T-sejt [72]) hagyja el a tímuszt [73], majd folytatja a differenciációt a periférián.

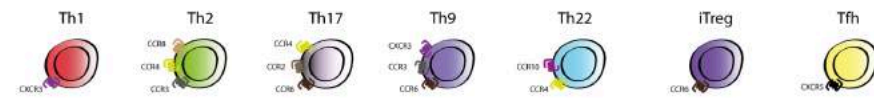


3. ábra Pozitív és negatív szelekció a tímuszban

A pozitív szelekció során a CD4⁺CD8⁺ kettős pozitív (DP) timociták a kortexben interakcióba lépnek a kortikális epithél sejtekkel (cTEC). Azok a sejtek, amelyek nem ismerik fel a cTEC által a saját MHC-n bemutatott antigént, elpusztulnak (neglect), amelyek az MHC I komplexen bemutatott antigént ismernek fel CD8⁺ egyszerűen pozitív (SP) T-sejt irányba differenciálódnak, amelyek pedig az MHC II komplexen bemutatott antigént ismerik fel, CD4⁺ SP irányba köteleződnek el. A negatív szelekció során szelektálódnak ki azok a sejtek, melyek a saját antigéneket ismerik fel. A medulláris epithél sejtek (mTEC) vagy dendritikus sejtek (DC) által bemutatott saját antigéneket nagy affinitással felismerő sejtek apoptózissal elpusztulnak (magas a TcR-n keresztüli jelerősség), míg a saját bemutatott antigéneket nem felismerő sejtek konvencionális CD4⁺, illetve CD8⁺ SP sejtekké érnek. A CD4⁺ SP sejtek regulatórikus T-sejtekké (T_{reg}) is alakulhatnak, amennyiben a negatív szelekció közben közepes erősségű jelátvitel zajlik le a TcR-n keresztül. Az NKT (natural killer T) sejt prekursorok szintén a DP sejtekből alakulnak ki a CD1 molekul által prezentált lipid antigének felismerését követő pozitív szelekcióval. (átvéve: [44])

A periférián a naiv CD4⁺ T-sejtek a bemutatott antigénnel való találkozás után aktiválódnak, proliferálnak, majd meghatározott helper T-sejt (Th) alcsoporttá differenciálódnak [74]. A differenciáció irányát befolyásolja az antigén affinitása és dózisa [75], a TcR jelátvitel erőssége/időtartama [76], a jelenlévő kostimulációs molekulák [77], valamint a veleszületett immunsejtek által termelt citokinek [78]. A fő Th alcsoportok a Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh és Treg, ezenkívül leírtak Th3 és Th22 alcsoportokat is, de a csoportosítás még nem egységes az irodalomban. A differenciációt indukáló citokinek és transzkripciós faktorokat, valamint a jellemzően termelt citokinek a 4. ábrán foglaltuk össze.

A különböző alcsoportokhoz való elköteleződés visszafordítható, a helper T-sejtek igen nagy plaszticitást mutatnak, melyet többek között a pleiotróp citokinek, átfedő transzkripciós hálózatok és a változatos epigenetikai folyamatok befolyásolnak [77].



	Th1	Th2	Th17	Th9	Th22	iTreg	Tfh
Differenciációt elősegítő citokinek	IL-12	IL-4	TGFβ IL-6	TGFβ IL-4	IL-6 TNFα IL-1β??	TGFβ IL-2	IL-21 IL-6??
Differenciációért felelős transzkripciós faktorok	T-Bet	GATA-3	RORγt	PU.1	AhR?	FoxP3	Bcl-6
Termelt citokinek	IFNγ	IL-4	IL-17	IL-9	IL-22	IL-10 TGFβ	IL-21
Funkció	Intracelluláris patogének elleni immunválasz	Extracelluláris patogének elleni immunválasz	Antimikrobiális peptid-szekréció ↑ Autoimmunitás	Férgek elleni immunválasz	Bőr homeosztázis Szöveti gyulladás ?	Immunválasz szabályozása	B-sejtes immunválasz szabályozása

4. ábra T-helper sejt alcsoportok

(rövidítések: Th: T-helper sejt, IL-: interleukin, TGFβ: transzformáló növekedési faktor β, TNFα: tumor nekrozis faktor α, GATA-3: GATA binding protein 3, RORγt: retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t, AhR: aromás szénhidrogén receptor, FoxP3: forkhead box protein 3, Bcl-6: B-cell lymphoma 6 protein) (átvéve és szerkesztve: [79])

1.3 A ZAP-70 molekula szerepe a T-sejtek fejlődésében

A Syk fehérjecsaldába tartozó ZAP-70 és Syk protein tirozin kinázok kiemelkedően fontos szerepet töltenek be a T-sejtek fejlődésében [80,81]. A két fehérje expressziója ellentétes módon változik a T-sejt differenciáció során, a Syk a korai, kettős negatív (DN1-DN3) stádiumban expresszálódik, míg a ZAP-70 később, a DP timocitákban; a rövid, köztes, DN4 stádiumban pedig a két fehérje expressziója átfed [13]. A Syk a timociták β-szelekciójához fontos, a pre-TcR-on keresztüli jel

továbbításában játszik szerepet [13]. A ZAP-70 expresszióját ez a jelátvitel indukálja, így a Syk-dependens pre-TcR jelátvitelt egy ZAP-70-dependens jelátvitel váltja fel [13,19]. A váltás hátterében valószínűleg az áll, hogy a DP sejtek pozitív szelekciójához a megfelelő MHC-koreceptor kapcsolathoz van szükség [53,82]. A ZAP-70 csak azután tudja foszforilálni a TcR komplex ITAM-ait, hogy az Lck, egy Src kináz aktiválja/foszforilálja, ezáltal feloldja a ZAP-70 autoinhibitor konformációját [83]. Az Lck a CD4/CD8 koreceptorokhoz kapcsolódik, ezért csak a megfelelő MHC felismerésekor kerül közel a TcR komplexhez, így biztosítva az MHC-restríkiót a pozitív szelekció során a fejlődő timocitákban [84].

A ZAP-70 expressziója a pozitív szelekció során upregulálódik, a molekula intracelluláris mennyisége nő a DP1–DP3 fejlődési irányban [51]. Az upregulációhoz a pozitív szelekció alatt a TcR-n keresztüli jelátvitel is hozzájárul, ezáltal egy pozitív visszacsatolási rendszer alakul ki [85]. Timocitákon végzett tetraciklin-indukált ZAP-70 transzgen expressziós vizsgálatok kimutatták, hogy a ZAP-70 rögzített expressziós szintje mellett, az upreguláció és pozitív visszacsatolás hiányában a CD8⁺ SP sejtek DP sejtekből történő érése gátolt [51]. A CD4⁺ SP timociták fejlődését is megzavarta a rögzített expresszió miatt kialakult elégtelen TcR-n keresztüli jelátvitel, az MHC II-t felismerő DP sejtek kb. 40%-a vagy elpusztult, vagy CD8 irányba történő differenciációt kísérelt meg a DP3 stádiumon keresztül [86].

Összességében elmondható, hogy a ZAP-70 mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ SP timociták érésében fontos szerepet játszik, feltételezhetően a pozitív szelekcióhoz nélkülözhetetlen TcR-ZAP-70 pozitív visszacsatolási rendszeren keresztül.

1.3.1 ZAP-70 hiányos egértörzsek

Az első ZAP-70 knockout egértörzset Negishi és munkatársai hozták létre a teljes protein kinázt kódoló gén deléciójával [81]. A SCID betegekkel ellentétben a homozigóta knockout (ZAP-70^{-/-}) egerek másodlagos immunszerveiben nincsenek sem CD4⁺, sem CD8⁺ T-sejtek, a tímuszukban is csupán DN és DP sejtek találhatóak [81]. A lép áramlási citometriás analízise során leírták, hogy ott nem találhatóak αβ T-sejt receptort expresszáló T-sejtek, a B220⁺ B-sejtek száma viszont emelkedett [81]. Az ZAP-70^{-/-} egerek immunhiányosak, de SPF körülmények között 10 hónapos korukig is élnek [81]. Az immunhiányos állapot miatt szuszceptibilisek különböző infekciókra, ezért konvencionális állatházi körülmények között saját tapasztalataink szerint csak 7-10 hétig tarthatóak életben.

A protein kináz kódoló régió egy szegmensének deléciójával egy másik ZAP-70 knockout egértörzset is létrehoztak [12], melynek fenotípusa megegyezik az előzőekben ismertetett egérével. Weiss és kollégái leírták, hogy a ZAP-70^{-/-} egerek nyirokcsomóiban találhatóak CD3⁺ T-sejtek, melyek főként $\gamma\delta$ T-sejt receptort expresszáltak [12].

1.3.2 A ZAP-70 hiány helyreállítása

Az irodalomban számos tanulmány számol be ZAP-70 hiányos egerekben a T-sejt fejlődés helyreállításáról.

Adjali és munkatársai a humán ZAP-70-t kódoló, T-sejt-specifikus lentivirális vektort injektáltak ZAP-70 deficiens egerek tímuszába, majd leírták, hogy 7-13 hét múlva érett T-sejtek jelentek meg a perifériás vérben, lépben és nyirokcsomókban [87].

A lentivirális alapú rendszer kikerülése érdekében a ZAP-70-t kódoló plazmid tímuszba való direkt elektroporációjával is próbálkoztak [88]. A kezelt egerekben helyreállt a T-sejtek fejlődése a tímuszban, valamint 3 héttel a transzfer után a másodlagos nyirokszervekben érett T-sejtek jelentek meg, melyek *in vivo* funkcionálisan aktívak voltak.

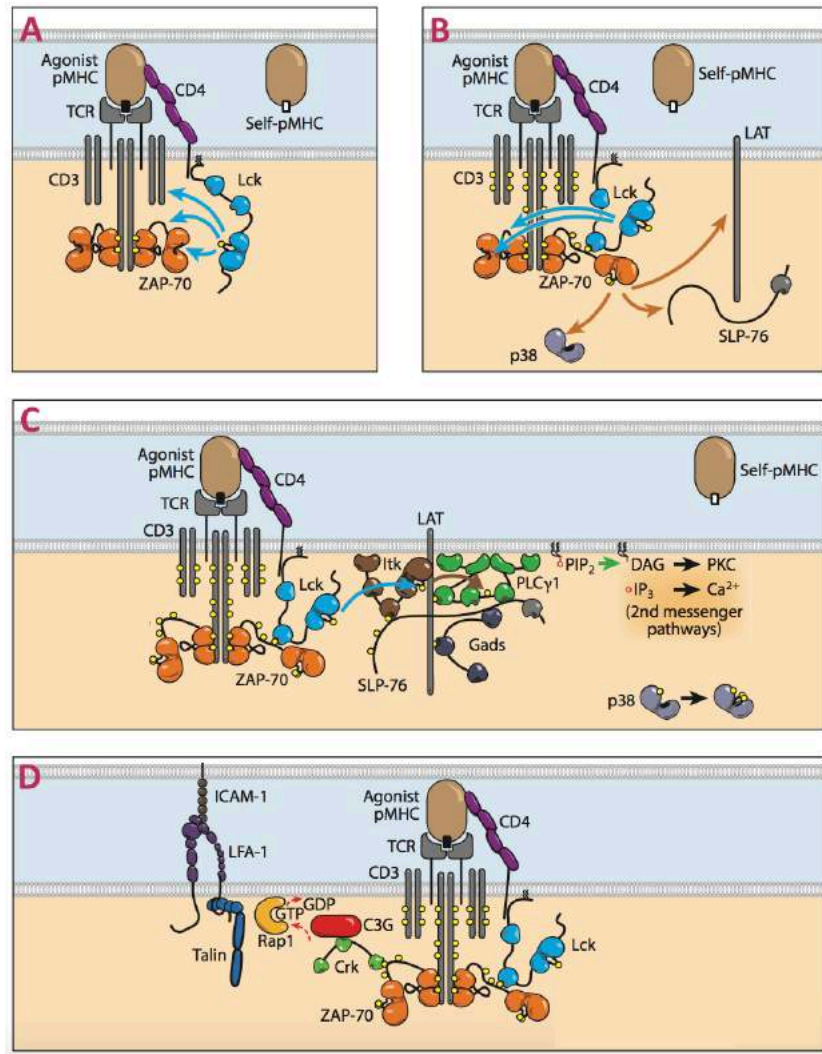
Korábbi, adoptív sejttanszfer kísérletekben csontvelői eredetű prekurzor sejteket használtak, az intravénás illetve intratímikus adiminisztrációs útvonalak hatékonyságát összehasonlítva [89]. Az intratímikus útvonal mind kinetikájában, mind minimálisan szükséges sejtszám tekintetében jobbnak bizonyult az intravénás (i.v.) útvonalnál, 4 héttel a transzfert követően SP timociták jelentek meg a tímuszban, a lépben és nyirokcsomókban pedig szignifikánsan több érett T-sejt volt megfigyelhető, mint az i.v. transzfer esetében. Ellentétben az i.v. sejttanszferrel, az intratímikus transzplantáció esetében hosszú távon, 13 héttel a transzfer után is aktív T-sejtképződés zajlott.

Ennek a hosszú távú rekonstitúciónak a további vizsgálatára ugyanezen kutatócsoport 20-25 hétig monitorozta az i.v. illetve intratímikus úton, csontvelői hematopoetikus őssejtekkel transzplantált egereket [89]. Azt találták, hogy a direkt tímuszba transzplantált HSC-k hosszú távon képesek fenntartani a tímuszban a T-sejt-érést; a donor-eredetű sejtek a T-sejt differenciáció minden stádiumában jelen voltak, de más, nem-T-sejt irányú sejt differenciációhoz nem járultak hozzá.

1.4 TcR jelátvitel

A T-sejtek az antigén prezentáló sejtek által a megfelelő MHC-n bemutatott peptid antigént a T-sejt receptorokkal ismerik fel. A T-sejt receptoron keresztüli jelátvitel a TcR komplexen keresztül zajlik, amely TCR α és β láncokból, valamint a CD3 komplexből áll [90].

A T-sejtek eredményes aktivációjához az immunológiai szinapszis kialakulására van szükség [91]. A T-sejtek felszínén megjelenő kostimulációs molekulák közül a TcR komplex közvetlen közelségében a MHC-reszktrikció szerinti CD4 (MHC II felismeréséhez), illetve CD8 (MHC I felismeréséhez), illetve a CD28 (az antigén prezentáló sejten található CD80/86-hoz köt) található; ezek a molekulák alkotják a centrális szupramolekuláris aktivációs komplexet (cSMAC) [92]. A proximális, illetve disztális szupramolekuláris aktivációs komplexben LFA1, CD44, illetve CD45 molekulák találhatóak [91,92]. Ezeken a molekulákon kívül a T-sejteken aktiváltsági szinttől és differenciációs állapottól függően más kostimulációs molekulák is megjelenhetnek (összefoglalva: [93]). A TCR α és β láncai a peptid antigén–MHC molekula felismeréséért felelősek, az intracelluláris jelátvitelhez azonban a CD3 komplexre is szükség van [94,95]. A CD3 komplex γ , δ és ϵ láncokból épül fel, ezekhez egy $\zeta\zeta$ homodimer vagy $\zeta\eta$ heterodimer kapcsolódik [96]. A CD3 komplex intracelluláris része tartalmazza az ITAM szekvenciákat [(D/E)xxYxxI/Lx₍₆₋₈₎YxxI/L], melyek tirozin oldalláncai a TcR általi antigén-MHC komplex felismerést követően foszforilálódnak, ezzel hozzájárulva az aktivációs szignál továbbításához [97]. Az antigén felismerése után az immunológiai szinapszis kialakulásakor a TcR-komplex közelébe kerülve a CD45 foszfatáz lehasítja a CD4 vagy CD8 kostimulációs molekulához kapcsolt Lck tirozin kinázon található inhibitor foszfát-csoportot [98], majd az így aktivált Lck foszforilálja a TcR/CD3 komplex ζ -láncának ITAM régióit [99]. A ZAP-70 a citoplazmában inaktív, autoinhibíciós konformációban van jelen [100], a foszforilált ITAM régiókhöz való „dokkolás” eredményeként az interdomén B-ben található Y315/Y319 [101] és az aktivációs loopban található Y492/493 [102,103] elérhetővé válik az Lck-közvetített foszforiláció számára. Az aktív ZAP-70 foszforilálja a membránhoz kötött LAT (linker for the activation of T cells) [104] és SLP-76 (cytoplasmic SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) [105] adapter molekulákat, melyek egy proximális jelátviteli komplexet alkotnak [106].



5. ábra A ZAP-70 kináz szerepe a T-sejt receptor jelátvitelben.

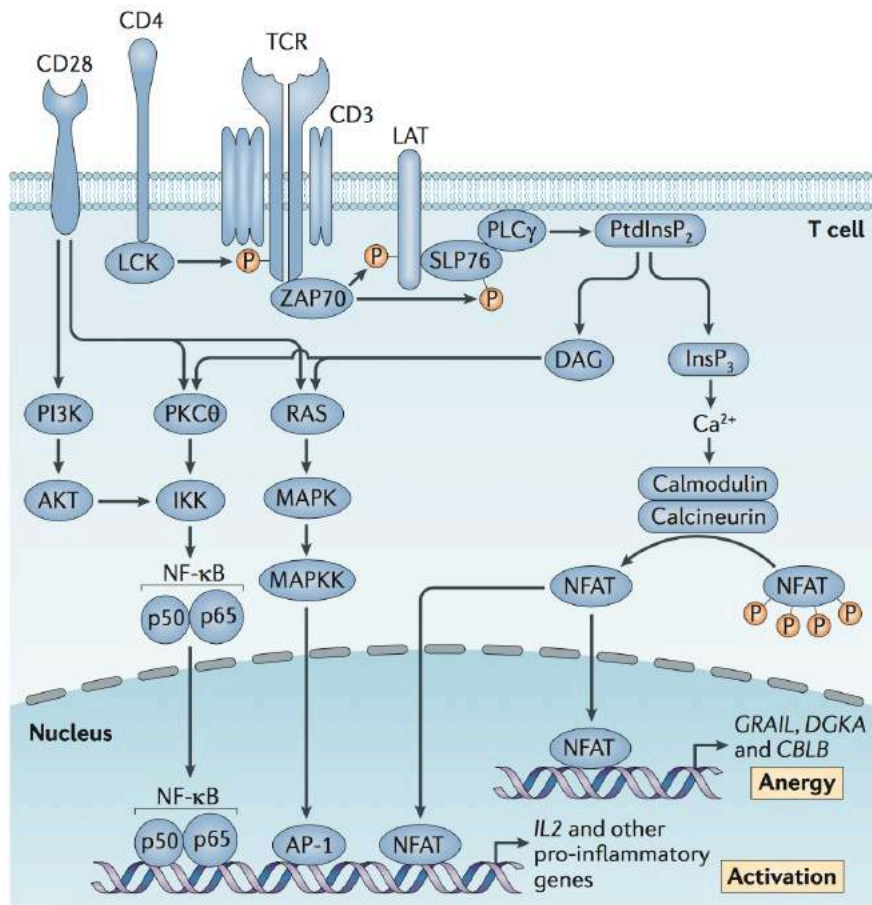
Az idegen antigén – MHC (agonist pMHC) komplex TcR és CD4 kostrimulációs molekula általi felismerése után a ZAP-70 az Lck által duplán foszforilált (sárga kör) ITAM régiókhoz kötődik a CD3 ζ -láncán. Az Lck foszforilálja ZAP-70-t és a CD3 komplex ITAM régióit (A), ezáltal a ZAP-70 aktivált konformációba kerül, és foszforilálja a LAT és SLP-76 adapter molekulákat, valamint a p38 MAPK-t is. (B) A ZAP-70 és a foszforilált SLP-76 és LAT adapter molekulák egy proximális jelátviteli komplexet alkotnak, melyhez különböző adapter és jelátviteli molekulák képesek kötődni, pl. a PLC γ 1, a Gads és az Itk (IL-2-induced tyrosine kinase). (C) A ZAP-70 egyik nem-katalitikus funkciója, hogy a Crk adaptor fehérje megkötése után a C3G guanin-nukleotid kicserélő faktoron és a Rap1 GTPázon keresztül olyan konformációs változást idéz elő az LFA-1 integrinben, mely az antigén prezentáló sejteken jelenlévő ICAM-1-hez való kapcsolódást segíti elő (D). (átvéve: [19])

A komplexhez különböző adapter- és jelátviteli molekulák képesek kötődni, pl. PLC γ 1, a PI3K p85 szabályozó alegysége, Grb2, Gads, Vav1, Itk (IL-2-induced tyrosine kinase), non-catalytic tyrosine kinase (Nck), Shc és ADAP [8,19,107].

A ZAP-70 egyik ismert, nem-katalitikus funkciója, hogy a Crk adaptor fehérjét a pY315-n keresztül megköti [108]. A Crk a C3G guanin-nukleotid kicserélő faktoron és a Rap1 GTPázon keresztül olyan konformációs változást idéz elő az LFA-1 integrinben, mely az antigén prezentáló sejteken jelenlévő ICAM-1-hez való kapcsolódást segíti elő [109].

A Vav1 a MAPK (mitogen-activated protein kinase)/JNK (c-Jun N-terminal kinase) jelátviteli útvonalat [101], az Itk molekula [110] pedig a PLC γ 1-n keresztül a MAPK/ERK (extracellular-signal-regulated kinase) jelátviteli útvonalat aktiválja [111]. A ZAP-70 a p38 α MAPK Y323-as nonkanonikus szabályozó tirozin oldalláncát is képes foszforilálni, ezáltal a LAT-tól és MAPK kinázoktól függetlenül járulhat hozzá a MAPK-aktivációhoz [112]. A PLC γ a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) hasítja inozitol-trifoszfát (IP₃) és diacilglicerol (DAG) másodlagos hírvivő molekulákra [113]. A membrán-kötött DAG két fő jelátviteli útvonalat, a rat sarcoma (Ras) és protein kináz C theta (PKC θ) útvonalakat aktiválja. A Ras a MAPK kaszkádon keresztül járul hozzá az AP-1 transzkripció faktor aktivációjához, míg a PKC θ az NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) útvonalat aktiválja [114]. Az IP₃ Ca²⁺-felszabadulást eredményez az endoplazmatikus retikulumból [115], mely a calmodulin-calcineurin komplexen keresztül a citoplazmatikus NFAT (nuclear factor of activated T-cells) transzkripció faktor sejtmagba való transzlokációjához vezet [116]. Az említett útvonalak aktivációjának következtében komplex génextpressziós változások indulnak el az aktivált T-sejtekben, melyek sejtproliferációt és különböző citokinek termelését eredményezik [117,118]. Az egyik termelt citokin az IL-2, mely pozitív visszacsatolással fenntartja a T-sejtek aktivációját [119].

A kostimulációs molekulák közül a CD28 erősíti legnagyobb mértékben a T-sejtek aktivációjakor végbemenő jelátvitelt [120]. A CD28 a T-sejtek antigén-felismerésekor az immunológiai szinapszisban található, az antigén prezentáló sejteken található CD80/86-hoz való kapcsolódás után az intracelluláris doménjén keresztül járul hozzá a jelátviteli folyamatokhoz [121].



6. ábra A T-sejt receptoron és a kostimulációs molekulákon keresztüli jelátvitel

A T-sejtek aktivációjához a TcR és CD3 komplexen keresztül lezajló jelátvitel mellett a CD4/CD8, illetve a CD28 kostimulációs molekulákon keresztüli szignalizációra is szükség van. Az antigén-MHC komplex TcR/CD3/CD4 vagy CD8 általi felismerése után kialakul a proximális jelátviteli komplex (ZAP-70, SLP-76, PLC γ). A PLC γ a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP $_2$) hasítja inozitol-trifoszfát (InsP $_3$) és diacilglicerol (DAG) másodlagos hírvivő molekulákra. Az InsP $_3$ Ca $^{2+}$ felszabadulást eredményez, mely a kalmodulin-kalcineurin komplexen keresztül a citoplazmatikus NFAT (nuclear factor of activated T-cells) transzkripciós faktor sejtmagba való transzlokációját idézi elő. A DAG a rat sarcoma (Ras) és a protein kináz C theta (PKC θ) útvonalakat aktiválja. A Ras a MAPK kaszkádon keresztül aktiválja az AP-1 transzkripciós faktort, míg a PKC θ az NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) sejtmagba való transzlokációját indukálja. A CD28-on keresztüli jelátvitel a Ras és PKC θ útvonalakat erősíti, valamint a PI3K-n és az Akt-n keresztül az NF κ B aktivációjához járul hozzá.(átvéve: [122])

A CD80/86 ligáció után a PI3K a CD28 citoplazmatikus régiójában található pYMNM motívumhoz kapcsolódik [123], majd foszfatidilinozitol (3,4,5) trifoszfáttá (PIP₃) alakítja a PIP₂-t a sejtmembránban [124]. A keletkezett PIP₃ dokkolási lehetőséget biztosít a PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) fehérjének, mely aktiválja az Akt/PKB útvonalat [125]. Az Akt útvonal aktivációjának eredményeként az NFκB és az NFAT transzkripciós faktorok sejtmagba való transzlokációja, illetve a sejtmagban való tartózkodásának ideje megnő, ezáltal hozzájárulnak a T-sejtek fokozott túléléséhez és citokin-termeléséhez [126,127]. A TcR/CD28 kostimuláció után a T-sejtek felszínén megnő a Glut1 inzulin transzporter expressziója [128], ami fokozott glükóz-felvételen és glikolízisen keresztül a sejtosztódás miatt megnövekedett metabolikus igényekhez járul hozzá [129].

Az aktivált T-sejtek nyugalmi állapotba való visszatéréséhez a TcR-n keresztül zajló jelátvitel különböző inhibitoraira, negatív regulátoraira van szükség [130]. A jelátvitel korai szakaszában szerepet játszó molekulákat (Lck, ZAP-70) különböző kinázok és foszfatázok módosíthatják. A Csk kináz az Lck aktivitását gátolja az inhibitor Y505 foszforilációjával [131], míg a SHP1 foszfatáz az aktivációs tirozinok defoszforilációjával inaktiválja a ZAP-70-t [132] és Lck-t [133], az Sts-1 foszfatáz pedig a ZAP-70-t [134]. A jelátviteli komplex fehérjéinek degradációja szintén fontos szerepet játszik a T-sejt aktiváció leállításában. A Cbl-b, illetve c-Cbl fehérjék E3-ubikvitin ligázok [135], elősegítik többek között a LAT, a PLC-γ1, a PI3K, a Vav, és a PKC-θ ubikvitinációját [136]. A c-Cbl a ZAP-70 negatív szabályozója [137], a folyamat pontos mechanizmusáról azonban nincs konszenzus az irodalomban [138,139]. A kostimuláció gátlásával működnek a klinikumban terápiás célpontként is használt CTLA-4 és a PD-1 fehérjék [140]. Az aktiváció után a CD28 helyét a cSMAC-ban átveszi a CTLA-4, mely mind a lokalizációért [141], mind a CD80/86 ligandokért verseng a CD28-cal [142], arról azonban ellentmondásosak az adatok az irodalomban, hogy a T-sejtek aktivációját milyen jelátviteli mechanizmussal gátolja [143]. A PD1 az antigén prezentáló sejteken található PD1-L-hoz kapcsolódva elősegíti az SHP1 és SHP2 foszfatázok TcR komplexhez való kapcsolódását, és ezáltal a ZAP-70 és az Lck defoszforilációját [144,145], a Cbl fehérjék által ubikvitinált TcR endocitózist, valamint az MAPK és Akt útvonalak gátlását [146].

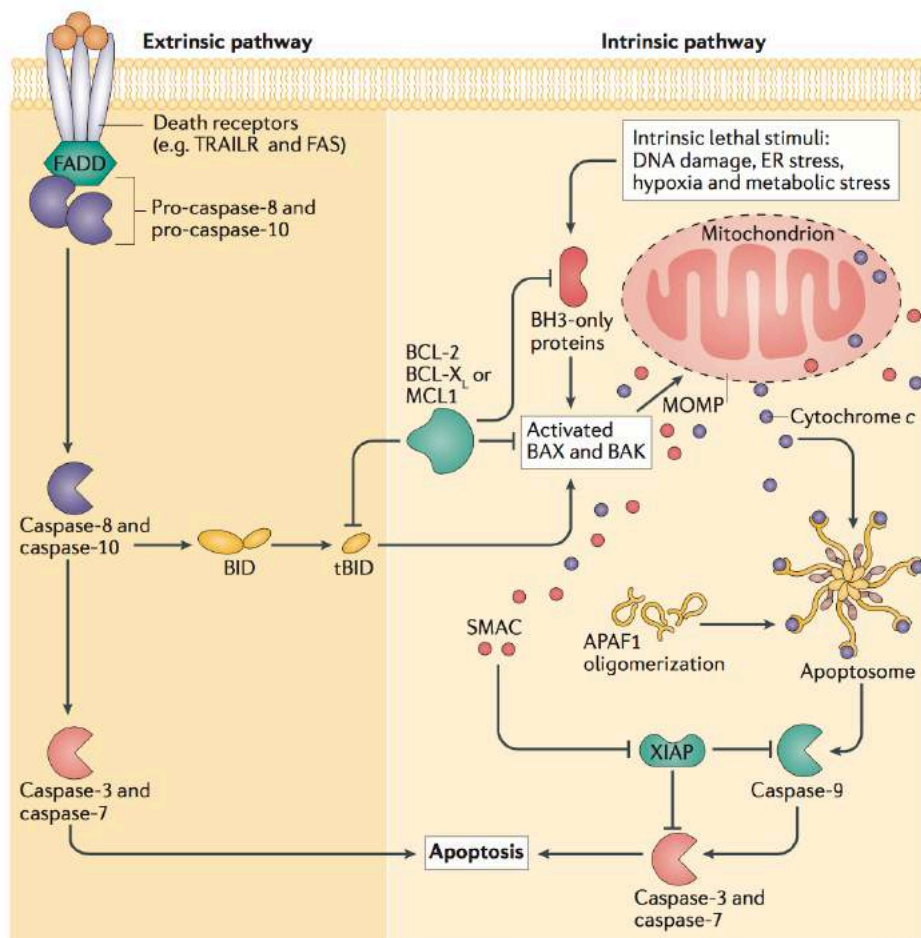
1.5 Apoptózis

A sejthalál része az élő szervezet normál homeosztatisz működésének [147]. Ha a sejtet érő extrém mechanikai, fizikai vagy kémiai hatások eredményeként a plazmamembrán megsérül, a sejtek azonnali, kontrollálatlan, úgynevezett véletlen sejthalállal (accidental cell death–ACD) pusztulnak el [148]. Az extra- vagy intracelluláris mikrokörnyezetben bekövetkező irreverzibilis zavarok eredményeként olyan genetikailag szabályozott jelátviteli útvonalak aktiválódhatnak, melyek a sejtek pusztulásához vezetnek [149]. A sejthalál ezen formája a szabályozott sejthalál (regulated cell death–RCD), mely pontos mechanizmusa alapján további alcsoportokra osztható [148], melyek közül az intrinszik- és extrinszik apoptotikus útvonallal foglalkoztunk.

A szabályozott sejthalál folyamatában kiemelkedő szerepük van a kaszpáz proteáz enzimeknek, melyek cisztein-dependens aszpartát-specifikus peptidázok (Cystein-dependent ASPartate-specific peptidASE) [150]. A kaszpázok funkciójuk alapján három csoportra oszthatóak, iniciátor (kaspáz-2, -8, -9 és -10), effektor (kaspáz-3, -6 és -7) és inflammatorikus (kaspáz-1, -4 és -5) kaszpázokra [151]. A sejtben belül inaktív (zimogén) formában vannak jelen (prokaspáz), aktiválásukhoz autoaktivációra, vagy más molekula/kaspáz általi hasítására van szükség [152].

Az intrinszik apoptotikus útvonal akkor aktiválódik, ha a sejtet intracelluláris stressz éri, például magas Ca^{2+} -koncentráció a citoplazmában, oxidatív stressz, irreverzibilis genetikai károsodás, vagy hibás szerkezetű fehérjék felszaporodása az endoplazmatikus retikulumban [148]. A stressz-szignáltól függően az intrinszik apoptózisnak több verziója létezik, a mitokondrium-indukált apoptózis, az endoplazmatikus retikulum stressz-indukált apoptózis, illetve a kaszpáz-independens útvonal [153].

Az intrinszik apoptotikus útvonal szabályozói a Bcl-2 fehérjecsald tagjai, melyek jellemzője, hogy 1-4 Bcl-2 homology domént (BH1, BH2, BH3, BH4) tartalmaznak [154]. A Bcl-2 fehérjék anti- (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W, Mcl-1, A1) és pro-apoptotikus csoportba sorolhatók [155]. A pro-apoptotikus csoporton belül a Bax és a Bak a multidomén pro-apoptotikus fehérjék közé tartozik, míg a Bim, Bid, Bad, PUMA és a Noxa „BH3-only” fehérje [153,155].



7. ábra Az apoptózis útvonalak összefoglalása

Az intrinszik útvonal intracelluláris stressz (intrinsic lethal stimuli) hatására aktiválódik: a BH3-only fehérjék aktiválják a pro-apoptotikus Bax és Bak fehérjéket, melyek oligomerizálódva a mitokondrium külső membránjában pórust formálnak (mitochondrial outer membrane pore: MOMP), melynek hatására Smac és citokróm c fehérjék szabadulnak ki a mitokondriumból. A citoplazmában a citokróm c komplexet alkot az Apaf-1 fehérjével, ez az úgynevezett apoptoszóma. Az apoptoszóma aktiválja a kaszpáz 9-t, mely az effektor kaszpáz-3 és -7 hasításához vezet. Az extrinszik útvonal a „halál” receptorok (death receptor) ligand kötése után aktiválódik: a DISC-en keresztül (death inducing signaling complex) aktiválódik a kaszpáz-8, mely az effektor kaszpázokat hasítja. A II-es típusú sejtekben (ld. lent: 24.old. 2. bekezdés) a kaszpáz-8 hasítja a Bid-et (tBid), mely elindítja az intrinszik apoptotikus útvonalat. (átvéve: [156])

Az intracelluláris stressz szignál eredményeként a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék a mitokondrium külső membránjába transzlokálódnak és pórusokat formálnak (mitochondrial outer membrane pore- MOMP), az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjék ezzel szemben a mitokondrium körül elhelyezkedve gátolják a pórusformálást [157]. A MOMP létrejötte a „point of no return”, ezután visszafordíthatatlan, letális változások

következnek be a mitokondriumban: a metabolikus folyamatok, például a légzési lánc gátlása, reaktív oxigén gyökök termelésének fokozódása, a mitokondriális membránpotenciál csökkenése, ezáltal az ATP szintézis megszűnése, valamint különböző toxikus fehérjék (citokróm c, apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G (EndoG), Smac és HtrA2) citoplazmába való kiszabadulása [148,153,158]. A citokróm c a citoplazmában asszociálódik az Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor) fehérjével és a prokaspáz-9-cel [159,160]. Az így létrejött apoptoszóma aktiválja a kaszpáz-9-t, mely a kaszpáz-3 és -7 effektor kaszpázok aktiválásával elindítja a sejthalálhoz vezető proteolitikus kaszkádot [148,161].

Az extrinszik apoptotikus útvonal az extracelluláris környezetből érkező jelekre adott válaszreakció [148]. A különböző stressz-szignálokat „halál”-receptorok érzékelik és továbbítják az intracelluláris térbe, ezek közül a legjobban ismertek a Fas receptor (Fas/APO-1/CD95), a tumor nekrozis faktor receptorok (TNFR) és a TRAILR [162,163]. A receptorok intracelluláris szakasza tartalmazza az úgynevezett death doméneket (DD), ezek közé tartozik a TRADD (TNFR1 associated death domain protein) és a FADD (Fas associated death domain protein) [162,164]. A megfelelő ligand kötése után (FasL-Fas, TNF-TNFR, TRAIL-TRAILR) az intracelluláris térben aktivációs molekulák (pl. E3 ubikvitin ligáz, c-FLIP, RIPK1, c-IPA) toborzódnak a death doménekhez, kialakítva a death-inducing signaling complex-et (DISC), majd ez a komplex aktiválja a prokaspáz-8-t [148,153,165]. Az alapján, hogy az intrinszik útvonal részt vesz-e az effektor kaszpázok kaszpáz-8 hasítása utáni aktivációjában, I-es- (pl. érett limfociták) és II-es típusú (pancreas β -sejtek, daganatos sejtek nagy része, hepatociták) sejteket különböztetünk meg [166]. Az I-es típusú sejtekben a kaszpáz-3 és -7 hasításához elegendő mennyiségű aktív kaszpáz-8 keletkezik, viszont a II-es típusú sejtekben az X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) gátolja az effektor kaszpázok aktivációját [167,168]. Ezekben a II-es típusú sejtekben a kaszpáz-8 hasítja a Bid fehérjét (tBid), ami a mitokondriumba transzlokálódva elindítja az intrinszik útvonalat [169,170].

1.6 Rheumatoid arthritis

A rheumatoid arthritis (RA) krónikus, szimmetrikus, sokízületi gyulladással járó szisztémás autoimmun betegség, mely végül az ízületek pusztulásához vezet [171,172]. A RA az európai és észak-amerikai populáció 0,5-1%-át érinti, ezzel az egyik leggyakoribb autoimmun betegség; nőknél magasabb a prevalenciája [171].

Az ízületeken kívül más szervrendszereket érintő, ún. extraartikuláris tünetek is kialakulhatnak, például a tüdőben, a bőrben, a gyomor-bélrendszerben, a szemben, továbbá előfordulhat fokozott infekcióhajlam, felgyorsult atherosclerosis és vasculitis is [173].

A RA-ra jellemző az autoantitestek megjelenése, gyakori szerológiai eltérés a rheuma faktor (RF) és az antri-citrullinált protein antitestek (anti-CCP, ACPA) emelkedett mennyisége, melyek a diagnosztikában is kiemelkedő fontosságúak [174–176]. A kialakuló szinovitiszben jelentős mértékű fehérvérsejt infiltráció látható, melyet főleg T- és B-sejtek, makrofágok, granulocyták és dendritikus sejtek alkotnak [177]. Az ezen sejtek által helyileg termelt kemokinek és gyulladásozó citokinek vezetnek az ízület és a csont pusztulásához [178]. Mind RA-ban, mind a RA állatmodelljeiben leírták a komplement-rendszer kóros aktivációját, a szöveti károsodás kialakulásában a C5a anafilatoxin és a C3b opszonin szerepe is feltételezett [179–181]. Hagyományosan a RA-t Th1 típusú betegségnek tartották, de az IL-17 felfedezése után a Th17, illetve Th1/Th17 sejtek szerepe is bizonyítása került [182].

1.6.1 A rheumatoid arthritis állatmodelljei

A RA patogenezisének megértésében fontos szerepet játszanak a betegség állatmodelljei [183]. Az arthritis kialakulhat spontán- és indukált módon, a legtöbb modellben rágszálókat használnak (összefoglalva: [183–186]).

A spontán modellek közül a K/BxN-, a TNF-transzgenikus- és az SKG egérmodellek a legjobban karakterizáltak.

A K/BxN egerek együttesen expresszálják a borjú RNáz-t felismerő transzgen T-sejt receptort (KRN) és az A^{g7} MHC II allélt [187]. Az állatok 4-hetes korára spontán, uniform, súlyos gyulladásozó arthritis jelenik meg [188], valamint glükóz-6-foszfát izomeráz (GPI) ellenes antitest termelődik [189]. Az arthritises egerekből nyert szérum transzferével a betegség átvihető, arthritis alakul ki a recipiensekben is (szérum transzfer modell) [190].

A TNF-transzgenikus egerek overexpresszálják a humán TNF- α -t kódoló, poszttranszlációs modifikációs regulátor elemeiben módosított transzgént [191]. Az egerekben szimmetrikus, erozív poliartthritis alakul ki, melyhez főként a szinóvium sejtjei által termelt transzgén TNF- α -expresszió járul hozzá [192].

Az SKG egértörzsben a ZAP-70-t kódoló gén pontmutációja miatt elégtelen T-sejt receptoron keresztüli jelátvitel alakul ki, mely zavart eredményez a T-sejt-szelekció folyamatában [193]. Ennek következtében autoreaktív T-sejtek kerülhetnek ki a perifériára, amelyek spontán Th17 sejtekké differenciálódnak, hozzájárulva a rheuma faktor (RF)-pozitív autoimmun arthritis, valamint különböző extraartikuláris extraartikuláris kialakulásához [194–196].

A leggyakrabban használt indukálható arthritis modell a kollagén-indukált arthritis (CIA), mely DBA/1 egerek komplett Freud adjuvánsban (CFA) feloldott II-es típusú kollagénnel történő ismételt intrakután immunizálásával váltható ki [197].

Mi a munkánk során, egy másik indukálható arthritis modellt választottunk: a rekombináns humán G1 (rhG1)-indukált arthritis (GIA) [198], mely mind immunológiai, mind klinikai képében nagyon hasonlít a humán betegségre. Az arthritis kiváltásához 4-5 hónapos BALB/c nőtény egereket rhG1 antigénnel immunizálunk, mely a humán porc-eredetű proteoglikán aggregán fehérje G1 doménjét és egy egér IgG-Fc régiót tartalmazó fúziós fehérje. A G1 domén három artritogén T-sejt epitópot is tartalmaz, ami jól jelzi a T-sejtek fontosságát a betegség patogenezisében [199]. A GIA T-és B-sejt-függő-, autoantitest termeléssel (RF, anti-CCP) járó folyamat [198]. A GIA-ban szignifikáns IL-17 és IFN γ -termelés figyelhető meg, így a kiváltott arthritis jelentős Th1/Th17 polarizációt mutat [200]. Mindezen klinikai, szövettani és immunológiai jellemzők alapján, valamint a kórfolyamat progresszív és visszafordíthatatlan jellegére való tekintettel kijelenthető, hogy a GIA minden szempontból alkalmas a humán RA komplex modellezésére.

2 Célkitűzések

A ZAP-70 mind a T-sejt fejlődésben, mint aktivációban kiemelkedő fontosságú molekula [19]. Kutatócsoportunk korábban részletesen vizsgálta a ZAP-70 szerepét a T-sejt receptoron keresztül [201], valamint a glükokortikoidok nem-genomikus [202] jelátvitelében. Néhány éve rendelkezésünkre áll a ZAP-70 knockout egértörzs, amiben lehetőségünk nyílt a ZAP-70 fehérjével kapcsolatos *in vivo* vizsgálatokra. Intézetünkben kutatásokat végzünk a rheumatoid arthritis GIA egérmodelljében [198], melyben tudomásunk szerint eddig még nem vizsgálták a T-sejt jelátvitelben részt vevő ZAP-70 molekula szerepét.

PhD munkám során ZAP-70 knockout egerek *in vivo* vizsgálatait tűztük ki célként.

A vizsgálatok első részében ZAP-70^{-/-} egerek T-sejt rekonstitúciós vizsgálatát végeztük, ezzel a ZAP-70 T-sejtek fejlődésében betöltött szerepének részletesebb megismerése és a súlyos kombinált immunhiány megszüntetése volt a cél.

- I. A ZAP-70^{-/-} és ZAP-70^{+/-} egerek immunfenotípusának részletes jellemzése szövettan és áramlási citometria segítségével.
- II. A T-sejt rekonstitúció korai kinetikájának és a hosszú-távú változásoknak követése a másodlagos nyirokszervekben és a tímuszban.
- III. A transzferált T-sejtek funkcionális vizsgálata.
- IV. A donor timociták tímuszba való homingjának vizsgálata.

A munkánk másik részében ZAP-70^{+/-} egerekben a ZAP-70 részleges hiányának autoimmun arthritis kialakulására való hatását tanulmányoztuk.

- V. A GIA kialakulásának és súlyosságának vizsgálata ZAP-70^{+/-} egerekben.
- VI. Az ZAP-70^{+/-} állatokban indukált arthritisben bekövetkező immunológiai változások jellemzése (citokinek mintázata, autoantitestek mennyisége, T-sejt válasz).
- VII. Az autoimmun arthritis és a ZAP-70 részleges hiányának T-sejt-aktivációra és apoptózisra gyakorolt hatásainak vizsgálata.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Kísérleti állatok

Kísérleteink során BALB/c, ZAP-70-deficiens és EF1 α -GFP transzgenikus egereket használtunk. A kísérleti állatokat a PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézet állatházában, konvencionális körülmények között tenyésztettük és tartottuk.

A Jackson Laboratories-tól (Bar Harbor, Maine, Egyesült Államok) eredetileg beszerzett ZAP-70 deficiens egereket (B6.129X1-Zap70tm1Weis/J) BALB/c alapra kereszteztük vissza. Az egereket a Jackson Laboratories által ajánlott primerekkel (ZAP-70 WT: 5'-AATTAGTCCATCCGCCTTCA-3, ZAP-70 mut: 5'-GCTATCAGGACATAGCGTTGG-3', ZAP-70 common: 5'-CATATGCACTGTCCCTGGTCT-3') genotipizáltuk, melyek segítségével mindhárom lehetséges genotípus (ZAP-70^{-/-}, ZAP-70^{+/-}, ZAP-70^{+/+}) elkülöníthető.

A transzfer kísérletekben GFP-transzgenikus egereket használtunk donorként, melyekben a GFP a humán elongation factor 1 α (EF1 α) promoter irányítása alatt minden sejtben ubikviter módon expresszálódik [203].

A GIA kísérletekhez 4-5 hónapos BALB/c és ZAP-70^{+/-} nőtény egereket használtunk.

Minden kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottságának engedélyével végeztünk (BA02/2000-3/2012).

3.2 Timocita transzfer

Az adoptív transzfer kísérletek során a recipiens ZAP-70 homozigóta knockout (ZAP-70^{-/-}) egerek vad-típusú társaik (ZAP-70^{+/+}) vagy GFP-transzgenikus egerek timocitáit kapták. A donor egerek tímuszát eltávolítottuk, majd PBS-ben egysejtszuszpenziót készítettünk belőlük. A recipiens egerek 3-4-hetes korban 10⁷ donor thymocytát kaptak intraperitoneális (i.p.) oltás formájában.

A transzfer után a CD3⁺ T-sejtek megjelenését vérvétel után, áramlási citometriás mérésekkel követtük. A kísérlet végén az állatok tímuszát, lépét, perifériás és mezenteriális nyirokcsomóit, az omentumot, valamint a Peyer plakkokat szövettani és áramlási citometriás módszerrel elemeztük.

A timociták peritoneális homingjának vizsgálatához a donor timocitákat az i.p. oltás előtt karboxifluoreszcein szukcinimidil észterrel (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, Egyesült Államok) jelöltük meg *in vitro*, a gyártó leírásának megfelelően.

3.3 Áramlási citometria

A kísérletek végén izolált szövetek sejtes összetételét áramlási citometria segítségével határoztuk meg. A sejtpopulációkat az alábbiak szerint definiáltuk (1. táblázat):

Populáció	Marker	Antitest	Hígítás	Gyártó
T-sejtek	CD3+	anti-CD3-APC-Cy7	1:200	BD
$\alpha\beta$ T-sejtek	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	anti-CD3-FITC anti-TCR $\alpha\beta$ -Alexa Fluor 700	1:100 1:200	PTE-IBI BD
T _{reg}	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3 ⁺	anti-CD3-FITC anti-CD4-PE.Cy5 anti-CD25-APC anti-FoxP3-PE	1:100 1:200 1:200 1:50	PTE-IBI BD BD Miltenyi
$\gamma\delta$ T-sejtek	CD3 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺	anti-CD3-FITC anti-TCR $\gamma\delta$ -BV 421	1:100 1:200	PTE-IBI BD
B-sejtek	B220+	anti-B220-PE-Cy7	1:200	BD
DN timociták	CD4 ⁻ CD8 ⁻	anti-CD4-PE anti-CD8-PE-Cy5.5	1:200 1:200	BD BD
DP timociták	CD4 ⁺ CD8 ⁺			
CD4 ⁺ timocita	CD4 ⁺ CD8 ⁻			
CD8 ⁺ timocita	CD8 ⁺ CD4 ⁻			

1. táblázat Az áramlási citometriás mérések során meghatározott sejtpopulációk

BD: BD Biosciences (San Jose, Egyesült Államok); PTE-IBI: saját laborban előállított és jelölt antitestek

A szerveket (tímusz, lép, nyirokcsomók, Peyer plakk) homogenizáltuk, majd átszűrtük, az alvadágátolt vért és a lépet hemolizáltuk. Az így kapott egysejt-szuszpenziókat 0,1% BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok) és 0,1% nátrium-azid (Sigma Aldrich) tartalmú PBS-el mostuk. A sejtfelszíni jelöléshez mintánként 10⁶ sejtet sötétben, 30 percig a megfelelő antitest-keverékekkel inkubáltunk, majd 0,1% azid tartalmú PBS-sel mostuk. A regulatórikus T-sejtek meghatározásához szükséges intracelluláris jelölést a sejtfelszíni jelölést követően FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, Thermo Scientific,

Waltham, Egyesült Államok) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. Röviden: a sejteket 30 percig jégen inkubáltuk a fixáló/permeabilizáló pufferrel, majd mostunk. Ezután szintén 30 percig, jégen inkubáltuk a mintákat a FoxP3-specifikus antitesttel, majd mosópufferrel mostuk őket. A sejteket mindkét típusú jelölés végén 1% paraformaldehidet (Sigma Aldrich) tartalmazó PBS-ben vettük fel.

A mérést és az adatok analízisét FACS Canto II áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, Egyesült Államok), FACS Diva Software analízáló programmal (BD Biosciences) végeztük.

3.4 Immunfluoreszcens festés

A tímuszokból, nyirokcsomókból és lépéből 8 µm vastagságú kriosztátos metszeteket készítettünk, majd 10 perces hideg acetonos (Sigma Aldrich) fixálás után a metszeteket 5% BSA-tartalmú (Sigma Aldrich) PBS oldattal blokkoltuk 20 percig. Az immunfluoreszcens festéshez a megfelelő antitest-keverékkel (2. táblázat) 1 órán át inkubáltuk, majd PBS-es mosás után lefedtük a metszeteket.

Minta	Sejt	Antitest	Hígítás	Gyártó
lép nyirokcsomók Peyer plakk	T-sejtek	anti-CD3-FITC (KT3)	1:100	PTE - IBI
	B sejtek	anti-B220-Alexa Fluor 647 (6.B2)	1:100	PTE - IBI
tímusz (timociták)	CD4 T-sejtek	anti-CD4-PE (H129.19)	1:100	BD Biosciences
	CD8 T-sejtek	anti-CD8-FITC (IBL-3/25)	1:100	PTE - IBI
tímusz (epithél sejtek)	kortikális epithél sejtek	anti-Ly51-PE (6C3)	1:100	eBioscience
	medulláris epithél sejtek	anti-EpCAM1- FITC (G8.8)	1:100	PTE - IBI
tímusz (kvantitatív immunhisztokémia)	medulláris epithél sejtek	patkány anti- EpCAM1 (G8.8)	1:100	PTE - IBI
		anti-patkány Ig- peroxidáz	-	Hisztopatológia Kft.
Omentum	extracelluláris mátrix	nyúl anti- fibronectin	1:100	Abcam
		kecske anti-nyúl IgG-Cy3	1:100	Abcam
	donor sejtek	CFSE	-	Invitrogen

2. táblázat A szövettani vizsgálatok során felhasznált antitestek

BD: BD Biosciences (San Jose, Egyesült Államok); PTE-IBI: saját laborban előállított és jelölt antitestek; eBioscience (Bécs, Ausztria); Hisztopatológia Kft. (Pécs, Magyarország); Abcam, (Cambridge, UK); Invitrogen (Carlsbad, Egyesült Államok)

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a tímusz metszeteket a blokkolás után 10 percig 1mg/ml koncentrációjú fenilhidrazin (Sigma Aldrich) oldattal kezeltük az endogén peroxidáz aktivitás gátlására. Ezután a jelöletlen anti-EpCAM1 patkány anti-egér elsődleges antitesttel inkubáltuk a metszeteket 1 órán át, majd PBS-es (Molar Chemikals) mosás után másodlagos antitestként anti-patkány Ig-peroxidáz antitestet alkalmaztuk szintén 1 órán át. Újabb mosást követően a metszeteket diamino-benzidinnel (DAB) (Dako Products/Agilent, Santa Clara, Egyesült Államok) hívtuk elő.

A képeket Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal, az analySIS szoftver segítségével (Olympus Optical Co.; Tokyo, Japán) készítettük. A képek analízisét és szerkesztését Adobe Photoshop CS2 szoftverrel (Adobe Systems Inc., San Jose, Egyesült Államok) végeztük.

Az intraperitoneális homing kísérletek végén az omentumot whole-mount immunohisztokémia segítségével analizáltuk. Az eltávolított omentumokat 4%-os paraformaldehid (Sigma Aldrich) oldattal fixáltuk, majd 0,1% szaponin (Sigma Aldrich) tartalmú PBS oldatos (Molar Chemikals) mosást követően 5% BSA (Sigma Aldrich) és 0,1% szaponin (Sigma Aldrich) tartalmú PBS-sel (Molar Chemikals) telítettük 2 órán keresztül. Háromszor 20 perces PBS-es (Molar Chemikals) mosást követően nyúl anti-fibronektin (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) elsődleges antitestet adtunk a mintákhoz (éjszakán át, 4°C). Újabb háromszor 20 perces mosást követően anti-nyúl-IgG-Cy3 (Abcam) másodlagos antitesttel inkubáltuk a mintákat 3 órán keresztül 4°C-on. A mintákat Olympus Fluo-View FV-1000 (Olympus) konfokális mikroszkóppal analizáltuk.

3.5 T-sejt izolálás és *in vitro* aktiváció

A recipiens egerek lépéből a transzfert követően T-sejteket izoláltunk az EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada) segítségével a gyártó utasításának megfelelően. Az izolált T-sejteket 24-lyukú lemezen 24, illetve 48 órán keresztül stimuláltuk anti-CD3/CD28 MACSiBead™ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) hozzáadásával (5×10^6 sejt/lyuk, bead:sejt arány 2:1). Az így aktivált T-sejteket két részre osztottuk: a sejtek proliferációs rátáját Promega CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, Egyesült Államok) segítségével határoztuk meg 96 lyukú

lemezen (2×10^4 sejt/lyuk, triplikátumokban), a maradék mintákból pedig sejtlizátumokat készítettünk Western blot analízishez.

3.6 Western blot

Az aktivált T-sejtek líziséhez Triton X lízis puffert használtunk (50 mM HEPES, 10mM nátrium-pirofoszfát, 10mM EDTA, 100 mM nátrium-fluorid, 10% glicerin, 1% Triton X (mind a Sigma Aldrichtól)), melyhez proteáz inhibitor (Sigma Aldrich) és nátrium-ortovanadátot (Sigma Aldrich) adtunk. A lízist 30 percen keresztül jégen végezzük, majd a mintákat 13 000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk, szintén 4°C-on. A felülészókat merkapto-etanol-tartalmú (Sigma Aldrich) SDS mintapufferben (Sigma Aldrich) forraltuk, majd a minták elválasztása nátrium-dodecil-szulfát – poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) történt. A következő töménységű géleket használtuk: 7,5 % (Cbl), 10% (foszfotirozin, kaszpáz-9), 15% (Bim, kaszpáz-3 és 8, Bcl-2, citokróm c).

A géleket 2 óra alatt nitrocellulóz membránra blottoltuk Mini Trans-Blot Cell blottolóban (Bio-Rad, Hercules, California, Egyesült Államok).

Blottolás után a nitrocellulóz membránokat a megfelelő oldatokkal telítettük (3. táblázat: az oldatok összetétele: 2 vagy 5% BSA-val vagy 5% tejjel (NFD, nonfatty dry milk) kiegészített 10mM Tris, 100 mM nátrium-klorid, 0,1% Tween 20, pH=7,4 (mind a Sigma Aldrichtól)), a felsorolt antitestekkel (3. táblázat) inkubáltuk, majd a megfelelő másodlagos antitestekkel hívtuk elő (anti-egér-IgG-peroxidáz (PTE, IBI) vagy anti-nyúl-IgG-peroxidáz (PTE, IBI)).

Antitest	Eredet	Klón	Hígítás	Telítő	Gyártó
anti-foszfotirozin	egér	PY20	1:1000	2% BSA	BD Biosciences
anti-Bcl-2	nyúl	D17C4	1:1000	5% BSA	Cell Signaling Technology
anti-Bim	nyúl	C34C5	1:1000	5% BSA	
anti-Cbl-b	nyúl	D3C12	1:1000	5% BSA	
anti-kaspáz-3 (hasított)	nyúl	5A1E	1:1000	5% NFD	
anti-kaspáz-8 (hasított)	nyúl	D5B2	1:1000	5% BSA	
anti-kaspáz-9 (hasított)	nyúl	poli	1:1000	5% NFD	
anti-citokróm c	egér	6H2.B4	1:500	2% BSA	BD Biosciences
anti-β-aktin	egér	poli	1:5000	2% BSA	Sigma Aldrich

3. táblázat A western blot vizsgálatokhoz használt antitestek listája

BD: BD Biosciences (San Jose, Egyesült Államok); Cell Signaling Technology (Leiden, Hollandia); Sigma Aldrich (Saint Louis, Egyesült Államok)

A blotokat kemilumineszcens előhívó reagenssel (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate, Thermo Scientific, Waltham, Egyesült Államok) hívtuk elő, a gyártó utasításainak megfelelően. A kemilumineszcens jelek detektálása Fujifilm LAS 4000 blot imaging system (Fuji, Japán) segítségével történt. A minták egyenlő mennyiségének és tisztaságának ellenőrzésére a blotokat anti- β -actin (klón: AC-74, Sigma-Aldrich) antitesttel is előhívtuk.

3.7 Arthritis indukció

Az autoimmun arthritis kiváltásához háromhetente, háromszor intraperitoneálisan immunizáltunk 4-4-5-hónapos BALB/c, illetve ZAP-70^{+/-} nőstény egereket 40 μ g rhG1 és dimetil-dioktadecil-ammónium-bromid (DDA) adjuváns (Sigma Aldrich) keverékével. A második oltást követően (21. naptól) az arthritis megjelenését és súlyosságát klinikai pontszámokkal monitoroztuk. Minden állat minden végtagját egy 0-tól 4-ig terjedő pontszámmal jellemeztünk, melyet a láb duzzanata, pirossága, és az arthrosis (beszűkült mozgathatóság) jelenléte szab meg. A harmadik immunizálást követően az egereket feláldoztuk, majd a szérumokat és a lépeket begyűjtöttük. A szérumokból az autoantitest és a citokin koncentrációk meghatározását végeztük, a lépsejtekből pedig *in vitro* sejt kultúrát indítottunk, valamint áramlási citometriás méréseket, és néhány kísérletekben T-sejt aktivációs vizsgálatokat végeztünk.

3.8 *In vivo* biolumineszcens vizsgálatok

Az *in vivo* képalkotó vizsgálatok során az altatott egereket luminol (Sigma Aldrich) PBS-es (Molar Chemikals) oldatával (20 mg/ml) oltottuk be intraperitoneálisan (150mg/ttkg). A neutrophil-eredetű myeloperoxidáz enzim oxidálja a luminolt, mely a folyamat eredményeként kék fényt bocsát ki ($\lambda_{max} = 425$ nm) [204]. A képeket 10 perccel a luminol beadása után készítettünk el az IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Egyesült Államok; 60 s acquisition, F/Stop = 1, Binning = 8) készülék segítségével.

3.9 Intracelluláris citokin mérés

Az intracelluláris citokin méréshez 10^6 sejtet 24-lyukú lemezen PMA/ionomycinnel 12 órán át, Brefeldin A hozzáadása mellett stimuláltunk, majd az IL-17 és IFN- γ citokinek intracelluláris mennyiségét áramlási citometriával határoztuk meg, a jelölés a 3.3 pontban ismertetett intracelluláris jelölés protokollja szerint zajlott.

3.10 *In vitro* lépsejtkultúra

A kísérleti állatok lépéből izolált sejtekből 48-lyukú lemezen sejtkultúrát létesítettünk ($1,8 \times 10^6$ sejt 600 μ l DMEM + 10% FCS médiumban), majd a sejteket 1,5 μ g rhG1 antigén hozzáadásával/hozzáadása nélkül 3 napig tenyésztettük. A felülúszókat begyűjtöttük, majd fagyasztottuk a későbbi citokin ELISA vizsgálatokhoz.

3.11 Proliferáció

Az immunizált állatok lépéből izolált sejtek egy részét 96-lyukú lemezen antigén jelenléte mellett/nélkül 3 napig tenyésztettünk (3×10^5 sejt/lyuk, triplikátumokban, DMEM + 10% FCS médiumban, végtér fogat: 200 μ l), majd a proliferáció mértékét Promega CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, Egyesült Államok) segítségével határoztuk meg.

3.12 Citokin ELISA mérések

A szérumból illetve a lépsejtkultúra felülúszókból különböző citokinek (IL1 β , IL4, IL6, IL-17, IFN γ , TNF α) koncentrációját határoztuk meg ELISA kitek (R&D Systems (Minneapolis, MN, Egyesült Államok) segítségével a gyártó utasításának megfelelően.

A rhG1 antigénre specifikus autoantitestek szérumból koncentrációját szintén ELISA segítségével határoztuk meg. 96-lyukú ELISA lemezekre lyukanként 0,1 μ g rhG1 antigént adszorbeáltattunk 100 μ l coating pufferben (karbonát puffer) szobahőmérsékleten overnight. A lemezeket 200 μ l/lyuk 1,5% NFD/ PBS oldattal telítettük szobahőmérsékleten 1 órán keresztül, majd a 5x300 μ l PBS-Tween (0,5% Tween PBS-ben) oldattal mostuk. A szérumokkal (100 μ l/well) 2 órán keresztül inkubáltuk a lemezeket, majd újabb 5x300 μ l PBS-Tween oldattal mostuk. Másodlagos antitestként anti-IgG1-peroxidáz (BD Biosciences) antitestet használtunk

(2 óra, szobahőmérsékleten), majd ortho-pheniléndiamin kromofór és hidrogen-peroxidáz szubsztrát hozzáadásával előhívtuk a lemezeket.

3.13 Statisztikai módszerek

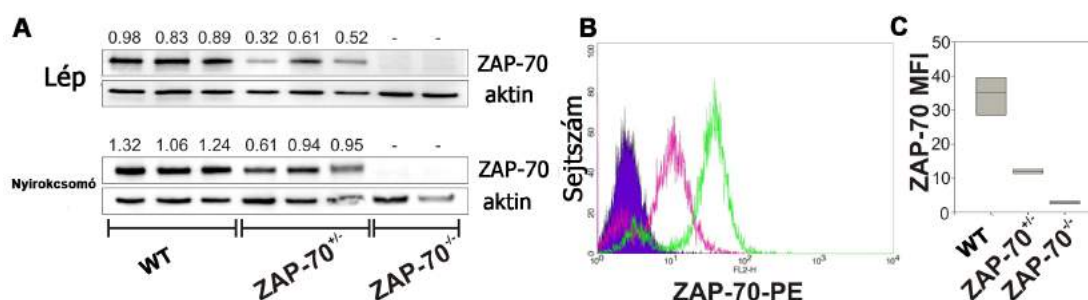
Az eredmények statisztikai analízisét a GraphPad szoftverrel végeztük, kétmintás t-próba segítségével, ahol statisztikailag szignifikáns különbségnek a $p < 0.05$ értéket tekintettük. Az ábrázolt értékek minden esetben átlag \pm SEM.

4 Eredmények

4.1 A ZAP-70 knockout egér modell jellemzése

4.1.1 ZAP-70 expresszió ZAP-70 hiányos egerekben

A ZAP-70 fehérje expresszióját Western blot és áramlási citometria technikákkal vizsgáltuk (8. ábra). A ZAP-70^{+/+} és ZAP-70^{+/-} egerek nyirokcsomóiban és lépében kimutatható a ZAP-70 fehérje, míg a ZAP-70^{-/-} állatok mintáiban a várakozásoknak megfelelően nem expresszálódik. Méréseinket kvantifikálva igazoltuk, hogy a ZAP-70^{+/-} egerekben a ZAP-70 expressziója kb. fele a ZAP-70^{+/+} egerekben mértnek.

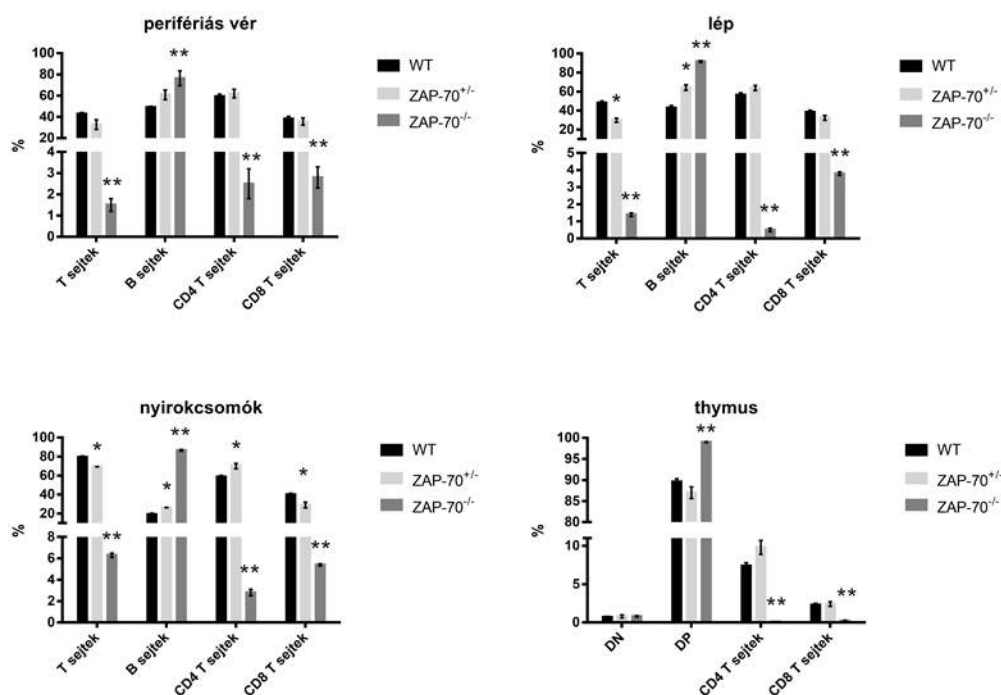


8. ábra ZAP-70 expresszió másodlagos nyirokszervekben.

A vad-típusú (WT, ZAP-70^{+/+}), ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerek lépéből és nyirokcsomójából izolált sejtek lizátumát SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd western blot technikával anti-ZAP-70 ellenanyag segítségével vizsgáltuk (A), az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotok reprobingjét anti- β -aktinnal végeztük. Az ábrán reprezentatív blotok láthatók, az egyes bandek β -aktin-ra normalizált denzitás értékeit a blotok felett tüntettük fel. A hisztogramokon (B) ZAP-70^{+/+} (zöld), ZAP-70^{+/-} (rózsaszín) és ZAP-70^{-/-} (lila, kitöltött) egerek nyirokcsomóiból izolált sejtek ZAP-70 expressziója látható intracelluláris jelölést követően áramlási citometriás méréssel. A box plotokon (C) a minták átlagos fluoreszcencia intenzitása (mean fluorescence intensity – MFI) látható a SEM értékekkel.

4.1.2 A másodlagos nyirokszervek sejtösszetétele

A ZAP-70 knockout egerek vérének, másodlagos nyirokszerveinek és tímuszának sejtösszetételében bekövetkező változásokat áramlási citometriával vizsgáltuk (9. ábra).



9. ábra ZAP-70 hiányos egerek nyirokszerveinek sejtösszetétele

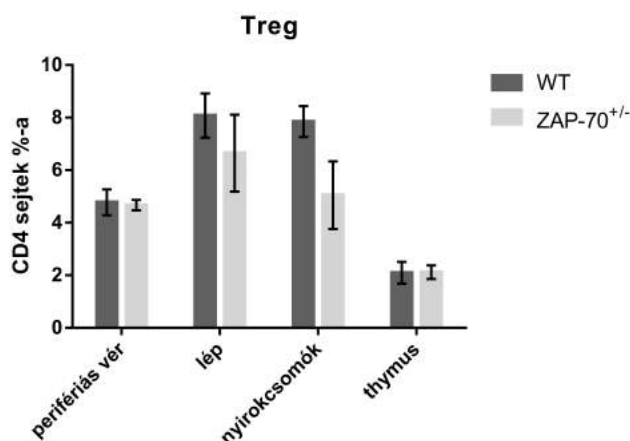
ZAP-70^{+/+} (WT), ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerekben sejtfelszíni jelölést követően áramlási citometriával vizsgáltuk a vérben, nyirokcsomókban, lépben és tímuszban a limfocitákon belül a T- és B-sejtek arányát, valamint a T-sejteken belül a CD4⁺ és CD8⁺ sejtek arányát. Az oszlopdiagramokon n=3 ZAP-70^{+/+}, n=4 ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} eredményei láthatók, átlag ± SEM *P<0.05; **P<0.005.

Ahogy vártuk, a ZAP-70^{-/-} egerek szerveiben szinte alig mutathatók ki T-sejtek (vér: 1,5±0,3 %, periferiás nyirokcsomók: 6,3±0,2%, lép: 1,4±0,1%) a ZAP-70^{+/+} kontrollhoz képest (vér: 42,9±1,3%, periferiás nyirokcsomók: 79,5±1,1%, lép: 48,2±2,0%), míg a B-sejtek aránya szignifikánsan nőtt (vér: 76,3±7,0% vs 49,0±0,9%, periferiás nyirokcsomók: 86,6±0,9% vs 19,2±1,2%, lép: 91,6±1,0% vs 42,8±2,7%). (2. ábra) A ZAP-70^{+/-} egerek esetében vannak T sejtek a periferiás nyirokszervekben, de százalékos arányuk szignifikánsan csökkent a ZAP-70^{+/+} kontrollhoz képest, míg a B

sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, bár kisebb mértékben, mint a ZAP-70^{-/-} egerekben.

A ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{+/+} tímuszokban a sejttözetétel hasonló volt, a timociták kevesebb, mint 1%-a kettős negatív (ZAP-70^{+/+}: 0,7±0,1%, ZAP-70^{+/-}: 0,8±0,2%), a többség kettős pozitív (ZAP-70^{+/+}: 89,6±0,7%, ZAP-70^{+/-}: 87,0±1,4%), a CD4 egyszeresen pozitív sejtek aránya 7,4±0,4%, a CD8 egyszeresen pozitív sejteké 2,3±0,2% a ZAP-70^{+/+} egérben, a ZAP-70^{+/-} tímuszban pedig 9,8±0,9%, illetve 2,4±0,3%. A ZAP-70^{-/-} egerek tímuszában a timociták szinte mind kettős pozitívak (99,9±0,1%), a kettős negatív sejtek aránya nem tér el a vad-típustól, az egyszeresen pozitív sejtek viszont szinte teljesen hiányoznak (CD4: 0,1±0,0%, CD8: 0,2±0,1%).

A ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{+/+} egerek nyirokszerveiben és vérében megvizsgáltuk a T_{reg} sejtek arányát a CD4⁺ sejteken belül. A tímuszban és a vérben nem volt különbség a ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{+/+} egerek T_{reg} aránya között (tímusz: ZAP-70^{+/+}: 2,1±0,4%, ZAP-70^{+/-}: 2,1±0,3%; vér: ZAP-70^{+/+}: 4,8±0,5%, ZAP-70^{+/-}: 4,7±0,2%), a ZAP-70^{+/+} egerek lépében és nyirokcsomóiban azonban nagyobb arányban találhatóak T_{reg} sejtek, mint a ZAP-70^{+/-} állatokéban (lép: ZAP-70^{+/+}: 8,1±0,8%, ZAP-70^{+/-}: 6,6±1,5%; nyirokcsomók: ZAP-70^{+/+}: 7,9±0,6%, ZAP-70^{+/-}: 5,1±1,3%).



10. ábra Regulatórikus T-sejtek (T_{reg}) aránya ZAP-70 hiányos egerek nyirokszerveiben

ZAP-70^{+/+} és ZAP-70^{+/-} egerekben sejtfelszíni és intracelluláris jelölést követően áramlási citometriával vizsgáltuk a vérben, nyirokcsomókban, lépben és tímuszban a CD4⁺ sejteken belül a T_{reg} -sejtek arányát. Az oszlopdigramokon n=6 ZAP-70^{+/+} és n=6 ZAP-70^{+/-} állat eredményei láthatók, az átlag ± SEM feltüntetésével.

4.1.3 Szövettan

A lépben, inguinális és mezenteriális nyirokcsomókban, valamint a tímuszban bekövetkező morfológiai változásokat immunfluoreszens technikával elemeztük.

A ZAP-70^{+/+} egerek lépében jól láthatóak a follikulusok a B-sejtekkel és a T-sejtek által alkotott PALS régiók. A T-sejtek arányában tapasztalt csökkenés ellenére a ZAP-70^{+/-} egerek lépében a PALS régiók jelen vannak, a szövet morfológiája hasonló a ZAP-70^{+/+}-hoz. Ezzel szemben a ZAP-70^{-/-} egerek lépéből teljesen hiányoznak a PALS régiók, a centrális artériák mellett nincsenek jelen T-sejt zónák, a B-sejtek viszont itt is follikulusokba rendeződnek (11. ábra).

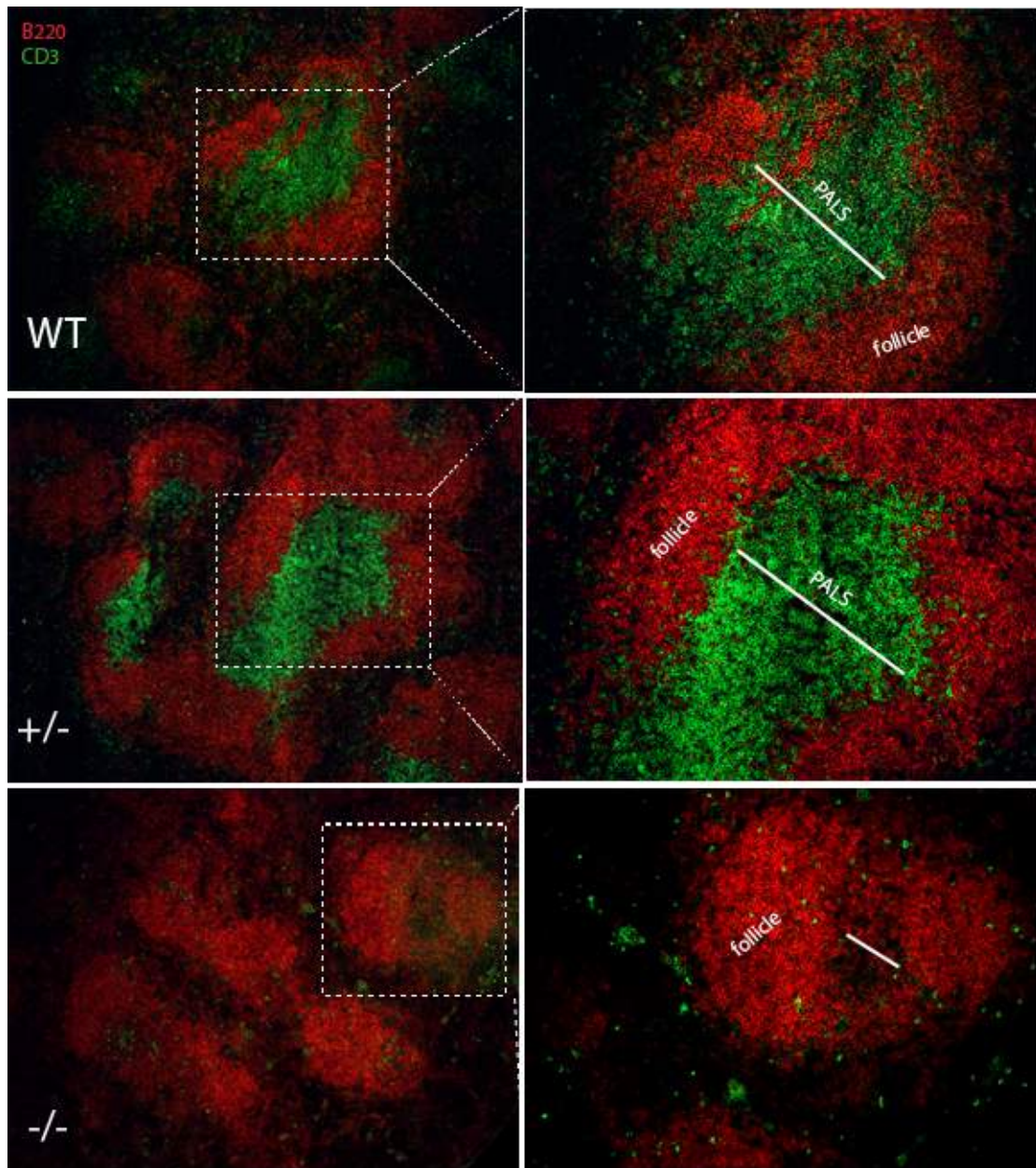
Az inguinális nyirokcsomók esetében a ZAP-70^{+/-} egerekben a parakortikális T-sejt zóna jelen van, de kevesebb sejtet tartalmaz és kevésbé strukturált, mint a ZAP-70^{+/+} nyirokcsomóban, míg a ZAP-70^{-/-} mintákban a kevés, elszórtan jelenlévő T-sejt nem alkot rendezett struktúrát a paracortexben (12. ábra).

Ezzel szemben a mezenteriális nyirokcsomókban a változások sokkal kevésbé látványosak: a ZAP-70^{+/-} nyirokcsomókban jelentős számú T-sejt található, így a morfológia hasonló a vad-típúshoz. Szintén nem elhanyagolható mennyiségű T-sejt található a ZAP-70^{-/-} mezenteriális nyirokcsomókban, de ezek sem alkotnak rendezett T-sejt zónát (13. ábra).

A ZAP-70^{+/+} és ZAP-70^{+/-} egerek tímuszában elkülöníthető a kettős pozitív sejteket tartalmazó cortex és az egyszeresen pozitív timocitákat tartalmazó medulla. A medulla méretében csökkenés figyelhető meg a heterozigóta tímuszban is, de a ZAP-70^{-/-} tímuszokból teljes egészében hiányzik a egyszeresen pozitív sejteket tartalmazó medulla, mely összhangban van az áramlási citometriás eredményekkel (14. ábra).

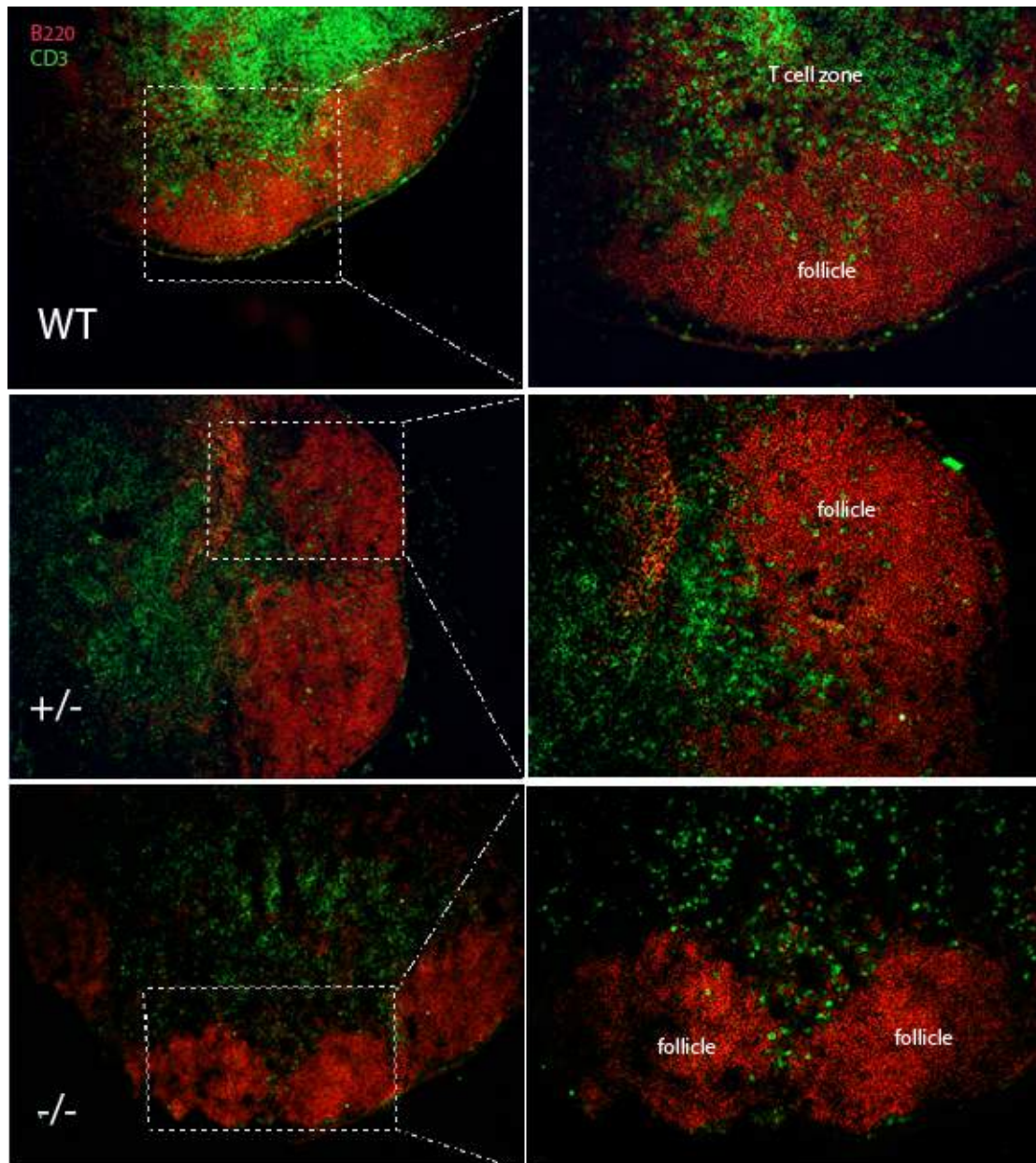
Ezek után megvizsgáltuk, hogy a timociták számában tapasztalt változásoknak következtében a tímusz különböző epithél sejtjeinek aránya és elhelyezkedése is megváltozik-e.

A timociták arányában megfigyelt változásokkal párhuzamosan a tímusz epithél sejtek arányában is eltérések figyelhetőek meg (15. ábra). A ZAP-70^{-/-} egerek tímuszában csak elszórtan vannak jelen medulláris epithél sejtek, kortikális epithél sejtek töltik ki a szövet nagy részét, a ZAP-70^{+/-} egerekben ugyan a medulla és a cortex elkülöníthető, a medulláris epithél sejtek által kitöltött terület azonban kisebb, mint a ZAP-70^{+/+} esetében (15. ábra).



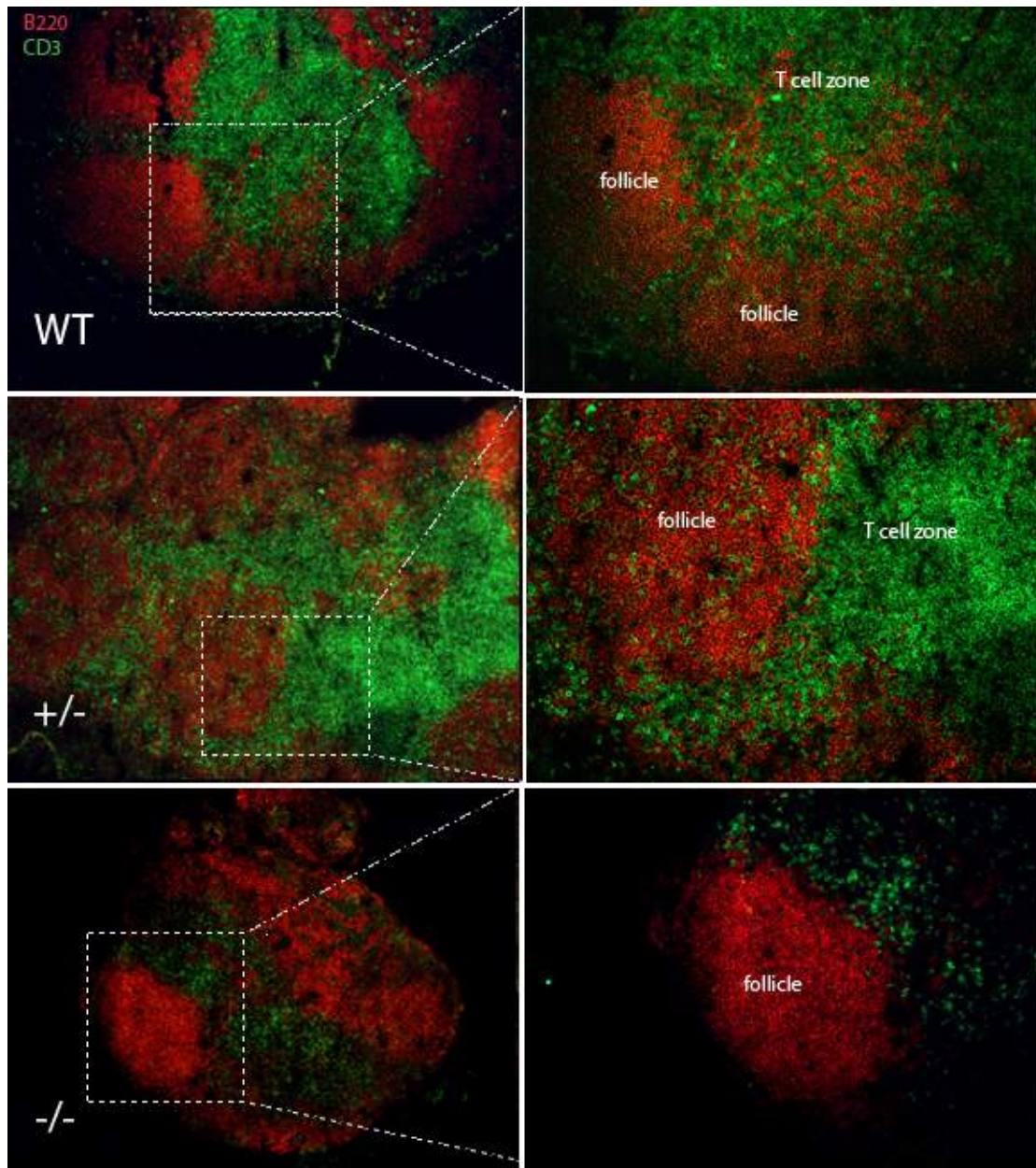
11. ábra A lép összehasonlító immunhisztológiája

ZAP-70^{+/+} (WT), ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerek lépe anti-CD3-FITC (zöld) és anti-B220-Alexa Fluor 647 (piros) immunfluoreszcens festéssel. 10x (bal panel) és 20x (jobb panel) nagyítású képeken látható, hogy lép fehér pulpa B sejt (follikulus) és T-sejt (PALS) régiókra osztható. WT: ZAP-70^{+/+}; +/-: ZAP-70^{+/-}; -/-: ZAP-70^{-/-} egér lép.



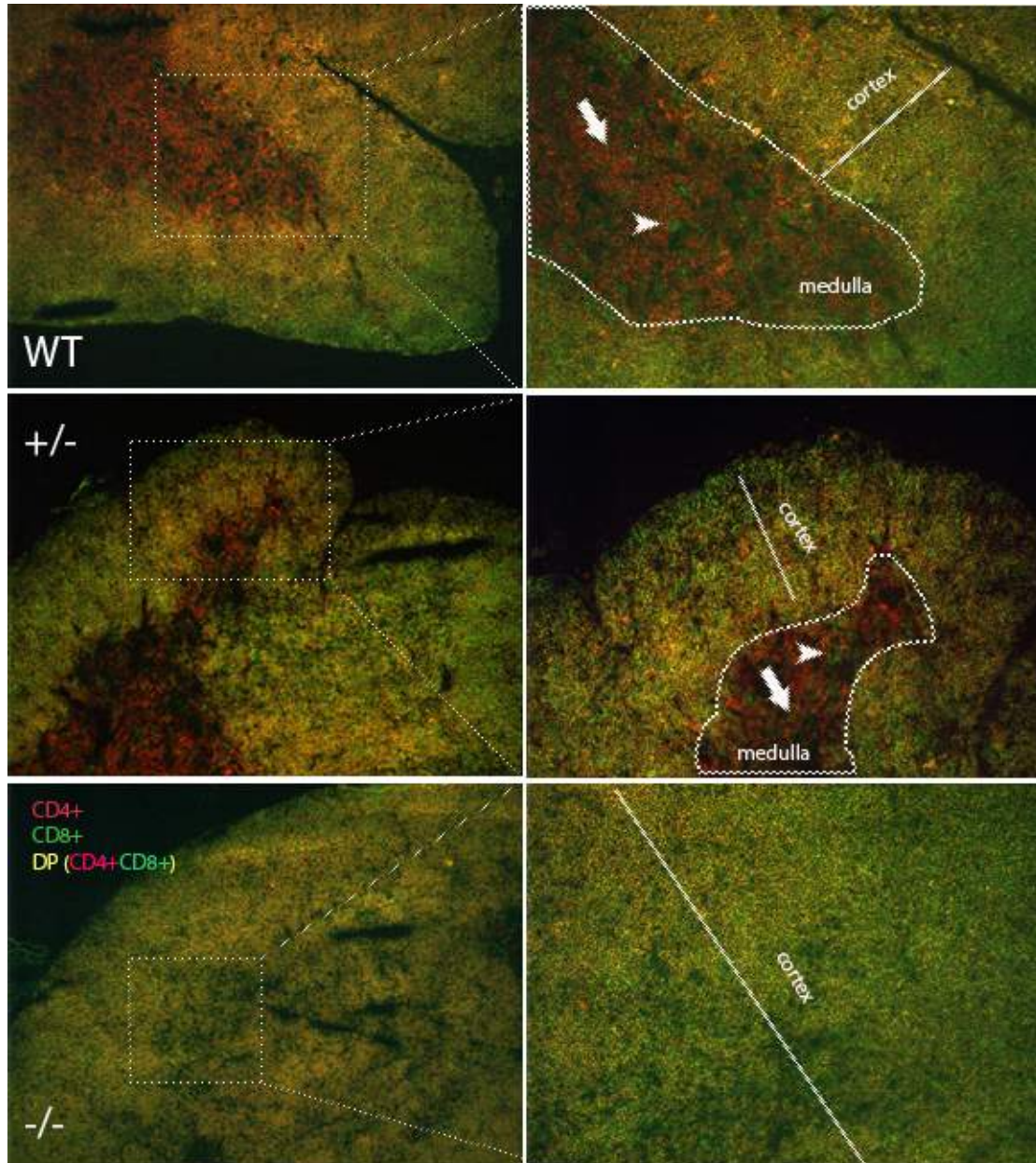
12. ábra Az inguinális nyirokcsomók összehasonlító immunhisztológiája

ZAP-70^{+/+} (WT), ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerek inguinális nyirokcsomója anti-CD3-FITC (zöld) és anti-B220-Alexa Fluor 647 (piros) immunfluoreszcens festéssel. 10x (bal panel) és 20x (jobb panel) nagyítású képeken látható, hogy az inguinális nyirokcsomó B sejt (follikulus) és T-sejt (paracortex) régiókra osztható. WT: ZAP-70^{+/+}; +/-: ZAP-70^{+/-}; -/-: ZAP-70^{-/-} egér nyirokcsomó.



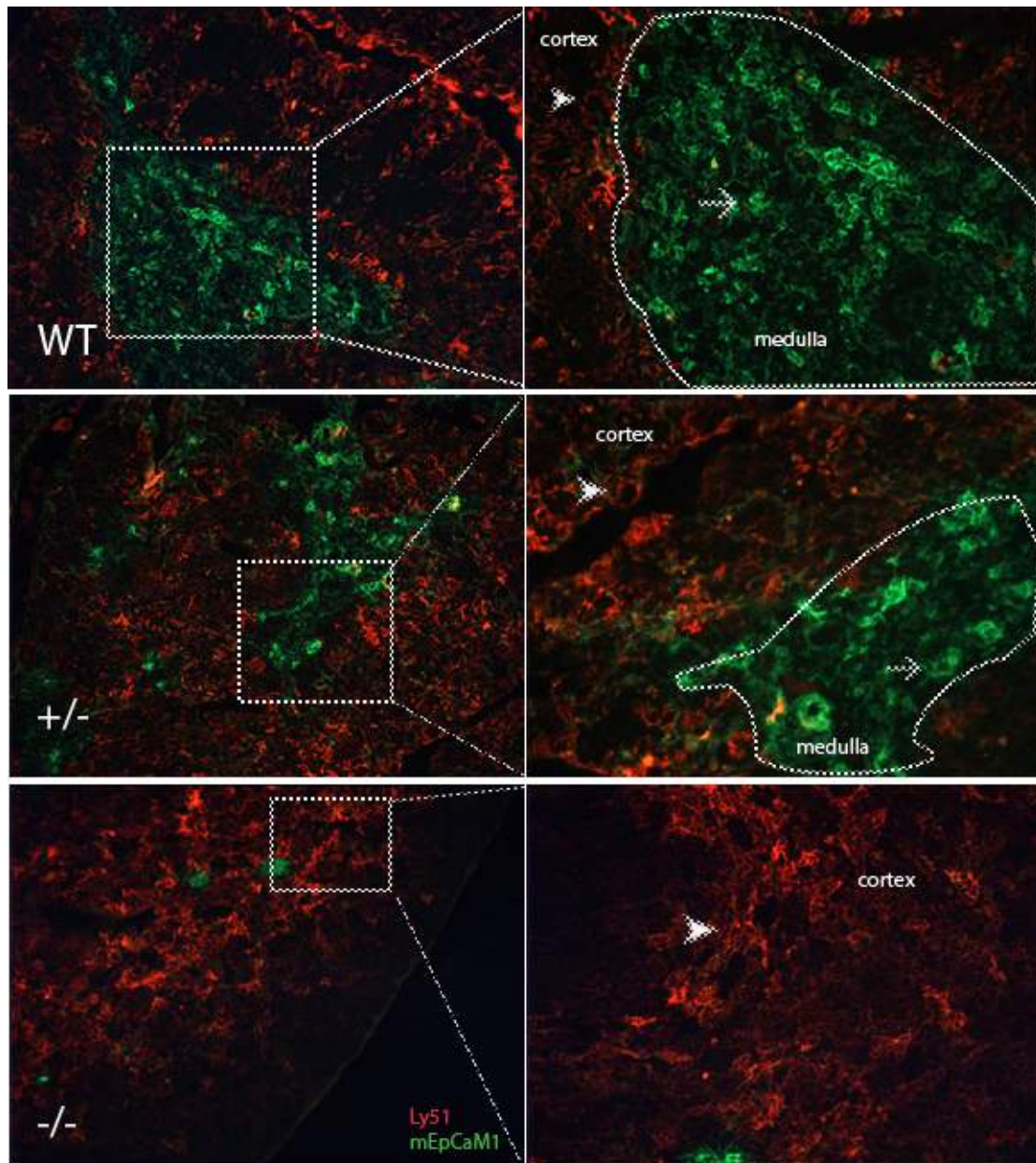
13. ábra A mesenterialis nyirokcsomók összehasonlító immunhisztológiája

ZAP-70^{+/+} (WT), ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerek mesenterialis nyirokcsomója anti-CD3-FITC (zöld) és anti-B220-Alexa Fluor 647 (piros) immunfluoreszcens festéssel. 10x (bal panel) és 20x (jobb panel) nagyítású képeken látható, hogy a nyirokcsomó B sejt (follikulus) és T-sejt (paracortex) régiókra osztható. WT: ZAP-70^{+/+}; +/-: ZAP-70^{+/-}; -/-: ZAP-70^{-/-} egér nyirokcsomó.



14. ábra A timociták megoszlásának összehasonlító immunhisztológiája

ZAP-70^{+/+} (WT), ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerek tímusza anti-CD8-FITC (zöld) és anti-CD4-PE (piros) immunfluoreszcens festéssel. 10x (bal panel) és 20x (jobb panel) nagyítású képeken a CD8⁺ egyszeresen pozitív (zöld, nyílhegy) CD4⁺ egyszeresen pozitív (piros, nyíl) és kettős pozitív (sárga; zöld és piros szignál kolokalizációja) sejtek a tímuszban. Az egyszeresen pozitív sejteket (medulla, bekarikázva) és kettős pozitív sejteket (cortex) tartalmazó régiók jól elválnak az ábrákon.

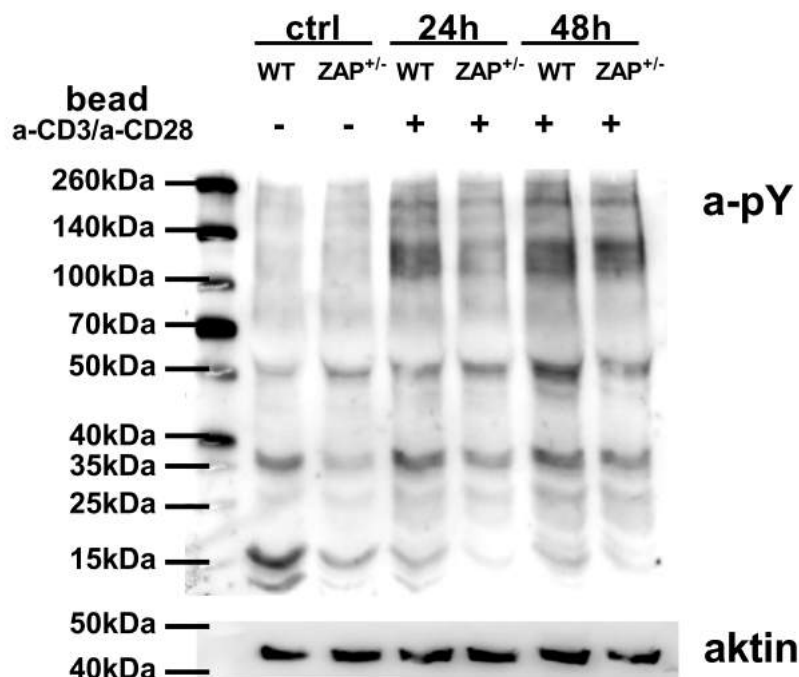


15. ábra A tímusz epitél összehasonlító immunhisztológiája

ZAP-70^{+/+} (WT), ZAP-70^{+/-} és ZAP-70^{-/-} egerek tímusa patkány anti-EpCAM1 + anti-rat-Ig-FITC (zöld) és anti-Ly51-PE (piros) immunfluoreszcens festéssel. 10x (bal panel) és 20x (jobb panel) nagyítású képeken látható, hogy a tímusz Ly51⁺ (cortex) és EpCAM1⁺ (medulla, szaggatott vonallal jelzett) régiókat tartalmaz.

4.1.4 T-sejt aktiváció és apoptózis

Elsőként a ZAP-70 T-sejt aktivációra gyakorolt hatását vizsgáltuk meg: az anti-CD3/CD28 stimulációt követően a ZAP-70^{+/-} egerekből származó T-sejtek eltérő mintázatú, csökkent mértékű tirozin-foszforilációt mutattak mind 24, mind 48 h kezelés után a ZAP-70^{+/+} kontrollokhoz viszonyítva (16. ábra).



16. ábra T-sejtek aktivációját követő foszforilációs mintázatok összehasonlítása.

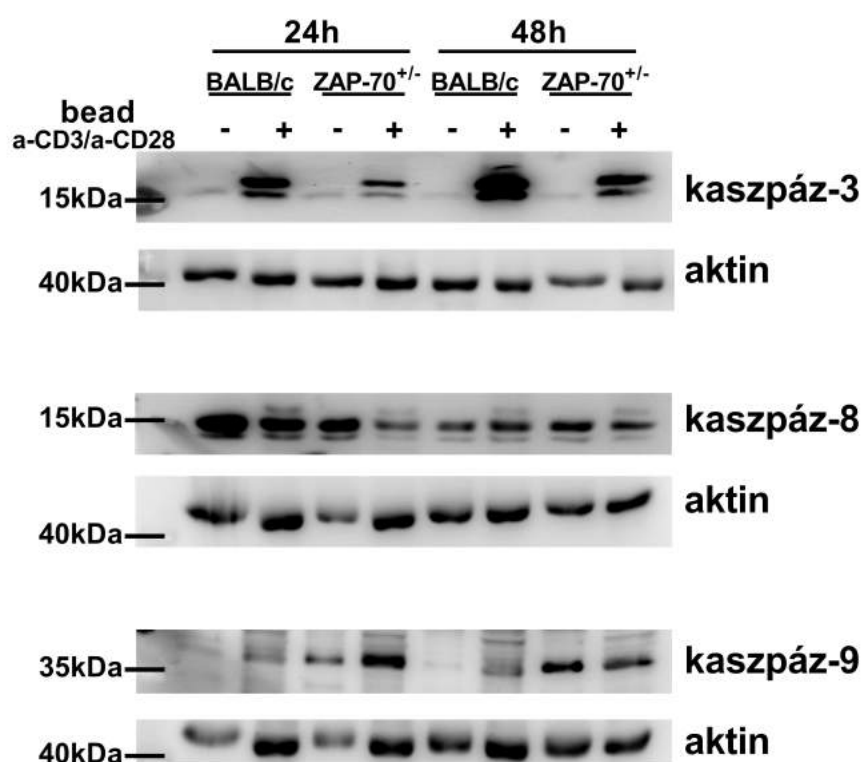
Egészséges ZAP-70^{+/+} (WT) és ZAP-70^{+/-} egerek lépéből izolált T-sejtjeit 24, illetve 48 h anti-CD3/anti-CD28 stimulációt követően lizáltuk. A mintákat SDS-PAGE elektroforézissel 10% gélben választottuk el, majd western blot technikával anti-foszfotirozin (pY) ellenanyag segítségével vizsgáltuk (felső panel), az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotok reprobíngját β -aktinnal végeztük (alsó panel). Az ábrán reprezentatív blotok láthatók.

A hasított kaszpáz-3 jelenléte az apoptotikus útvonalak aktivitását jelzi (17. ábra) [162]. A stimulált ZAP-70^{+/-} T-sejtekben kevesebb hasított kaszpáz-3 mutatható ki mind 24, mind 48 h után, mint a BALB/c egerek stimulált T-sejtekben (17. ábra). 48h után a BALB/c és a ZAP-70^{+/-} egerek stimulált T-sejtjeiben egyaránt magasabb volt a kaszpáz-3 hasított formájának expressziója, mint 24 h stimuláció után (17. ábra).

A hasított kaszpáz-8 az extrinszik útvonal iniciátor kaszpáza [205]. 24h stimuláció után a BALB/c T-sejtekben kis mértékben csökkent a kaszpáz-8 aktiváció,

a ZAP-70^{+/-} egerek T sejtjeiben viszont kifejezettebb volt ez a különbség (17. ábra). 48h után ez a különbség kiegyenlítődik, a stimulálatlan BALB/c T-sejtekben pedig csökken a hasított kaszpáz-8 mennyisége (17. ábra).

Az intrinszik apoptotikus útvonal aktiválódását a hasított kaszpáz-9 segítségével vizsgáltuk (17. ábra) [161]. ZAP-70^{+/-} egerek T-sejtjeiben mind 24, mind 48h után jelentősen több a hasított kaszpáz-9 mennyisége, mint a BALB/c mintákban (17. ábra). A 24 órás mintákban, valamint a 48 órás minták közül a BALB/c T-sejtekben stimuláció hatására nő a kaszpáz-9 hasított formájának expressziója, azonban 48 óra elteltével a ZAP-70^{+/-} egerek stimulált és stimulálatlan T-sejtjeiben körülbelül megegyezik a hasított kaszpáz-9 mennyisége (17. ábra).



17. ábra A ZAP-70 részleges hiányának hatása a sejthalálra és –proliferációra.

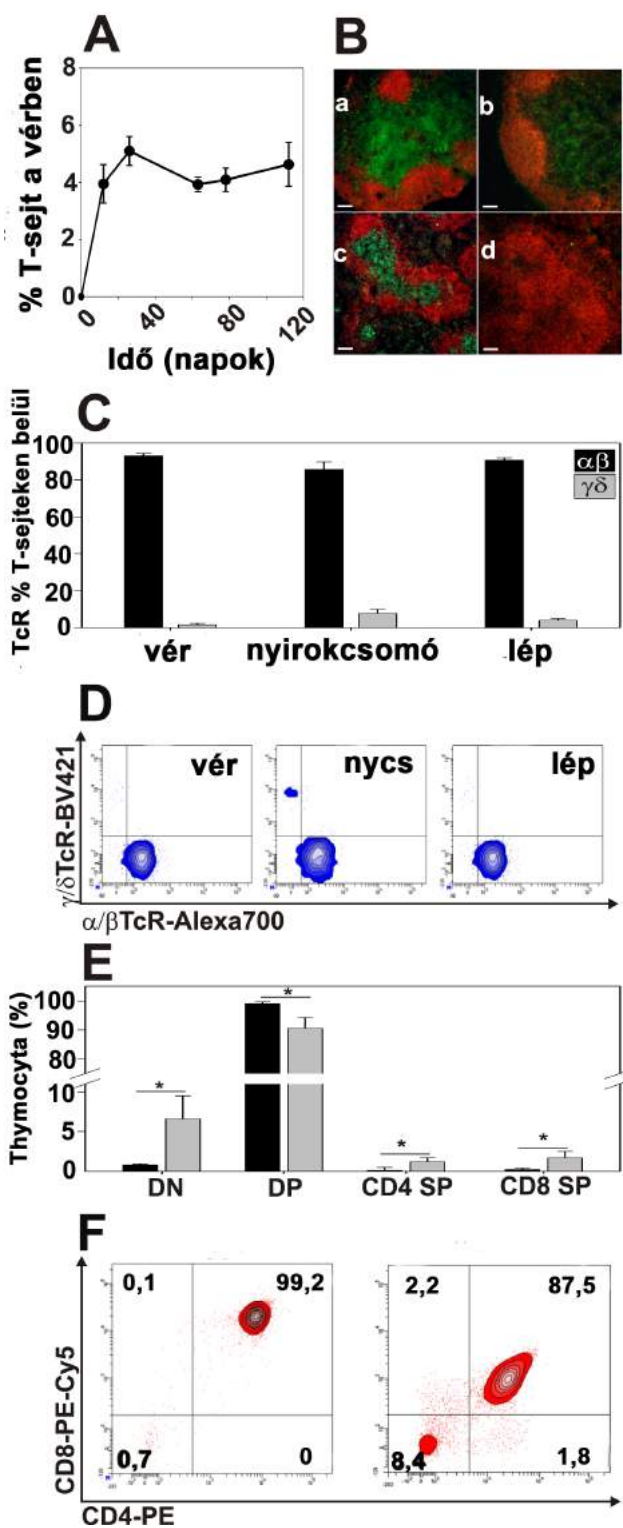
Egészséges BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek lépéből izolált T-sejteit 24, illetve 48 h anti-CD3/anti-CD28 stimulációt követően lizáltuk. A mintákat SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd western blot technikával a kaszpáz-3,-8 és -9 hasított formáját felismerő ellenanyag segítségével vizsgáltuk, az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotok töltési kontrollját β -aktinra végeztük. Az ábrán reprezentatív blotok láthatók.

4.2 T-sejt rekonstitúció ZAP-70^{-/-} egerekben

A ZAP-70 deficiens egerekben a DP stádiumban leáll a timociták differenciációja, ezért súlyos kombinált immunhiányuk alakul ki, ami csökkent élettartammal jár konvencionális (nem SPF) tenyésztési körülmények között (ld. 1.3.1). A T-sejtek helyreállítására történt korábbi kísérleteket az 1.3.2.-es fejezetben foglaltuk össze. Előkísérleteink során mi is többféle módszerrel próbálkoztunk a T-sejt-képzés helyreállítására, többek között újszülött ZAP-70^{-/-} egerek intrahepatikus vad-típusú csontvelő transzferével, valamint 3-4-hetes ZAP-70^{-/-} egerek vad-típusú timocitákkal történő i.v., illetve i.p. oltásával. Az intrahepatikus csontvelő- és az i.p. timocita transzfer után sikerült T-sejteket detektálnunk, az i.v. timocita oltás azonban nem volt hatékony, egyik transzferált egér sem élt egy hónappal a transzfer után, a vérükben pedig nem jelentek meg T-sejtek. Technikai megfontolások (donor szövet elérhetősége, szükséges sejtszám, beadási mód kivitelezhetősége), valamint a kevés rendelkezésre álló, timociták transzferét vizsgáló tanulmány [206–208] miatt úgy döntöttünk, hogy az i.p. timocita transzfert választjuk a T-sejt rekonstitúciós kísérleteinkhez.

Az intaperitoneális timocita transzfer után a T-sejtek megjelenését a periférián vérvételt követően áramlási citometria segítségével monitoroztuk (18. ábra A). Már 10 nappal a transzfer után T-sejtek jelentek meg a vérben (kb. 4%), arányuk pedig a kísérlet időtartalma alatt (120 nap) állandó maradt (4 és 6 % között) (18. ábra, A). Az állatok vérében, perifériás nyirokcsomóiban és lépében az $\alpha\beta/\gamma\delta$ T-sejtek aránya normalizálódott, a T-sejtek több, mint 80%-a $\alpha\beta$ T-sejt receptort expresszált (3. ábra, C). A kísérlet végén a recipiens egerek perifériás nyirokcsomóiból és lépéből immunfluoreszcens szövettani mintákat is készítettünk, melyeken jól látható, hogy a transzfert kapott állatok vizsgált nyirokszerveiben T-sejt zónák jelentek meg. (18. ábra, B)

Hogy igazoljuk, hogy a ZAP-70^{-/-} egerekben a timocita transzfer hatására normalizálódik a T-sejt érés, a recipiens egerek tímuszában vizsgáltuk a különböző timocita alcsoportokat. Míg a ZAP-70^{-/-} egerek tímuszában a timociták szinte kizárólag kettős pozitív fenotípusúak ($99 \pm 0,7$ %), a transzfer után ez az arány $90,5 \pm 3,7$ %-ra csökkent, valamint megjelentek CD4⁺ ($1,2 \pm 0,6$ %) és CD8⁺ ($1,7 \pm 0,8$ %) egyszeresen pozitív thymociták. (18. ábra, E és F)



18. ábra $ZAP-70^{+/+}$ timociták intraperitoneális (i.p.) transzferének hosszútávú eredményei

A $ZAP-70^{-/-}$ egereket 3 hetes korukban 10^7 $ZAP-70^{+/+}$ timocitával oltottunk be, majd több hónapon keresztül monitoroztuk őket. (A) A T-sejt rekonstitúció kinetikája. A $CD3^+$ T-sejtek arányát rendszeres vérvétel után áramlási citometriás méréssel határoztuk meg, a

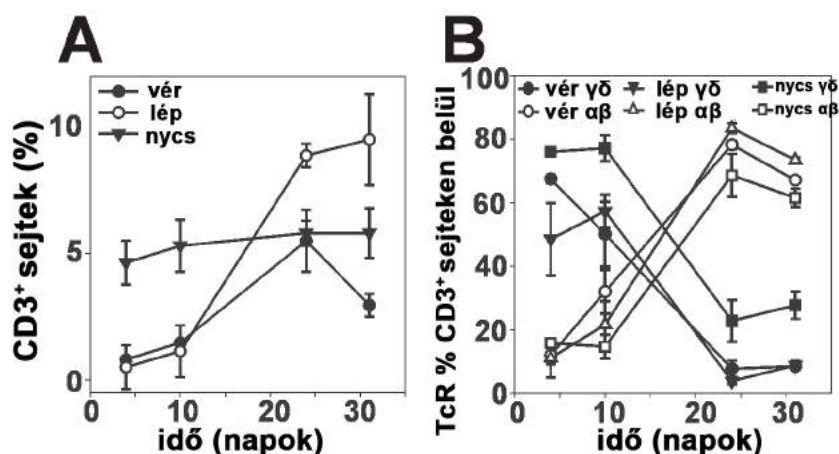
transzfert követő 4. hónapig. Az oszlopdigrammokon átlag \pm SEM értékeket tüntettünk fel (n=7 egér). (B) Reprezentatív immunfluoreszcens szövettani metszetek transzferált egerek nyirokcsomójából (nycs) (a) és lépéből (c), 4 hónappal a transzfer után, összehasonlítva ZAP-70^{-/-} egerek nyirokcsomójával (b) és lépével (d). A CD3⁺ T-sejtek (zöld) és a B220⁺ B-sejtek (piros) 10x nagyításban láthatók (scale bar: 200 μ m). (C) A $\alpha\beta$ és $\gamma\delta$ T-sejt receptorral rendelkező sejtek arányát áramlási citometriás mérésrel állapítottuk i.p. timocita transzfer kapott ZAP-70^{-/-} egerek perifériás véréből, nyirokcsomóiból és lépéből. Az oszlopdigrammokon átlag \pm SEM értékeket tüntettünk fel (n=4 egér). (D) A reprezentatív áramlási citometriás kontúr plotok az $\alpha\beta$ és $\gamma\delta$ T-sejtek eloszlását mutatják a vérben, nyirokcsomókban és lépben. (E) A timociták összetételét CD4/CD8 festést követő áramlási citometriával határoztuk meg a tímuszban. Az oszlopdigramm a timocita alcsoportok megoszlását mutatja (DN: CD4⁻CD8⁻ kettős negatív; DP: CD4⁺CD8⁺ kettős pozitív; CD4 SP: CD4⁺ egyszeresen pozitív; CD8 SP: CD8⁺ egyszeresen pozitív) kontroll ZAP-70^{-/-} (fekete) és timocita transzfert kapott ZAP-70^{-/-} egerek (szürke) tímuszából, 4-8 hónappal a transzfer után. Az oszlopdigrammokon átlag \pm SEM értékeket tüntettünk fel (n=4 ZAP-70^{-/-} egér és n=7 transzferált egér). A statisztikailag szignifikáns (*P<0.01) különbségeket jelöltük. (F) A reprezentatív áramlási citometriás kontúr ploton, a bal panel ZAP-70^{-/-} egér, a jobb panel timocita transzfert kapott egér timocita alcsoportjait mutatja.

A timocita transzfer hosszútávú hatásainak vizsgálatára a transzfert kapott egerek egy csoportját 120 nap elteltével nem dolgoztuk fel, 4 állat esetében pedig egészen 12 hónapig folytattuk a monitorozást. A kimérizmus továbbra is stabilnak bizonyult, a transzfer sikerességét jól mutatja az is, hogy az állatok élettartama jelentősen megnőtt a transzfert nem kapott társaikéhoz képest.

4.2.1 Az adoptív timocita transzfer korai kinetikája

A transzfert követő tizedik napon már megjelentek T-sejtek a vérben, ezért egy következő kísérletben a T-sejt pótlás, korai fázisát kívántuk megvizsgálni. Ennek érdekében az egerek vérében, perifériás nyirokcsomóiban és lépében vizsgáltuk a T-sejtek arányát 4, 10, 24 és 31 nappal a transzfer után (19. ábra, A). A vérben a 10. nap és a 24. nap között 1,0%-ról 5,5%-ra nőtt, majd a 31. napra 3,0%-ra csökkent a T-sejt arány. A lépben ugyanez az arány a 24. napra gyorsan megemelkedett (1,1%-ról 8,9%-ra), majd tovább nőtt a 31. napig (9,5%). Ezzel szemben a nyirokcsomókban a vizsgált időszakban csak enyhén nőtt a T-sejt arány (4,6%-ról a 4. napon 5,8%-ra a 31. napon), igaz a legmagasabb kiindulási T-sejt arányt is itt mértük (feltehetően a ZAP-70^{-/-} nyirokcsomókban jelenlévő $\gamma\delta$ T-sejtek miatt ld. 1.3.1).

A vérben és vizsgált másodlagos nyirokszervekben az $\alpha\beta$ és $\gamma\delta$ T-sejtek arányának változását is követtük (19. ábra, B). 4 nappal a transzfer után a T-sejtek többsége $\gamma\delta$ T-sejt volt az összes vizsgált szervben (vér: $67,4 \pm 1,3\%$, lép: $48,5 \pm 11,4\%$, nyirokcsomók: $75,9 \pm 1\%$). A $\gamma\delta$ T-sejtek aránya ezután folyamatosan csökkent a 24. napig a vérben ($7,7 \pm 2,6\%$), a lépben és a nyirokcsomókban ez a tendencia csak a 10. nap után mutatkozott. A 24. napra a lépben $3,8 \pm 0,9\%$ volt a $\gamma\delta$ T-sejtek aránya, azonban a nyirokcsomókban ebben az időpontban sem csökkent $22,8 \pm 6,6\%$ alá. Ezzel párhuzamosan az $\alpha\beta$ T-sejtek aránya a vérben $12 \pm 2,8\%$ %-ról (4. nap) $78,2 \pm 1,3\%$ -ra (24. nap), a lépben $11,1 \pm 6,2\%$ -ról (4. nap) $83,4 \pm 1,6\%$ -ra (24. nap) emelkedett. A nyirokcsomókban a 10. napig nem történt változás (4. nap: $15,8 \pm 1,1\%$, 10. nap: $14,7\% \pm 3,8\%$), majd növekedésnek indult az $\alpha\beta$ T-sejtek aránya (24. nap: $68,6 \pm 6,7\%$). A 24. nap után összes vizsgált mintában kis mértékben csökkent a $\alpha\beta$ T-sejt arány.



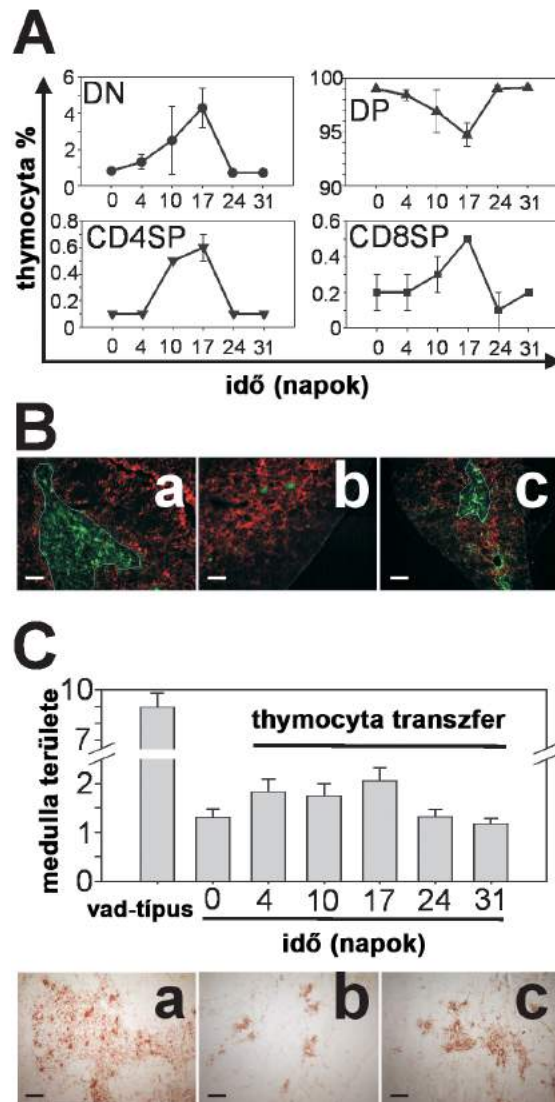
19. ábra A T-sejt rekonstitúció korai (1. hónap) kinetikája

ZAP-70^{-/-} egerek másodlagos nyirokszerveiben ZAP-70^{+/+} timociták i.p. transzfere után. (A) A CD3⁺ T-sejtek arányát áramlási citometriás mérésel határoztuk meg a vérben (fekete kör), nyirokcsomókban (háromszög) és lépben (üres kör) 4, 10, 24 és 31 nappal a transzfer után. A diagrammokon átlag \pm SEM értékeket tüntettünk fel (n=3 egér minden időpontban). (B) Az $\alpha\beta$ (fehér) és $\gamma\delta$ T-sejt (fekete) receptorral rendelkező sejtek arányát áramlási citometriás mérésel állapítottuk i.p. timocita transzfer kapott ZAP-70^{-/-} egerek perifériás véréből (kör), nyirokcsomóiból (négyzet) és lépéből (háromszög). A diagrammokon átlag \pm SEM értékeket tüntettünk fel (n=3 egér minden időpontban).

4.2.2 A tímuszban lezajló korai változások vizsgálata

A timocita transzfer korai hatásait a tímuszban is megvizsgáltuk: egyrészt a timocita alcsoportok arányának változását tanulmányoztuk, másrészt a tímusz morfológiai változásait analizáltuk.

Változásokat már az i.p. transfert követő 10-17. napon láttunk (20. ábra, A): a kettős negatív timociták aránya $0,8\pm0,1\%$ -ról $4,3\pm1,1\%$ -ra nőtt (10. nap), ezzel párhuzamosan a kettős pozitív sejtek aránya $99\pm0,7\%$ -ról $94,7\pm1,1\%$ -ra csökkent. Az érett, egyszeresen pozitív timociták aránya folyamatosan emelkedett a negyedik naptól, majd a 17. napon mind a $CD4^+$ ($0,6\pm0,1\%$), mind a $CD8^+$ timociták ($0,5\pm0,1\%$) aránya elérte a maximumát, jelezve a tímuszban zajló T-sejtérés normalizálódását. Érdekes módon a 24. napra az összes timocita alcsoport aránya visszatért a kiindulási értékre.



20. ábra A T-sejt rekonstitúció korai (1. hónap) kinetikája ZAP-70^{-/-} egerek tímuszában

A: A timocita alcsoportok összetételének változását áramlási citométeres mérésekkel követtük 0, 4, 10, 17, 24 és 31 nappal a transzfer után. Az oszlopdiaagrammokon átlag ± SEM értékeket tüntettünk fel (n=3 egér) B: A tímusz szövettani összetételét anti-epithelial cell adhesion molecule 1 (EpCAM1) (zöld) és anti-Ly51 (piros) medulláris, illetve cortikális régiót festő antitestek segítségével analizáltuk. Reprezentatív immunfluoreszcens kép ZAP-70^{+/+} (a), ZAP-70^{-/-} (b), illetve transzferált ZAP-70^{-/-} (c) egér tímuszából (10x nagyítás, scale bar: 200 µm). C: A tímusz medulláris régiójának területét anti-EpCAM1 elsődleges, és peroxidáz-konjugált másodlagos antitesttel határoztuk meg 4, 10, 17, 24 és 31 nappal a transzfer után. ZAP-70^{+/+}, ZAP-70^{-/-} és transzferált egerek tímuszából 4-4 metszetet készítettünk, majd minden mintáról 20 képet készítettünk, majd az EpCAM1 pozitív régiók területét ImageJ szoftver segítségével mértük le. Az oszlopdiaagrammokon átlag±SEM értékeket tüntettünk fel (n=3 egér). Reprezentatív EpCAM1 immunohisztokémiai képek ZAP-70^{+/+} (a), ZAP-70^{-/-} (b) és transzferált ZAP-70^{-/-} (c) egerek tímuszában (10x nagyítás, scale bar: 200 µm)

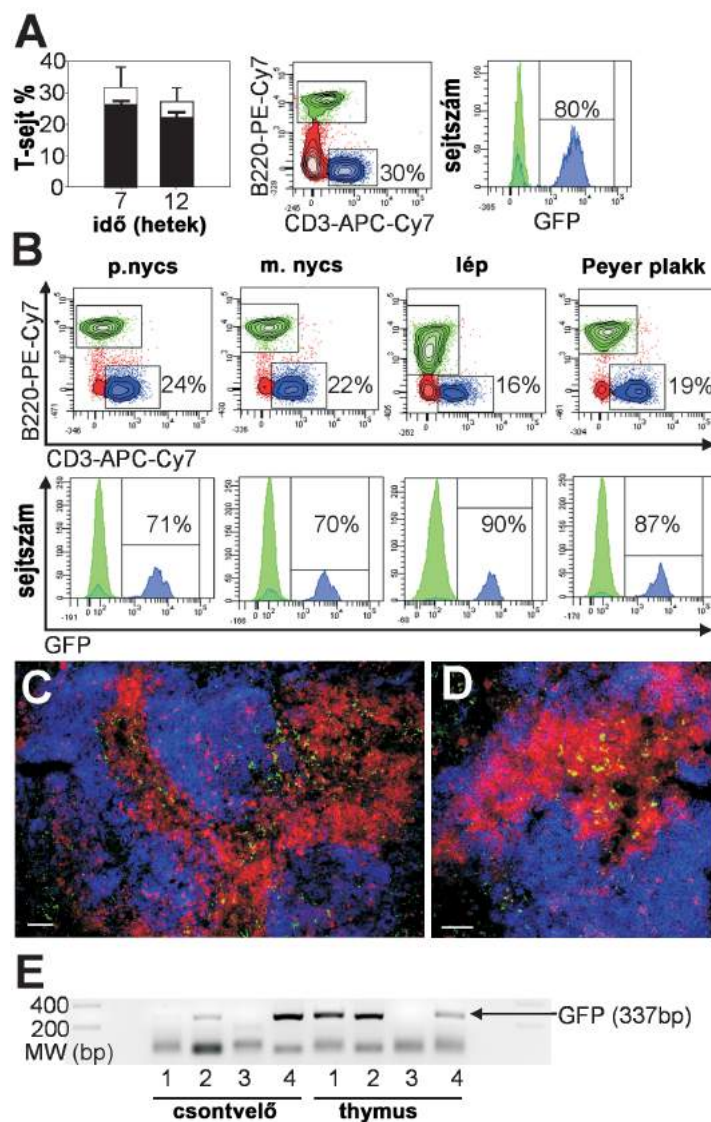
Kíváncsiak voltunk, hogy a timocita csoportokban lezajló változások hatással vannak-e a tímusz morfológiájára is (20. ábra B, C). Tizenhét nappal a transzfer után a szövettan alapján rendezett, medulláris területek jelentek meg foltszerű elrendezésben, a kvantitatív mérések alapján (20. ábra C) a medulláris részek területe a timocita alcsoportok arányával párhuzamosan változott: a 17. napon látott kezdeti növekedés (0. nap: $1,3 \pm 0,17$, 17. nap: $2,05 \pm 0,27$) után a medulla területe ismét csökkent ($1,17 \pm 0,12$)

4.2.3 GFP-transzgén expresszáló timociták transzfere

Annak bizonyítására, hogy a fentiekben ismertetett T-sejt repopuláció valóban a transzferált timociták által kialakított stabil kimérizmus eredménye, GFP-transzgenikus egerekből származó donor timocitákkal is elvégeztük a transzfert.

A perifériás vérben a T-sejtek aránya (21. ábra, A) a transzfert követő 7. és 12. hétre $31,6 \pm 6,4\%$ -ra (ebből $83,5 \pm 3,9\%$ GFP⁺), illetve $27,1 \pm 4,4\%$ -ra (ebből $78,5 \pm 6\%$ GFP⁺) nőtt. A másodlagos nyirokszervekben is vizsgáltuk a donor-eredetű T-sejtek arányát (6. ábra, B): a perifériás és mezenterialis nyirokcsomókban, lépben és Peyer plakkokban is azt találtuk, hogy a transzfert követően a T-sejtek aránya 16 és 24 % között van, a donor sejtek aránya a T-sejteken belül a nyirokcsomókban 70%, a lépben 90%, a Peyer plakkban pedig 87% volt.

A donor sejtek elhelyezkedését a lépben szövettan segítségével vizsgáltuk (21. ábra, C,D): GFP⁺ sejtek csak a T-sejteket tartalmazó PALS régióban láttunk, a B-sejteket tartalmazó folliculusokban nem. A tímuszban szövettan segítségével nem sikerült kimutatni GFP⁺ sejteket feltehetően azok alacsony száma miatt, azonban RT-PCR segítségével erős GFP expresszió látható a GFP⁺ timocita transzfer kapott egerek tímuszában, míg ugyanezen egerek csontvelő mintáiban igen alacsony volt a GFP expressziója (21. ábra, E).



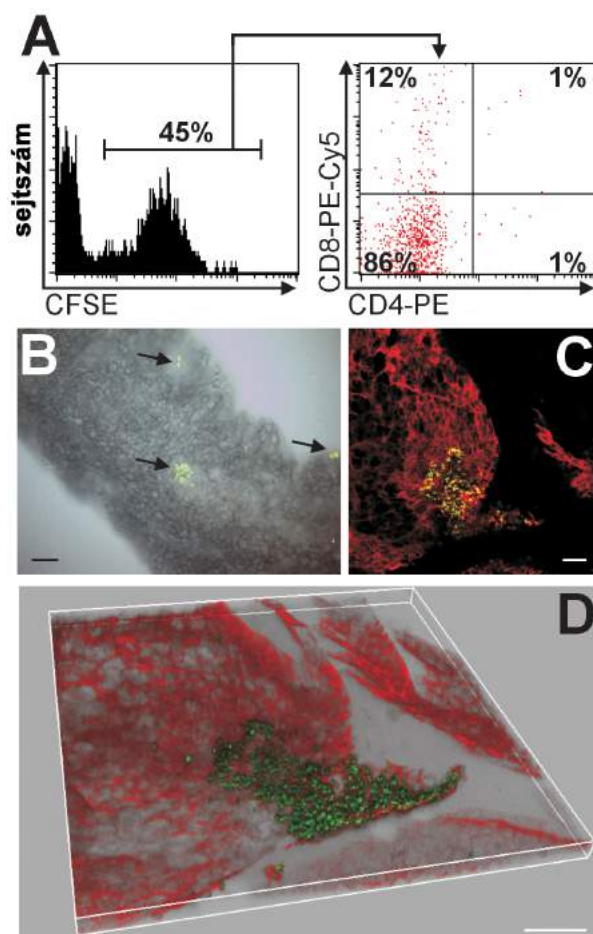
21. ábra A GFP-t expresszáló timociták transzferét követő rekonstitúció vizsgálata.

(A) 7, illetve 12 héttel a GFP-transzgenikus donor egerekből származó timociták i.p. transzferét követően a vér limfocitáinak összetételét áramlási citometriával vizsgáltuk CD3, B220 festés és GFP expresszió alapján. Az oszlopdiaagram a T-sejtek (üres oszlop), valamint azon belül a GFP⁺ sejtek arányát (átlag±SEM, n=6) mutatja. A reprezentatív áramlási citometriás ábrán a T- (CD3⁺, kék populáció) és B-sejtek (B220⁺, zöld populáció) láthatóak kontúr plot-on, valamint a sejtcsoportokon belüli GFP-expresszió a hisztogramon. (B) A reprezentatív áramlási citometriás ábrák a T- (CD3⁺, kék populáció) és B-sejtek (B220⁺, zöld populáció) GFP-expresszióját (hisztogram) mutatják transzferált ZAP-70^{-/-} egerek perifériás (p. nycs) és mezenterialis (m. nycs) nyirokcsomóiban, lépében és Peyer plakkjaiban. (C, D) A reprezentatív immunfluoreszcens szövettani ábrák 10x (c), illetve 20x nagyításban (d) GFP⁺-timocitákkal transzferált ZAP-70^{-/-} egerek lépéből T- (anti-CD5-phycoerythrin, piros), és B-sejt (anti-B220-Alexa-Fluor670, kék) festés után. A GFP⁺ sejtek (zöld) főként a T-sejteket (piros) tartalmazó PALS régiókban láthatók (scale bar: 200 μm (10x), 100 μm (20x)) (E) A GFP-expresszió kimutatása RT-PCR segítségével

két GFP⁺ timocita transzfert kapott ZAP-70^{-/-} (1, 2), egy BALB/c (3), illetve egy GFP-transzgenikus egér (4) csontvelőjének sejtjeiben, illetve timocitáiban.

4.2.4 A timociták peritoneumból való homingjának vizsgálata

A következőkben azt szeretnénk meg tudni, hogy a peritoneumba beadott sejtek hogyan hagyják el a peritoneumot és jutnak el a keringésbe. Ennek vizsgálatára CFSE-jelölt timocitákkal oltottunk be intraperitoneálisan ZAP-70^{-/-} egereket, majd 12, 24, 48 és 72 óra múlva analizáltuk a mediastinális, inguinális és axilláris nyirokcsomókat, valamint a peritoneum különböző szerveit. A legtöbb donor limfocitát az omentumban találtuk, melyben a CFSE⁺ sejtek többsége CD4⁻CD8⁻ kettős negatív volt (22. ábra, A). A whole mount szövettan alapján a donor-sejtek nem elszórva, hanem aggregátumok formájában jelennek meg az omentumban (22. ábra, B), immunfluoreszcens festés (22. ábra, C,D) segítségével pedig megállapítottuk, hogy a CFSE⁺ sejtek az omentum limfoid területein, az úgy nevezett milky spotokban találhatóak.

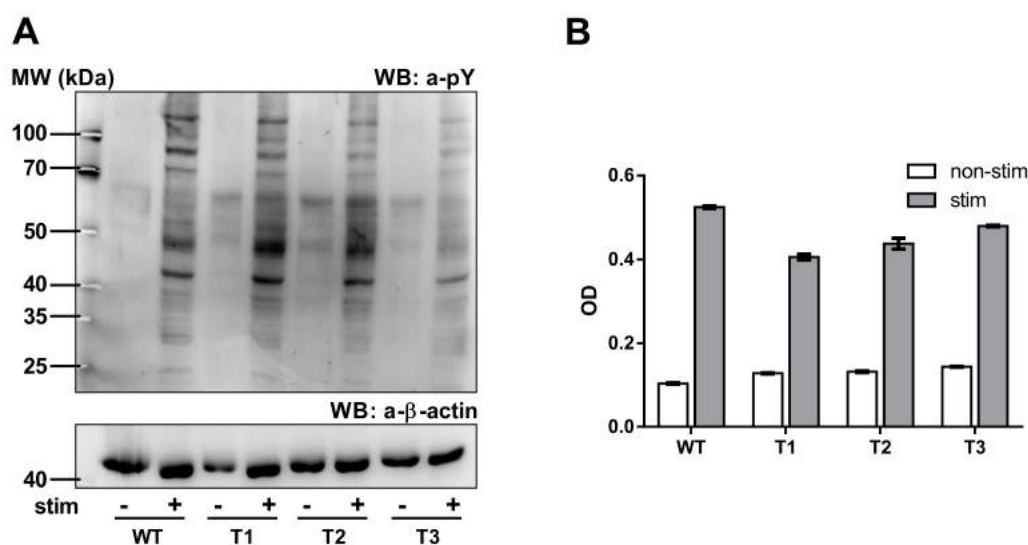


22. ábra A donor timociták az omentumban található milky spotokon keresztül hagyják el a peritoneumot.

CFSE-jelölt timociták intraperitoneális transzfere után a transzferált $ZAP-70^{-/-}$ egerek omentumát 24 óra múlva vizsgáltuk. (A) Áramlási citometriás vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a $CFSE^{+}$ sejtek megjelentek az omentumban (bal hisztogram), majd vizsgáltuk a $CFSE^{+}$ sejtek CD4/CD8 mintázatát sejtfelszíni jelölés után (jobb dot plot). Egy transzferált $ZAP-70^{-/-}$ egér omentumából származó reprezentatív ábrák. (B) Fénymikroszkópos whole-mount preparátumon látható, hogy a $CFSE^{+}$ -sejtek (zöld) az omentumban aggregátumokat alkotnak (nyíl) (scale bar: 250 μm) (C,D) Konfokális mikroszkópos kép a $CFSE^{+}$ timociták lokalizációjáról az omentumban. Az extracelluláris mátrixot fibronectin ellenes antitesttel vizualizáltuk (piros). Reprezentatív kétdimenziós kép (C) és 3D-s rekonstrukció (D) (scale bar: 50 μm)

4.2.5 Funkcionális tesztek

Annak a vizsgálatára, hogy a transzfert követően megjelenő T-sejtek funkcionálisan aktívak-e *in vitro* T-sejt aktivációs tesztekét végeztünk. Az anti-CD3/CD28 gyöngyökkel történt stimuláció hatására a transzferált egerek lépéből izolált T-sejtek proliferációs és tirozin foszforilációs mintázata a ZAP-70^{+/+} egerek T-sejtjeihez hasonló (23. ábra). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a donor timocitákból differenciálódott T-sejtek aktivációs és proliferációs képessége megközelíti a kontrollokét.



23. ábra Donor T-sejtek *in vitro* funkcionális vizsgálata.

(A) Western blot az anti-CD3/CD28 stimulációt követő tirozin foszforilációs mintázatról. ZAP-70^{+/+} (WT) és transzferált egerekből (T1, T2, T3) izolált stimulálatlan- és stimulált T-sejtek lizátumát SDS-PAGE elektroforézissel 10% gélben választottuk el, majd western blot technikával anti-foszfortirozin (pY) ellenanyag segítségével vizsgáltuk (felső panel), az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotok reprobingját β -aktin-nal végeztük (alsó panel). Az ábrán reprezentatív blotok láthatóak. (B) Az aktivált T-sejtek *in vitro* proliferációjának vizsgálatát Promega CellTiter 96 non-radioaktív assay segítségével végeztük. Az oszlopdigramokon stimulálatlan (fehér) és anti-CD3/CD28 stimulált (szürke) mintákból mért optikai denzitást (O.D.) ábrázoltunk. Átlag \pm SEM, triplikátumokból mérve.

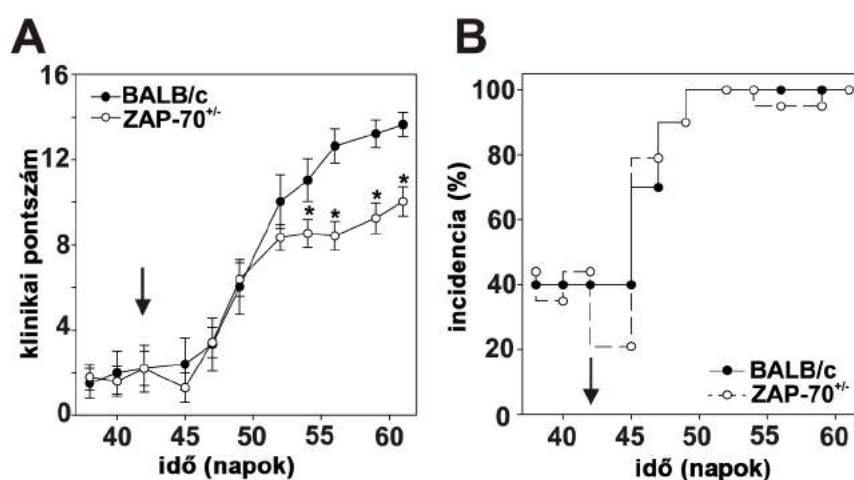
4.3 Rekombináns humán G1-indukált arthritis (GIA) vizsgálata részleges ZAP-70 hiányos egerekben

4.3.1 Az autoimmun arthritis klinikai képe

Az arthritis indukációs kísérleteket csak ZAP-70^{+/-} egereken végeztük el, mivel a ZAP-70^{-/-} állatok 4-5 hónapos korukra konvencionális állatházi körülmények között tartva elpusztulnak, ennél fiatalabb egerekben viszont a GIA nem indukálható hatékonyan [209].

A kezdeti hasonló klinikai pontszámok (2-es pontszám a második oltás időpontjában) után az 52. naptól a ZAP-70^{+/-} csoportban szignifikánsan enyhébb arthritist figyeltünk meg (62. nap: 10-es pontszám vs 14-es pontszám a ZAP-70^{+/+} csoportban) (24. ábra, A).

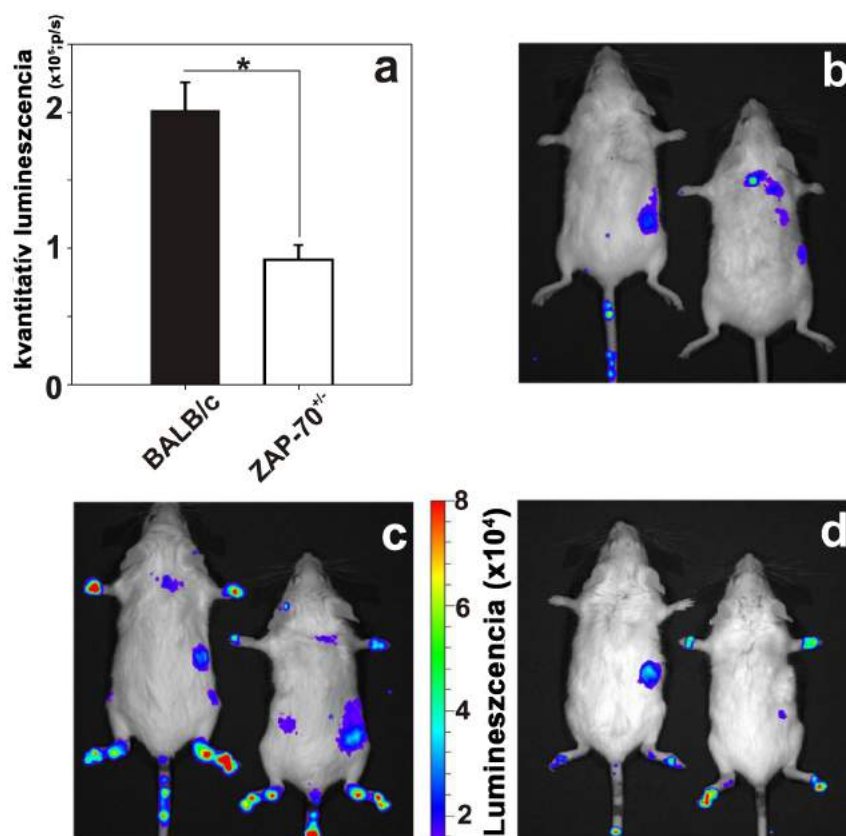
Az arthritis incidenciája a ZAP-70^{+/-} csoportban (20%) a fele volt a második oltás időpontjában (42. nap) a ZAP-70^{+/+} csoportban megfigyeltnek (40%). Ezután a két csoportban a betegség gyakorisága hasonló módon emelkedett, majd a kísérlet végén mindkét csoportban elérte a 100%-ot (24. ábra, B).



24. ábra A rhG1-indukált arthritis (GIA) klinikai paramétereinek összehasonlítása BALB/C (fekete kör) és ZAP-70^{+/-} (üres kör) egerekben.

Az egereket rhG1 és DDA keverékével három hetente, összesen háromszor immunizáltuk, az ábrákon a betegség súlyossága (A) és incidenciája (B) látható az első oltás után eltelt napok függvényében. Mindkét ábrán nyíl jelzi a harmadik oltás időpontját (42. nap). A betegség súlyosságát a második oltás után (21. nap) minden második nap egy 4-es pontrendszer segítségével pontoztuk. A klinikai pontszámokat átlag ± SEM (n=10 BALB/c, n=19 ZAP-70^{+/-} egér) formában ábrázoltuk, a szignifikáns (*p < 0.05) különbségeket jelöltük.

In vivo biolumineszcens vizsgálatokkal a gyulladás mértékét kívántuk mennyiségileg is pontosabban jellemezni (25. ábra). A gyulladás esetén megjelenő neutrophilek myeloperoxidáz enzim-aktivitása az állatoknak beadott luminolból származó biolumineszcencia mértékével jól jellemezhető. A klinikai pontszámoknak megfelelően az arthritises ZAP-70^{+/-} állatok hátsó lábán szignifikánsan kisebb myeloperoxidáz aktivitást mértünk (25. ábra, a, c-d).

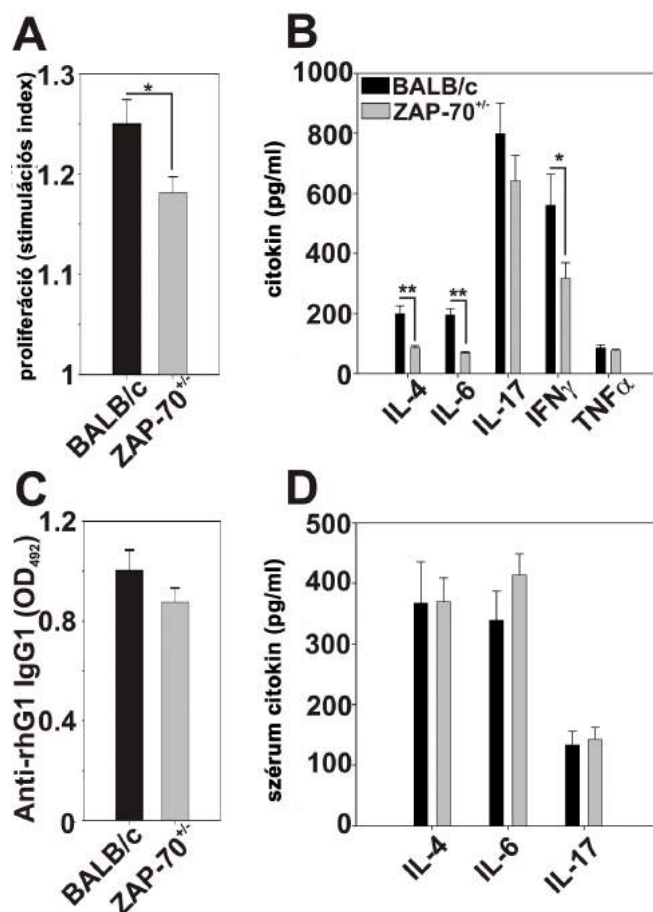


25. ábra *In vivo* biolumineszcens vizsgálatok egészséges és arthritises egerekben.

Az intraperitoneálisan beadott luminol lumineszcenciája jól korrelál a neutrophil eredetű myeloperoxidáz aktivitással. (a) Az oszlopdiaagram a kvantitatív lumineszcencia értékek átlag ± SEM-t mutatja (n=10 BALB/c, n=19 ZAP-70^{+/-} egér egerek hátsó lábainak érintett ízületeiben mérve) a szignifikáns különbségeket jelöltük (*p < 0.05). A reprezentatív felvételek egészséges BALB/c (b), arthritises BALB/c (c) és arthritises ZAP-70^{+/-} egerekről (d) készültek luminol beadását követően.

4.3.2 Antigén-specifikus proliferáció, citokin- és autoantitést termelés

Az arthritises ZAP-70^{+/-} egerek lépsejtjei rhG1 stimuláció hatására szignifikánsan kisebb mértékben osztódtak (26. ábra, A), mint az arthritises BALB/c egerek lépsejtjei (stimulációs index: $1,18 \pm 0,02$ vs $1,25 \pm 0,02$).



26. ábra *In vitro* lépsejtkultúra rhG1-specifikus proliferációja, citokin termelése és szérumból mért antitest és citokin koncentrációja.

Az arthritises egerek lépsejtjeit rhG1 jelenlétében vagy anélkül tenyésztettük, majd a sejtek *in vitro* proliferációjának (A) vizsgálatát Promega CellTiter 96 non-radioaktív assay segítségével végeztük. Az oszlopdiagramok a stimulált és rhG1-stimulált minták optikai denzitásának hányadosából számított stimulációs indexet ábrázolják BALB/c (fekete) és ZAP-70^{+/-} (szürke) mintákból. A lépsejtkultúra felülcszójából *in vitro* antigén-stimulusra termelt citokin mennyiségek (B) BALB/c (fekete) és ZAP-70^{+/-} (szürke) mintákból. A kísérletek végén az állatok begyűjtött szérumból mért rhG1-ellenes IgG1 izotípusú antitest (C), valamint gyulladáscitokinek (D) mennyisége arthritises BALB/c (fekete) és ZAP-70^{+/-} (szürke) egerekben. Az oszlopdiagramokon átlag \pm SEM értékeket ábrázoltunk n=10 BALB/c, n=19 ZAP-70^{+/-} egér mintáiból mérve, a szignifikáns (*p < 0.05) különbségeket jelöltük.

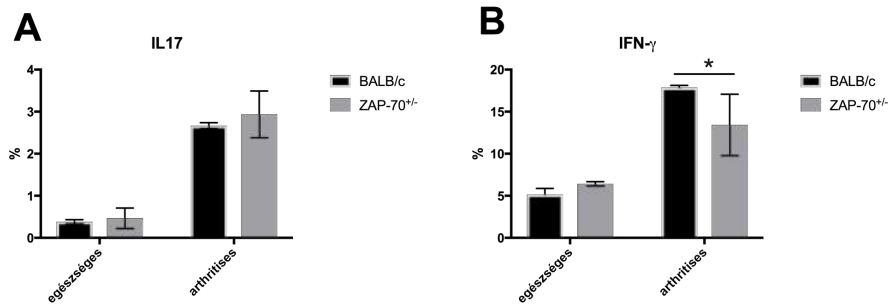
A rhG1 antigénnel stimulált lépsejtkultúrák felülúszójából mért citokinek (26. ábra, B) közül az IL-4, IL-6 és IFN- γ mennyisége szignifikánsan kevesebb volt a ZAP-70^{+/-} egerek mintáiban ($86,18 \pm 6,65$ vs $119,74 \pm 26,31$, $68,70 \pm 4,36$ vs $195,40 \pm 21,04$, $317,75 \pm 51,54$ vs $560,73 \pm 103,04$) az IL-17 mennyisége szintén csökkent ($641,57 \pm 83,96$ vs $798,16 \pm 101,82$), míg a TNF- α körülbelül hasonló mennyiségben ($77,03 \pm 4,34$ vs $86,16 \pm 9,69$) volt jelen az arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} felülúszókban.

Az arthritises egerek szérumból mért rhG1 antigén ellenes, IgG1 izotípusú autoantitestek mennyisége szintén kevesebb volt a ZAP-70^{+/-} állatokban (26. ábra, C), de a különbség statisztikailag nem mutatkozott szignifikánsnak. A szérumban IL-17 és IL-4 szintek hasonlóak voltak a két csoportban, IL-6 viszont nagyobb mennyiségben volt jelen az arthritises ZAP-70^{+/-} egerek szérumban (26. ábra, D).

4.3.3 Helper T-sejt alcsoportok meghatározása intracelluláris citokin termelés méréseivel

A következő kísérletben összehasonlítottuk az egészséges és arthritises egerek lépsejtjeinek PMA/ionomycin stimulálás hatására történő intracelluláris citokin termelését (27. ábra).

Az IL-17 esetén az arthritises CD4⁺ sejtek szintén több IL-17-t termelnek, mint az egészséges állatokból származó CD4⁺ sejtek, míg az egészséges és arthritises csoportokon belül a BALB/c és ZAP-70^{+/-} állatok között jelentős eltérést nem figyeltünk meg (27. ábra A). Ahogy várható volt: az arthritises egerekből származó CD4⁺ sejtek nagyobb arányban termeltek IFN γ -t, mint a nem arthritises csoportok CD4⁺ sejtjei. Az arthritises csoporton belül a BALB/c egerek CD4⁺ sejtjei szignifikánsan nagyobb arányban termeltek IFN γ -t, mint a ZAP-70^{+/-} egereké (27. ábra B).



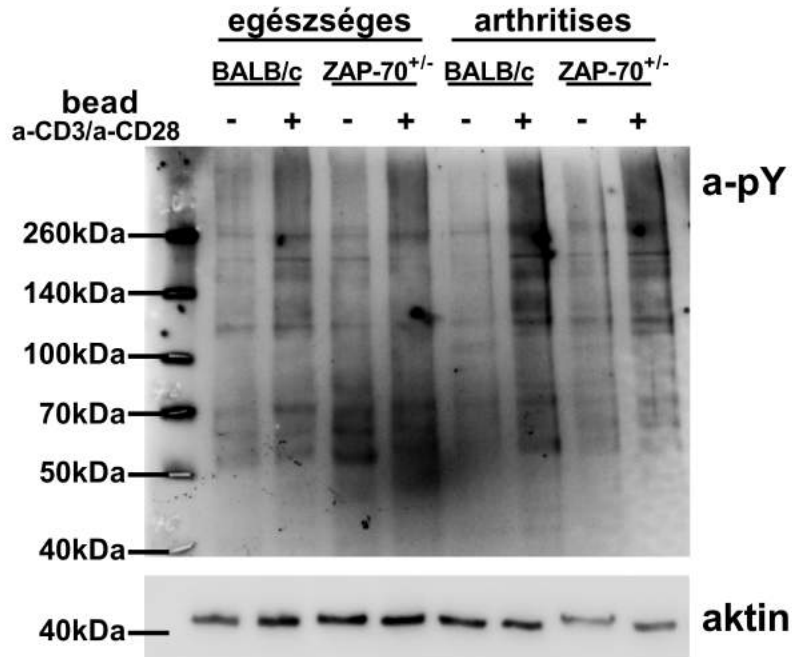
27. ábra T helper-sejtek citokin profilja arthritises és egészséges egerekben.

A citokin-termelő sejtek arányát egészséges és arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} lépsejtjeiből PMA/ionomycin stimuláció után intracelluláris jelölést követően áramlási citometriával mértük. Az IL-17 (A) és IFN γ (B) citokint termelő CD4-sejtek aránya egészséges BALB/c és ZAP-70^{+/-}, valamint arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerekben. Ay oszlopdiagrammokon átlag \pm SEM értékeket ábrázoltunk (egészséges csoport: n=3-3, arthritises csoport: n=3 BALB/c, n=4 ZAP-70^{+/-})

4.3.4 A T-sejt aktiváció és apoptózis mintázat változásai autoimmun arthritisen és ZAP-70 részleges hiányában

Mivel a ZAP-70 fontos szerepet játszik a T-sejtek aktivációjában, ezért meg kívántuk vizsgálni, hogy a ZAP-70 részleges hiányában az arthritis klinikai képében megfigyelt eltérések a T-sejtek esetlegesen megváltozott aktivációs és apoptózis mintázatával vannak-e összefüggésben.

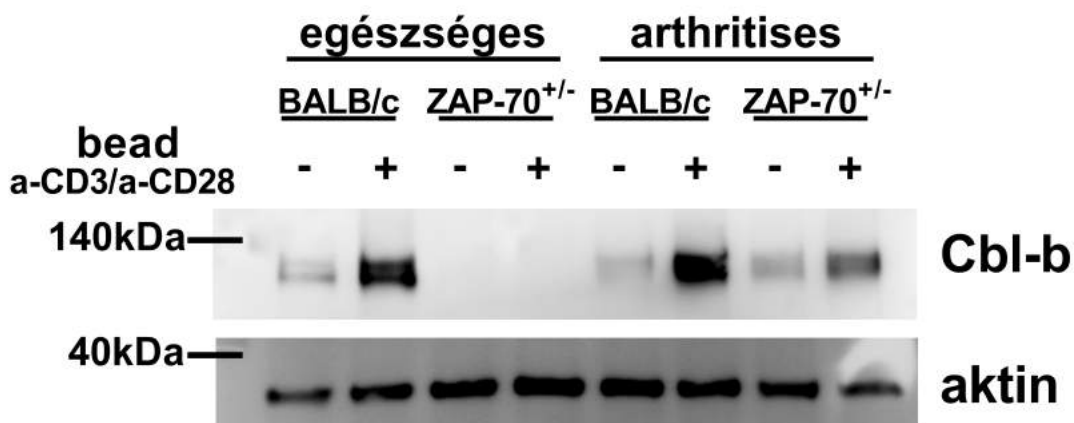
A tirozin-foszforilációs mintázat alapján az egészséges és arthritises BALB/c egerek T-sejtjei hasonló mértékben aktiválódnak anti-CD3/CD28 stimuláció hatására, míg ehhez képest az arthritises ZAP-70^{+/-} egerek T-sejtjeiben csökkent tirozin foszforilációt mértünk a stimuláció után. Mindkét stimulált arthritises mintában nagyobb mértékű foszforiláció látható, mint az egészséges állatokéban (28. ábra).



28. ábra A T-sejt aktiváció összehasonlítása arthritises és egészséges T-sejtekben *in vitro* stimulációt követően.

Egészséges és arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek lépből izolált T-sejtjeit 72 h anti-CD3/CD28 stimulációt követően lizáltuk. A mintákat SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd western blot technikával anti-foszfotirozin (pY) ellenanyag segítségével vizsgáltuk (felső panel), az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotokat stripping után anti-β-aktin antitesttel is előhívtuk (alsó panel). Az ábrán reprezentatív blotok láthatók.

A Cbl-b a ZAP-70 negatív regulátora, a T-sejt aktiváció és jelátvitel leállításában van szerepe (lásd 1.4 fejezet 22. old.) [210]. Az egészséges és arthritises BALB/c egerekből izolált T-sejtekben stimuláció hatására nőtt a Cbl-b mennyisége (29. ábra), az arthritises stimulált mintákban az egészségeshez hasonló expresszió látható. Az egészséges ZAP-70^{+/-} T-sejtekben nem tudtunk Cbl-b-t kimutatni stimuláció után sem, azonban az arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben megjelenik Cbl-b a stimuláció után a stimulálatlanhoz képest nagyobb, de a BALB/c-nél kisebb mennyiségben (29. ábra).



29. ábra A Cbl-b expressziójának vizsgálata egészséges és arthritises T-sejtekben *in vitro* stimulációt követően

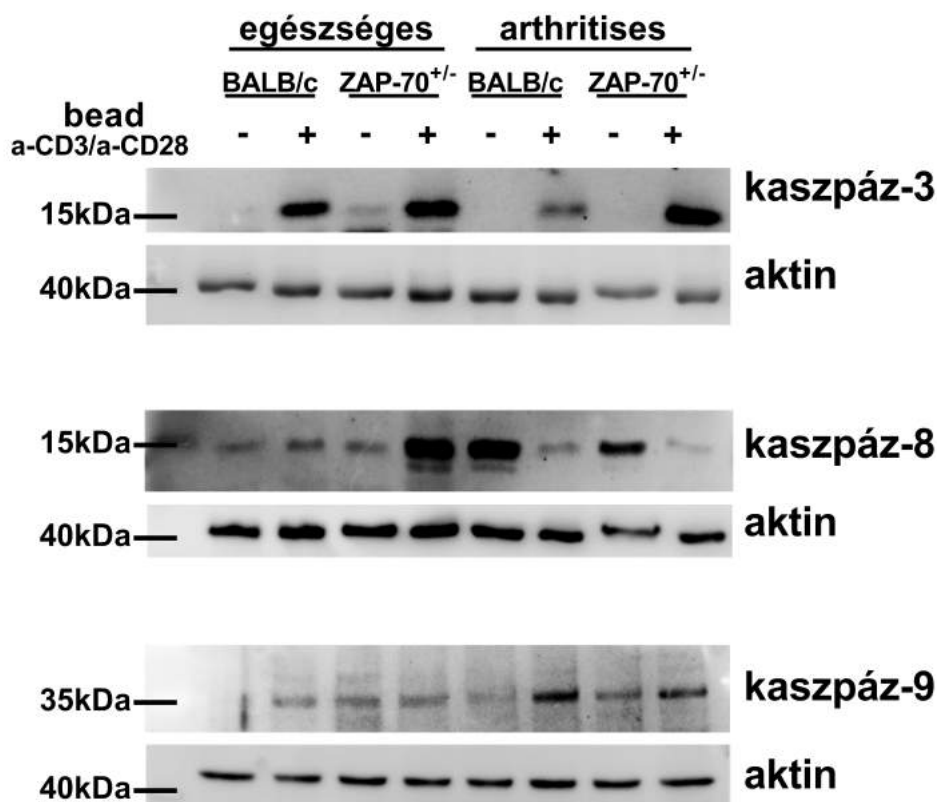
Egészséges és arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek lépből izolált T-sejtjeit 72 h anti-CD3/CD28 stimulációt követően lizáltuk. A mintákat SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd western blot technikával a Cbl-b-t felsimerő ellenanyag segítségével vizsgáltuk (felső panel), az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotokat stripping után anti- β -aktin antitesttel is előhívtuk (alsó panel). Az ábrán reprezentatív blotok láthatók.

Az apoptotikus útvonalak közös markereként használt hasított kaszpáz-3 mellett a hasított kaszpáz-8 kimutatásával az extrinszik, a hasított kaszpáz-9 vizsgálatával pedig az intrinszik apoptózis útvonal aktivitását kívántuk tanulmányozni (lásd 1.5 fejezet) [211]. Az arthritises BALB/c stimulált T-sejtjeiben kisebb mennyiségben van jelen hasított kaszpáz-3, mint az egészséges BALB/c egerekében, ezzel szemben az egészséges és arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben hasonló volt az expresszió mértéke. Az arthritises egereket összehasonlítva a hasított kaszpáz-3 mennyisége a ZAP-70^{+/-} egerek stimulált T-sejtjeiben több, mint a BALB/c-k stimulált T-sejtjeiben (30. ábra).

A hasított kaszpáz-8 az összes mintában kimutatható volt, azonban míg az arthritises egerekben a stimuláció hatására csökkent a szintje, addig az egészséges BALB/c-k T-sejtjeiben nem változott, az egészséges ZAP-70^{+/-} T-sejtekben viszont emelkedett (30. ábra).

BALB/c egerekben a hasított kaszpáz-9 mennyisége megnőtt a stimuláció hatására mind az egészséges, mind az arthritises T-sejtekben, a stimulált, arthritises BALB/c T-sejtekben nagyobb expressziót találtunk. A hasított kaszpáz-9 mennyisége egészséges ZAP-70^{+/-} egerekben a stimuláció hatására nem változott, de már a stimulálatlan mintákban is megjelent az aktivált forma. Az arthritises ZAP-70^{+/-} T-

sejtekben stimuláció nélkül is hasonló mennyiségben volt jelen hasított kaszpáz-9, mint az egészséges, stimulált ZAP-70^{+/-} T-sejtekben. Anti-CD3/CD28 aktiváció hatására enyhén emelkedett a hasított kaszpáz-9 mennyisége, de az expresszió mértéke kisebb, mint az arthritises stimulált BALB/c mintákban (30. ábra).

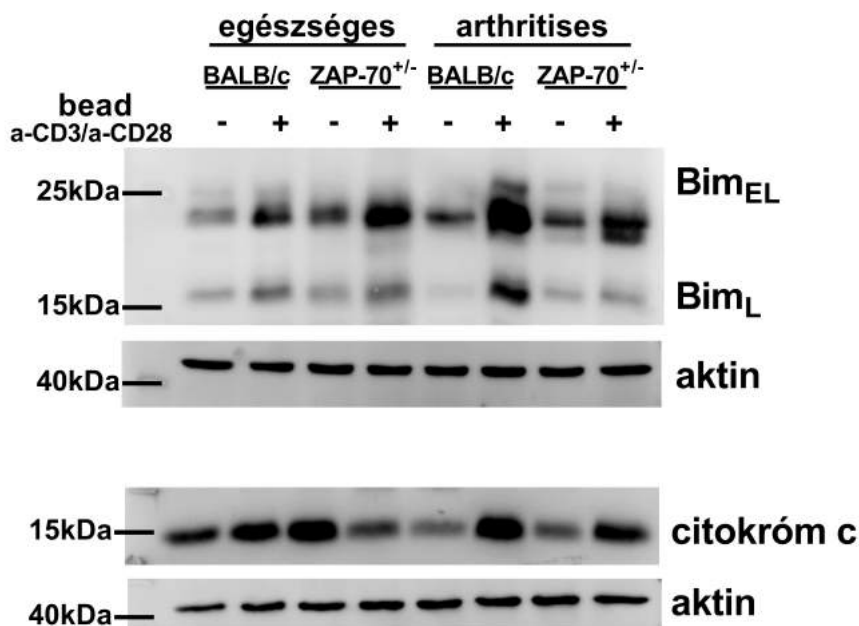


30. ábra Kaspázok aktivációjának vizsgálata egészséges és arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek T-sejtjeiben *in vitro* stimulációt követően.

Egészséges és arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek lépből izolált T-sejtjeit 72 óra anti-CD3/CD28 stimulációt követően lizáltuk. A mintákat SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd western blot technikával a kaszpáz-3 kaszpáz-8 és kaszpáz-9 hasított (aktív) formáját felsimerő ellenanyag segítségével vizsgáltuk, az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotokat stripping után anti-β-aktin antitesttel is előhívtuk. Az ábrán reprezentatív blotok láthatók.

A Bim a Bcl-2 családba tartozó proapoptotikus fehérje, az intrinszik apoptotikus útvonal egyik fontos szabályozója, izoformái közül a Bim_{EL}-t és a Bim_L-t vizsgáltuk [212]. Mindkét izoforma kimutatható volt az összes mintában 72h anti-CD3/CD28 stimuláció után, nagyobb mennyiségben a Bim_{EL} volt jelen (31. ábra). Stimuláció hatására a Bim_{EL} mennyisége minden mintapárban emelkedett, az arthritises mintákban nagyobb mértékben. A stimuláció által kiváltott emelkedés az arthritises BALB/c T-

sejtekben az egészségeshez viszonyítva jelentősebb, mint az ZAP-70^{+/-} T-sejtekben látott különbség, mivel itt az egészséges és arthritises T-sejtekben hasonló mértékű változást tapasztaltunk a stimuláció hatására (31. ábra). A Bim_L szintén jelen volt az összes mintában, azonban a stimulációt követő változások nem voltak olyan látványosak, mint a Bim_{EL} esetében. Ez alól kivételt képeznek az arthritises BALB/c T-sejtek, ahol stimuláció hatására a legnagyobb expresszió-növekedést tapasztaltunk mindkét izoformát figyelembe véve (31. ábra).



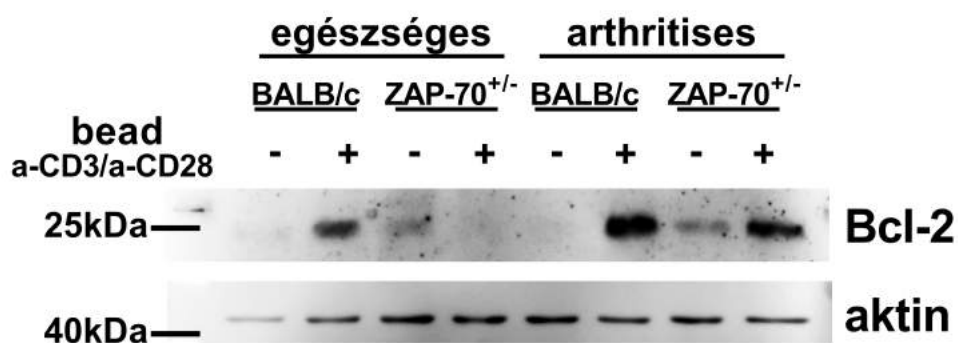
31. ábra A Bim és a citokróm c expressziójának vizsgálata egészséges és arthritises T-sejtekben *in vitro* stimulációt követően.

Egészséges és arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek lépből izolált T-sejtjeit 72 óra anti-CD3/CD28 stimulációt követően lizáltuk. A mintákat SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd western blot technikával a Bim (Bim_{EL} és Bim_L formáját), valamint a citokróm c-t felsimerő ellenanyag segítségével vizsgáltuk, az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotokat stripping után anti-β-aktin antitesttel is előhívtuk. Az ábrán reprezentatív blotok láthatók.

A citokróm c az intrinszik apoptotikus útvonal aktiválódásakor jelenik meg a citoplazmában a mitokondriumból felszabadulva [213]. Az egészséges BALB/c T-sejtekben stimuláció hatására kismértékben emelkedik a citokróm c a citoplazmában, míg egészséges ZAP-70^{+/-} T-sejtekben a stimuláció hatására inkább ellentétes változást tapasztaltunk (31. ábra). Minden arthritises mintában növelte a stimuláció a citokróm c felszabadulását, a növekedése mértéke hasonló volt a BALB/c és a ZAP-70^{+/-} T-

sejtekben. Érdekes módon az arthritises stimulálatlan mintákban kevesebb citokróm c-t mutattunk ki, mint az egészséges stimulálatlan T-sejtekben.

A Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje, mely az intrinszik apoptózis útvonalban neutralizálja a pro-apoptotikus fehérjét, ezáltal megakadályozza a MOMP kialakulását és a citokróm c felszabadulását (lásd 1.5 fejezet) [158]. A BALB/c egerekből izolált T-sejtekben csak stimuláció hatására mutatható ki Bcl-2, az arthritises mintában nagyobb mennyiségben (32. ábra). Ezzel szemben az egészséges ZAP-70^{+/-} T-sejtekben csak a stimulálatlan mintában van jelen Bcl-2 kis mennyiségben, ugyanezen arthritises T-sejtekben a stimuláció növeli a Bcl-2 mennyiségét, de a stimulálatlan mintában is kimutatható (32. ábra).



32. ábra A Bcl-2 c expressziójának vizsgálata egészséges és arthritises T-sejtekben *in vitro* stimulációt követően.

Egészséges és arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-} egerek lépből izolált T-sejtjeit 72 h anti-CD3/CD28 stimulációt követően lizáltuk. A mintákat SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd western blot technikával a Bcl-2-t felsimerő ellenanyag segítségével vizsgáltuk (felső panel), az azonos mintamennyiség ellenőrzésére a blotokat stripping után anti- β -aktin antitesttel is előhívtuk (alsó panel). Az ábrán reprezentatív blotok láthatók.

5 Új eredmények

Munkánk során igazoltuk, hogy ZAP-70^{-/-} egerekben ZAP-70^{+/+} timociták intraperitoneális transzferével:

1. Tartósan helyreállítható a T-sejt képzés (egerek megnövekedett túlélése, hosszú távú T-sejt rekonstitúció)
2. a transzfer után a tímuszban normalizálódik a T-sejt képzés
3. az újonnan képződött, donor-eredetű T-sejtek funkcionálisak
4. a beadott timociták az omentum milky spotjain keresztül hagyják el a peritoneumot

A rekombináns humán G1 indukált arthritis (GIA) modellt alkalmazva:

1. autoimmun arthritist indukáltunk ZAP-70^{+/-} egerekben
2. a heterozigóta egerekben a betegség klinikai képe enyhébb volt
3. az arthritises ZAP-70^{+/-} egerekben csökkent antigén-indukált T-sejt proliferációt és IFN γ termelést, viszont jelentős IL-17 citokin termelést mértünk

Az arthritises egerekből izolált T-sejtekben

1. anti-CD3/CD28 stimuláció nélkül a ZAP-70 részleges hiányában az apoptózis intrinszik-, a vad-típusban az extrinszik útvonala hangsúlyosabb
2. anti-CD3/CD28 stimuláció után ezek a különbségek eltűnnek, de a vad-típusú T-sejtekben kisebb mértékű az apoptózis a ZAP-70^{+/-} T-sejtekhez képest, összhangban az *in vitro* eredményekkel (nagyobb proliferáció, kifejezettebb aktiváció) és a megfigyelt súlyosabb klinikai képpel

6 Megbeszélés

6.1 ZAP-70 deficiencia hatása az immunfenotípusra, a T-sejt aktivációra és - apoptózisra

A ZAP-70 kiemelkedő fontosságú molekula a T-sejt fejlődésben, ezt jól bizonyítja, hogy a ZAP-70^{-/-} egerek [12,81], valamint a molekula valamely mutálódott formáját expresszáló, a SCID ritka formájában szenvedő betegek [15] nem rendelkeznek érett T-sejtekkel, ezáltal súlyos immundeficienciában szenvednek.

Mivel a tervezett kísérleteink során ZAP-70^{+/-} egerekkel is terveztünk dolgozni, elvégeztük az állatok alap immunfenotípusának jellemzését. A ZAP-70^{+/-} egerek perifériás nyirokszerveiben csökkent a T-sejtek aránya a vad-típushoz képest, azonban nem annyira látványosan, mint a ZAP-70^{-/-} egerek esetében, melyeknek gyakorlatilag nincsenek T-sejtjeik a periférián. A B-sejtek aránya mind a ZAP-70^{+/-}, mind a ZAP-70^{-/-} egerekben nőtt a vad-típushoz képest. A tímuszban kisebb a különbség a vad-típus és a ZAP-70^{+/-} állatok sejtarányai között, mint a perifériás nyirokszervekben, a CD4⁺ timociták aránya nőtt a ZAP-70^{+/-} egerekben, de ez a különbség nem volt szignifikáns. Ennek hátterében az állhat, hogy a ZAP-70 a CD8⁺ sejtek fejlődésében jelentősebb szerepet játszik, a ZAP-70 pozitív szelekció előtti upregulációja nélkül CD8 SP timociták nem jelennek meg [51], míg a CD4 SP timociták egy része be tudja fejezni így is a fejlődését [86], a ZAP-70 csökkent expressziója a heterozigóta állatokban valószínűleg a CD8 SP sejtek érését jobban befolyásolja, mint a CD4 SP timocitákét. Ezzel összefüggésben állhat az a megfigyelésünk is, hogy a ZAP-70^{+/-} perifériás nyirokszervekben nagyobb arányban találtak CD4⁺ T-sejteket, mint a vad-típusában. A regulatórikus T-sejtek is a CD4⁺ populációba tartoznak, ezért vizsgáltuk arányukat vérben, tímuszban, illetve másodlagos nyirokszervekben. A tímuszban és vérben nem találtunk különbséget a vad-típus és a heterozigóta állatok között, a lépben és nyirokcsomókban azonban csökkent T_{reg} arányt figyeltünk meg a ZAP-70^{+/-} egerekben. A tímuszban a természetes T_{reg}-ek (tT_{reg}) fejlődnek [214], melyek differenciációjához a pozitív szelekciókor a saját antigén felismerésekor „közepes” erősségű TcR szignál szükséges [215]. Ezzel szemben az indukált T_{reg}-ek (iT_{reg}) a periférián keletkeznek CD4⁺ sejtekből antigén, IL-2 és TGF-β jelenlétében [214]. Ezek alapján feltételezhető, hogy a tT_{reg}-fejlődéshez szükséges, „közepes” erősségű TcR szignálhoz elegendő a ZAP-70 expressziós szintje a heterozigóta állatokban, így ezekben az állatokban a tT_{reg}

aránya a tímuszban nem tér el jelentősen a vad-típustól. Azonban a csökkent ZAP-70 expresszió a heterozigóta állatokban valószínűleg nem tud olyan effektív TcR jelátvitelt biztosítani antigén hatására, ami elégséges az iT_{reg}-ek kialakulásához a perifériás nyirokszervekben, ennek eredménye lehet az alacsonyabb T_{reg} arány a lépben és a nyirokcsomókban.

Mivel a ZAP-70 fontos szerepet játszik a T-sejtek proximális TcR-n keresztüli jelátvitelében [107,201], ezért vizsgáltuk izolált ZAP-70^{+/-} T-sejtek TcR-n keresztüli aktiválhatóságát és apoptózis érzékenységét. A tirozin foszforilációs mintázat jól jellemzi a sejtek aktiváltsági szintjét [216], a CD3 és a CD28 kostimulációs molekulán keresztül stimulálva a ZAP-70^{+/-} T-sejtek csökkent foszforilációt mutattak a vad-típushoz képest mind 24, mind 48 óra elteltével. A csökkent ZAP-70 expresszió eredményeként a ZAP-70^{+/-} T-sejtek kevésbé aktiválhatóak a TcR komplexen és kostimulációs molekulákon keresztül, mint a vad-típusú T-sejtek. Ez az eredmény összhangban van más tanulmányokkal, melyekben hipomorf ZAP-70 mutációkat hordozó egerek timocitái, illetve T-sejtjei csökkent TcR-n keresztüli jelátvitelt mutattak [217–221].

Az immunválasz és a T-sejtek aktivációjának egyik szabályozója az apoptózis [222], melynek intrinszik és extrinszik, kaspáz-dependens útvonalait vizsgáltuk. A kaspáz-3 mindkét útvonal közös effektor kaspáza, melynek hasított formáját a stimulálatlanhoz képest nagyobb mennyiségben mutattuk ki stimulált T-sejtekben, a fehérje mennyisége a stimulált BALB/c mintákban volt a legnagyobb. A kaspáz-9 hasított formáját a stimulált és stimulálatlan ZAP-70^{+/-} T-sejtekben egyaránt ki tudtuk mutatni, körülbelül hasonló mennyiségben, míg a BALB/c T-sejtekben a stimuláció hatására emelkedett meg a hasított kaspáz-9 mennyisége. A ZAP-70 csökkent expressziója eredményeink szerint nem csak a T-sejtek aktivációjára, hanem apoptózis érzékenységére is hatással van. A ZAP-70^{+/-} T-sejtek kevésbé aktiválódtak, és kevésbé voltak érzékenyek az apoptózisra 24, illetve 48 óra stimuláció után. A ZAP-70^{+/-} T-sejtekben aktív intrinszik apoptotikus útvonal nem okoz megfigyelhető kaspáz-3 aktivációt, ez feltételezésünk szerint az aktivált kaspáz-9 inhibitorainak, túlélési faktoroknak (Erk, Akt útvonalak) a következménye lehet [160,161,223].

6.2 A T-sejtes immundeficiencia korrekciója timocita transzferrel

Az irodalomban eddig közölt T-sejt rekonstitúciós tanulmányok főként HSC-k irradiált recipiensekbe történő transzplantációját követő eseményeket analizáltak [224–227], ezenkívül fetális májból vagy lépéből izolált sejtek [228], T-sejt progenitorok [229], kettős pozitív timociták [206], izolált timociták [207,208], illetve *in vitro* generált T-sejt prekursorok [225] adoptív transzferét elemezték. Előkísérletek során többféle módszerrel próbálkoztunk a ZAP-70^{-/-} egerek T-sejtjeinek rekonstitúciójára, többek között vad-típusú csontvelő újszülött a ZAP-70^{-/-} egerekbe történő intrahepatikus transzferével, illetve 3-4 hetes ZAP-70^{-/-} egerek intravénásan beadott, vad-típusú timocita transzferével. Az iv. timocita transzfer sikertelennek bizonyult, egy transzferált ZAP-70^{-/-} állat sem maradt életben egy hónappal a transzfer után, az ezt megelőző időszakban pedig T-sejtek nem jelentek meg a vérben (saját megfigyelés). Az intrahepatikus csontvelő transzfer után sikerült érett T-sejteket detektálnunk a vérben, azonban technikai megfontolások miatt (intrahepatikus beadás újszülött egerekbe nehezen kivitelezhető, magas sejtszám szükséges, amihez sok donor csontvelőre van szükség), valamint timociták adoptív transzferét vizsgáló tanulmányok kis száma miatt a továbbiakban timociták intraperitoneális transzferével dolgoztunk.

Munkánk során bebizonyítottuk, hogy ZAP-70^{+/+} timociták intraperitoneális transzferével a T-sejt-képzés tartósan helyreállítható. Vad-típusú, ZAP-70^{+/+} egerekből származó 5-10x10⁶ timocita egyszeri, intraperitoneális beadása hosszú-távon megszünteti az immundeficienciát, ezzel szignifikánsan megnövelve az egerek élettartamát: míg a ZAP-70^{-/-} egerek konvencionális állatházi körülmények között átlagosan csak 7-10 hetes korukig élnek, a transzferált egerek közül volt, amely 8-12 hónapos kort is megélt.

A létrehozott kimérizmus stabilitását jelzi, hogy a vérben és másodlagos nyirokszervekben hónapokkal a transzfer után is jelen voltak érett T-sejtek, melyek többsége $\alpha\beta$ T-sejt receptort expresszált. A szövettani vizsgálatok alapján a transzferált állatok nyirokcsomói és lépe a ZAP-70^{+/+}-hoz hasonló szerkezetet mutatott, mely arra utal, hogy a transzfer után megjelenő T-sejtek képesek helyreállítani a ZAP-70^{-/-} egerek másodlagos nyirokcsomóinak morfológiai eltéréseit. A GFP⁺ timocitákkal végzett transzferkísérletek pedig egyértelműen bizonyítják, hogy a transzfer után megjelenő érett T-sejtek donor eredetűek.

A kimériszmus hosszú-távú fenntartásához folyamatos T-sejt képzésre van szükség, melyhez a tímusz repopulációja is szükséges. Ezt alátámasztja, hogy a tímuszban egyszeresen pozitív timociták jelentek meg 17 nappal a transzfer után, melyet a medulláris régió területének növekedése kísért, így feltételezésünk szerint a transzfer hatására a tímuszba helyreállt a T-sejt-képződés. A T-sejtek érése során a timociták és a tímusz epithél sejtek közti cross-talk ismert jelenség [230]. Az általunk megfigyelthez hasonlóan a medulláris régió növekedését írták le csontvelői-eredetű T-sejt progenitor sejtek transzferét követően [231]. Összhangban az eredményeinkkel, hasonló kinetikával, 3 héttel a transzfer után írták le illetve egyszeresen pozitív timociták megjelenését a tímuszban ZAP-70 kódoló plazmidok intarthymicus elektroporációját követően [88]. Bár a transzfert követően a timocita alcsoportok összetétele továbbra is jelentősen eltért a ZAP-70^{+/+}-tól, ugyanakkor mások is hasonló mennyiségű egyszeresen pozitív timocita megjelenéséről számoltak be, T-sejt progenitorok intratímikus transzferét követően [89].

Megfigyeltük továbbá, hogy a perifériás vérben a tímuszban található egyszeresen pozitív timociták megjelenését pár nap késéssel követve fokozatosan emelkedő mennyiségű, érett T-sejt jelenik meg, valamint, hogy a másodlagos nyirokszervekben a 21. napon az $\alpha\beta/\gamma\delta$ T-sejtek aránya már a ZAP-70^{+/+}-ra emlékeztet. Ezek alapján a valószínűsíthető, hogy a donor timociták képesek a recipiens egerek nyirokszerveit érett, $\alpha\beta$ -T-sejtek formájában repopulálni.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy az intraperitoneális transzfert követő első hónapban a T-sejt fejlődés egy hulláma zajlott le, hosszú távon regenerálva a tímuszt, melyben így hónapokon át T-sejt termelés zajlott.

A hasüregbe beadott timociták képesek eljutni a tímuszba, az azonban nem volt ismert, hogy milyen útvonalon hagyják el a peritoneumot. Az irodalmi adatok alapján a hasüregbe intraperitoneálisan beadott sejteket a mediastinális, illetve ipsilaterális inguinális nyirokcsomók drenálják [232], azonban kísérleteink során nem találtunk CFSE⁺ donor sejteket a nyirokcsomókban. Szignifikáns mennyiségű, CFSE⁺ sejtaggregátumokat találtunk viszont az omentumban, az úgynevezett milky spot régiókban, melyekről ismert, hogy szerepet játszanak a B2-B-sejtek [233] és dendritikus sejtek homingjában [234], valamint a tumorok által preferált adhéziós régiók (összefoglalva: [235]). A milky spotok szerkezete jelentősen különbözik a másodlagos nyirokszervekétől, a T-sejtek és B-sejtek nem kompartmentalizálódnak, nincsenek afferens nyirokerek, az antigének a nem-folytonos mezotheliális réteg

fenesztrációin keresztül jutnak be a peritoneumból [236,237]. Feltételezhetően ezeken az intercelluláris “réseken” keresztül jutnak be az omentumba az i.p. beadott sejtek is. Az általunk megfigyelt CFSE⁺ sejtek nagy része CD4⁻CD8⁻ kettős negatív, feltételezhetően ez a DN populáció az egyik forrása azoknak a donor timocitáknak, melyek a recipiens tímuszba eljutva hozzájárulnak az érett SP timociták kialakulásához.

Eredményeink alapján az alábbi mechanizmust feltételezzük a ZAP-70^{+/+} timocita transzfert követő T-sejt repopulációra ZAP-70^{-/-} állatokban. Az intraperitonális oltás során beadott timociták egy kevert sejtpopulációt alkotnak, a donor tímuszok összetétele tipikusan 3–5% kettős negatív, 75–80% kettős pozitív, 10–15% CD4 egyszeresen pozitív és 5–10% CD8 egyszeresen pozitív timocita [36]. Így a transzfer során érett és éretlen sejtek keverékét adjuk be a recipiens állatok peritoneumába. Feltételezésünk szerint a donor sejtek összetett módon repopulálják a ZAP-70^{-/-} recipienseket: az érett, egyszeresen pozitív sejtek valószínűleg eljutnak a másodlagos immunszervekbe, az ott lejátszódó perifériás homeosztatiszikus expanszió pedig az ideiglenes helyreállított immunválasz révén hozzájárul a túléléshez a transzfert követő kezdeti időszakban.

Ezzel párhuzamosan, az éretlen sejtek feltehetően képesek az elsődleges nyirokszervekbe, főként a tímuszba vándorolni, és ott hosszú távon helyreállítani a T-sejt-képzést. A kettős pozitív sejtek apoptózis-érzékenysége rendkívül nagy [36], ezért feltételezzük, hogy nem ez a sejtpopuláció, hanem inkább a kettős negatív timociták játszhatnak fontos szerepet a tímusz repopulációjában. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a transzfer után az omentumban főként a kettős negatív donor timociták akkumulációját figyeltük meg, melyek hipotézisünk szerint később eljuthatnak a csontvelőbe/tímuszba, majd kolonizálják ezen szerveket. Mivel a ZAP-70^{-/-} timociták fejlődése a kettős pozitív stádiumban megáll [12,81], a ZAP-70^{+/+} donorsejtek valószínűleg szelektív túlélési előnnyel rendelkeznek, ezáltal képesek helyreállítani a tímuszban a T-sejt-képzést. A kettős negatív sejtek kevesebb, mint 5%-át képezik a beadott timocitáknak, ez magyarázhatja a transzferhez szükséges magas sejtszámot (5–10x10⁶), illetve az előkísérletek során alacsonyabb sejtszámmal (10⁶ sejt/egér) végzett transzferek sikertelenségét.

Összefoglalva, bizonyítottuk, hogy az intraperitoneálisan beadott ZAP-70^{+/+} timociták képesek eljutni a recipiens ZAP-70^{-/-} egerek tímuszába, helyreállítani annak morfológiáját és az ott lejátszódó T-sejt-képzést. Az érett, donor-eredetű αβ T-sejtek megjelentek a perifériás vérben és a másodlagos nyirokszervekben, ahol rendezett T-

sejt zónákat alakítottak ki. A létrehozott kimérizmus stabilnak bizonyult hosszú távon is, ahogy azt az immundeficiens $ZAP-70^{-/-}$ egerek timocita transzfer következtében jelentősen megnövekedett túlélése is jól mutatja.

6.3 A T-sejt aktiváció/apoptózis jelátviteli útvonalak változásai autoimmun arthritis modellben

A T-sejtek szerepe jól ismert mind a humán rheumatoid arthritisben, [238] mind egérmmodelljeiben [183], ezért munkánk során $ZAP-70^{+/-}$, részlegesen $ZAP-70$ hiányos egerekben vizsgáltuk a GIA kialakulását és jellemzőit. A $ZAP-70$ kiemelkedő fontosságú a T-sejtek aktivációjában és jelátvitelében [4], ezért feltételezésünk szerint az autoimmun arthritis patogenezisét is befolyásolhatja. A GIA indukció 4-5 hónapos, nőstény, BALB/c egerekben a legoptimálisabb, a $ZAP-70^{-/-}$ egerek viszont timocita transzfer nélkül, konvencionális állatházi körülmények között csak 7-10 hetes korukig élnek (saját megfigyelés), ezért a kísérleteket $ZAP-70^{+/-}$ egereken végeztük. Ezekben a heterozigóta állatokban a T-sejtek száma a másodlagos nyirokszervekben nem csökkent annyira drasztikusan a $ZAP-70^{+/+}$ -hoz képest, mint a $ZAP-70^{-/-}$ egerekben, viszont a $ZAP-70$ expressziója a heterozigóta T-sejtekben áramlási citometriás méréseik alapján körülbelül fele a $ZAP-70^{+/+}$ T-sejtekben mértnek. Hipotézisünk szerint ez az expressziós különbség befolyásolhatja a T-sejtek aktivációját.

Munkánk során a $ZAP-70^{+/-}$ egerekben is sikerült arthritist indukálni, a kísérlet végére a betegség incidenciája hasonló volt a BALB/c kontrollokban megfigyelthez, azonban az ízületi gyulladás mértéke a klinikai pontszámok alapján kevésbé volt súlyos, amit az *in vivo* képalkotó vizsgálatok is alátámasztottak.

A szérumban mért gyulladásos citokinek (IL-4, IL-6, IL-17) mennyisége hasonló az arthritises BALB/c illetve $ZAP-70^{-/-}$ egerekben, azonban ez egy össz-citokin mennyiség, melyet többféle, szisztémás immunválaszban részt vevő immunsejt termel, ami a finomabb különbségek elmosódásához vezethet. Mivel a $ZAP-70^{+/-}$ egerekben az arthritis indukcióhoz szükséges antigénre specifikus IgG1 autoantitest-produkció csak kismértékben csökkent, ezért feltételezzük, hogy a T-sejtek B-sejtekkel való kooperációja alapvetően nem sérült, és a B-sejtek betegségben betöltött szerepe feltételezhetően változatlan.

Az antigén-specifikus immunválaszok az arthritises $ZAP-70^{+/-}$ állatokban szignifikáns eltérést mutattak a $ZAP-70^{+/+}$ kontrollokhoz képest: az *in vitro*

lépsejtkultúrában a rhG1 stimuláció hatására mért sejt-proliferáció szignifikánsan csökkent, a felülúszóból mért citokin-mintázat pedig jelentősen eltért. Az arthritises, antigén-stimulált ZAP-70^{+/-} lépsejtek szignifikánsan kevesebb IL-4, IL-6 és IFN γ citokint termelnek, azonban a termelt IL-17 mennyisége nem változott jelentősen.

A szérumból, illetve lépsejtkultúrából mért citokinek esetében nem ismert, hogy melyik sejtcsoport termeli, ezért a T-sejtek által termelt, a GIA-ban kulcsszerepet játszó citokinek mennyiségének meghatározását áramlási citometriával is elvégeztük. Az IL17-termelő CD4⁺ T-sejtek aránya hasonló volt az arthritises BALB/c illetve ZAP-70^{+/-} egerekben PMA/ionomycin stimuláció hatására, viszont az IFN γ ⁺ CD4⁺ T-sejtek arányában azonban itt is csökkentést tapasztaltunk a heterozigóta állatokban. Ezek alapján a ZAP-70 részleges hiánya a Th1/Th17 polarizációt is befolyásolta, a GIA modellre jellemző Th1/Th17 közti intermedier forma [200] helyett a csökkent IFN γ produkció mellett inkább az IL-17 termelés marad jellemző.

Jelenlegi és korábbi eredményeink alapján feltételezzük, hogy klinikai képen tapasztalt változások a T-sejtekben a ZAP-70 részleges hiánya miatt megváltozott aktivációs és apoptotikus folyamatok következményei [239]. Ennek részletesebb tanulmányozására egészséges és arthritises egerek izolált T-sejtjeiben vizsgáltuk különböző apoptotikus jelátviteli útvonalak molekuláit CD3/CD28 kostimuláció hatására.

A tirozin foszforilációs mintázat alapján az arthritises T-sejtek stimuláció hatására erőteljesebb aktivációt mutatnak, mint az egészséges állatok T-sejtjei. Valószínűsíthető, hogy az arthritises egerekből izolált sejtekben nagyobb arányban találhatóak effektor T-sejtek, ezekre pedig jellemző az erőteljes tirozin foszforiláció [240]. A ZAP-70^{+/-} egerek esetében az arthritis hatására kisebb mértékben szintén emelkedett a tirozin foszforiláció mértéke CD3/CD28 kostimuláció hatására. Ez egyrészt jelezheti, hogy az arthritis indukció során “kiválogatódtek” azok a sejtek, melyek képesek effektíven aktiválódni, másrészt azonban a tirozin foszforilációs mintázat csupán a foszforiláció mértékét mutatja meg, így nem csak az aktivációról ad felvilágosítást, hanem az aktiváció negatív szabályozói, vagy akár a sejthalálhoz vezető folyamatokban részt vevő molekulák foszforilációját is jelezheti.

Az immunválasz része a T-sejtek aktivációjának leállítása is, ennek egyik regulátora a Cbl-b, mely a Cbl fehérjecsald tagja, főként perifériás T-sejtekben expresszálódik [130]. A Cbl-b a TcR jelátvitel szabályozójaként a ZAP-70 gátló foszfortirozinjaihoz kapcsolódva gátolja a ZAP-70 aktivált állapotának fenntartását

[133], valamint különböző jelátviteli molekulák (pl. Vav1, PLC γ 1, PKC- θ) gátlásával [241] járul hozzá a T-sejt anergia kialakulásához [131]. A vártnak megfelelően stimuláció hatására nőtt a Cbl-b mennyisége az egészséges BALB/c T-sejtekben, azonban ZAP-70^{+/-} T-sejtekben nem volt kimutatható mennyiségű stimuláció után sem. Ezt magyarázhatja, hogy mivel a ZAP-70^{+/-} T-sejtek kevésbé aktiválódnak anti-CD3/anti-CD28 stimuláció hatására, mint a BALB/c T-sejtek, feltételezhető, hogy a az aktiváció szupressziójához nincs szükség a Cbl-b inhibitor hatására. Továbbá, a Cbl-b foszforiláltsági szintje az SLP-76 foszforilációjával együtt változik [238], és mivel az SLP-76-t a ZAP-70 foszforilálja [102], elképzelhető, hogy a csökkent ZAP-70 expresszió mindkét molekula esetén alacsonyabb foszforilációt eredményez. Továbbá az is ismert, hogy a ZAP-70 közvetlenül kapcsolódik a Cbl-b-hez [202], ezért lehetséges, hogy az expressziójában bekövetkező változások befolyásolják a Cbl-b expresszióját is.

Leírták, hogy Cbl-b hiányos egerekben sérül a T-sejt tolerancia, ezáltal a vad-típusnál súlyosabb arthritis váltható ki, akár adjuváns nélkül is [237]. Az általunk vizsgált arthritises állatok T-sejtjeiben az egészségeshez képest változatlan a Cbl-b mennyisége, tehát a GIA modellben nem csökkent az autoimmun folyamatok hatására a Cbl-b mennyisége; ehhez hasonlóan leírtak humán RA-s betegek T-sejtjeiben is [242]. Tehát noha a Cbl-b hiánya autoimmun folyamatokat eredményezhet, az autoimmun T-sejt aktiváció nem feltétlenül vonja maga után a Cbl-b mennyiségének változását. Érdekes módon az arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben indukálódott a Cbl-b expressziója, ennek háttérében elméletünk szerint az aktivált effektor sejtek *in vivo* szelekciója állhat (lásd kettővel ezelőtti bekezdés).

Mind RA-s betegekben, mind egérmodellekben megfigyelték, hogy a T-sejtekre jellemző az “apoptózis rezisztancia”, mely a folyamatos T-sejt aktiváció mellett hozzájárul a krónikus gyulladás kialakulásához [243,244]. Ezzel összhangban mi is azt találtuk, hogy az arthritises BALB/c egerekből izolált T-sejtekben csökkent az apoptózis mértéke a hasított kaszpáz-3 mennyisége alapján. Ezzel szemben az arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben az egészségeshez hasonló mértékű, az arthritises BALB/c T-sejtekhez képest jelentősebb apoptózis figyelhető meg. Ez részben magyarázhatja a ZAP-70^{+/-} egerek enyhébb betegségét, az aktivált T-sejtek a BALB/c egerekben az apoptotikus folyamatok hiányában perzisztáltak, fenntartva a gyulladást és hozzájárulva a súlyosabb szöveti károsodáshoz.

Az aktiváció indukált sejthalál fontos útvonala az extrinszik apoptotikus útvonal

[245,246]. Ezzel ellentétben az arthritises egerek T-sejtjeiben anti-CD3/CD28 restimuláció után nem láttunk hasított kaszpáz-8-t, ami összhangban van az apoptotikus folyamatok előzőekben leírt hiányával, azaz BALB/c egerekben, autoimmun arthritisen az aktivált T-sejtek feltételezhetően ellenállnak az aktiváció indukált sejthalálnak is. Az általunk használt egérmodellhez hasonló módon, azonban human eredetű proteoglikán aggregáttal immunizált BALB/c egerek T-sejtjeinél korábban már megfigyelték, hogy anti-CD3 restimuláció hatására nem zajlik le az aktiváció indukált sejthalál az abnormális FLIP expresszió miatt, mely a kaszpáz-8 DISC-hez való relokációját gátolja [247]. Ezzel szemben az arthritises egerekből izolált, de nem restimulált T-sejtekben viszont jelentős a hasított kaszpáz-8 mennyisége. Ennek hátterében az állhat, hogy az általunk használt arthritis indukációs módszer három immunizációt igényel, amely ismételt antigén-stimulusként aktiváció indukált sejthalált válthat ki *in vivo* az extrinszik útvonalon keresztül. Az arthritises, anti-CD3/CD28 stimulált T-sejtekben megfigyelt aktiváció indukált sejthalált gátló folyamatok valószínűleg azért nem indulnak itt el, mert a FLIP expressziója a TcR-n keresztüli jelátvitel következtében emelkedik meg [248], a jelátvitel erőssége, a kostimuláció mértéke, valamint a jelátviteli molekulák aktiváltsági szintje más az *in vitro* és *in vivo* stimuláció során. A ZAP-70 fontos szerepet játszik az aktiváció indukált sejthalál folyamatában is, ZAP-70 hiányában a FasL upregulációja nem valósul meg, így az extrinszik apoptotikus útvonal nem aktiválódik [249,250]. Ez magyarázhatja, hogy az arthritises, anti-CD3/CD28 beadékkal nem stimulált ZAP-70^{+/-} T-sejtekben miért alacsonyabb a kaszpáz 8 mennyisége, mint a BALB/c egerekében.

Az aktiváció indukált sejthalál létezik halál-receptortól független, intrinszik útvonalon keresztül lezajló változata is [246,251,252]. A folyamat kulcsfontosságú molekulái a Bim és a Bcl-2 [212,253,254]. Eredményeink alapján az arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben anti-CD3/CD28 stimulációtól függetlenül aktív volt az intrinszik apoptotikus útvonal, melyet a hasított kaszpáz-9 jelez. Az arthritises BALB/c T-sejtekben csak a stimuláció hatására aktiválódik az intrinszik útvonal. A pro-apoptotikus Bim mennyisége a stimuláció hatására minden mintában nőtt, azonban az arthritises egerek T-sejtjeiben nagyobb mennyiségben mutattuk ki, mint az egészségesekben. Ehhez hasonlóan változott az anti-apoptotikus Bcl-2 mennyisége; a re-stimulált, arthritises mintákban jelentős expressziót mutattunk ki. A Bcl-2 és a Bim mennyiségének aránya határozza meg a sejt sorsát: ha a Bcl-2 van túlsúlyban, gátolja a Bim pro-apoptotikus hatását és a sejt túlél, ha viszont a Bim mennyisége nagyobb,

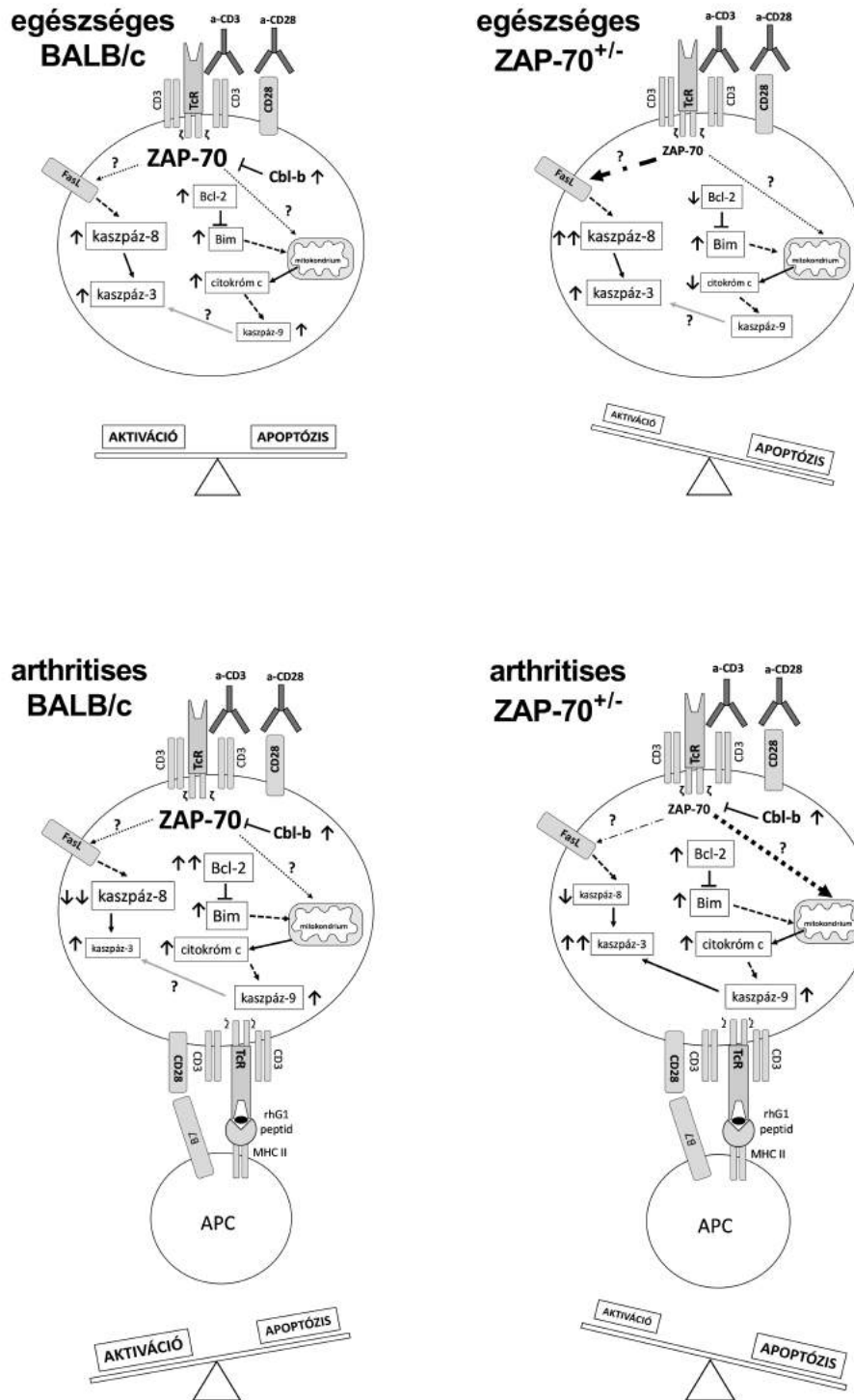
akkor az intrinszik útvonalon keresztül a sejt apoptózissal elpusztul [253,255]. A folyamat eredményeként citokróm c szabadul fel a mitokondriumból [213] ami összhangban van eredményeinkkel, ahol a stimuláció hatására az arthritises egerek T-sejtjeiből származó lizátumban emelkedett citokróm c mennyiséget mértünk. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az arthritises egerekben a stimuláció hatására megnőtt Bim expresszió hatásait nem tudja teljes mértékben semlegesíteni a Bcl-2, ezért a folyamat eredőjeként citokróm c szabadul fel, ami a kaszpáz-9 aktivációjához vezet az apoptozómán keresztül. Noha az arthritises BALB/c és ZAP-70^{+/-}, anti-CD3/CD28 stimulált T-sejtekben körülbelül hasonló mennyiségű kaszpáz-9-t mutattunk ki, a BALB/c T-sejtekben mégis kevesebb a kaszpáz-3 mennyisége, ennek oka lehet, hogy a kaszpáz-3 kaszpáz-9 általi hasítását különböző molekulák befolyásolhatják, másrészt a kaszpáz-3 ZAP-70^{+/-} T-sejtekben megfigyelt fokozott aktivációja más, általunk nem vizsgált útvonalak is előidézhethet.

Eredményeinket összefoglalva (33. ábra) a vad-típusú BALB/c T-sejtekben az arthritis hatására nőtt az aktiváció indukált sejthalál (kaspáz-8) mértéke anti-CD3/CD28 stimuláció nélkül, azonban érdekes módon az effektor, hasított kaszpáz-3 nem volt kimutatható. Az anti-CD3/CD28 stimuláció hatására csökkent az apoptózis mértéke az arthritises BALB/c T-sejtekben az egészséges T-sejtekhez képest, az aktiváció indukált sejthalál kaszpáz-8-on keresztül végbemenő formája itt feltételezhetően nem játszik kiemelt szerepet. Azonban a Bim a Bcl-2-höz képest nagyobb mennyiségben expresszálódik, így a Bcl-2 nem képes a Bim apoptotikus hatását gátolni, a mitokondriumból citokróm c szabadul fel, ami a kaszpáz-9 aktiválódásához vezet. Elképzelhető, hogy ezután a kaszpáz-3 aktivációja a stimuláció és az arthritis együttes hatásaként nem következik be, különböző, általunk nem vizsgált inhibitorok, illetve anti-apoptotikus molekulák aktiválódása révén.

Az arthritis eredményeként a stimulálatlan ZAP-70^{+/-} T-sejtekben is megjelenik a Cbl-b, valószínűsíthetően az arthritis indukció során alkalmazott immunizáció és epitóp spreading során bekövetkező aktiváció gátlására. A stimulálatlan arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben az aktiváció indukált sejthalál (kaspáz-8) kifejezettebb, az intrinszik útvonal azonban kevésbé aktív, mivel megjelenik a Bcl-2, mely a Bim hatásait gátolja, a folyamatok eredményeként azonban a kaszpáz-3 nem hasítódik. Az anti-CD3/CD28 stimulált arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben noha nő a Cbl-b expressziója, az aktiváció fokozottabb az egészséges stimulált ZAP-70^{+/-} T-sejtekhez képest. Az arthritises, anti-CD3/CD28 stimulált ZAP-70^{+/-} T-sejtekben az intrinsic apoptotikus útvonal

hangsúlyosabb, míg az egészséges anti-CD3/CD28 stimulált ZAP-70^{+/-} T-sejtekben az extrinszik útvonal tűnik jelentősebbnek.

Mindezek alapján a ZAP-70 hiányának hatása az arthritises T-sejtek apoptózisára főként a nem stimulált mintákban mutatkozott meg, a vad-típusú T-sejtekben inkább az extrinszik, a ZAP-70^{+/-} T-sejtekben inkább az intrinszik útvonal domináns. Az anti-CD3/CD28 stimuláció után ezek a különbségek elmosódtak, de az apoptózis (kaspáz-3) mértéke összességében a BALB/c T-sejtekben alacsonyabb, összhangban a jelentősebb aktivációs mintázattal, nagyobb proliferációs rátával és a súlyosabb klinikai képpel.



33. ábra A ZAP-70 részleges hiányában bekövetkező változások a T-sejt aktivációs és apoptotikus útvonalakban

Az egészséges BALB/c egerekben anti-CD3/CD28 stimuláció eredményeként emelkedett Cbl-b, Bcl-2, hasított kaszpáz-3 és -9 mennyiség az aktivációs és apoptotikus folyamatok egyensúlyához vezetett. Egészséges ZAP-70^{+/-} egerek T-sejtjeiben emelkedett Bim, kaszpáz-3 és -8 expressziót, valamint csökkent Bcl-2 és citokróm c mennyiséget tapasztaltunk stimuláció hatására, így az egyensúly az apoptózis irányába tolódott el.

Arthritises BALB/c T-sejtekben nőtt a Cbl-b, Bcl-2, Bim, citokróm c, kaszpáz-3 és -9 mennyisége, a kaszpáz-8-é pedig csökkent, aktiváció irányába tolva el az egyensúlyt. Arthritises ZAP-70^{+/-} T-sejtekben a stimulációt követően emelkedett a Cbl-b, Bcl-2, Bim, citokróm c, kaszpáz-3- és -9 mennyisége, az apoptotikus folyamatok túlsúlyához vezetve. A molekulák nevének betűmérete a western blotokon megfigyelt mennyiségükre utal, míg a felfelé vagy lefelé mutató nyilak a stimulálatlan mintákhoz viszonyított expressziós változásokat mutatják. A pontozott, illetve pontozott szaggatott nyilak pedig az halál-receptor independens, illetve extrinszik útvonalakkal feltételezett kapcsolatot jelképezik.

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr Boldizsár Ferencnek a támogatást és szakmai segítségét, valamint Prof. Dr. Berki Tímeának, hogy lehetővé tette számomra az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben való munkát.

Hálával tartozok az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának, különösen Prof. Dr. Balogh Péternek, hogy megtanította a szövettani vizsgálatok kivitelezését, valamint Dr. Olasz Katalinnak az arthritises kísérletekhez való hozzájárulásáért.

Dr. Botz Bálintnak (PTE, KK, Radiológiai Klinika) az *in vivo* biolumineszcens vizsgálatok elvégzését szeretném megköszönni.

Külön köszönöm családomnak, hogy mindenben támogattak és segítettek a dolgozat és a különböző előadások, ábrák elkészítésében. Lillának köszönöm a kísérletek során nyújtott rengeteg segítséget, valamint hogy a munkahelyen is ilyen jó barát, örülök, hogy együtt dolgoztunk. Diának köszönöm a hasznos tanácsait, és hogy mindig szívesen látott minket a szobájában. Johannes, thank you supporting this whole project with your enormous positivity and trust.

Munkám az alábbi támogatások segítségével valósult meg: EFOP-3.6.1.-16-2016-00004), GINOP 2.3.2-15-2016-00050, TÁMOP 4.2.2.B-15 KONV-2015-0011, OTKA K101493, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Boldizsár Ferenc, BO/00086/12/5)

8 Referenciák

- [1] A.C. Chan, B.A. Irving, J.D. Fraser, A. Weiss, The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 9166–9170.
- [2] A.C. Chan, M. Iwashima, C.W. Turck, A. Weiss, ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain., *Cell.* 71 (1992) 649–62.
- [3] E. Vivier, A.J. da Silva, M. Ackerly, H. Levine, C.E. Rudd, P. Anderson, Association of a 70-kDa tyrosine phosphoprotein with the CD16: zeta: gamma complex expressed in human natural killer cells., *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 1872–6.
- [4] C. Scielzo, A. Camporeale, M. Geuna, M. Alessio, A. Poggi, M.R. Zocchi, M. Chilosi, F. Caligaris-Cappio, P. Ghia, ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage, *Leukemia.* 20 (2006) 689–695.
- [5] G. Chakupurakal, A. Bell, M. Griffiths, F. Wandroo, P. Moss, Analysis of ZAP70 expression in adult acute lymphoblastic leukaemia by real time quantitative PCR, *Mol. Cytogenet.* 5 (2012) 22.
- [6] E. Schweighoffer, L. Vanes, A. Mathiot, T. Nakamura, V.L.. Tybulewicz, Unexpected Requirement for ZAP-70 in Pre-B Cell Development and Allelic Exclusion, *Immunity.* 18 (2003) 523–533.
- [7] F. Fallah-Arani, E. Schweighoffer, L. Vanes, V.L.J. Tybulewicz, Redundant role for Zap70 in B cell development and activation, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 1721–1733.
- [8] H. Wang, T.A. Kadlecsek, B.B. Au-Yeung, H.E.S. Goodfellow, L.-Y. Hsu, T.S. Freedman, A. Weiss, ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a002279.
- [9] C.A. Koch, D. Anderson, M.F. Moran, C. Ellis, T. Pawson, SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins., *Science.* 252 (1991) 668–74.
- [10] M. Iwashima, B.A. Irving, N.S. van Oers, A.C. Chan, A. Weiss, Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases., *Science.* 263 (1994) 1136–9.
- [11] Q. Yan, T. Barros, P.R. Visperas, S. Deindl, T.A. Kadlecsek, A. Weiss, J. Kuriyan, Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker., *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 2188–201.

- [12] T.A. Kadlecsek, N.S.C. van Oers, L. Lefrancois, S. Olson, D. Finlay, D.H. Chu, K. Connolly, N. Killeen, A. Weiss, Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development., *J. Immunol.* 161 (1998) 4688–4694.
- [13] E.H. Palacios, A. Weiss, Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development., *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1703–1715.
- [14] K. Walkovich, M. Vander Lugt, *ZAP70-Related Combined Immunodeficiency*, 1993.
- [15] M. Elder, D. Lin, J. Clever, A. Chan, T. Hope, A. Weiss, T. Parslow, Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase, *Science* (80-.). 264 (1994) 1596–1599.
- [16] A.C. Chan, T.A. Kadlecsek, M.E. Elder, A.H. Filipovich, W.L. Kuo, M. Iwashima, T.G. Parslow, A. Weiss, ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency., *Science.* 264 (1994) 1599–601.
- [17] E. Arpaia, M. Shahar, H. Dadi, A. Cohen, C.M. Roifman, Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase., *Cell.* 76 (1994) 947–58.
- [18] M.E. Elder, S. Skoda-Smith, T.A. Kadlecsek, F. Wang, J. Wu, A. Weiss, Distinct T cell developmental consequences in humans and mice expressing identical mutations in the DLAARN motif of ZAP-70., *J. Immunol.* 166 (2001) 656–61.
- [19] B.B. Au-Yeung, N.H. Shah, L. Shen, A. Weiss, ZAP-70 in Signaling, Biology, and Disease, *Annu. Rev. Immunol.* 36 (2018) 127–156.
- [20] Y. Takahama, Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection., *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 127–35.
- [21] A.Y. Lai, M. Kondo, Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 6311–6316.
- [22] N. Saran, M. Lyszkiewicz, J. Pommerencke, K. Witzlau, R. Vakilzadeh, M. Ballmaier, H. von Boehmer, A. Krueger, Multiple extrathymic precursors contribute to T-cell development with different kinetics, *Blood.* 115 (2010) 1137–1144.
- [23] B.A. Schwarz, A. Bhandoola, Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 953–960.
- [24] A. Bhandoola, H. von Boehmer, H.T. Petrie, J.C. Zúñiga-Pflücker, Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from, *Immunity.* 26 (2007) 678–689.

- [25] H.R. Rodewald, K. Kretzschmar, S. Takeda, C. Hohl, M. Dessing, Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization., *EMBO J.* 13 (1994) 4229–40.
- [26] D.A. Zlotoff, B.A. Schwarz, A. Bhandoola, The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man, *Semin. Immunopathol.* 30 (2008) 371–382.
- [27] D.A. Zlotoff, A. Bhandoola, Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217 (2011) 122–38.
- [28] I. Dzhagalov, H. Phee, How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells., *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 663–82.
- [29] C. Liu, T. Ueno, S. Kuse, F. Saito, T. Nitta, L. Piali, H. Nakano, T. Kakiuchi, M. Lipp, G.A. Hollander, Y. Takahama, The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi, *Blood.* 105 (2005) 31–39.
- [30] A. Krueger, S. Willenzon, M. Lyszkiewicz, E. Kremmer, R. Forster, CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus, *Blood.* 115 (2010) 1906–1912.
- [31] D.A. Zlotoff, A. Sambandam, T.D. Logan, J.J. Bell, B.A. Schwarz, A. Bhandoola, CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus, *Blood.* 115 (2010) 1897–1905.
- [32] E.F. Lind, S.E. Prockop, H.E. Porritt, H.T. Petrie, Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development., *J. Exp. Med.* 194 (2001) 127–34.
- [33] F.M. V Rossi, S.Y. Corbel, J.S. Merzaban, D.A. Carlow, K. Gossens, J. Duenas, L. So, L. Yi, H.J. Ziltener, Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 626–634.
- [34] D.L. Foss, E. Donskoy, I. Goldschneider, The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice., *J. Exp. Med.* 193 (2001) 365–74.
- [35] A. Krueger, N. Ziętara, M. Łyszkiewicz, T Cell Development by the Numbers., *Trends Immunol.* 38 (2017) 128–139.
- [36] R. Ceredig, T. Rolink, Opinion: A positive look at double-negative thymocytes, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 888–897.

- [37] D.I. Godfrey, J. Kennedy, T. Suda, A. Zlotnik, A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression., *J. Immunol.* 150 (1993) 4244–52.
- [38] J.J. Peschon, P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L.S. Park, S.F. Ziegler, D.E. Williams, C.B. Ware, J.D. Meyer, B.L. Davison, Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice., *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1955–60.
- [39] F. Radtke, A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H.R. MacDonald, M. Aguet, Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1., *Immunity.* 10 (1999) 547–58.
- [40] N.L. Alves, O.R.-L. Goff, N.D. Huntington, A.P. Sousa, V.S.G. Ribeiro, A. Bordack, F.L. Vives, L. Peduto, A. Chidgey, A. Cumano, R. Boyd, G. Eberl, J.P. Di Santo, Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 1512–1517.
- [41] N. Lopes, A. Sergé, P. Ferrier, M. Irla, Thymic Crosstalk Coordinates Medulla Organization and T-Cell Tolerance Induction, *Front. Immunol.* 6 (2015) 365.
- [42] E.R. Breed, S.T. Lee, K.A. Hogquist, Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection., *Semin. Cell Dev. Biol.* 84 (2018) 2–10.
- [43] J. Abramson, G. Anderson, Thymic Epithelial Cells, *Annu. Rev. Immunol.* 35 (2017) 85–118.
- [44] S. Gerondakis, T.S. Fulford, N.L. Messina, R.J. Grumont, NF- κ B control of T cell development, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 15–25.
- [45] H.E. Porritt, K. Gordon, H.T. Petrie, Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice., *J. Exp. Med.* 198 (2003) 957–62.
- [46] F. Livák, M. Tourigny, D.G. Schatz, H.T. Petrie, Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development., *J. Immunol.* 162 (1999) 2575–80.
- [47] H. von Boehmer, H.J. Fehling, STRUCTURE AND FUNCTION OF THE PRE-T CELL RECEPTOR, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 433–452.
- [48] P. Zarin, E.L.Y. Chen, T.S.H. In, M.K. Anderson, J.C. Zúñiga-Pflücker, Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when

- and how much?, *Cell. Immunol.* 296 (2015) 70–75.
- [49] A.C. Carpenter, R. Bosselut, Decision checkpoints in the thymus., *Nat. Immunol.* 11 (2010) 666–73.
- [50] S. Trop, M. Rhodes, D.L. Wiest, P. Hugo, J.C. Zúñiga-Pflücker, Competitive displacement of pT alpha by TCR-alpha during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and alpha beta TCR., *J. Immunol.* 165 (2000) 5566–72.
- [51] M. Saini, C. Sinclair, D. Marshall, M. Tolaini, S. Sakaguchi, B. Seddon, Regulation of Zap70 Expression During Thymocyte Development Enables Temporal Separation of CD4 and CD8 Repertoire Selection at Different Signaling Thresholds, *Sci. Signal.* 3 (2010) ra23-ra23.
- [52] L. Klein, B. Kyewski, P.M. Allen, K.A. Hogquist, Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)., *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 377–91.
- [53] P. Kisielow, H.S. Teh, H. Blüthmann, H. von Boehmer, Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules, *Nature.* 335 (1988) 730–733.
- [54] M. Sawicka, G.L. Stritesky, J. Reynolds, N. Abourashchi, G. Lythe, C. Molina-París, K.A. Hogquist, From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection., *Front. Immunol.* 5 (2014) 19.
- [55] N. Kurd, E.A. Robey, T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective, *Immunol. Rev.* 271 (2016) 114–126.
- [56] E. Brugnera, A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T.I. Guinter, Y. Yamashita, S.O. Sharrow, A. Singer, Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells., *Immunity.* 13 (2000) 59–71.
- [57] A. Singer, S. Adoro, J.-H. Park, Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice., *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 788–801.
- [58] I. Taniuchi, CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation, *Annu. Rev. Immunol.* 36 (2018) 579–601.
- [59] T. Sato, S. Ohno, T. Hayashi, C. Sato, K. Kohu, M. Satake, S. Habu, Dual Functions of Runx Proteins for Reactivating CD8 and Silencing CD4 at the Commitment Process into CD8 Thymocytes, *Immunity.* 22 (2005) 317–328.

- [60] T. Egawa, D.R. Littman, ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 1131–1139.
- [61] G.A. Passos, C.A. Speck-Hernandez, A.F. Assis, D.A. Mendes-da-Cruz, Update on *Aire* and thymic negative selection, *Immunology.* 153 (2018) 10–20.
- [62] M.S. Anderson, E.S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S.P. Berzins, S.J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, D. Mathis, Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein, *Science* (80-.). 298 (2002) 1395–1401.
- [63] H. Takaba, Y. Morishita, Y. Tomofuji, L. Danks, T. Nitta, N. Komatsu, T. Kodama, H. Takayanagi, Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance, *Cell.* 163 (2015) 975–987.
- [64] H. Takaba, H. Takayanagi, The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus, *Trends Immunol.* 38 (2017) 805–816.
- [65] M.S. Anderson, M.A. Su, Aire and T cell development., *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011) 198–206.
- [66] G.L. Stritesky, S.C. Jameson, K.A. Hogquist, Selection of self-reactive T cells in the thymus., *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012) 95–114.
- [67] M.S. Jordan, A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Holenbeck, M.A. Lerman, A. Naji, A.J. Caton, Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 301–306.
- [68] B.R. Marks, H.N. Nowyhed, J.-Y. Choi, A.C. Poholek, J.M. Odegard, R.A. Flavell, J. Craft, Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation., *Nat. Immunol.* 10 (2009) 1125–32.
- [69] S.B. Bennstein, Unraveling Natural Killer T-Cells Development, *Front. Immunol.* 8 (2018) 1950.
- [70] A.J. Leishman, L. Gapin, M. Capone, E. Palmer, H.R. MacDonald, M. Kronenberg, H. Cheroutre, Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8 α α (+) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides., *Immunity.* 16 (2002) 355–64.
- [71] M. Matloubian, C.G. Lo, G. Cinamon, M.J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M.L. Allende, R.L. Proia, J.G. Cyster, Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1, *Nature.* 427 (2004) 355–360.

- [72] A. Krueger, N. Ziętara, M. Łyszkiewicz, J.A. Dudakov, M.R. van den Brink, E.V. Rothenberg, et al., J. Sun, et al., K. Busch, et al., D.E. Harrison, et al., S.J. Szilvassy, et al., A. Wilson, et al., R. Lu, et al., A. Gerrits, et al., S.H. Naik, et al., L. Perie, et al., L.V. Bystrykh, et al., T. Hofer, et al., C.M. Sawai, et al., T.S. Weber, et al., A. Bhandoola, et al., S.M. Schlenner, H.R. Rodewald, B.A. Schwarz, A. Bhandoola, A. Krueger, H. von Boehmer, O. Umland, et al., A.Y. Lai, M. Kondo, D.A. Zlotoff, et al., I. Goldschneider, D.E. Wright, et al., T. Serwold, et al., N. Saran, et al., S.M. Schlenner, et al., A. Krueger, et al., M. Svensson, et al., F.M. Rossi, et al., K.M. Veerman, et al., D.A. Zlotoff, et al., R. Scollay, et al., V.J. Wallis, et al., S. Mori, et al., M.L. Scimone, et al., K. Gossens, et al., N. Zietara, et al., D.L. Foss, et al., D.L. Foss, et al., E.F. Lind, et al., H.E. Porritt, et al., B. Lucas, et al., Y. Shi, et al., M. Buono, et al., S.E. Prockop, H.T. Petrie, L.I.R. Ehrlich, et al., M. Łyszkiewicz, et al., E. Manesso, et al., N.N. Belyaev, et al., B.A. Schwarz, et al., L. Peaudecerf, et al., E. Manesso, et al., K. Germar, et al., B.N. Weber, et al., M. Regelin, et al., C. Benz, et al., G.L. Stritesky, et al., M. Egerton, et al., G.L. Stritesky, et al., M. Sawicka, et al., C.D. Surh, J. Sprent, T.M. Laufer, et al., J.P. van Meerwijk, et al., A.E. Moran, et al., C. Sinclair, et al., R.G. Scollay, et al., R. Scollay, K. Shortman, K.A. Hogquist, et al., Y. Xing, et al., T.E. Boursalian, et al., A.M. Berkley, et al., T.M. McCaughtry, et al., G.P. Wang, et al., A. Aiuti, et al., R.N. La Motte-Mohs, et al., I. den Braber, et al., A. Rangarajan, R.A. Weinberg, R.T. Calado, B. Dumitriu, D.R. Boggs, I. Visan, et al., K.H. Diehl, et al., T Cell Development by the Numbers, *Trends Immunol.* 0 (2016) 467–476.
- [73] R.G. Scollay, E.C. Butcher, I.L. Weissman, Thymus cell migration: Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice, *Eur. J. Immunol.* 10 (1980) 210–218.
- [74] R.V. Luckheeram, R. Zhou, A.D. Verma, B. Xia, CD4⁺T cells: differentiation and functions., *Clin. Dev. Immunol.* 2012 (2012) 925135.
- [75] S. Keck, M. Schmalzer, S. Ganter, L. Wyss, S. Oberle, E.S. Huseby, D. Zehn, C.G. King, Antigen affinity and antigen dose exert distinct influences on CD4 T-cell differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 14852–14857.
- [76] T. Nakayama, M. Yamashita, The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation, *Semin. Immunol.* 22 (2010) 303–309.
- [77] J.M. Coquet, L. Rausch, J. Borst, The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation, *Immunol. Cell Biol.* 93 (2015) 780–788.
- [78] N. Schmitt, H. Ueno, Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines, *Curr. Opin. Immunol.* 34 (2015) 130–136.
- [79] E.E. Kara, I. Comerford, K.A. Fenix, C.R. Bastow, C.E. Gregor, D.R. McKenzie, S.R. McColl, Tailored Immune Responses: Novel Effector Helper T Cell Subsets in Protective Immunity, *PLoS Pathog.* 10 (2014) e1003905.
- [80] F. Colucci, D. Guy-Grand, A. Wilson, M. Turner, E. Schweighoffer, V.L. Tybulewicz,

- J.P. Di Santo, A new look at Syk in alpha beta and gamma delta T cell development using chimeric mice with a low competitive hematopoietic environment., *J. Immunol.* 164 (2000) 5140–5.
- [81] I. Negishi, N. Motoyama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A.C. Chan, D.Y. Loh, Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes., *Nature.* 376 (1995) 435–438.
- [82] H. von Boehmer, H.S. Teh, P. Kisielow, The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful, *Immunol. Today.* 10 (1989) 57–61.
- [83] J.M. Ashe, D.L. Wiest, R. Abe, A. Singer, ZAP-70 protein promotes tyrosine phosphorylation of T cell receptor signaling motifs (ITAMs) in immature CD4(+)8(+) thymocytes with limiting p56(lck)., *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1163–8.
- [84] F. Ois, V. Laethem, A.N.N. Tikhonova, L.A.A. Pobezinsky, X. Tai, M.Y.Y. Kimura, C. Cile Le Saout, T.I.I. Guinte, A. Adams, S.O.O. Sharrow, G. Nter Bernhardt, L. Feigenbaum, A. Singer, F. Van Laethem, A.N.N. Tikhonova, L.A.A. Pobezinsky, X. Tai, M.Y.Y. Kimura, C. Le Saout, T.I.I. Guinte, A. Adams, S.O.O. Sharrow, G. Bernhardt, L. Feigenbaum, A. Singer, Lck Availability during Thymic Selection Determines the Recognition Specificity of the T Cell Repertoire, *Cell.* 154 (2013) 1326–1341.
- [85] C. Sinclair, B. Seddon, Overlapping and Asymmetric Functions of TCR Signaling during Thymic Selection of CD4 and CD8 Lineages, *J. Immunol.* 192 (2014) 5151–5159.
- [86] C. Sinclair, M. Ono, B. Seddon, A Zap70-dependent feedback circuit is essential for efficient selection of CD4 lineage thymocytes, *Immunol. Cell Biol.* 93 (2015) 406–416.
- [87] O. Adjali, G. Marodon, M. Steinberg, C. Mongellaz, V. Thomas-Vaslin, C. Jacquet, N. Taylor, D. Klatzmann, In vivo correction of ZAP-70 immunodeficiency by intrathymic gene transfer., *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2287–2295.
- [88] M. Irla, M. Saade, A. Kissenpfennig, L.F. Poulin, L. Leserman, P.N. Marche, E. Jouvin-Marche, F. Berger, C. Nguyen, ZAP-70 restoration in mice by in vivo thymic electroporation., *PLoS One.* 3 (2008) e2059.
- [89] O. Adjali, R.R. Vicente, C. Ferrand, C. Jacquet, C. Mongellaz, P. Tiberghien, K. Chebli, V.S. Zimmermann, N. Taylor, Intrathymic administration of hematopoietic progenitor cells enhances T cell reconstitution in ZAP-70 severe combined immunodeficiency., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 13586–13591.
- [90] S.M. Hedrick, D.I. Cohen, E.A. Nielsen, M.M. Davis, Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins., *Nature.* 308 (n.d.) 149–53.

- [91] M.L. Dustin, C.T. Baldari, The Immune Synapse: Past, Present, and Future, in: *Methods Mol. Biol.*, 2017: pp. 1–5.
- [92] B. Alarcón, D. Mestre, N. Martínez-Martín, The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering?, *Immunology*. 133 (2011) 420–425.
- [93] L. Chen, D.B. Flies, Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 227–242.
- [94] L.E. Samelson, M.D. Patel, A.M. Weissman, J.B. Harford, R.D. Klausner, Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor., *Cell*. 46 (1986) 1083–90.
- [95] F. Letourneur, R.D. Klausner, Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon., *Science*. 255 (1992) 79–82.
- [96] M.S. Kuhns, M.M. Davis, K.C. Garcia, Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex., *Immunity*. 24 (2006) 133–9.
- [97] M.L. Bettini, P.-C. Chou, C.S. Guy, T. Lee, K.M. Vignali, D.A.A. Vignali, Cutting Edge: CD3 ITAM Diversity Is Required for Optimal TCR Signaling and Thymocyte Development, *J. Immunol.* 199 (2017) 1555–1560.
- [98] G. Furlan, T. Minowa, N. Hanagata, C. Kataoka-Hamai, Y. Kaizuka, Phosphatase CD45 Both Positively and Negatively Regulates T Cell Receptor Phosphorylation in Reconstituted Membrane Protein Clusters, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 28514–28525.
- [99] M. Steinberg, O. Adjali, L. Swainson, P. Merida, V. Di Bartolo, L. Pelletier, N. Taylor, N. Noraz, T-cell receptor-induced phosphorylation of the zeta chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk., *Blood*. 104 (2004) 760–7.
- [100] S. Deindl, T.A. Kadlecsek, T. Brdicka, X. Cao, A. Weiss, J. Kuriyan, Structural Basis for the Inhibition of Tyrosine Kinase Activity of ZAP-70, *Cell*. 129 (2007) 735–746.
- [101] V.D. Bartolo, M. Malissen, E. Dufour, E. Sechet, B. Malissen, O. Acuto, Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 568–575.
- [102] A.C. Chan, M. Dalton, R. Johnson, G.H. Kong, T. Wang, R. Thoma, T. Kurosaki, Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function., *EMBO J.* 14 (1995) 2499–508.
- [103] J.D. Watts, M. Affolter, D.L. Krebs, R.L. Wange, L.E. Samelson, R. Aebersold, Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine

- phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 29520–9.
- [104] P.E. Paz, S. Wang, H. Clarke, X. Lu, D. Stokoe, A. Abo, Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells., *Biochem. J.* 356 (2001) 461–71.
- [105] J. Bubeck Wardenburg, C. Fu, J.K. Jackman, H. Flotow, S.E. Wilkinson, D.H. Williams, R. Johnson, G. Kong, A.C. Chan, P.R. Findell, Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 19641–4.
- [106] B. Malissen, P. Bongrand, Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues, *Annu. Rev. Immunol.* 33 (2015) 539–561.
- [107] J.C.D. Houtman, R.A. Houghtling, M. Barda-Saad, Y. Toda, L.E. Samelson, Early phosphorylation kinetics of proteins involved in proximal TCR-mediated signaling pathways., *J. Immunol.* 175 (2005) 2449–58.
- [108] S. Gelkop, N. Isakov, T cell activation stimulates the association of enzymatically active tyrosine-phosphorylated ZAP-70 with the Crk adapter proteins., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21519–27.
- [109] B.B. Au-Yeung, S.E. Levin, C. Zhang, L.-Y. Hsu, D.A. Cheng, N. Killeen, K.M. Shokat, A. Weiss, A genetically selective inhibitor demonstrates a function for the kinase Zap70 in regulatory T cells independent of its catalytic activity., *Nat. Immunol.* 11 (2010) 1085–92.
- [110] Q. Qi, A. August, Keeping the (Kinase) Party Going: SLP-76 and ITK Dance to the Beat, *Sci. STKE.* 2007 (2007) pe39-pe39.
- [111] T.M. Herndon, X.C. Shan, G.C. Tsokos, R.L. Wange, ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappa B activation in response to engagement of CD3 and CD28., *J. Immunol.* 166 (2001) 5654–64.
- [112] J.M. Salvador, P.R. Mittelstadt, T. Guszczynski, T.D. Copeland, H. Yamaguchi, E. Appella, A.J. Fornace, J.D. Ashwell, Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor–proximal tyrosine kinases, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 390–395.
- [113] G. Kadamur, E.M. Ross, Mammalian Phospholipase C, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 127–154.
- [114] J.W. Putney, T. Tomita, Phospholipase C signaling and calcium influx., *Adv. Biol. Regul.* 52 (2012) 152–64.

- [115] N. Isakov, A. Altman, Protein kinase C(theta) in T cell activation., *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 761–794.
- [116] G.R. Crabtree, S.L. Schreiber, SnapShot: Ca²⁺-calcineurin-NFAT signaling., *Cell.* 138 (2009) 210, 210.e1.
- [117] A.E. Nel, T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse., *J. Allergy Clin. Immunol.* 109 (2002) 758–70.
- [118] J.E. Smith-Garvin, G.A. Koretzky, M.S. Jordan, T cell activation., *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 591–619.
- [119] S. GAFFEN, K. LIU, Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications, *Cytokine.* 28 (2004) 109–123.
- [120] J.H. Esensten, Y.A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J.A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy., *Immunity.* 44 (2016) 973–88.
- [121] T. Girard, D. Gaucher, M. El-Far, G. Breton, R.-P. Sékaly, CD80 and CD86 IgC domains are important for quaternary structure, receptor binding and co-signaling function, *Immunol. Lett.* 161 (2014) 65–75.
- [122] K.N. Pollizzi, J.D. Powell, Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 435–446.
- [123] J.S. Boomer, J.M. Green, An enigmatic tail of CD28 signaling., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a002436.
- [124] F. Garcon, D.T. Patton, J.L. Emery, E. Hirsch, R. Rottapel, T. Sasaki, K. Okkenhaug, CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer, *Blood.* 111 (2007) 1464–1471.
- [125] B.A. Hemmings, D.F. Restuccia, The PI3K-PKB/Akt pathway., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015).
- [126] L.P. Kane, A. Weiss, The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3, *Immunol. Rev.* 192 (2003) 7–20.
- [127] L.P. Kane, P.G. Andres, K.C. Howland, A.K. Abbas, A. Weiss, Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN- γ but not TH2 cytokines, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 37–44.

- [128] S.R. Jacobs, C.E. Herman, N.J. Maciver, J.A. Wofford, H.L. Wieman, J.J. Hammen, J.C. Rathmell, Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways., *J. Immunol.* 180 (2008) 4476–86.
- [129] C.S. Palmer, T. Hussain, G. Duette, T.J. Weller, M. Ostrowski, I. Sada-Ovalle, S.M. Crowe, Regulators of Glucose Metabolism in CD4⁺ and CD8⁺ T Cells, *Int. Rev. Immunol.* 35 (2016) 477–488.
- [130] T. Saito, S. Yamasaki, Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors., *Immunol. Rev.* 192 (2003) 143–60.
- [131] R.J. Salmond, A. Filby, I. Qureshi, S. Caserta, R. Zamoyska, T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance, *Immunol. Rev.* 228 (2009) 9–22.
- [132] J. Brockdorff, S. Williams, C. Couture, T. Mustelin, Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2539–2550.
- [133] G.G. Chiang, B.M. Sefton, Specific Dephosphorylation of the Lck Tyrosine Protein Kinase at Tyr-394 by the SHP-1 Protein-tyrosine Phosphatase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 23173–23178.
- [134] N. Carpino, S. Turner, D. Mekala, Y. Takahashi, H. Zang, T.L. Geiger, P. Doherty, J.N. Ihle, Regulation of ZAP-70 activation and TCR signaling by two related proteins, Sts-1 and Sts-2., *Immunity.* 20 (2004) 37–46.
- [135] L. Qingjun, H. Zhou, W. Langdon, J. Zhang, E3 ubiquitin ligase Cbl-b in innate and adaptive immunity, *Cell Cycle.* 13 (2014) 1875–1884.
- [136] C.B.F. Thien, W.Y. Langdon, c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses, *Biochem. J.* 391 (2005) 153–166.
- [137] W. Meng, S. Sawasdikosol, S.J. Burakoff, M.J. Eck, Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase., *Nature.* 398 (1999) 84–90.
- [138] M.L. Lupher, Z. Songyang, S.E. Shoelson, L.C. Cantley, H. Band, The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 33140–4.
- [139] C.B.F. Thien, R.M. Scaife, J.M. Papadimitriou, M.A. Murphy, D.D.L. Bowtell, W.Y. Langdon, A mouse with a loss-of-function mutation in the c-Cbl TKB domain shows

- perturbed thymocyte signaling without enhancing the activity of the ZAP-70 tyrosine kinase., *J. Exp. Med.* 197 (2003) 503–13.
- [140] E.I. Buchbinder, A. Desai, CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition., *Am. J. Clin. Oncol.* 39 (2016) 98–106.
- [141] T. Yokosuka, W. Kobayashi, M. Takamatsu, K. Sakata-Sogawa, H. Zeng, A. Hashimoto-Tane, H. Yagita, M. Tokunaga, T. Saito, Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation, *Immunity.* 33 (2010) 326–339.
- [142] D.M. Sansom, CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?, *Immunology.* 101 (2000) 169–77.
- [143] L.S.K. Walker, D.M. Sansom, Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology., *Trends Immunol.* 36 (2015) 63–70.
- [144] K.-A. Sheppard, L.J. Fitz, J.M. Lee, C. Benander, J.A. George, J. Wooters, Y. Qiu, J.M. Jussif, L.L. Carter, C.R. Wood, D. Chaudhary, PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ , *FEBS Lett.* 574 (2004) 37–41.
- [145] T. Arulraj, D. Barik, Mathematical modeling identifies Lck as a potential mediator for PD-1 induced inhibition of early TCR signaling, *PLoS One.* 13 (2018) e0206232.
- [146] H. Arasanz, M. Gato-Cañas, M. Zuazo, M. Ibañez-Vea, K. Breckpot, G. Kochan, D. Escors, PD1 signal transduction pathways in T cells., *Oncotarget.* 8 (2017) 51936–51945.
- [147] J.P. Kolb, T.H. Oguin, A. Oberst, J. Martinez, J. Martinez, Programmed Cell Death and Inflammation: Winter Is Coming., *Trends Immunol.* 38 (2017) 705–718.
- [148] L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E.S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D.W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E.H. Baehrecke, N.A. Barlev, N.G. Bazan, F. Bernassola, M.J.M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F.K.-M. Chan, N.S. Chandel, E.H. Cheng, J.E. Chipuk, J.A. Cidlowski, A. Ciechanover, G.M. Cohen, M. Conrad, J.R. Cubillos-Ruiz, P.E. Czabotar, V. D'Angiolella, T.M. Dawson, V.L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K.-M. Debatin, R.J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V.M. Dixit, S.J. Dixon, C.S. Duckett, B.D. Dynlacht, W.S. El-Deiry, J.W. Elrod, G.M. Fimia, S. Fulda, A.J. García-Sáez, A.D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D.R. Green, L.A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J.M. Hardwick, I.S. Harris, M.O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P.J. Jost, P.P. Juin, W.J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R.N. Kitsis, D.J. Klionsky, R.A. Knight, S. Kumar, S.W. Lee, J.J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S.A. Lipton, R.A.

- Lockshin, C. López-Otín, S.W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J.-C. Marine, S.J. Martin, J.-C. Martinou, J.P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E.A. Miao, J.D. Molkenin, U.M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J.M. Penninger, D.M. Pereira, S. Pervaiz, M.E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J.H.M. Prehn, H. Puthalakath, G.A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C.M.P. Rodrigues, D.C. Rubinsztein, T. Rudel, K.M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H.-U. Simon, A. Sistigu, B.R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S.W.G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M.G. Vander Heiden, A. Villunger, H.W. Virgin, K.H. Vousden, D. Vucic, E.F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J.A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer, Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 486–541.
- [149] S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516.
- [150] O. Julien, J.A. Wells, Caspases and their substrates, *Cell Death Differ.* 24 (2017) 1380–1389.
- [151] I.N. Lavrik, A. Golks, P.H. Krammer, Caspases: pharmacological manipulation of cell death., *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2665–72.
- [152] K.M. Boatright, G.S. Salvesen, Mechanisms of caspase activation., *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 725–31.
- [153] S.G. Solano-Gálvez, J. Abadi-Chiriti, L. Gutiérrez-Velez, E. Rodríguez-Puente, E. Konstat-Korzenny, D.-A. Álvarez-Hernández, G. Franyuti-Kelly, L. Gutiérrez-Kobeh, R. Vázquez-López, Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease., *Med. Sci. (Basel, Switzerland)*. 6 (2018).
- [154] A.M. Petros, E.T. Olejniczak, S.W. Fesik, Structural biology of the Bcl-2 family of proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1644 (2004) 83–94.
- [155] F. Edlich, BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500 (2018) 26–34.
- [156] G. Ichim, S.W.G. Tait, A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process, *Nat. Rev. Cancer.* 16 (2016) 539–548.
- [157] R.W. Birkinshaw, P.E. Czabotar, The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation, *Semin. Cell Dev. Biol.* 72 (2017) 152–162.
- [158] S.W.G. Tait, D.R. Green, Mitochondria and cell death: outer membrane

- permeabilization and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 621–632.
- [159] S. Yuan, C.W. Akey, Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation, *Structure*. 21 (2013) 501–515.
- [160] R. Shakeri, A. Kheirollahi, J. Davoodi, Apaf-1: Regulation and function in cell death, *Biochimie*. 135 (2017) 111–125.
- [161] P. Li, L. Zhou, T. Zhao, X. Liu, P. Zhang, Y. Liu, X. Zheng, Q. Li, Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application, *Oncotarget*. 8 (2017) 23996–24008.
- [162] D.R. Green, F. Llambi, Cell Death Signaling, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a006080.
- [163] C. Falschlehner, U. Schaefer, H. Walczak, Following TRAIL's path in the immune system, *Immunology*. 127 (2009) 145–154.
- [164] H.H. Park, Y.-C. Lo, S.-C. Lin, L. Wang, J.K. Yang, H. Wu, The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 561–586.
- [165] M.E. Peter, P.H. Krammer, The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 26–35.
- [166] B.C. Barnhart, E.C. Alappat, M.E. Peter, The CD95 type I/type II model., *Semin. Immunol.* 15 (2003) 185–93.
- [167] Z. Hao, T.W. Mak, Type I and Type II Pathways of Fas-mediated Apoptosis Are Differentially Controlled by XIAP, *J. Mol. Cell Biol.* 2 (2010) 63–64.
- [168] D. Vucic, XIAP at the crossroads of cell death and inflammation., *Oncotarget*. 9 (2018) 27319–27320.
- [169] P.J. Jost, S. Grabow, D. Gray, M.D. McKenzie, U. Nachbur, D.C.S. Huang, P. Bouillet, H.E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser, T. Kaufmann, XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis, *Nature*. 460 (2009) 1035–1039.
- [170] M. Grinberg, R. Sarig, Y. Zaltsman, D. Frumkin, N. Grammatikakis, E. Reuveny, A. Gross, tBID Homooligomerizes in the Mitochondrial Membrane to Induce Apoptosis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12237–12245.
- [171] J.S. Smolen, D. Aletaha, I.B. McInnes, Rheumatoid arthritis, *Lancet*. 388 (2016)

2023–2038.

- [172] J.S. Smolen, D. Aletaha, A. Barton, G.R. Burmester, P. Emery, G.S. Firestein, A. Kavanaugh, I.B. McInnes, D.H. Solomon, V. Strand, K. Yamamoto, Rheumatoid arthritis, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4 (2018) 18001.
- [173] M.-C. Boissier, L. Semerano, S. Challal, N. Saidenberg-Kermanac'h, G. Falgarone, Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction, *J. Autoimmun.* 39 (2012) 222–228.
- [174] K. Conrad, D. Roggenbuck, D. Reinhold, T. Dörner, Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies, *Autoimmun. Rev.* 9 (2010) 431–435.
- [175] D.M. Boeters, L. Mangnus, S. Ajeganova, E. Lindqvist, B. Svensson, R.E.M. Toes, L.A. Trouw, T.W.J. Huizinga, F. Berenbaum, J. Morel, S. Rantapää-Dahlqvist, A.H.M. van der Helm-van Mil, The prevalence of ACPA is lower in rheumatoid arthritis patients with an older age of onset but the composition of the ACPA response appears identical, *Arthritis Res. Ther.* 19 (2017) 115.
- [176] L. Mathsson Alm, D.L. Fountain, K.K. Cadwell, A.M. Madrigal, G. Gallo, M. Poorafshar, The performance of anti-cyclic citrullinated peptide assays in diagnosing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis., *Clin. Exp. Rheumatol.* 36 (n.d.) 144–152.
- [177] M.J. Townsend, Molecular and cellular heterogeneity in the Rheumatoid Arthritis synovium: Clinical correlates of synovitis, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 28 (2014) 539–549.
- [178] S.M. Jung, K.W. Kim, C.-W. Yang, S.-H. Park, J.H. Ju, Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis., *J. Immunol. Res.* 2014 (2014) 263625.
- [179] M. Hashimoto, K. Hirota, H. Yoshitomi, S. Maeda, S. Teradaira, S. Akizuki, P. Prieto-Martin, T. Nomura, N. Sakaguchi, J. Köhl, B. Heyman, M. Takahashi, T. Fujita, T. Mimori, S. Sakaguchi, Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis., *J. Exp. Med.* 207 (2010) 1135–43.
- [180] M. Okroj, D. Heinegård, R. Holmdahl, A.M. Blom, Rheumatoid arthritis and the complement system, *Ann. Med.* 39 (2007) 517–530.
- [181] R. Giacomelli, A. Afeltra, A. Alunno, E. Bartoloni-Bocci, O. Berardicurti, M. Bombardieri, A. Bortoluzzi, R. Caporali, F. Caso, R. Cervera, M.S. Chimenti, P. Cipriani, E. Coloma, F. Conti, S. D'Angelo, S. De Vita, S. Di Bartolomeo, O. Distler, A. Doria, E. Feist, B.A. Fisher, M. Gerosa, M. Gilio, G. Guggino, V. Liakouli, D.P.E. Margiotta, P. Meroni, G. Moroncini, F. Perosa, M. Prete, R. Priori, C. Rebuffi, P. Ruscitti, R. Scarpa, Y. Shoenfeld, M. Todoerti, F. Ursini, G. Valesini, S. Vettori, C. Vitali, A.G. Tzioufas, Guidelines for biomarkers in autoimmune rheumatic diseases -

- evidence based analysis, *Autoimmun. Rev.* (2018).
- [182] D.M. Roeleveld, M.I. Koenders, The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy, *Cytokine*. 74 (2015) 101–107.
- [183] T. Kobezda, S. Ghassemi-Nejad, K. Mikecz, T.T. Glant, Z. Szekanecz, Of mice and men: how animal models advance our understanding of T-cell function in RA., *Nat. Rev. Rheumatol.* 10 (2014) 160–70.
- [184] A. Billiau, P. Matthys, Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory?, *Cytokine Growth Factor Rev.* 22 339–44.
- [185] K. McNamee, R. Williams, M. Seed, Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they?, *Eur. J. Pharmacol.* 759 (2015) 278–286.
- [186] N. Bessis, P. Decker, E. Assier, L. Semerano, M.-C. Boissier, Arthritis models: usefulness and interpretation, *Semin. Immunopathol.* 39 (2017) 469–486.
- [187] P.A. Monach, D. Mathis, C. Benoist, The K/BxN Arthritis Model, in: *Curr. Protoc. Immunol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2008: p. Unit 15.22.
- [188] H.J. Ditzel, The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis, *Trends Mol. Med.* 10 (2004) 40–45.
- [189] M. Maccioni, G. Zeder-Lutz, H. Huang, C. Ebel, P. Gerber, J. Hergueux, P. Marchal, V. Duchatelle, C. Degott, M. van Regenmortel, C. Benoist, D. Mathis, Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice., *J. Exp. Med.* 195 (2002) 1071–7.
- [190] A.D. Christensen, C. Haase, A.D. Cook, J.A. Hamilton, K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis, *Front. Immunol.* 7 (2016) 213.
- [191] M.D. Hayward, B.K. Jones, A. Saporov, H.S. Hain, A.-C. Trillat, M.M. Bunzel, A. Corona, B. Li-Wang, B. Strenkowski, C. Giordano, H. Shen, E. Arcamone, J. Weidlick, M. Vilensky, M. Tugusheva, R.H. Felkner, W. Campbell, Y. Rao, D.S. Grass, O. Buiakova, An extensive phenotypic characterization of the hTNF α transgenic mice, *BMC Physiol.* 7 (2007) 13.
- [192] E. Ntougkos, P. Chouvardas, F. Roumelioti, C. Ospelt, M. Frank-Bertoncelj, A. Filer, C.D. Buckley, S. Gay, C. Nikolaou, G. Kollias, Genomic Responses of Mouse Synovial Fibroblasts During Tumor Necrosis Factor-Driven Arthritogenesis Greatly Mimic Those in Human Rheumatoid Arthritis, *Arthritis Rheumatol.* 69 (2017) 1588–1600.

- [193] N. Sakaguchi, T. Takahashi, H. Hata, T. Nomura, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Sakihama, T. Matsutani, I. Negishi, S. Nakatsuru, S. Sakaguchi, Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice., *Nature*. 426 (2003) 454–60.
- [194] R. Thomas, M. Turner, A.P. Cope, High avidity autoreactive T cells with a low signalling capacity through the T-cell receptor: central to rheumatoid arthritis pathogenesis?, *Arthritis Res. Ther.* 10 (2008) 210.
- [195] K. Hirota, M. Hashimoto, H. Yoshitomi, S. Tanaka, T. Nomura, T. Yamaguchi, Y. Iwakura, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis., *J. Exp. Med.* 204 (2007) 41–7.
- [196] C. Wakasa-Morimoto, T. Toyosaki-Maeda, T. Matsutani, R. Yoshida, S. Nakamura-Kikuoka, M. Maeda-Tanimura, H. Yoshitomi, K. Hirota, M. Hashimoto, H. Masaki, Y. Fujii, T. Sakata, Y. Tsuruta, R. Suzuki, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis, *Int. Immunol.* 20 (2008) 1331–1342.
- [197] K.M. Pietrosimone, M. Jin, B. Poston, P. Liu, Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis., *Bio-Protocol*. 5 (2015).
- [198] T.T. Glant, M. Radacs, G. Nagyeri, K. Olasz, A. Laszlo, F. Boldizsar, A. Hegyi, A. Finnegan, K. Mikecz, Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis., *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1312–21.
- [199] A. Finnegan, K. Mikecz, P. Tao, T.T. Glant, Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines., *J. Immunol.* 163 (1999) 5383–90.
- [200] F. Boldizsar, O. Tarjanyi, P. Nemeth, K. Mikecz, T.T. Glant, Th1/Th17 polarization and acquisition of an arthritogenic phenotype in arthritis-susceptible BALB/c, but not in MHC-matched, arthritis-resistant DBA/2 mice., *Int. Immunol.* 21 (2009) 511–522.
- [201] M. Szabo, T. Czompoly, K. Kvell, G. Talaber, D. Bartis, P. Nemeth, T. Berki, F. Boldizsar, Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells, *Int. Immunol.* 24 (2012) 79–87.
- [202] F. Boldizsar, M. Szabo, K. Kvell, T. Czompoly, G. Talaber, J. Bjorkan, D. Bartis, P. Nemeth, T. Berki, ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in T cells, *Mol. Immunol.* 53 (2013) 111–117.
- [203] K. Kvell, T. Czömpöly, L. Hiripi, P. Balogh, J. Kóbor, L. Bodrogi, J.E. Pongrácz, W.A. Ritchie, Z. Bósze, Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain

- established by lentiviral transgenesis, *Transgenic Res.* 19 (2010) 105–112.
- [204] S. Gross, S.T. Gammon, B.L. Moss, D. Rauch, J. Harding, J.W. Heinecke, L. Ratner, D. Piwnica-Worms, Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo, *Nat. Med.* 15 (2009) 455–461.
- [205] G.S. Salvesen, C.M. Walsh, Functions of caspase 8: the identified and the mysterious., *Semin. Immunol.* 26 (2014) 246–52.
- [206] H. Tamauchi, N. Tamaoki, S. Habu, CD4+CD8+ thymocytes develop into CD4 or CD8 single-positive cells in athymic nude mice, *Eur. J. Immunol.* 18 (1988) 1859–1862.
- [207] S. V Lair, B.B. Lozzio, Thymocyte reconstitution of athymic and athymic-splenic mice: graft rejection and antibody synthesis., *Exp. Cell Biol.* 48 (1980) 439–444.
- [208] I. Goldschneider, K.L. Komschlies, D.L. Greiner, Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors., *J. Exp. Med.* 163 (1986) 1–17.
- [209] O. Tarjanyi, F. Boldizsar, P. Nemeth, K. Mikecz, T.T. Glant, Age-related changes in arthritis susceptibility and severity in a murine model of rheumatoid arthritis, *Immun. Ageing.* 6 (2009) 8.
- [210] Z. Zhang, C. Elly, L. Qiu, A. Altman, Y.C. Liu, A direct interaction between the adaptor protein Cbl-b and the kinase zap-70 induces a positive signal in T cells., *Curr. Biol.* 9 (1999) 203–6.
- [211] A.B. Parrish, C.D. Freel, S. Kornbluth, Cellular mechanisms controlling caspase activation and function., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a008672.
- [212] R.V. Sionov, S.A. Vlahopoulos, Z. Granot, Regulation of Bim in Health and Disease, *Oncotarget.* 6 (2015) 23058–134.
- [213] X. Jiang, X. Wang, Cytochrome *C* -Mediated Apoptosis, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 87–106.
- [214] N. Ohkura, Y. Kitagawa, S. Sakaguchi, Development and Maintenance of Regulatory T cells, *Immunity.* 38 (2013) 414–423.
- [215] M.O. Li, A.Y. Rudensky, T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function., *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 220–33.

- [216] T. Hunter, The genesis of tyrosine phosphorylation., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (2014) a020644.
- [217] O.M. Siggs, L.A. Miosge, A.L. Yates, E.M. Kucharska, D. Sheahan, T. Brdicka, A. Weiss, A. Liston, C.C. Goodnow, Opposing Functions of the T Cell Receptor Kinase ZAP-70 in Immunity and Tolerance Differentially Titrate in Response to Nucleotide Substitutions, *Immunity.* (2007).
- [218] L.-Y. Hsu, Y.X. Tan, Z. Xiao, M. Malissen, A. Weiss, A hypomorphic allele of ZAP-70 reveals a distinct thymic threshold for autoimmune disease versus autoimmune reactivity, *J. Exp. Med.* (2009).
- [219] S. Tanaka, S. Maeda, M. Hashimoto, C. Fujimori, Y. Ito, S. Teradaira, K. Hirota, H. Yoshitomi, T. Katakai, A. Shimizu, T. Nomura, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, Graded Attenuation of TCR Signaling Elicits Distinct Autoimmune Diseases by Altering Thymic T Cell Selection and Regulatory T Cell Function, *J. Immunol.* (2010).
- [220] B. Cauwe, L. Tian, D. Franckaert, W. Pierson, K.A. Staats, S.M. Schlenner, A. Liston, A novel Zap70 mutation with reduced protein stability demonstrates the rate-limiting threshold for Zap70 in T-cell receptor signalling, *Immunology.* (2014).
- [221] L.Y. Hsu, D.A. Cheng, Y. Chen, H.E. Liang, A. Weiss, Destabilizing the autoinhibitory conformation of Zap70 induces up-regulation of inhibitory receptors and T cell unresponsiveness, *J. Exp. Med.* (2017).
- [222] C.M. Walsh, A.L. Edinger, The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis, *Immunol. Rev.* 236 (2010) 95–109.
- [223] A.H. Kim, G. Khursigara, X. Sun, T.F. Franke, M. V. Chao, Akt Phosphorylates and Negatively Regulates Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 893–901.
- [224] A.R. Cuddihy, B.T. Suterwala, S. Ge, L.A. Kohn, J. Jang, J. Andrade, X. Wang, G.M. Crooks, Rapid thymic reconstitution following bone marrow transplantation in neonatal mice is VEGF-dependent., *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18 (2012).
- [225] A.M. Holland, J.L. Zakrzewski, G.L. Goldberg, A. Ghosh, M.R.M. van den Brink, Adoptive precursor cell therapy to enhance immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation in mouse and man., *Semin. Immunopathol.* 30 (2008) 479–487.
- [226] O. Alpdogan, S.J. Muriglan, J.M. Eng, L.M. Willis, A.S. Greenberg, B.J. Kappel, M.R.M. van den Brink, IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation., *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1095–1107.

- [227] E.-J. Wils, E. Braakman, G.M.G.M. Verjans, E.J.C. Rombouts, A.E.C. Broers, H.G.M. Niesters, G. Wagemaker, F.J.T. Staal, B. Löwenberg, H. Spits, J.J. Cornelissen, Flt3 ligand expands lymphoid progenitors prior to recovery of thymopoiesis and accelerates T cell reconstitution after bone marrow transplantation., *J. Immunol.* 178 (2007) 3551–3557.
- [228] K.A. Kelly, R. O’Brien, W. Born, Reconstitution of SCID mice with haemopoietic precursors: a detailed analysis of gamma delta T-cell reconstitution., *Immunology.* 91 (1997) 65–72.
- [229] S. Dejbakhsh-Jones, M.E. Garcia-Ojeda, D. Chatterjea-Matthes, D. Zeng, S. Strober, Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 7455–7460.
- [230] B. Lucas, N.I. McCarthy, S. Baik, E. Cosway, K.D. James, S.M. Parnell, A.J. White, W.E. Jenkinson, G. Anderson, Control of the thymic medulla and its influence on $\alpha\beta$ T-cell development., *Immunol. Rev.* 271 (2016) 23–37.
- [231] R. Vicente, O. Adjali, C. Jacquet, V.S. Zimmermann, N. Taylor, Intrathymic transplantation of bone marrow-derived progenitors provides long-term thymopoiesis., *Blood.* 115 (2010) 1913–1920.
- [232] M. Kool, T. Soullié, M. van Nimwegen, M.A.M. Willart, F. Muskens, S. Jung, H.C. Hoogsteden, H. Hammad, B.N. Lambrecht, Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells, *205* (2008) 869–882.
- [233] S. Berberich, S. Dähne, A. Schippers, T. Peters, W. Müller, E. Kremmer, R. Förster, O. Pabst, Differential Molecular and Anatomical Basis for B Cell Migration into the Peritoneal Cavity and Omental Milky Spots, *J. Immunol.* 180 (2008) 2196–2203.
- [234] R.J. Creusot, S.S. Yaghoubi, P. Chang, J. Chia, C.H. Contag, S.S. Gambhir, C.G. Fathman, Lymphoid-tissue-specific homing of bone-marrow-derived dendritic cells., *Blood.* 113 (2009) 6638–6647.
- [235] H. Chkourko Gusky, J. Diedrich, O.A. MacDougald, I. Podgorski, Omentum and bone marrow: how adipocyte-rich organs create tumour microenvironments conducive for metastatic progression., *Obes. Rev.* 17 (2016) 1015–1029.
- [236] R.E. Mebius, Lymphoid Organs for Peritoneal Cavity Immune Response: Milky Spots, *Immunity.* 30 (2009) 670–672.
- [237] S. Meza-Perez, T.D. Randall, Immunological Functions of the Omentum, *Trends Immunol.* 38 (2017) 526–536.

- [238] E. Calabresi, F. Petrelli, A.F. Bonifacio, I. Puxeddu, A. Alunno, One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis., *Clin. Exp. Rheumatol.* 36 (n.d.) 175–184.
- [239] A. Hanyecz, K. Olasz, O. Tarjanyi, P. Nemeth, K. Mikecz, T.T. Glant, F. Boldizsar, Proteoglycan aggrecan conducting T cell activation and apoptosis in a murine model of rheumatoid arthritis., *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 942148.
- [240] D.L. Farber, S.F. Hussain, D.L. Farber, Differential TCR signaling and the generation of memory T cells., *J. Immunol.* 160 (1998) 535–9.
- [241] M. Shamim, S.G. Nanjappa, A. Singh, E.H. Plisch, S.E. LeBlanc, J. Walent, J. Svaren, C. Seroogy, M. Suresh, Cbl-b regulates antigen-induced TCR down-regulation and IFN-gamma production by effector CD8 T cells without affecting functional avidity., *J. Immunol.* 179 (2007) 7233–43.
- [242] L. Doníz-Padilla, V. Martínez-Jiménez, P. Niño-Moreno, C. Abud-Mendoza, B. Hernández-Castro, R. González-Amaro, E. Layseca-Espinosa, L. Baranda-Cándido, Expression and function of Cbl-b in T cells from patients with systemic lupus erythematosus, and detection of the 2126 A/G *Cblb* gene polymorphism in the Mexican mestizo population, *Lupus.* 20 (2011) 628–635.
- [243] C. Malemud, Malemud, C. J., Defective T-Cell Apoptosis and T-Regulatory Cell Dysfunction in Rheumatoid Arthritis, *Cells.* 7 (2018) 223.
- [244] A. Korb, H. Pavenstädt, T. Pap, Cell death in rheumatoid arthritis, *Apoptosis.* 14 (2009) 447–454.
- [245] D.R. Green, N. Droin, M. Pinkoski, Activation-induced cell death in T cells, *Immunol. Rev.* 193 (2003) 70–81.
- [246] R. Arnold, D. Brenner, M. Becker, C.R. Frey, P.H. Krammer, How T lymphocytes switch between life and death, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 1654–1658.
- [247] J. Zhang, T. Bárdos, K. Mikecz, A. Finnegan, T.T. Glant, Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis., *J. Immunol.* 166 (2001) 4981–6.
- [248] N. Zhang, K. Hopkins, Y.-W. He, c-FLIP protects mature T lymphocytes from TCR-mediated killing., *J. Immunol.* 181 (2008) 5368–73.
- [249] C.M. Eischen, B.L. Williams, W. Zhang, L.E. Samelson, D.H. Lynch, R.T. Abraham, P.J. Leibson, ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of Fas ligand in activation-induced T cell apoptosis., *J. Immunol.* 159 (1997) 1135–9.

- [250] L. Zhong, C.-H. Wu, W.-H. Lee, C.-P. Liu, Zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70), but not Syk, tyrosine kinase can mediate apoptosis of T cells through the Fas/Fas ligand, caspase-8 and caspase-3 pathways., *J. Immunol.* 172 (2004) 1472–82.
- [251] D. Brenner, P.H. Krammer, R. Arnold, Concepts of activated T cell death, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2008).
- [252] Y. Zhan, E.M. Carrington, Y. Zhang, S. Heinzl, A.M. Lew, Life and death of activated T cells: How are they different from naïve T Cells?, *Front. Immunol.* (2017).
- [253] E. Sandalova, C.-H. Wei, M.G. Masucci, V. Levitsky, Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004).
- [254] D.A. Hildeman, Y. Zhu, T.C. Mitchell, P. Bouillet, A. Strasser, J. Kappler, P. Marrack, Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic Bcl-2 family member Bim, *Immunity.* (2002).
- [255] Y. Zhu, B.J. Swanson, M. Wang, D.A. Hildeman, B.C. Schaefer, X. Liu, H. Suzuki, K. Mihara, J. Kappler, P. Marrack, Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 7681–7686.

9 Saját publikációk

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Prenek L, Berki T, Balogh P, Boldizsar F: Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knockout mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY 2018 Jun;192(3):302-314. doi: 10.1111/cei.13114. IF: 3,410

Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Mikecz K, Rauch TA, Glant TT, Boldizsar F. Enigma of IL-17 and Th17 Cells in Rheumatoid Arthritis and in Autoimmune Animal Models of Arthritis. MEDIATORS OF INFLAMMATION 2016;2016:6145810. doi: 10.1155/2016/6145810. IF: 3.232 (megosztott első szerző K.Z.-al)

Kugyelka R, Prenek L, Olasz K, Kohl Z, Botz B, Glant T. T, Berki T, Boldizsár F: ZAP-70 regulates autoimmune arthritis via alterations in T cell activation and apoptosis. *Beküldve (bírálat alatt)* CELLS (Special issue: „The Molecular and Cellular Basis of Rheumatoid Arthritis”)

Egyéb közlemény:

Prenek L, Boldizsar F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, Nemeth P, Berki T
The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells.
APOPTOSIS 22:(2) pp. 239-253. (2017) IF: 3,833

Poszterek, előadások listája:

1. Magyar Immunológiai Társaság 42. Vándorgyűlése, Pécs, 2013. október 16-18.
T cell reconstitution studies in ZAP-70 deficient mice (poszter)
2. Semmelweis Symposium, Budapest, 7-9 November 2013
The effect of ZAP-70 deficiency upon the histological composition of primary-and secondary lymphoid organs in mice (előadás)

3. VI. Nemzetközi XII. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, Pécs, 2014. március 18-20.
Alterations in the lymphoid structures of ZAP-70 deficient mice (előadás)
4. 21. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely, 2014. március 27-30.
Szöveti és sejtszerkezeti eltérések ZAP-70 hiányos egerek centrális és perifériás nyirokszerveiben (előadás)
5. 44. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2014. május 20-23.
A T-sejt képzés helyreállításának kinetikai vizsgálata ZAP-70 deficiens egerekben (poszter)
6. Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlése, Velence, 2014. október 15-17.
Studies on the reconstitution of T cell production in ZAP-70 deficient mice (poszter)
7. 45. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 2015. május 19-22.
A ZAP-70 kináz részleges hiányának vizsgálata rheumatoid arthritisarthrit is egér modellben (poszter)
8. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna, 6-9 September 2015
Analysis of partial ZAP-70 deficiency in a rheumatoid arthritis murine model (poszter)
9. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence, 2015. október 14-16.
Investigation of ZAP-70 deficiency in a murine model of rheumatoid arthritis (előadás)
10. 46. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 2016. május 19-22.
T-sejt specifikus transzgen-expresszió vizsgálatok egér modellben (poszter)
11. Magyar Immunológiai Társaság 45. Vándorgyűlése, Velence, 2016.
T cell-specific transgene expression studies in murine models (poszter)
1. Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology, 2016.
Investigation of T cell-specific transgene expression in murine models (poszter)
12. 47. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 2017.
Intraperitoneálisan beadott donor thymocyták lehetséges homing útvonalainak vizsgálata (poszter, majd kiválasztott előadás)
13. Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Velence, 2017.
Partial ZAP-70 Deficiency Ameliorates Autoimmune Arthritis In Mice By Controlling T Cell Activation And Apoptosis Sensitivity (előadás)
14. 14th Spring School of Immunology of the German Society of Immunology, Ettal, 2018.
Absence of Nkx2.3 transcription factor ameliorates autoimmune arthritis in mice (poszter)
15. 11th International Congress of Autoimmunity
Absence of Nkx2.3 transcription factor ameliorates autoimmune arthritis in mice (előadás)

10 Melléklet

Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knock-out mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes

R. Kugyelka, Z. Kohl, K. Olasz,
L. Prenek, T. Berki, P. Balogh and
F. Boldizsár 
*Department of Immunology and Biotechnology,
Medical School, University of Pecs, Pecs,
Hungary*

Summary

The tyrosine kinase zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70) plays a key role in T cell development and signalling. In the absence of ZAP-70, T cell development is arrested in the CD4⁺CD8⁺ double-positive stage, thus ZAP-70 homozygous knockout (ZAP-70^{-/-}) mice have no mature T cells in their peripheral lymphoid organs and blood, causing severe immunodeficiency. We investigated the early kinetics and long-term effects of wild-type thymocyte transfer on T cell repopulation in ZAP-70^{-/-} mice. We used a single intraperitoneal (i.p.) injection to deliver donor thymocytes to the recipients. Here, we show that after i.p. injection donor thymocytes leave the peritoneum through milky spots in the omentum and home to the thymus, where donor-originated CD4⁻CD8⁻ double-negative thymocytes most probably restore T cell development and the disrupted thymic architecture. Subsequently, newly developed, donor-originated, single-positive αβ T cells appear in peripheral lymphoid organs, where they form organized T cell zones. The established chimerism was found to be stable, as donor-originated cells were present in transferred ZAP-70^{-/-} mice as late as 8 months after i.p. injection. We demonstrate that a simple i.p. injection of ZAP-70^{+/+} thymocytes is a feasible method for the long-term reconstitution of T cell development in ZAP-70-deficient mice.

Keywords: homing, immunodeficiency, repopulation, T cell development, thymus

Accepted for publication 6 February 2018
Correspondence: F. Boldizsár, Department of
Immunology and Biotechnology, University of
Pecs, Szigeti ut 12, Pecs H7624, Hungary.
E-mail: boldizsar.ferenc@pte.hu

Introduction

ZAP-70, a T cell receptor zeta chain-associated protein of 70 kDa was identified by Chan and colleagues [1] in T cell receptor (TCR)-stimulated Jurkat cells. This tyrosine kinase plays a central role in signal transduction through the antigen receptor during T cell activation [2]. ZAP-70 is also indispensable in T cell differentiation: in its absence, the maturation of T cells in the thymus is blocked at the double-positive (DP: CD4⁺CD8⁺) stage, and as a consequence, no mature T cells can be found in the peripheral lymphoid organs, leading to severe combined immunodeficiency (SCID) in both humans and mice [3,4].

In the first ZAP-70 knock-out mice the whole protein kinase-coding gene was deleted [5]. Unlike human SCID patients, ZAP-70 knock-out mice have no mature CD4⁺ or CD8⁺ single-positive (SP) thymocytes; only DP cells can be found in their thymus [5]. Using flow cytometry, it was also shown that no functional TCR-αβ-expressing cells

were present in their spleen, while the number of B220⁺ B cells was elevated [5]. These knock-out mice are immunodeficient, but under specific pathogen-free (SPF) conditions they live up to 10 months [5].

Later, a second strain of ZAP-70-deficient mice was established with the deletion of a segment of the ZAP-70 coding gene [6]. The phenotype of these latter mice was consistent with the earlier study [5]; additionally, it was reported that the lymph nodes of ZAP-70 knock-out mice contained some CD3⁺ T cells, which expressed mainly TCR-γδ [6].

Several attempts have been made to restore the impaired T cell development in ZAP-70 knock-out mice; Adjali and colleagues [7] injected a T cell-specific lentiviral vector encoding human ZAP-70 directly into the thymi of ZAP-70-deficient mice, after which CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes appeared in 7–13 weeks and mature, functional T cells could be detected in the peripheral blood, spleen and lymph nodes.

To overcome the safety issues of the lentiviral gene delivery system, direct electroporation of the thymus was also tested in ZAP-70-deficient animals using a ZAP-70 coding expression vector [8]. They observed restored T cell differentiation in the thymus and detected mature T cells in the peripheral lymphoid organs 3 weeks following the transfer [8]. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells exhibited normal functional properties *in vivo* [8].

Previous adoptive transfer studies in ZAP-70-deficient mice used bone marrow (BM)-originated precursors as donor cells. Comparing intravenous (i.v.) and intrathymic routes of delivery of lineage-negative, haematopoietic stem cells (HSC), intrathymic transfer was found to be more efficient in terms of both kinetics and required cell numbers [9]. Upon intrathymic injection, SP thymocytes appeared in the thymus 4 weeks after the transfer with significantly higher numbers of mature T cells in the spleen and lymph nodes compared to the i.v. injection [9]. In contrast to the i.v. transfer, where no SP thymocytes were detected 13 weeks after the transfer, intrathymic transplantation of HSCs resulted in maintained T cell differentiation even 13–14 weeks post-transplantation [9].

Vicente and colleagues [10] investigated the long-term reconstitution, i.e. 20–25 weeks after i.v. or intrathymic transplantation of lineage-negative HSCs. Intrathymic transfer resulted in significantly higher numbers of peripheral T cells [10]. Furthermore, it was proved that intrathymic HSC transfer provides long-term donor thymopoiesis with donor-derived progenitors contributing to all stages of T cell differentiation, but not to the differentiation of non-T-lineage haematopoietic lineages [10]. Additionally, the architecture of the thymi of intrathymically reconstituted mice was restored [10].

In preliminary experiments, we have also tried various methods to reconstitute T cells in ZAP-70^{-/-} mice, including intrahepatic injection of wild-type (WT) BM in newborn mice or i.v. and intraperitoneal (i.p.) injection of WT thymocytes at 3–4 weeks of age. We managed to detect the presence of T cells after both intrahepatic BM transfer and i.p. thymocyte transfer, but i.v. injection of thymocytes was less effective: no mice survived more than 1 month after the transfer and we could not detect T cells in their blood in this period (our unpublished observations). Moreover, as ZAP-70^{-/-} mice are severely immunocompromised, and thus their lifespan under conventional housing is only 7–10 weeks (our own observation), the transfer has to be applied in a relatively narrow time-frame, i.e. between 3 and 5 weeks of age for best results. Based on technical considerations (accessibility of donor tissue, required cell numbers, route of administration) and the scarcity of studies investigating adoptive transfer of thymocytes [11–13], we decided that the i.p. thymocyte transfer was the simplest and most promising method to be tested further.

Herein, we show that a single i.p. injection of ZAP-70^{+/+} thymocytes into ZAP-70^{-/-} recipients corrected the T cell

deficiency permanently: T cells appeared in the peripheral lymphoid organs, the thymic T cell development showed normalization and, most importantly, the average lifespan of mice increased significantly.

Materials and methods

Mice

Mice deficient for the ZAP-70 kinase (B6.129X1-Zap70tm1Weis/J) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and bred in the transgenic mouse facility of the Department of Immunology and Biotechnology under conventional conditions. Mice were genotyped routinely from tail DNA with primers recommended by Jackson Laboratories, which could differentiate reliably between all three potential genotypes using three primers (ZAP-70 WT: 5'-AATTAGTCCATCCGCCTTCA-3', ZAP-70 mut: 5'-GCTATCAGGACATAGCGTTGG-3', ZAP-70 common: 5'-CATATGCACTGTCCCTGGTCT-3'). Breeding was conducted on a heterozygous basis.

In some experiments, we used green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice as thymocyte donors, where the GFP is expressed ubiquitously by most somatic cells, including thymocytes, under the control of the human elongation factor 1 α (EF1 α) promoter [14].

All experimental animals were kept and bred in the transgenic mouse facility of the Department of Immunology and Biotechnology under conventional, non-SPF conditions at 24 \pm 2°C with a controlled 12 h/12 h light/dark cycle. Animals used for the experiments were housed in cages in groups of five and they received food and drinking water *ad libitum*.

All animal experiments were performed in accordance with the regulations set out by the Animal Welfare Committee of the University of Pecs (BA02/2000-3/2012 to F.B.).

Thymocyte transfer

For adoptive transfer experiments, homozygous ZAP-70^{-/-} recipient mice were collected. As donors for thymocytes, we used either WT (ZAP-70^{+/+}) littermates or GFP-transgenic mice. Briefly, thymi were isolated from donor mice and cells were released by mechanical dissociation then washed once in phosphate-buffered saline (PBS). Recipients received 5–10 \times 10⁶ thymocytes with a single i.p. injection at the age of 3–4 weeks. We took blood from the transferred animals regularly to check the appearance of CD3⁺ T cells, which was the ultimate sign of the successful adoptive transfer. At the end of the experiments mice were killed and we isolated the thymus, spleen, lymph nodes and Peyer's patches for histological and flow cytometric analysis.

In some experiments, before the i.p. injection, we labelled the donor thymocytes with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, Budapest, Hungary) *in vitro*, according to the manufacturer's instructions. Briefly, CFSE (50-mM stock in dimethylsulphoxide; Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) was diluted to a final concentration of 0.5 μ M and the cells were incubated for 30 min at 37°C while shaking. Then cells were washed with warm 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) in PBS and incubated in this buffer for another 30 min at 37°C. Cells were resuspended in sterile PBS for the intraperitoneal injection.

Antibodies

For immunofluorescent detection of B and T cells, anti-B220-Alexa Fluor 647 (clone: 6.B2; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) and anti-CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone: KT3; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) rat anti-mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used, respectively.

In thymic sections anti-CD4-phycoerythrin (PE) (clone: H129.19; BD Biosciences, Budapest, Hungary) and anti-CD8-FITC (clone: IBL-3/25; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) rat anti-mouse mAbs were applied to visualize the thymocyte composition.

For the discrimination of the cortex and medulla in the thymus, anti-Ly51-PE (clone: 6C3; eBioscience, Vienna, Austria) and anti-epithelial cell adhesion molecule 1 (EpCAM1)-FITC (clone G8.8; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) rat anti-mouse antibodies were used.

For quantitative immunohistochemistry, anti-EpCAM1 (clone G8.8; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) was used with anti-rat immunoglobulin (Ig)-peroxidase secondary antibody (Histols-Rat, cat. no. 30011.Rat50; Histopathology Ltd, Pécs, Hungary). Positive staining was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako-Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) colour reaction.

Omentum preparations for confocal microscopy were stained with rabbit anti-fibronectin (ab23750; Abcam, Cambridge, UK) and goat anti-rabbit IgG-cyanin 3 (Cy3) (ab6939; Abcam) antibodies.

Cells were labelled for flow cytometry with anti-CD3-allophycocyanin (APC)-Cy7, anti-B220-PE-Cy7, anti-CD4-PE and anti-CD8-PE-Cy5.5 (all from BD Biosciences) mAbs.

The distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in various tissues of transferred mice was detected using anti-CD3-FITC (clone: KT3; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology), anti-TCR- $\alpha\beta$ -Alexa Fluor 700

and anti-TCR- $\gamma\delta$ -Brilliant Violet 421 mAbs (both from BD Biosciences).

For Western blotting, purified mouse anti-phosphotyrosine (clone: PY20, BD Biosciences) and anti- β -actin (clone no. AC-74, Sigma-Aldrich) primary antibodies were used, which were visualized with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology).

Flow cytometry

Cell surface markers of peripheral blood, lymph nodes, spleen and Peyer's patches were analysed by multi-colour flow cytometry, as described [15]. Briefly, anti-coagulated blood was haemolyzed while the solid lymphoid organs were homogenized in PBS containing 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) first, and then filtered. After washing with PBS containing 0.1% sodium azide and 0.1% BSA (Sigma-Aldrich) 10^6 cells were labelled with fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min in the dark; cells were then resuspended in PBS containing 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Data acquisition and analysis were performed on a FACS Canto II flow cytometer using FACS Diva Software (both from BD Biosciences).

Cell populations were defined as follows: CD3⁺: T cells; B220⁺: B cells; CD3⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺: $\alpha\beta$ T cells; CD3⁺ TCR- $\gamma\delta$ ⁺: $\gamma\delta$ T cells; CD4⁻CD8⁻: DN thymocytes; CD4⁺CD8⁺: DP thymocytes; CD4⁺CD8⁻: CD4 SP thymocytes; and CD8⁺CD4⁻: CD8 SP thymocytes. Percentages of the different cell populations were quantified using two-dimensional density plots; GFP expression was analysed on histograms.

Immunohistochemistry and fluorescent microscopy

Multiple immunofluorescent staining of frozen, acetone-fixed sections from thymi, spleens and peripheral lymph nodes was performed as described earlier [16]. Acetone-fixed, frozen sections were blocked for 20 min with PBS containing 5% BSA (Sigma-Aldrich), followed by a 45-min incubation with the appropriate antibody cocktails. After washing with PBS, samples were mounted and analysed.

For immunohistochemistry, frozen thymus sections were blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS. Then, samples were treated with 1 mg/ml phenylhydrazine (Sigma-Aldrich) in PBS for 10 min. After 45-min incubation with unlabelled anti-EpCAM1, rat anti-mouse mAb samples were washed with PBS and anti-rat Ig peroxidase was used as secondary antibody for 1 h at room temperature. The sections were developed by DAB (Dako) colour reaction.

Immunofluorescent and immunohistochemical samples were analysed using an Olympus BX61 fluorescent microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan). The acquisition of digital images was performed with a CCD camera using analySIS software. Photos were overlaid using Adobe Photoshop CS2 software (Adobe Systems Inc., San Jose,

CA, USA), with adjustments for brightness, contrast and black level applied equally to all images.

Omenta were processed for whole-mount immunohistochemistry as described [17]. Briefly, harvested omenta were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and, after washing with 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS, were blocked with PBS containing 5% BSA (Sigma-Aldrich) and 0.1% saponin for 2 h. After washing three times for 20 min, samples were incubated with rabbit anti-fibronectin (Abcam) at 4°C overnight, then washed three times for 20 min. Anti-rabbit-Cy3 (Abcam) was used as secondary antibody (3 h at 4°C). Samples were viewed using an Olympus Fluo-View FV-1000 laser scanning confocal imaging system (Olympus).

cDNA synthesis and polymerase chain reaction (PCR)

After isolating total RNA from BM and thymi using the RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), cDNA was prepared with the RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Subsequent PCR was performed using primer pairs for GFP: 5'-GACGTAACGGCCACAAGTT-3' and 5'-CCTCCTTGAA GTCGATGCC-3'.

T cell isolation and *in-vitro* activation

T cells were isolated from the spleens of wild-type (WT) or transferred mice using the EasySep™ mouse T cell isolation kit (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada), according to the manufacturer's instructions. Purified T cells were then stimulated *in vitro* using MACSiBead™ particles (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) loaded with CD3 and CD28 antibodies for 48 h (bead/cell ratio 2 : 1). Proliferation capacity of the stimulated T cells (20 000 cells/well in a 96-well plate) was assessed using Promega CellTiter 96® non-radioactive cell proliferation assay (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

Western blot

Some activated T cells were processed for Western blotting. Briefly, cells were lysed in Triton X lysis buffer [50 mM HEPES, 10 mM Na-pyrophosphate, 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Na-fluoride, 10% glycerol, 1% Triton X] complemented freshly with protease inhibitor and Na-orthovanadate (all from Sigma-Aldrich). After centrifugation at 16 000 g for 10 min, the supernatant was boiled immediately in sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer for 10 min. Samples were separated with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a 10% gel. The gels were blotted for 2 h to nitrocellulose membranes using the Mini Trans-Blot cell blotting equipment (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After transfer, nitrocellulose membranes were soaked in blocking buffer [2% BSA (Sigma-Aldrich), 10 mM Tris, 100 mM

sodium chloride and 0.1% Tween 20 (Molar Chemicals, Halásztelek, Hungary), pH 7.4] and then incubated with purified mouse anti-phosphotyrosine primary antibody (clone: PY20; BD Biosciences). Anti-β-actin (clone no. AC-74; Sigma-Aldrich) was used as loading control. Blots were then probed with peroxidase-conjugated anti-mouse-IgG (University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology). Blots were washed in a buffer containing 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20 (pH 7.4). Western blots were visualized using enhanced chemiluminescent reagent (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate; Thermo Scientific), as described in the manufacturer's instructions. Luminescent light signals were detected with Fujifilm LAS 4000 blot imaging system (Fuji, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Data are presented as means ± standard error of the mean (s.e.m.). Statistical significance was determined using the unpaired, two-sample Student's *t* test. *P* < 0.01 was considered statistically significant.

Results

T cell reconstitution in ZAP-70^{-/-} mice after i.p. thymocyte transfer

Instead of performing a conventional BM transplantation to correct the T cell deficiency in ZAP-70^{-/-} mice (for detailed reasons see Introduction above), we tested whether a simple i.p. transfer of WT thymocytes was a feasible method for the reconstitution of T cells in ZAP-70^{-/-} mice. To that end, we injected 5–10 × 10⁶ thymocytes into the peritoneal cavity of 3–4-week-old recipient mice and subsequently analysed blood and peripheral lymphoid organs for T cells. As ZAP-70^{-/-} mice have virtually no mature T cells in the peripheral lymphoid organs [5,6] (Supporting information, Figs S1 and S2), the appearance of T lymphocytes is a reliable sign of the successful adoptive transfer. First, for follow-up, we monitored the ratio of T cells in the peripheral blood: 10 days after the i.p. injection of thymocytes T cells had already appeared in the blood (~4%), and their ratio remained steady at between 4 and 6% during the 120 days of the monitoring (Fig. 1a). Four months after the i.p. thymocyte transfer, we killed recipient mice and performed a histological analysis of the peripheral lymph nodes (Fig. 1b) and spleen (Fig. 1b) which showed that, indeed, T cells appeared in the periphery, as the organs of mice receiving i.p. thymocyte transfer showed restored T cell areas (Fig. 1b A,C) in contrast to ZAP-70^{-/-} mice, where no peri-arteriolar lymphatic sheath (PALS) was seen in the spleen and lymph nodes also lacked defined T cell zones (Fig. 1b B,D and Supporting information, Fig. S1b).

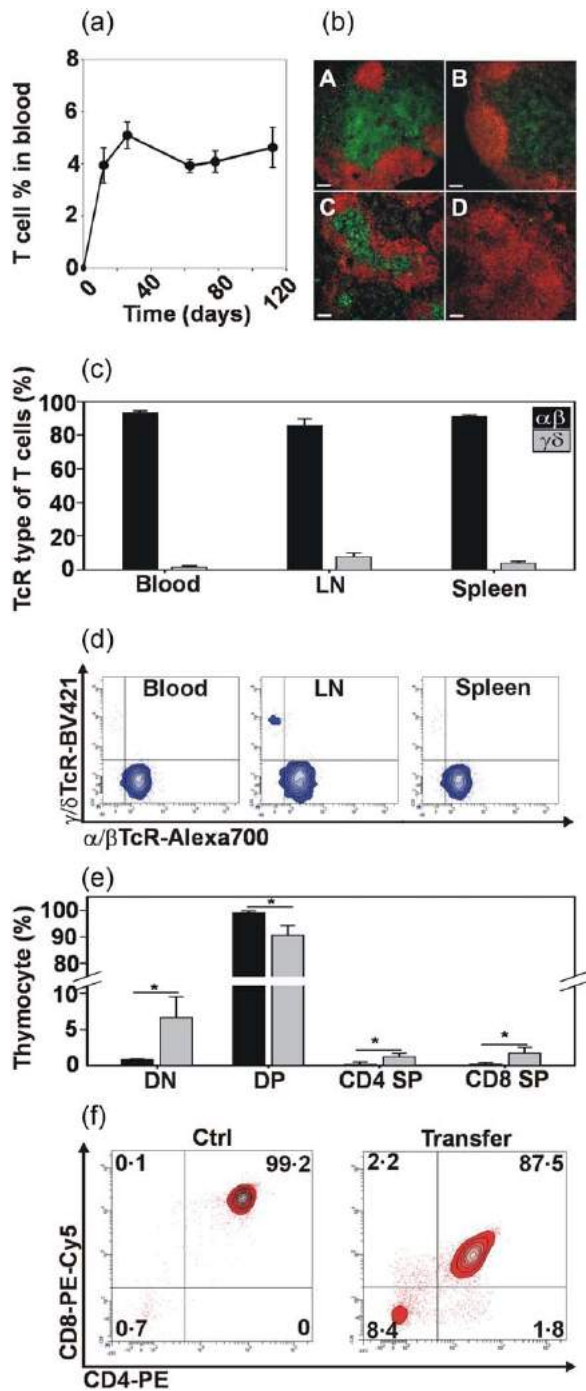


Fig. 1. Intrapерitoneal (i.p.) thymocyte transfer from wild-type (WT) mice reconstituted T cells on the long run in the peripheral lymphatic organs of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} mice. ZAP-70^{-/-} mice were injected with 10⁷ WT thymocytes i.p. at 3 weeks of age and observed up to several months. (a) Kinetics of T cell reconstitution. T cell percentage was assessed regularly by flow cytometric CD3 staining from peripheral blood samples until 4 months from the time of the transfer. Data points represent mean \pm standard error of mean (s.e.m.) values calculated from the data of seven mice. (b) Representative immunohistochemistry panels show lymph node (LN) (A) or spleen (C) isolated from mice, which underwent thymocyte transfer 4 months before killing. CD3⁺ T cells (green) and B220⁺ B cells (red) are shown at $\times 10$ magnification. ZAP-70^{-/-} LN (B) and spleen (D) sections are shown as negative controls. (c) T cell receptor (TCR) type was determined using antibodies against the $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ forms of the TCR by flow cytometric analysis. Bar diagram shows the percentages of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the blood, lymph nodes and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer. Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four mice. (d) Representative flow cytometric contour plots show the typical distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the blood, LN and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer 4 months before killing. (e) Composition of thymocytes was determined using anti-CD4/CD8 staining by flow cytometry [also see (f)]. Bar diagram shows the percentages of the four major thymocyte subpopulations (DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4 SP = CD4⁺ single-positive; CD8 SP = CD8⁺ single-positive) in control ZAP-70^{-/-} mice (black bars) and in those ZAP-70^{-/-} mice which received i.p. thymocyte transfer 4–8 months before killing (grey bars). Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four control and seven transferred mice. Statistically significant ($P < 0.01$) differences between groups of mice using unpaired Student's *t*-test are indicated (*). (f) Representative flow cytometric contour plots show the distribution of thymocytes based on their CD4 and CD8 staining. The left panel shows the typical thymocyte composition of a ZAP-70^{-/-} mouse, the right panel shows the thymus of a ZAP-70^{-/-} mouse, which received i.p. thymocyte transfer 8 months before killing. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Normally, the majority of mature T cells leaving the thymus carry TCR- $\alpha\beta$ [18]; however, in ZAP-70^{-/-} animals, where the T cell development is impaired [5], those few T cells that are present in the periphery (mainly the lymph nodes) express TCR- $\gamma\delta$ [6]. Here, we found that the TCR expression was normalized in recipients receiving thymocyte transfer: more than 80% of T cells expressed TCR- $\alpha\beta$ in the blood, lymph nodes and spleen (Fig. 1c,d).

Although we show here the results obtained 4 months after the i.p. thymocyte transfer (Fig. 1), in several cases we

monitored mice up to 12 months after the transfer and found that the T cell reconstitution remained stable even for these extended periods of time (data summarized in Supporting information, Fig. S3), which suggested the successful reconstitution of T cell development. The normalized lifespan of ZAP-70^{-/-} mice, which are otherwise seriously immunocompromised and susceptible to early death due most probably to infections, was further important evidence for the success of T cell repopulation. According to our experience, ZAP-70^{-/-} mice have a life expectancy of 7–10 weeks on average under conventional, non-SPF conditions (our observation).

To verify that the i.p. thymocyte transfer had indeed the potential to restore thymic T cell development in ZAP-70^{-/-} mice, thymocyte subpopulations were assessed 4–8 months after the transfer (Fig. 1e,f). We observed that, compared to the ZAP-70^{-/-} mice, where virtually all

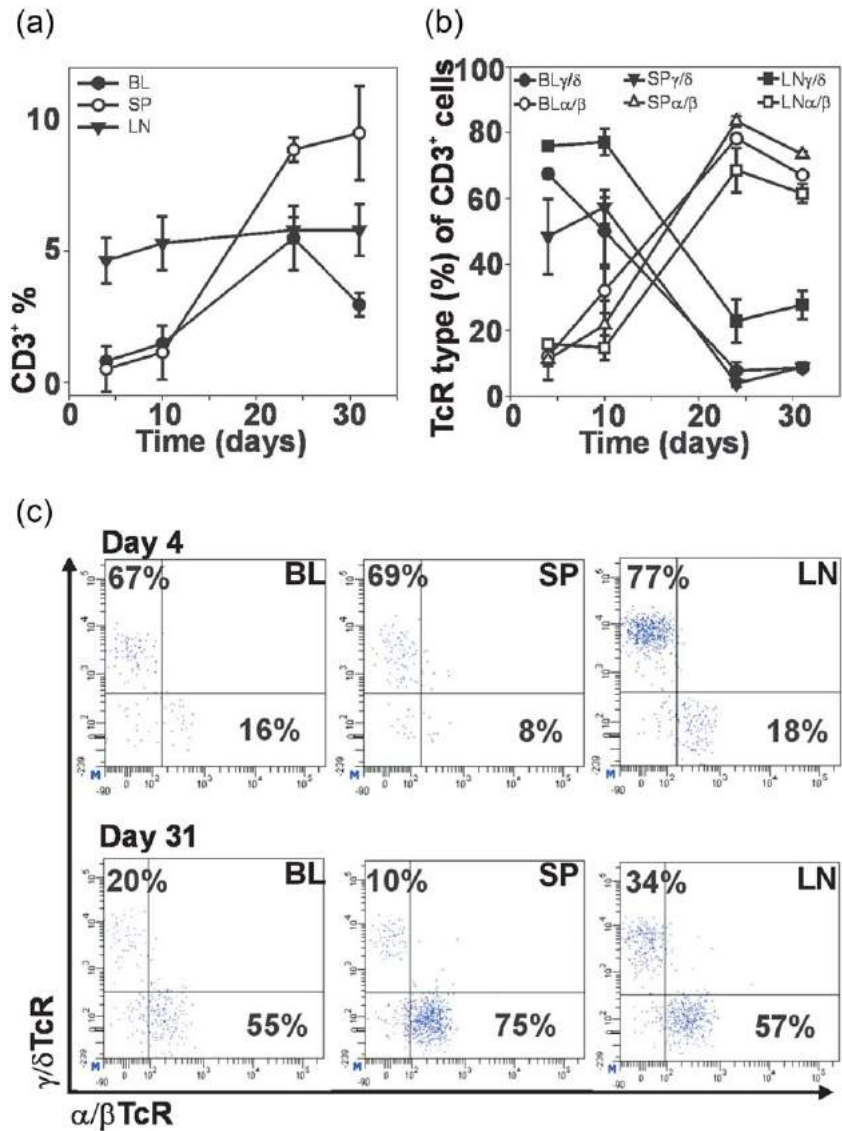


Fig. 2. Early time kinetics (1 month) of the T cell reconstitution of peripheral lymphoid organs in zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} recipient mice following an intraperitoneal (i.p.) thymocyte transfer from wild-type (WT) donor mice. (a) The number of T cells was assessed at days 4, 10, 24 and 31 in the blood (filled circles), lymph nodes (triangles) and spleen (empty circles) of recipient mice by staining with anti-CD3 antibody for flow cytometry. The diagram shows the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values calculated from the data of three mice killed at each time-point. (b) The T cell receptor (TCR) type of T cells was determined at days 4, 10, 24 and 31 in the blood (circles), lymph nodes (squares) and spleen (triangles) of recipient mice by staining with anti- $\alpha\beta$ (empty symbols) and $\gamma\delta$ (filled symbols) TCR-specific antibodies for flow cytometry. The diagram shows the mean \pm s.e.m. values calculated from the data of three mice killed at each time-point. (c) Representative flow cytometric dot-plots show the T cell distribution with anti- $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR-specific antibody staining in the blood (BL), spleen (SP) and lymph nodes (LN) at days 4 and 31 after the i.p. thymocyte injection. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

thymocytes are DP [5,6] (Supporting information, Figs S1 and S2), after transfer the thymocyte composition shifted: the ratio of DP thymocytes decreased from 99 ± 0.7 to 90.5 ± 3.7 , accompanied by a significant increase in CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes (from ~ 0 to 1.2 ± 0.6 and 1.7 ± 0.8 , respectively) (Fig. 1e,f). These findings implied that in the thymi of transferred mice some thymocytes were able to make the transition from DP to SP stage successfully.

Early kinetics of the T cell reconstitution in peripheral lymphoid organs after i.p. thymocyte transfer

First we observed that, in the blood, T cells already appeared 10 days after the i.p. thymocyte transfer. Thus, in the next set of experiments, we investigated the early kinetics of T cell reconstitution: the ratio of T cells was

assessed at days 4, 10, 24 and 31 after i.p. thymocyte transfer in the peripheral lymphoid organs of ZAP-70^{-/-} recipient mice (Fig. 2a). In the peripheral blood, the ratio of T cells reached 5.5% at day 24 and decreased slightly to 3% by day 31 (Fig. 2a). In the spleen, we observed a sudden increase between days 10 and 24 (from 1.1 to 8.9%), with the T cell ratio increasing further to 9.5% by day 31 (Fig. 2a). We think that this increase could be the combined result of both the increased immigration of T cells from the thymus (see next part of Results and Fig. 3) and local expansion of T cells in the spleen, which could be verified using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labelling or CD25 as proliferation/activation marker (data not shown). We detected only a slight increase in the T cell ratio (from 4.6% at day 4 to 5.8% at day 31) in the lymph nodes during the period assessed (Fig. 2a); however, the initial ratio of T cells was highest in the lymph nodes (due most probably to the presence

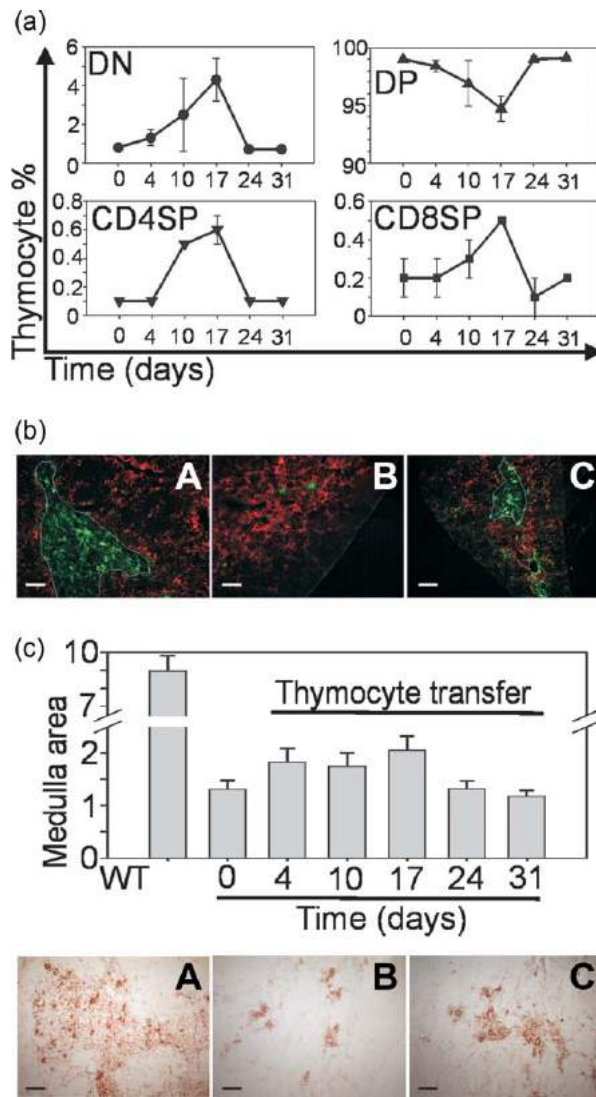


Fig. 3. Early time kinetics (1 month) of the cellular changes in the thymus of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} recipient mice following an intraperitoneal (i.p.) thymocyte transfer from wild-type (WT) donor mice. (a) Changes in the thymocyte subpopulations were assessed at days 0, 4, 10, 17, 24 and 31 after anti-CD4 and anti-CD8 labelling using flow cytometry. The diagram shows the changes in the percentages of the four major thymocyte subpopulations (DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4 SP = CD4⁺ single-positive; CD8 SP = CD8⁺ single-positive) in ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer. The diagram shows the mean ± standard error of the mean (s.e.m.) values calculated from the data of three mice killed at each time-point. (b) Histological compartments of the thymi were analysed with immunohistochemistry using anti-epithelial cell adhesion molecule 1 (EpCAM1) (green) and anti-Ly51 (red) antibodies specific for the medulla and the cortex, respectively. Representative thymus sections from wild-type (WT) (A), ZAP-70^{-/-} (B) and ZAP-70^{-/-} mice after i.p. thymocyte transfer (C) are shown at ×10 magnification. Medullary regions are highlighted by white borderline. (c) The area of the thymic medulla was analysed by immunohistochemistry using anti-EpCAM1 with peroxidase-labelled secondary antibody at days 0, 4, 10, 17, 24 and 31 after the i.p. thymocyte transfer. Four serial sections from thymi of WT, ZAP-70^{-/-} and ZAP-70^{-/-} mice were stained on the same slide and 20 images were taken from each sample and the EpCAM1-positive areas were analysed using the ImageJ image analysis software. Diagram shows the mean ± s.e.m. values calculated from the data of three mice killed at each time-point. Representative EpCAM1 immunohistochemistry images from WT (A), ZAP-70^{-/-} (B) and ZAP-70^{-/-} mice after i.p. thymocyte transfer (C) are shown at ×10 magnification. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

of $\gamma\delta$ T cells [6] (Supporting Information, Figs S1 and S2) (Fig. 2b,c).

Next, we investigated the kinetic changes in the distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the blood and peripheral lymphoid organs (Fig. 2b,c). At day 4, the majority of the T cells were $\gamma\delta$ T cells in the blood, spleen and lymph nodes ($67.4 \pm 1.3\%$, $48.5 \pm 11.4\%$ and $75.9 \pm 1\%$, respectively) (Fig. 2b,c). The ratio of $\gamma\delta$ T cells decreased constantly until day 24 ($7.7 \pm 2.6\%$) in the blood, while in the spleen and lymph nodes this change started only after day 10 (Fig. 2b,c). By day 24, the ratio dropped to $3.8 \pm 0.9\%$ in the spleen, but in the lymph nodes the percentage of $\gamma\delta$ T cells did not fall below $22.8 \pm 6.6\%$ (Fig. 2b,c). In parallel, the ratio of $\alpha\beta$ T cells increased steadily from $12 \pm 2.8\%$ (day 4) to $78.2 \pm 1.3\%$ (day 24) in the blood, and from $11.1 \pm 6.2\%$ (day 4) to $83.4 \pm 1.6\%$ (day 24) in the spleen (Fig. 2b,c). In the lymph nodes, the ratio of $\alpha\beta$ T cells did not change until day 10 ($15.8 \pm 1.1\%$ at day 4 *versus* $14.7 \pm 3.8\%$ at day 10), when an increase began ($68.6 \pm 6.7\%$ at day 24) (Fig. 2b,c).

After day 24, we measured a slight drop in the ratio of $\alpha\beta$ T cells in all organs until day 31 (Fig. 2b,c).

Investigation of the early changes in the thymus following i.p. thymocyte transfer

To assess the changes taking place in the thymus during the first 4 weeks following i.p. thymocyte transfer, thymocyte subpopulations were assessed at 0, 4, 10, 17, 24 and 31 days after the transfer. As already mentioned above, in ZAP-70^{-/-} mice the thymus is composed of almost only DP cells [5,6] (Fig. 1e,f, Supporting information, Figs S1 and S2.) Upon i.p. thymocyte transfer, we observed changes already in the thymocyte composition as early as 10–17 days (Fig. 3a). The ratio of CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) thymocytes elevated from 0.8 ± 0.1 to 4.3 ± 1.1 by day 17 while, simultaneously, the ratio of CD4⁺CD8⁺ DP cells dropped from 99 ± 0.7 to 94.7 ± 1.1 (Fig. 3a). In parallel, the ratio of mature SP cells started to increase after day 4, and reached a peak at day 17 in both the CD4⁺ ($0.6 \pm 0.1\%$) and CD8⁺ ($0.5 \pm 0.1\%$) SP subpopulations, indicating the restoration of thymic T cell development (Fig. 3a). Interestingly, the ratios reverted to the starting point in all thymocyte subpopulations by day 24 (Fig. 3a).

These results have raised the question of whether the observed changes were also mirrored by changes in the morphology of the thymus. The thymi of ZAP-70^{-/-} mice are characterized by the lack of distinct medullary regions [5] (Supporting information, Fig. S1, Fig. 3b B). Seventeen days after the i.p. thymocyte transfer, patches of reorganized medullary regions appeared (Fig. 3b C). Quantitative measurements (Fig. 3c) revealed that the area of the medullary regions changed parallel to that detected in the thymocyte subpopulations: i.e. an initial expansion of the medullary area until day 17 (from 1.3 ± 0.17 to 2.05 ± 0.27) was followed by a reduction in the size of the medulla (1.17 ± 0.12).

Detection of donor-derived T cells using GFP-transgenic thymocyte transfer

To confirm that the above-described T cell repopulation after i.p. thymocyte transfer in ZAP-70^{-/-} mice was indeed due to the development of stable chimerism, in the next experiments we used thymocytes derived from GFP-transgenic mice [14] as donors (Fig. 4). In this way we could trace the donor-originated cells in the lymphoid organs of recipients during the reconstitution of T cells. The ratio of T cells in peripheral blood was $31.6 \pm 6.4\%$ and $27.1 \pm 4.4\%$ at weeks 7 and 12 weeks after the transfer, respectively, $83.6 \pm 3.9\%$ and $78.5 \pm 6\%$ of which were GFP⁺, respectively (Fig. 4a). We investigated the cellular composition of the peripheral lymphoid organs of reconstituted mice and found that the percentage of T cells ranged between 16 and 24% in peripheral lymph nodes, mesenteric lymph nodes, spleen and Peyer's patches (Fig. 4b). Approximately 70% of the T cells were present in lymph nodes, while 87 and 90% of the T cells in the Peyer's patches and spleen were GFP⁺ donor cells, respectively (Fig. 4b). Fluorescent microscopic images supported the flow cytometric findings, as GFP⁺ cells could be visualized only in the T cell-rich PALS areas of the spleen, but not in the B cell follicles (Fig. 4c,d). We confirmed strong GFP expression in thymocytes isolated from the i.p. transferred-recipients using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), but only very low expression in the bone marrow of the same mice (Fig. 4e).

T cell reconstitution led to the development of functional T cells

Although, as already mentioned, the significantly elongated lifespan of the transferred mice clearly showed the recapitulation of the immune system by the newly developed T cells, we wanted to elaborate T cell functions directly. Therefore, we performed *in-vitro* T cell activation tests on isolated T cells from transferred mice (Fig. 5). We assessed cell proliferation and activation of donor T cells upon anti-CD3/CD28 stimulation (Fig. 5). We could detect similar tyrosine phosphorylation patterns and proliferative

capacity in the T cells from transferred mice as in T cells deriving from WT mice (Fig. 5a,b). These data showed clearly that the activation and proliferation of the donor-derived T cells was normal.

Donor thymocytes leave the peritoneal cavity through the milky spots of the omentum

The next interesting question regarded which pathways the injected thymocytes use to exit from the peritoneum. To address this, we injected CFSE-labelled thymocytes intraperitoneally (Fig. 6). After analysing various organs in the peritoneal cavity and the draining lymph nodes (mediastinal, inguinal, axillary) 12, 24, 48 and 72 h after the transfer (data not shown), we identified the omentum as the main collection site for thymocytes, as 45% of the lymphocytes isolated from the omentum were of donor origin (CFSE⁺) (Fig. 6a). Interestingly, the majority of these CFSE⁺ lymphocytes were of the CD4⁺CD8⁻ DN (86%) phenotype; only 12% were CD8⁺ SP (Fig. 6a). Whole mount images have shown that the CFSE⁺ donor cells were not scattered randomly in the omentum, but they formed aggregates at specific sites (Fig. 6b). To identify these specific entry zones, we performed immunofluorescent staining with a fibronectin-specific antibody, which revealed that the CFSE⁺ cell aggregates were localized in the lymphoid compartments of the omentum (known as 'milky spots') (Fig. 6c,d).

Discussion

ZAP-70 is an essential molecule in T cell development, as illustrated by ZAP-70^{-/-} mice [5,6], and those rare SCID patients who have mutations in this molecule [4] leading to the absence of mature T cells in the periphery, resulting in severe immunodeficiency. In our present work we demonstrated that, with the i.p. adoptive transfer of ZAP-70^{+/+} (WT) thymocytes, T cells can be reconstituted stably, thus correcting the immunodeficiency in ZAP-70^{-/-} mice.

Most T cell reconstitution studies so far have concentrated on analysing the reconstitution of T cells after the transfer of BM HSC into irradiated hosts [19–22]; furthermore, adoptive transfer of cells isolated from fetal liver or neonatal spleen [23], committed T cell progenitors [24], double-positive thymocytes [11], isolated thymocytes [12,13] and *in-vitro*-generated T cell precursors (reviewed in [20]) have also been studied. Here, we have shown that with a single, simple i.p. injection of 5–10 million thymocytes from WT (ZAP-70^{+/+}), donor mice corrected the T cell deficiency effectively in the long term. The correction of the immunodeficiency was shown clearly by the significantly longer survival of transferred ZAP-70^{-/-} animals: ZAP-70^{-/-} mice usually have a short lifespan (see above); however, some of the transferred animals were alive even 8–10 months after the i.p. injection. The efficacy of long-

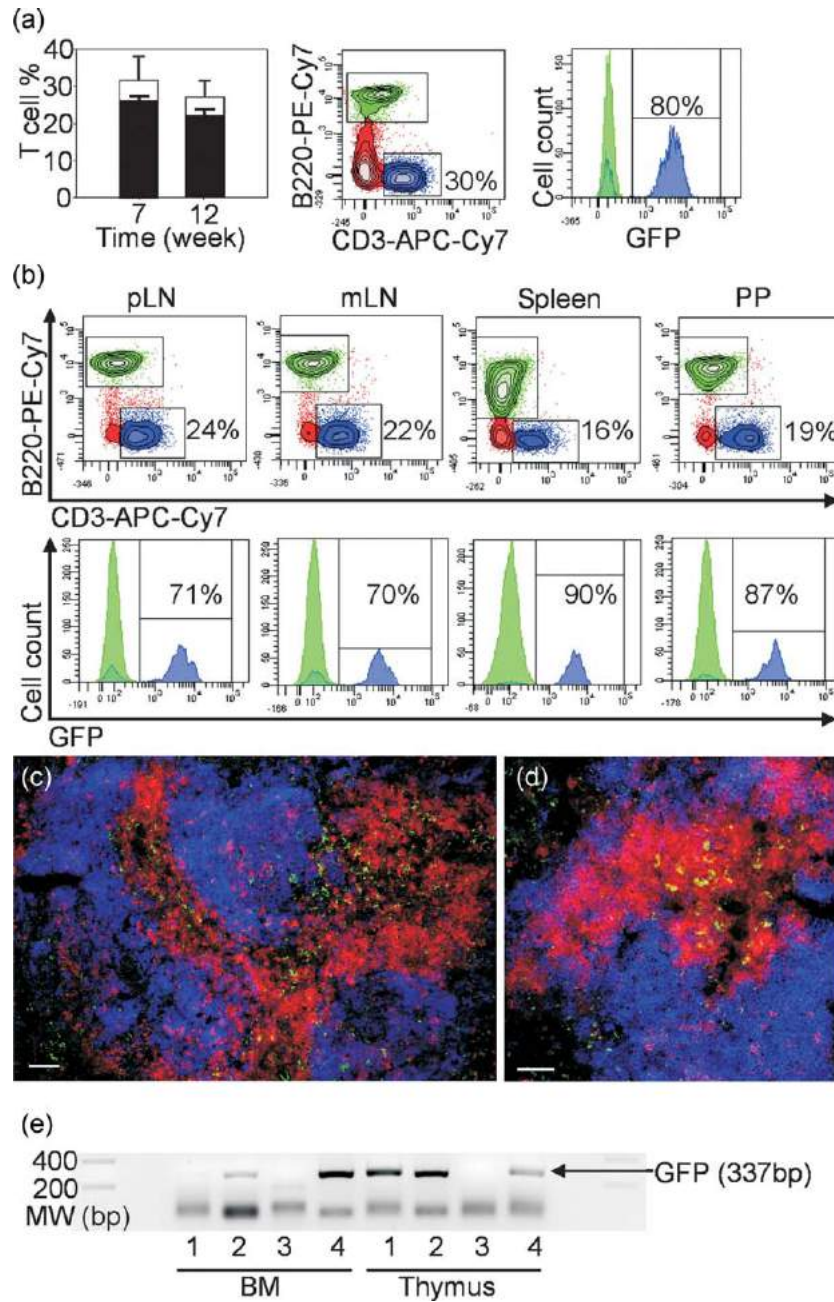


Fig. 4. Characterization of the T cell reconstitution using green fluorescent protein (GFP)-expressing donor thymocytes. (a) Zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} mice were injected intraperitoneally (i.p.) with thymocytes from GFP-transgenic donor mice. Blood lymphocytes were evaluated 7 and 12 weeks after the injection for CD3 and B220 staining as well as GFP expression. Bar diagram shows the mean ± standard error of the mean (s.e.m.) values of the T cell percentage (open bar) and the corresponding GFP⁺ fraction (black bar) of T cells calculated from the data of six mice killed at each time-point. Representative flow cytometric plots show the distribution of B (B220⁺; green population) and T (CD3⁺; blue population) cells (contour plot) and their GFP expression (histogram) in the blood. (b) Representative flow cytometric plots show the GFP expression of B (B220⁺; green population) and T (CD3⁺; blue population) cells in the peripheral (pLN) or mesenteric lymph nodes (mLN), the spleen and the Peyer's patches (PP) from ZAP-70^{-/-} mice, which were transferred with thymocytes from GFP-transgenic donor mice. (c,d) Representative images (at ×10 and ×20 magnification, respectively) from the spleen of a ZAP-70^{-/-} mouse, which was transferred with thymocytes from GFP-transgenic donor mice, show immunohistochemistry using anti-CD5-phycoerythrin (PE) (red) and anti-B220-AlexaFluor670 (blue) antibodies. GFP-positive cells (green) appear mainly in the T cell-rich areas (red) of the periarteriolar lymphatic sheath (PALS). (e) Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) image shows the GFP expression of bone marrow cells and thymocytes isolated from two GFP-thymocyte-transferred ZAP-70^{-/-} (lanes 1 and 2), one BALB/c (lane 3) and one GFP-transgenic (Tg) mice (lane 4). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

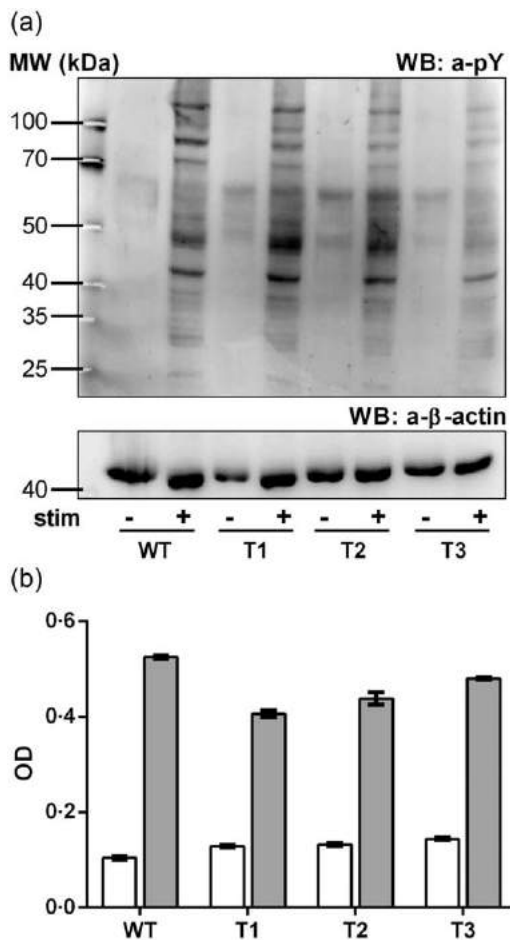


Fig. 5. *In-vitro* functional testing of donor T cells. (a) Western blot shows the anti-CD3/CD28-induced tyrosine phosphorylation. Cell lysates from non-stimulated and stimulated T cells derived from wild-type (WT) or transferred mice (T1, T2, T3) were separated on 10% sodium dodecyl sulphide-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and visualized with anti-phosphotyrosine (aPY) antibody (upper panel). Equal sample loading was verified by reprobating the same blot with anti- β -actin antibody (lower panel). (b) *In-vitro* proliferation test of activated T cells was assessed with Promega CellTiter 96[®] non-radioactive cell proliferation assay. The diagram shows the optical density values (OD) of non-stimulated (white) and anti-CD3/CD28-stimulated (grey) samples. Results are presented as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values calculated from triplicates of each sample.

term T cell reconstitution was confirmed by the presence of mature $\alpha\beta$ T cells up to several months after the transfer in blood and peripheral lymphoid organs, with the majority expressing TCR- $\alpha\beta$. Histological analysis revealed that the lymph node and spleen microstructure in transferred animals was similar to WT, suggesting that transfer-originated T cells were able to restore the disrupted morphology of ZAP-70^{-/-} peripheral lymphoid organs to normal. Furthermore, using GFP-transgenic thymocytes we could demonstrate clearly that the T cell repopulation was donor-derived.

The long-term stability of our chimeras suggested a continuous T cell production; thus, the possibility of thymic repopulation was also investigated. We have already observed SP thymocytes appearing in the thymus of ZAP-70^{-/-} recipient mice 17 days after the i.p. injection of WT thymocytes accompanied by an increase in the area of the medullary region, indicating that the thymic T cell development was reset by the treatment. Cross-talk between thymic epithelial cells and thymocytes during T cell

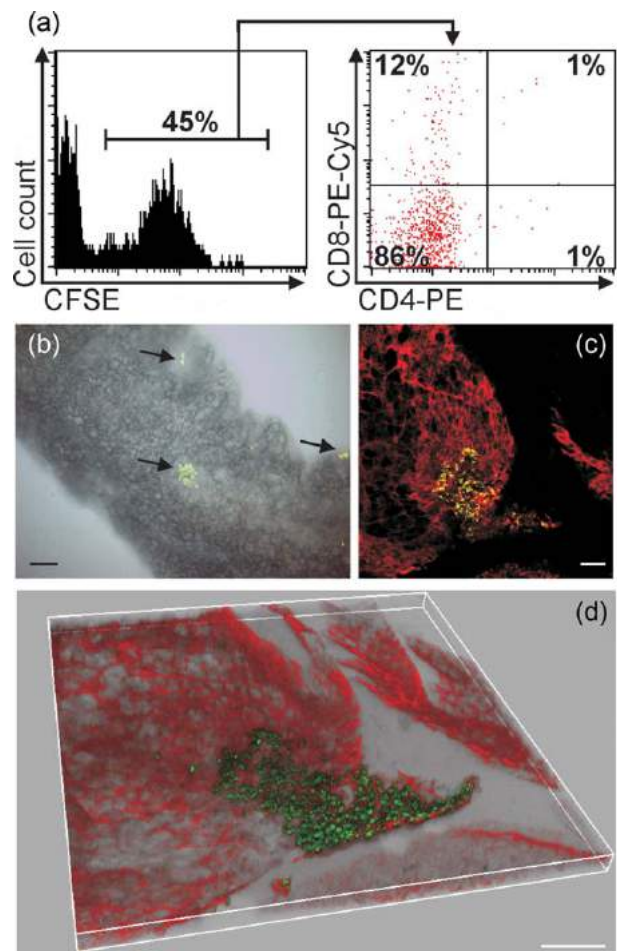


Fig. 6. Donor thymocytes exit from the peritoneal cavity via milky spots found in the omentum. Carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labelled thymocytes were injected intraperitoneally (i.p.) into zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} mice, then the omentum was isolated after 24/48 h. (a) Flow cytometric analysis showed that the CFSE⁺ thymocytes entered the omentum (left histogram). Cell surface staining of the CFSE⁺ population for CD4 and CD8 (right dot-plot). (b) Light microscopy whole mount preparation shows the CFSE⁺ cells entering into the omentum at specific sites as small cell aggregates (indicated by arrows). (c,d) Confocal microscopy image of CFSE⁺ donor thymocytes from the omentum of ZAP-70^{-/-} mice. Fibronectin was labelled with red. Representative images show two-dimensional slice (c) and three-dimensional reconstruction (d). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

development have been studied extensively [25]. Here, the re-organization of the medullary region took place after i.p. thymocyte transfer, which was in line with a previous study [10]. In another study, SP cells appeared in the thymus with similar kinetics, i.e. 3 weeks after intrathymic electroporation of ZAP-70 coding plasmids [8]. As ZAP-70-deficient host thymocytes suffer a developmental block at the DP stage, the appearance of SP cells suggests that they originated from the donor ZAP-70^{+/+} thymocyte population. The continuous increase in the ratio of T cells in peripheral blood, following the appearance of SP cells in the thymus with a lag (peak at day 21), suggested that these SP cells populated the peripheral lymphoid organs successfully. By day 21, $\alpha\beta/\gamma\delta$ T cell ratios in peripheral lymphoid organs resembled WT, providing further proof of donor thymocytes being able to repopulate host lymphoid organs in the form of mature $\alpha\beta$ T cells.

Interestingly, the changes observed in the thymus (appearance of SP cells and medullary islets) became more pronounced 4–8 months after i.p. transfer than in the first month, although the composition of thymocytes was still far from WT (data not shown). However, similar percentages of SP thymocytes were reported by others [9].

Overall, the emergence of SP thymocytes and medullary epithelial cells suggested that during the first month following the i.p. thymocyte transfer a wave of T cell development took place, which was followed by long-term thymic recovery which generated T cells for several months.

As these findings implied that the injected thymocytes were capable of entering the thymus, we also analysed which route the thymocytes could have used to leave the peritoneum. Although it was described earlier that the mediastinal and ipsilateral inguinal lymph nodes drain the peritoneal cavity after i.p. transfer of cells [26], in our experiments we have observed no CFSE-labelled donor cells in these localizations (data not shown). Contrary to this, significant CFSE⁺ cell aggregates were present in the omental milky spots, which were already described as gateways for trafficking of B2-B cells [27], dendritic cells [28] and preferential sites for tumour cell adhesion (reviewed in [29]). The morphology of milky spots resembles that of secondary lymphoid organs; however, they are covered by a discontinuous layer of mesothelial cells [30]. These intracellular gaps might also serve as entry sites for i.p. injected cells homing via lymphatic vessels and blood capillaries [31]. We have observed that the majority of CFSE⁺ cells in the omentum were the most immature CD4⁻CD8⁻ DN thymocytes, which might suggest that this population was the main source of donor thymocytes that entered the host thymus and supported the development of mature SP thymocytes.

Based on these results, we propose the following mechanism of the T cell recovery in ZAP-70^{-/-} mice after WT thymocyte transfer. When we injected thymocytes into the peritoneal cavity of recipient mice, we transferred a mixed cell population containing approximately 3–5% DN, 75–80% DP, 10–15% CD4 SP and 5–10% CD8 SP cells [32].

This means that both immature (DN and DP) and mature SP cells entered the recipient. We hypothesize that this mixed cell population repopulated the recipient's lymphoid organs in a complex manner. First, mature SP cells most probably have the capacity to enter peripheral lymphoid organs/tissues, where they could augment the immune response relatively quickly. This peripheral homeostatic expansion could be beneficial, especially in the early stages of the transfer to recapitulate the immune response (at least partially) and promote survival. Conversely, immature cells could have the potential to repopulate primary lymphoid organs and provide a long-term, stable T cell production for several months after the transfer. As DP cells are extremely sensitive to apoptosis [33], in our view they might not play a key role in restoring the T cell development. Instead it is more likely, and also supported by the aggregation in the omentum, that the DN most immature T cells reached the thymus and/or the bone marrow and they colonized these organs. As the recipient's own T cell progenitors do not have the capacity to mature into SP cells [5,6] there is a selective survival advantage of the ZAP-70^{+/+} donor cells. The need for relatively high donor cell numbers could also be a consequence of the following: DN cells represent < 5% of thymocytes, i.e. in the case of 10⁷ donor cells this means $\sim 5 \times 10^5$ cells. Initially, we also tried to transfer 1–2 million donor thymocytes, but the success rate was considerably lower (~ 10 –20%, data not shown), which might be due to the inadequate number of DN cells to repopulate the thymus.

In summary, we have demonstrated that i.p. injected ZAP-70^{+/+} thymocytes were able to enter the thymus of ZAP-70^{-/-} mice, reorganize its morphology and restore T cell development. Mature, donor-originated $\alpha\beta$ T cells were present in the peripheral blood and lymphoid organs, where they were organized into structured T cell zones. The established chimerism was stable in the long term as the immunodeficiency of ZAP-70^{-/-} mice was resolved, as shown by the long-term survival of mice after thymocyte transfer.

Finally, we believe that our work could have some important practical implications. First, this new and simple transfer technique could provide benefits for those researchers who work with ZAP-70^{-/-} mice. As the transferred mice become immunocompetent and their breeding is possible, they could be extremely useful for researchers who need larger quantities of ZAP-70^{-/-} mice for different *in-vitro* or *in-vivo* experiments (e.g. haemopoietic stem cell or embryonic liver cell isolation for *ex-vivo* genetic manipulation or genetic engineering of ZAP-70^{-/-} embryos). The simplicity and low risk of our transfer approach could be beneficial in such laboratories where the technically more challenging bone marrow transfer is not available. Secondly, although we are still far from the successful restoration of T cell deficiency caused by ZAP-70 deficiency in humans, we hope that our results could also contribute to the development of new therapeutic approaches in future.

Author contributions

R. K., Z. K., L. P. and K. O. performed the experiments, F. B. and P. B. assisted in the experiments, Z. K. and K. O. took part in the breeding of mice, R. K. and F. B. prepared the manuscript, T. B. and P. B. helped in the study design and gave useful advice during manuscript preparation and F. B. conceived the study, finalized the manuscript and was in charge of the project.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian National Research Fund (NKFIH, formerly OTKA) (grant number OTKA K101493 to F. B.); and Research Grant from the Medical Faculty of the University of Pecs (grant number KA-2015-23 to K. O.); the Janos Bolyai Research Scholarship from the Hungarian Academy of Sciences (grant number BO/00086/12/5 to F. B.) and a Post-Doctoral Research Scholarships from the Hungarian Academy of Sciences (grant number 716/180/2014/KIF to K. O.) and the Medical Faculty of the University of Pecs (grant number KA-POSTDOK-12-05 to K. O.). The project has been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund: Projects 'Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs' (EFOP-3.6.1.–16–2016-00004) and 'PEPSYS – Complexity of peptide-signalization and its role in systemic diseases' (GINOP 2.3.2.–15-2016-00050).

Disclosure

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

References

- Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**:9166–70.
- Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 1993; **73**: 209–12.
- Palacios EH, Weiss A. Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J Exp Med* 2007; **204**:1703–15.
- Elder M, Lin D, Clever J *et al.* Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994; **264**:1596–9.
- Negishi I, Motoyama N, Nakayama K *et al.* Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995; **376**:435–8.
- Kadlecek TA, van Oers N, Lefrancois S *et al.* Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development. *J Immunol* 1998; **161**:4688–94.
- Adjali O, Marodon G, Steinberg M *et al.* In vivo correction of ZAP-70 immunodeficiency by intrathymic gene transfer. *J Clin Invest* 2005; **115**:2287–95.

- Irla M, Saade M, Kissenpfennig A *et al.* ZAP-70 restoration in mice by in vivo thymic electroporation. *PLoS One* 2008; **3**: e2059.
- Adjali O, Vicente RR, Ferrand C *et al.* Intrathymic administration of hematopoietic progenitor cells enhances T cell reconstitution in ZAP-70 severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:13586–91.
- Vicente R, Adjali O, Jacquet C, Zimmermann VS, Taylor N. Intrathymic transplantation of bone marrow-derived progenitors provides long-term thymopoiesis. *Blood* 2010; **115**:1913–20.
- Tamauchi H, Tamaoki N, Habu S. CD4+CD8+ thymocytes develop into CD4 or CD8 single-positive cells in athymic nude mice. *Eur J Immunol* 1988; **18**:1859–62.
- Lair SV, Lozzio BB. Thymocyte reconstitution of athymic and athymic-splenic mice: graft rejection and antibody synthesis. *Exp Cell Biol* 1980; **48**:439–44.
- Goldschneider I, Komschlies KL, Greiner DL. Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med* 1986; **163**:1–17.
- Kvell K, Czömpöly T, Hiripi L *et al.* Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* 2010; **19**:105–12.
- Boldizsar F, Tarjanyi O, Nemeth P, Mikecz K, Glant TT. Th1/Th17 polarization and acquisition of an arthritogenic phenotype in arthritis-susceptible BALB/c, but not in MHC-matched, arthritis-resistant DBA/2 mice. *Int Immunol* 2009; **21**:511–22.
- Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem* 2004; **52**:1287–98.
- Martinez-Santibañez G, Cho KW, Lumeng CN. Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. *Methods Enzymol* 2014; **537**:17–30.
- Attaf M, Legut M, Cole DK, Sewell AK. The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune system. *Clin Exp Immunol* 2015; **181**:1–18.
- Cuddihy AR, Suterwala BT, Ge S *et al.* Rapid thymic reconstitution following bone marrow transplantation in neonatal mice is VEGF-dependent. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; **18**: 683–9.
- Holland AM, Zakrzewski JL, Goldberg GL, Ghosh A, van den Brink MRM. Adoptive precursor cell therapy to enhance immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation in mouse and man. *Semin Immunopathol* 2008; **30**: 479–87.
- Alpdogan O, Muriglan SJ, Eng JM *et al.* IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2003; **112**:1095–107.
- Wils E-J, Braakman E, Verjans GMGM *et al.* Flt3 ligand expands lymphoid progenitors prior to recovery of thymopoiesis and accelerates T cell reconstitution after bone marrow transplantation. *J Immunol* 2007; **178**:3551–7.
- Kelly KA, O'Brien R, Born W. Reconstitution of SCID mice with haemopoietic precursors: a detailed analysis of gamma delta T-cell reconstitution. *Immunology* 1997; **91**:65–72.
- Dejbakhsh-Jones S, Garcia-Ojeda ME, Chatterjea-Matthes D, Zeng D, Strober S. Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:7455–60.

- 25 Lucas B, McCarthy NI, Baik S *et al.* Control of the thymic medulla and its influence on $\alpha\beta$ T-cell development. *Immunol Rev* 2016; **271**:23–37.
- 26 Kool M, Soullié T, van Nimwegen M *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008; **205**:869–82.
- 27 Berberich S, Dähne S, Schippers A *et al.* Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. *J Immunol* 2008; **180**:2196–203.
- 28 Creusot RJ, Yaghoubi SS, Chang P *et al.* Lymphoid-tissue-specific homing of bone-marrow-derived dendritic cells. *Blood* 2009; **113**:6638–47.
- 29 Chkourko Gusky H, Diedrich J, MacDougald OA, Podgorski I. Omentum and bone marrow: how adipocyte-rich organs create tumour microenvironments conducive for metastatic progression. *Obes Rev* 2016; **17**:1015–29.
- 30 Cao L, Hu X, Zhang J, Huang G, Zhang Y. The role of the CCL22-CCR4 axis in the metastasis of gastric cancer cells into omental milky spots. *J Transl Med* 2014; **12**:267.
- 31 Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Carragher DM *et al.* Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* 2009; **30**:731–43.
- 32 Ceredig R, Rolink T. Opinion: a positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**:888–97.
- 33 Pozzesi N, Fierabracci A, Liberati AM *et al.* Role of caspase-8 in thymus function. *Cell Death Differ* 2014; **21**:226–33.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Fig. S1. Comparative immunohistochemistry analysis from the lymphatic organs of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{+/+} and ZAP-70^{-/-} mice. ZAP-70^{+/+} (a) and ZAP-70^{-/-} (e) thymi were stained with anti-CD4-phycoerythrin (PE) (red) and anti-CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC) (green) or anti-epithelial cell adhesion molecule 1 (EpCAM1)-FITC (green) and anti-Ly51-PE (red) (b,f). Note that on panels (a) and (e), yellow areas show the CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocyte-rich cortical areas of the thymi. ZAP-70^{+/+} and ZAP-70^{-/-} lymph nodes (c,g) and spleen (d,h) were stained to distinguish T and B cells with anti-CD3-FITC (green) and anti-B220-AlexaFluor647 (red), respectively.

Fig. S2. Comparative flow cytometric analysis from the lymphatic organs of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{+/+} and ZAP-70^{-/-} mice. ZAP-70^{+/+} and

ZAP-70^{-/-} blood, lymph nodes and spleen were stained with anti-CD3 and anti-B220 antibodies to distinguish T and B cells. Thymi were stained with anti-CD4 and anti-CD8 to distinguish the four major thymocyte subpopulations. (a) Bars show the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values of the T and B cell percentage in the different peripheral lymphatic organs and the thymocyte subpopulations calculated from the data of four mice. (b) Representative flow cytometric contour plots show the typical T and B cell distribution in the blood, spleen, lymph nodes and thymus of ZAP-70^{+/+} and ZAP-70^{-/-} mice.

Fig. S3. Long-term effect of the intraperitoneal (i.p.) thymocyte transfer. Zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} mice was evaluated 12 months after a single i.p. transfer with 10⁷ thymocytes isolated from ZAP-70^{+/+} mice. (a) Bars show the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values of the T (black bars) and B cell (open bars) percentage in the peripheral lymphatic organs calculated from the data of four transferred mice. (b) Representative flow cytometric density plots show the typical T and B cell distribution in the lymph nodes and spleen of transferred ZAP-70^{-/-} mice. (c) T cell receptor (TCR) type was determined using antibodies against the $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ forms of the TCR by flow cytometric analysis. Bar diagram shows the percentages of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the lymph nodes and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer. Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four mice. (d) Representative flow cytometric dot plots show the typical distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the lymph nodes and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer 12 months before killing. (e) Composition of thymocytes was determined using anti-CD4/CD8 staining by flow cytometry [also see (f)]. Bar diagram shows the percentages of the four major thymocyte subpopulations (DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4 SP = CD4⁺ single-positive; CD8 SP = CD8⁺ single-positive) in those ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer 12 months before killing. Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four mice. (f) Representative flow cytometric density plot shows the distribution of thymocytes isolated from ZAP-70^{-/-} mouse, which received i.p. thymocyte transfer 12 months before killing based on their CD4 and CD8 staining.

Review Article

Enigma of IL-17 and Th17 Cells in Rheumatoid Arthritis and in Autoimmune Animal Models of Arthritis

Reka Kugyelka,¹ Zoltan Kohl,¹ Katalin Olasz,¹ Katalin Mikecz,² Tibor A. Rauch,² Tibor T. Glant,² and Ferenc Boldizsar¹

¹Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Szigeti ut 12, Pécs 7624, Hungary

²Section of Molecular Medicine, Rush University Medical Center, 1735 West Harrison Street, Chicago, IL 60612, USA

Correspondence should be addressed to Ferenc Boldizsar; boldizsar.ferenc@pte.hu

Received 25 September 2015; Accepted 3 January 2016

Academic Editor: Julio Galvez

Copyright © 2016 Reka Kugyelka et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common autoimmune disorders characterized by the chronic and progressive inflammation of various organs, most notably the synovia of joints leading to joint destruction, a shorter life expectancy, and reduced quality of life. Although we have substantial information about the pathophysiology of the disease with various groups of immune cells and soluble mediators identified to participate in the pathogenesis, several aspects of the altered immune functions and regulation in RA remain controversial. Animal models are especially useful in such scenarios. Recently research focused on IL-17 and IL-17 producing cells in various inflammatory diseases such as in RA and in different rodent models of RA. These studies provided occasionally contradictory results with IL-17 being more prominent in some of the models than in others; the findings of such experimental setups were sometimes inconclusive compared to the human data. The aim of this review is to summarize briefly the recent advancements on the role of IL-17, particularly in the different rodent models of RA.

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disorder characterized by chronic synovitis leading to the progressive destruction of joints accompanied by systemic inflammation and the production of autoantibodies [1]. RA affects 0.5–1 percent of the human population making it one of the most common autoimmune disorders. Since the first modern description of the disease in 1800 [2], our knowledge regarding the pathomechanisms of RA has expanded to such a degree that specific therapies targeting various modulators of the inflammatory phase could be introduced, truly revolutionizing the treatment of RA. Yet little is known about how and when the disease starts although the new therapeutic agents proved to be much more effective than the conventional drugs used earlier. However, these disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) do not alter the autoimmunity per se; they do not lead to remission in all of

the patients. The central role of TNF α in the inflammatory phase of RA has been described earlier, but with the description of Th17 cells and the involvement of IL-17 in RA some new potential treatment options became available only recently [3]. Our review will mainly focus on the role of IL-17 in RA, particularly the rodent models of the disease, which all contributed to the development of novel therapeutic agents.

2. Th17 Cells in RA

The synovitis in RA is characterized by massive cellular infiltration of the synovium consisting mainly of leukocytes such as T and B cells, macrophages, granulocytes, and dendritic cells together with the increased local production of proinflammatory cytokines and chemokines, eventually leading to the destruction of the joint and bone. T cells, especially CD4⁺ T cells, play a major role in this process, also supported by

the effective use of Abatacept in the treatment of RA, an agent that selectively blocks T cell costimulation [4]. For a long time RA was considered to be a Th1-dependent disease. However, following the description and characterization of IL-17 and Th17 cells, more and more data indicated that these latter types of CD4⁺ cells are key players in the development of RA and that anti-IL-17 therapies might have beneficial effects [3].

Th17 cells are a subgroup of helper T cells with the capability to produce high levels of IL-17 described as their main characteristic along with the expression of the chemokine receptor CCR6 and the transcription factor ROR γ t (RAR-related orphan receptor gamma t) [5]. In humans, Th17 commitment requires the production of mainly IL-1 β , IL-6, IL-21, and IL-23, all of which are produced by tissue-resident activated macrophages and dendritic cells in an inflammatory environment [6, 7]. These members of the innate immune system are not only capable of inducing Th17 commitment but they also participate in the recruitment of Th17 cells to the site of inflammation through the production of chemokines that bind CCR6. CCR6 is expressed by a variety of cells such as immature dendritic cells, regulatory T cells (T_{reg}), and Th22 and Th17 cells. An increased proportion of CCR6⁺ Th17 cells were described in the peripheral blood of patients with early untreated RA [8], and Th17 cells infiltrated the joints as these cells were detected both in the synovial fluids and in synovial membranes of RA patients [9, 10]. While the number of Th17 cells in the peripheral blood does not seem to be a reliable diagnostic tool to date, their increased presence in the synovial fluid correlates with increased disease activity in RA [11].

In addition to elevated IL-17 levels, an increased concentration of CCL20 was also detected in the synovial fluid of RA patients, and *in vitro* cultured synovial fibroblasts of RA patients were capable of producing CCL20 after treating them with IL-1 and TNF α [12, 13]. It was demonstrated that CCL20 acts as a chemoattractant of the CCR6 expressing Th17 cells in mice. Human peripheral blood Th17 also expressed CCR6 (see above); thus CCL20 might be a key element in the recruitment of Th17 cells to the inflamed joints of RA patients [13]. Therefore, CCL20 is the most significant ligand of CCR6, and the CCL20/CCR6 axis may serve as potential therapeutic target.

3. Discovery of IL-17

Interleukin-17 (IL-17), originally termed as CTLA-8, was first identified in 1993 as a transcript from a cDNA library derived from a T cell hybridoma generated by the fusion of murine cytotoxic T cells and rat T cell lymphoma cells [14]. The sequence showed 58% identity to the Herpesvirus Saimiri gene 13 (HSV13) and both the recombinant CTLA-8 and HSV13 stimulated the NF- κ B pathway leading to increased IL-6 production in fibroblasts and also stimulated T cell proliferation acting similarly as the proinflammatory cytokines [15, 16]. Later, the CTLA-8 was renamed IL-17 [15] and in 1996 the originally identified rat CTLA-8 was confirmed as a homologue of the murine IL-17 [17].

In 1986, murine helper T cells were divided into Th1 and Th2 subtypes based on the cytokines they produced

[18]. According to this hypothesis the naive CD4⁺ T cells could differentiate either into IFN γ -producing Th1 or IL-4-producing Th2 cells, a process which is controlled mainly by the antigen presenting cells (APC) [19]. The discovery of IL-17 greatly challenged the former bipolar classification of helper T cells [20]. First, the amino acid sequence of IL-17 significantly differed from other cytokines previously described, and the structure of its receptor did not fit into those of other cytokine receptor families, making IL-17 a seemingly distinct signaling molecule. Subsequently, it was demonstrated that naive T cells primed with the lysate of *Borrelia burgdorferi* develop a phenotype characterized by markedly increased IL-17 production. However, IL-17 could not be classified as a Th1 or Th2 cytokine, which led to the discovery of Th17 cells as a distinct CD4⁺ T cell population [21]. Since then, a large number of studies have been performed to reveal the physiological role of IL-17 and Th17 cells, as well as their participation in pathological conditions. One of the most targeted areas was the autoimmunity including RA, multiple sclerosis, and psoriasis. Regarding the detailed structure and signaling pathways of IL-17 and IL-17R we refer to some previous reviews on the subject [22, 23]. Briefly, the IL-17 cytokine family consists of six currently known members (IL-17A–F) and five receptors (IL-17RA–RE) in mammals. IL-17A is the most prominent member of the family and is simply referred to as IL-17 by many authors. IL-17A and IL-17F are closely related, both secreted by Th17 cells and having an amino acid sequence homology of 50%. IL-17A can form homodimers, or heterodimers with IL-17F; both forms are biologically active through the binding of IL-17-RA, although the IL-17A homodimer is more potent [24].

4. The Role of IL-17 in Rheumatoid Arthritis (RA)

The human IL-17A was first cloned in 1996 and, first time, it was found to be produced by activated CD45(RO)⁺ memory helper T cells [25]. It was shown in the same study that IL-17A induces the production of IL-6, IL-8, PGE₂, and G-CSF in a dose-dependent manner in cultures of RA synovial fibroblasts. The IL-17A effect was blocked with anti-IL-17 antibodies [25]. Interestingly, TNF α had an additive effect on IL-17-induced secretion of IL-6. Soon after these observations it was found that synovial fluids of RA patients have high IL-17A levels compared to those with osteoarthritis. IL-4 or IL-13 completely inhibited the IL-17 production of *ex vivo* cultured RA synovium tissue [25], whereas exogenous IL-17 increased IL-6 production in synovial tissue cultures. These observations led to the conclusion that through the production of other proinflammatory cytokines, IL-17 has a significant, if not a central, role in the pathogenesis of RA [25].

5. IL-17 Regulates Bone Resorption in Human RA

Destruction of the articular cartilage accompanied by the juxta-articular bone resorption and marginal erosions in the bone are prominent histological features of RA [1].

Osteoclasts are large, multinucleated cells responsible for the degradation of bone [26]. It has been shown that certain cytokines play a major role in the differentiation of osteoclasts, although this field is complicated to study because many cytokines have both stimulatory and antagonistic effects on osteoclastogenesis, and their net effect is determined mainly by the specific bone microenvironment [27]. The cytokines promoting osteoclastogenesis act mostly via the RANKL expression, although some proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF α might be able to induce osteoclastogenesis independently of RANKL. The introduction of TNF α -inhibitors along with IL-1 and IL-6 antagonizing therapies further confirmed that these cytokines play a crucial role in bone and cartilage destruction, as these drugs proved to have a major protective effect on bone resorption [28].

IL-17, in particular, is also considered to be osteoclastogenic [29]. In an *in vitro* model of osteoclastogenesis, cocultured murine osteoblasts and hematopoietic cells were treated with IL-17 derived from the synovial fluids of RA patients resulting in an increased IL-17-dependent osteoclastogenesis [30]. Interestingly, this also induces an increased PGE₂ production in osteoblasts, and the addition of a COX2 inhibitor (e.g., indomethacin) had an inhibitory effect on osteoclast formation [30]. Later, it was shown that IL-17 is involved in increased bone resorption in human RA bone explant cultures and enhanced proteoglycan loss from mouse cartilage [31]. Another research group reported that IL-17 promoted osteoclastogenesis *in vitro* from human CD14⁺ osteoclast precursors acquired from healthy donors through the upregulation of the receptor activator of NF- κ B (RANK) [32].

Interestingly, some human γ δ T cells, capable of producing IL-17 under certain conditions, have been recently described in the peripheral blood [33], and it has been also confirmed earlier that the level of γ δ T cells in the synovial fluids of RA patients was elevated compared to healthy controls [34]. Even though IL-17 producing γ δ T cells are known to contribute to the pathogenesis of murine models of RA [35], activated γ δ T cells seemed to inhibit osteoclastogenesis in an IFN γ dependent manner *in vitro* [36]. IL-17 producing (IL-17⁺) CD4⁺ cells infiltrated the synovium and these CD4⁺IL-17⁺ T cells were detected in close proximity of osteoclasts in the joints of RA patients [37]. The introduction of anti-IL-17 therapeutic antibodies is expected to refine our knowledge on the effects of IL-17 regarding altered bone homeostasis in RA.

6. IL-17 in Animal Models of RA

Much of our knowledge about IL-17 is derived from animal models of RA. Several mouse models exist that mimic some or more characteristics of the human disease. Herein, we mention only those few autoimmune models, either spontaneous or inducible, in which IL-17 has been proposed to play a role (summarized in Table 1). We will pay special attention to proteoglycan aggrecan-induced arthritis (PGIA) which is perhaps the most complex available immunological model of RA.

7. Th17 Cell Driven Arthritis in SKG Mouse

SKG mice spontaneously develop rheumatoid factor- (RF-) positive autoimmune arthritis, which resembles human RA [77]. This mouse strain harbours a point mutation in the gene encoding the Src homology 2 (SH2) domain of Zeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP-70), a key molecule in T cell receptor signaling [77]. The altered thymic selection resulted in highly self-reactive T cells, which spontaneously differentiated into Th17 cells. It had been shown that IL-17 and IL-6 were essential in the development of arthritis, while, unexpectedly, IFN- γ had a protective role (Table 1) [38]. The role of IL-17 was further proven because the treatment with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibodies prevented the onset of arthritis in SKG mice by altering T_{reg}/Th17 ratio in synovial tissue and draining lymph nodes (Table 1) [39]. Furthermore, treatment with neutralizing anti-IL-17A slightly inhibited the progression of arthritis in SKG mice (Table 1) [40].

8. IL-17 in K/BxN Mice and the Serum Transfer Model

K/BxN mice express the transgenic T cell receptor KRN against bovine RNase antigen in nonobese diabetic (NOD) background having the MHC class II allele Ag⁷ (present in the NOD strain) spontaneously developing uniform, severe inflammatory arthritis by the age of 4 weeks. In addition to the spontaneous arthritis, the most evident pathological abnormality is the presence of anti-glucose-6-phosphate isomerase (GPI) antibody production in K/BxN mice [78]. Serum transfer from sick K/BxN mice causes a transient arthritis in a wide range of recipient mice [48, 49].

The importance of IL-17 in K/BxN was investigated by neutralization experiments using monoclonal anti-IL-17 antibodies (Table 1). When 25-day-old K/BxN mice housed in specific pathogen-free environment were treated with anti-IL-17 the onset of arthritis was delayed which was associated with a slower disease progression and reduced ankle thickening (Table 1). These anti-IL-17-treated mice also had lower serum levels of GPI autoantibodies (Table 1) [41]. Th17 cells play an important role in disease induction in K/BxN mice, which was supported by the fact that treatment of mice from birth with neomycin exacerbated arthritis, while treatment with vancomycin or ampicillin inhibited disease progression [41], most likely due to the fact that these latter two antibiotics are known to block Th17 T cell differentiation (Table 1). On the other hand, neomycin targets Gram-negative bacteria, which comprises the majority of gut microbiota, and, Th17 cells are known to mediate host defence against extracellular, especially Gram-negative bacteria (Table 1) [79].

Most recently it was investigated whether IL-17 or IL-17 producing cells play a role in the serum transfer model of arthritis (Table 1). Katayama and colleagues transferred K/BxN serum to IL-17A^{-/-} mice and found that the disease was significantly less severe than when the K/BxN serum was transferred into wild-type mice or mice with severe combined immunodeficiency (SCID) (Table 1) [42]. Interestingly, high

TABLE 1: Summary of the most important data about IL-17 in animal models of RA.

Model	Experiment	Effect	Reference
SKG	IL-17 ^{-/-} mice	Inhibited arthritis	[38]
	IL-6 ^{-/-} mice	Inhibited arthritis	[38]
	IFN- γ ^{-/-}	Exacerbated arthritis	[38]
	a-CD4	Prevented arthritis (altering T _{reg} /Th17 ratio)	[39]
	a-IL-17A	Inhibited arthritis progression	[40]
K/BxN	a-IL-17	Slower disease progression	[41]
	Neomycin	Exacerbated arthritis (Th17 differentiation)	[41]
K/BxN serum	IL-17A ^{-/-} mice	Less severe disease	[42]
	IL-17RA ^{-/-} mice	Reduced disease severity	[43]
CIA	Neutrophils	Source of IL-17 in effector phase	[42]
	Soluble IL-17R	Suppression of arthritis	[31]
	Ad-IL-17	Exacerbation of arthritis	[31]
		Angiogenesis	[44]
	IL-17 ^{-/-} mice	Suppression of arthritis	[45]
	IL-17 ^{-/-} BM transfer	Suppression of arthritis	[46]
	a-IL-17 serum	Suppression	[47]
	a-IL-1 β + a-IL-17A (sc, bs)	Suppression	[48]
	a-IL-1 β or a-IL-17A (c)	Suppression	[49]
	a-IL-1 β + a-IL-17A (bs, n)	Suppression	[50]
	a-IL-17 a-GM-CSF (c)	Suppression	[51]
	CD4 ⁺ Th17 cells	Stimulation of osteoclastogenesis	[37, 52]
	V4 γ ⁺ V4 δ ⁺ $\gamma\delta$ T cells	IL-17 production	[53]
		Upregulated by IL-17	[47]
	IL-6	Positive feedback loop triggered by IL-17A	[54]
		Induces Th17 differentiation	[55]
	IL-1 β	Upregulated by IL-17	[52]
	RANK, RANKL	Expression induced by Th17 cells	[56]
	Ad-IL-4	IL-17 mRNA levels \downarrow	
		Prevention of osteoclastogenesis	[57]
IL-12p35 ^{-/-} mice	More severe arthritis		
	IL-17 mRNA levels \uparrow	[58]	
	Suppressed arthritis		
Ad-IL-27	IL-17 levels in joint and serum \downarrow		
	IL-1 β , IL-6, and CCL2 expression \downarrow	[59]	
Ad-IL-37	Downregulates IL-17		
	Inhibits Th17 proliferation	[60]	
NK cell depletion	Exacerbation of arthritis	[61]	
B _{reg} cells	Suppression of arthritis (T _{reg} differentiation \uparrow)	[62]	
IL-10R Tg mice	Increased susceptibility of arthritis (IL-17 \uparrow)		
	IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells accumulate in joint	[63]	
IL-23p19 ^{-/-} mice	Inhibition of arthritis (Th17 differentiation \downarrow)	[58]	
IL-23p19 vaccine	Suppressed arthritis	[64]	
IFN- γ R ^{-/-} mice	Exacerbated arthritis	[65]	
IFN- γ R ^{-/-} mice + a-IL-17	Inhibited arthritis	[66]	
PGIA	Initiation phase	Local and systemic IL-17 production	[67]
	IL-17 ^{-/-} mice	Severity and onset similar to WT	[68]
		IL-1 β \uparrow IL-6 expression \downarrow	
	IFN- γ ^{-/-} mice	Amelioration of arthritis	[69]
		IL-17 levels \uparrow	
	Suppressed arthritis	[69]	
	Reduced joint damage and cellular infiltration		

sc: single-chain; bs: bispecific; n: neutralizing; c: combination therapy; Ad: adenoviral; Tg: transgenic; BM: bone marrow.

IL-17 serum levels were observed in transferred arthritic SCID mice, and it was revealed that neutrophils acted as source of IL-17 in the effector phase of arthritis (Table 1). Moreover, coinjection of wild-type neutrophils with K/BxN serum into IL-17A^{-/-} mice resulted in the exacerbation of the disease (Table 1) [42]. K/BxN serum transfer studies into IL-17RA^{-/-} animals resulted in similar findings: reduced clinical signs of arthritis and decreased expression of various chemokines, proinflammatory cytokines, and matrix metalloproteinases (Table 1) [43].

9. IL-17 in the Cytokine Network Regulation in Collagen-Induced Arthritis (CIA)

CIA is perhaps the most widely used inducible autoimmune (systemic) arthritis model, which can be induced by repeated intracutaneous immunization of DBA/1 mice with type II collagen (CII) emulsified with complete Freund's adjuvant.

The role of IL-17 in the development of CIA was first proved by the blockade of endogenous IL-17 with soluble IL-17 receptor protein in immunized DBA/1 mice [31], which resulted in the suppression of arthritis, accompanied by reduced joint damage. In contrast, either systemic or local (intra-articular) adenoviral gene transfer of IL-17 exacerbated CIA. These results were supported by Nakae and colleagues [80] using IL-17 deficient (IL-17^{-/-}) mice. Compared to wild-type animals both the incidence and severity of arthritis were markedly reduced and joint histology showed milder inflammation. Collagen-specific IgG2a levels were lower than that of wild-type mice. *In vitro* proliferative response to CII was reduced in IL-17^{-/-} lymph node cell cultures, suggesting a crucial role for IL-17 in the induction of CIA. In another study, mice were immunized after allogeneic IL-17^{-/-} bone marrow transplantation; type II collagen-immunized DBA/1 mice developed significantly less severe arthritis associated with reduced production of proinflammatory cytokines [46].

Both IL-17 producing CD4⁺ Th17 cells [52] and $\gamma\delta$ T cells [53] were described in CIA. Th17 cells are thought to mediate their effects by stimulating osteoclastogenesis [37], but it remains to be evaluated how V4 γ ⁺V4 δ ⁺ $\gamma\delta$ T cells contribute to the development of CIA via their IL-17 production.

Over the years various IL-17 blocking antibodies were tested in CIA (summarized in Table 1). The severity of the disease was successfully reduced using polyclonal rabbit anti-murine IL-17 antibody [47], single-chain bispecific antibody (scBsAb1/17) against both human IL-1 β and human IL-17A [48], combination therapies with anti-IL-1 β and anti-IL-17A antibodies [49] or anti-IL-17 and anti-GM-CSF antibodies [51], or bispecific and neutralizing antibodies (BsAB-1, BsAB-2 and BsAB-3) against both human IL-1 β and human IL-17A [50].

IL-17 exerts its proinflammatory actions through various pathways (Table 1). IL-17 upregulates other proinflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-1 β [44, 59]. IL-6 induces Th17 differentiation forming a positive feedback loop triggered by IL-17A [54]. Thus, the blockade of IL-6 in the early phase of CIA inhibits Th17 differentiation, hence suppressing disease progression [55]. Bone erosion in CIA is mediated by IL-17

and Th17 cells through the regulation of RANKL-mediated osteoclastogenesis [63, 64].

IL-17 was also found to contribute to angiogenesis, as local overexpression of IL-17 using adenoviral vectors resulted in increased endothelial staining in the ankles of CII-immunized mice compared to controls (Table 1) [44].

IL-17 production or differentiation of IL-17 producing cells is regulated by various cytokines and cells [3]. Intra-articular overexpression of IL-4 using adenoviral vectors resulted in reduced synovial IL-17 mRNA levels and prevented joint damage and bone erosion in CIA by suppressing osteoclastogenesis [57]. Sarkar and colleagues cocultured IL-4-transduced dendritic cells with splenic T cells from CII-immunized mice and found that IL-17 production by T cells was significantly reduced when T cells were harvested during the initiation phase of the disease, but that of T cells obtained during the end phase was not altered [81]. This result is particularly important and interesting because it shows that even during the progression of the disease there could be a shift in the cytokine balance and/or regulation, whose observation was further supported by results from the PGIA model (see Section 10) [82].

A number of cytokines regulate CIA in a network-like fashion (see also Table 1):

- (i) IL-12 is an important cytokine in Th1 differentiation by promoting IFN γ production. CIA is more severe in mice deficient of IL-12, accompanied by increased IL-17 mRNA levels, suggesting that IL-12 regulates IL-17 production in CIA [58].
- (ii) Local expression of IL-27 in the ankles of mice ameliorated CIA by reducing IL-17 levels in the serum and joints of animals [59].
- (iii) Monocyte and neutrophil recruitment as well as angiogenesis was inhibited in synovial tissue, and the expression of downstream targets of IL-17, such as IL-1 β , IL-6, and CCL2, was reduced [59].
- (iv) IL-37, a recently discovered member of IL-1 family, is expected to play an immunosuppressive role in CIA via the downregulation of IL-17 and Th17 cell proliferation [60].
- (v) NK cell depletion exacerbated experimental arthritis, supporting a possible protective role of NK cells in CIA by inhibiting Th17 differentiation via their IFN γ production [61].
- (vi) Regulatory B cells control autoimmunity by their IL-10 production by means of promoting T_{reg} differentiation over Th1/Th17 differentiation [62]. IL-10 signaling in T cells is important in ameliorating CIA, as blocking this pathway rendered mice highly susceptible to arthritis via increased IL-17 levels and accumulation of IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells in the joints [63].
- (vii) IL-23 proved to be essential in the development of CIA, supported by the fact that IL-23p19^{-/-} mice were resistant to arthritis, with no signs of bone or joint destruction. Results indicated that IL-23

promoted differentiation of IL-17 producing CD4⁺ T cells [58]. In contrast, immunization with peptide-based vaccines targeting the IL-23p19 subunit resulted in suppressed arthritis, but IL-17 mRNA level and T cell populations in the spleen were not altered [64].

- (viii) IFN γ receptor deficient mice develop exacerbated CIA [65]. Preventive treatment of these mice with anti-IL-17 inhibits CIA, with no signs of bone destruction, neutrophil infiltration, and granulopoiesis. It is supposed that besides inhibiting Th17 differentiation IFN γ protects from autoimmunity by inhibiting effector functions of IL-17 [66].

10. PGIA at the Border of Th1/Th17 Disease

In genetically susceptible BALB/c mice repeated intraperitoneal immunizations with human cartilage proteoglycan (aggrecan) emulsified with a synthetic adjuvant lead to chronic joint inflammation [83], resembling human RA in both clinical (progressive irreversible cartilage destruction, bone erosion, and ankylosis) and immunological characteristics (T cell-dependent, autoantibody-driven disease) [84].

Originally, PGIA was thought to be completely a Th1-type disease with significant IFN γ production [85]. Finnegan and colleagues demonstrated that in contrast to CIA, IFN γ deficiency or treatment with anti-IFN γ antibody resulted in the amelioration of arthritis. Similarly to CIA, PGIA is also controlled by a network of cytokines (Table 1): arthritis severity is regulated by IL-4 and IL-12 production as shown by testing PGIA in a number of knock-out animals [67].

Later, it was demonstrated that, during the immunization period of PGIA, that is, even before the onset of clinical signs, IL-17 is a prominent proinflammatory cytokine, produced in significant amounts both locally in the peritoneal cavity and systemically in the spleen or lymph nodes of mice (Table 1) [82]. This suggested that both Th1 and Th17 cytokines were involved in the development of PGIA. However, as implicated above (see Section 9), the cytokine balance could shift during the disease progression.

After repeated intraperitoneal immunizations with PG, resident B1 cells were replaced by T cells and conventional B cells in the peritoneum, which may trigger the effector phase of arthritis [82]. B1 cells shift the immune response towards Th1/Th17 direction, while conventional B cells favour T_{reg} induction [75, 86]. Although the number of B1 cells significantly decreased in the peritoneal cavity upon immunization [82], the residual cells seemed to have sufficient capacity to maintain Th1/Th17 polarization in BALB/c mice or, alternatively, their presence is only necessary during the initiation of the disease.

The role of IL-17 in PGIA was further investigated in IL-17 deficient (IL-17^{-/-}) mice, in which, surprisingly, the onset and severity of arthritis were equivalent to wild-type animals. Although the expression of IL-1 β increased significantly in the inflamed joints, IL-6 expression was suppressed. Joint histology and PG-specific T and B cell responses were similar in IL-17^{-/-} and wild-type mice, suggesting that IL-17 was not essential in PGIA (Table 1) [68].

There was a clear contradiction between the earlier mentioned study [82], where significant IL-17 production was detected in PG-immunized mice, and the latter results when IL-17^{-/-} mice were used [68]. The discrepancy between the two observations was solved, when the relation of IL-17 and IFN γ was assessed in the same model (PGIA) system (Table 1). In PG-immunized IFN γ -deficient mice IL-17 levels were significantly increased [69]. Double knockout (IFN γ ^{-/-}/IL-17^{-/-}) mice were then immunized to investigate the relationship between IFN γ and IL-17 in PGIA (Table 1). Compared to wild-type, IFN γ ^{-/-}, or IL-17^{-/-} mice, severity and onset of arthritis were significantly reduced in the double knockout mice, suggesting that PGIA “became” IL-17-dependent in the absence of IFN γ . Cellular infiltration in the synovium and joint destruction were diminished in double knockout IFN γ ^{-/-}/IL-17^{-/-} mice. The impaired migration of Th17 cells into the inflamed joints might be explained by the reduced synovial expression of CCL20, a ligand of chemokine receptor CCR6 on Th17 cells [69]. Results from IFN γ ^{-/-}/IL-17^{-/-} mice underline the network-like function of cytokines in PGIA: the absence of IL-17 was compensated by the overproduction of IFN γ . This may as well explain why IL-17^{-/-} mice developed PGIA, and, in turn, the overproduction of IL-17 in IFN γ -deficient mice can be responsible for the residual disease activity.

11. Concluding Remarks about the Experimental Autoimmune Models of RA

There are many animal models of RA, which might represent the heterogeneity of the human disease itself. Above, we reviewed the involvement of IL-17 and IL-17 producing cells in some spontaneous (SKG and K/BxN) and inducible (K/BxN serum transfer, CIA, and PGIA) animal models of RA (summarized in Table 1). Based on the studies available, the autoimmune arthritis observed in SKG, K/BxN serum transfer, and CIA models might be clearly IL-17-dependent disease. In contrast, PGIA might represent a transition between Th1 and Th17 mediated forms of autoimmune arthritis [69].

These results clearly exemplify that in the development of experimental autoimmune arthritis various cytokines and immune cells [61, 62] act in close association, proving the network-like functioning of the immune system. Nevertheless, when working with animal models one must be aware of the characteristics of the chosen model and take into consideration that because of the complex interactions of cytokines genetic modifications might result in diverse compensatory mechanisms.

12. IL-17 as a Therapeutic Target in RA

Since IL-17 seems to play a major role in various autoimmune disorders characterized by chronic inflammation, several studies reached the conclusion that antagonizing IL-17 could be beneficial in these pathological conditions [87]. Various IL-17 blocking agents have been developed and are currently being tested in RA (summarized in Table 2), psoriasis,

TABLE 2: Summary of the most important therapeutical trials targeting IL-17 in RA.

Name	Molecular target	Phase	Status	Patients	Weeks	Efficacy	Reference
Secukinumab	IL-17A	I	Completed	52	6	Supported	[70]
		II	Completed	237	16	Supported	[71]
		II	Completed	174	52	Supported	[72]
		III	Ongoing	n/a	n/a	n/a	NCT01377012
		III	Ongoing	n/a	n/a	n/a	NCT01350804
Ixekizumab	IL-17A	I	Completed	97	10	Supported	[73]
		II	Completed	448	12	Supported	[74]
Brodalumab	IL-17RA	I	Completed	40	48	Not confirmed	[75]
		II	Completed	252	12	Not confirmed	[76]

n/a: no information available.

ankylosing spondylitis, and inflammatory bowel diseases, including Secukinumab, Ixekizumab, and Brodalumab [87].

Secukinumab, manufactured by Novartis Pharma AG under the trade name Cosentyx, formerly referred to as AIN457, is a human monoclonal IgG1 that targets IL-17A (Table 2). The safety and efficacy of the drug were first tested in a small number of patients with psoriasis, RA, and chronic noninfectious uveitis and produced clinically relevant response rates of different magnitude in each of the above-mentioned disorders [70]. The drug was approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of psoriasis in January 2015 and is currently under investigation in RA (Table 2) and psoriatic arthritis [88].

The results of a phase II double-blind, randomized, placebo-controlled trial about the effectiveness of Secukinumab including 237 RA patients with incomplete responses to previous methotrexate therapy was published in 2013, in which different doses of Secukinumab (25, 75, 150, and 300 mg per month, resp.) were administered subcutaneously for a period of 16 weeks on a monthly basis [71]. Injections of 75, 150, and 300 mg Secukinumab reduced the levels of serum C-reactive protein (CRP) compared to placebo and also decreased the DAS28 (disease activity score 28) of patients, but the primary efficacy endpoint defined by the ACR20 (ACR: American College of Rheumatology) was not achieved (Table 2). The trial was extended to a period of 52 weeks to investigate the long-term effects with 174 of the original 237 patients [72]. The patients with improved CRP levels and DAS28 scores sustained their responses throughout the treatment, and the response of those patients who received 150 mg of Secukinumab was improved through week 52 (ACR50: week 16 = 45%, week 52 = 55%) (Table 2). Mostly mild or moderate adverse effects were found in 64.8% of the patients, and serious adverse effects were detected only in 8.9% of the patients. Based on these results, the authors concluded that 150 mg of monthly Secukinumab treatment can produce clinically relevant response in patients who previously failed to respond to cDMARD or bDMARD treatments [72]. The effectiveness and safety of Secukinumab are now being investigated in two phase III clinical trials (NCT01377012 and NCT01350804).

Ixekizumab is an anti-human IL-17A humanized IgG4 developed by Eli Lilly and Company under the name LY2439821 (Table 2). The first proof-of-concept study consisted of two phases. First, 20 RA patients received 1 intravenous dose of Ixekizumab or placebo and patients were regularly controlled by an 8-week period (Table 2). In the second study, 77 RA patients being already on stable doses of either Ixekizumab or placebo 5 times with two-week intervals (Table 2). Intravenous Ixekizumab added to oral DMARD therapy improved both DAS28 and the ACR20 scores greater than placebo [73]. The initial study was followed by a phase II clinical trial in which Ixekizumab was given subcutaneously to 260 bDMARD naive patients and to 188 patients with inadequate responses to anti-TNF α biologics combined with cDMARD therapies [74]. Using a logistic regression model, in the biologically naive group, a dose-related response rate was detected at week 12 by measuring ACR20 response rates. In patients with inadequate response rates to TNF α -blocking agents, Ixekizumab also produced clinically improved ACR20 responses [74]. However, Ixekizumab has not been approved by the FDA to date, but there are ongoing phase III clinical trials in psoriasis (NCT01597245), ankylosing spondylitis (NCT01870284), and psoriatic arthritis (NCT02349295) (Table 2). Recently, no additional studies are performed with RA patients.

Brodalumab is also a novel therapeutic monoclonal antibody that targets the IL-17 system, although, unlike the previously listed agents, it directly binds to the IL-17RA. Brodalumab is a human IgG2 monoclonal antibody developed by Amgen Inc. under the name AMG 827 (Table 2), even though Brodalumab was found to be effective in psoriasis in phase II clinical studies [41, 79], and phase III trials are still ongoing in moderate to severe psoriasis (NCT01708590). The efficacy of Brodalumab in RA was not confirmed by clinical studies (Table 2). The results of a phase I study were published in 2013, in which 40 human subjects with methotrexate resistant moderate-to-severe RA were treated with Brodalumab [75]. Although the drug blocked the IL-17RA in circulating leukocytes, it did not have a clinically significant effect on the response rates as by day 85 (Table 2) [73]. A total of 252 RA patients with inadequate responses to methotrexate

were included in a subsequent phase II trial which also failed to find evidence on the clinical efficacy and, therefore, it was concluded that Brodalumab seems to be ineffective in RA (Table 2) [76].

The fact that the effectiveness of biological therapies targeting different proinflammatory cytokines differs from patient to patient seems to support the hypothesis of the heterogeneity of RA in terms of the possible underlying pathomechanisms and responsiveness to certain cytokines contributing to disease development in different RA patients. Moreover, while IL-17 is a relatively new therapeutic target in RA, IL-17, and IL-17R family members show a high variability in the expression in individual patients [10]. Therefore, it is not surprising that the blockade of IL-17A or its receptor with monoclonal antibodies did not lead to complete disease remission so far. As indicated in the above sections, discussing the animal models of RA, IL-17, and Th17 cells is part of a very complex immunopathological network, where targeting one single entity might not be sufficient in suppressing the autoimmune process. Thus, currently it is more likely that IL-17 targeting agents could be used to complement/augment current therapies.

However, it cannot be completely ruled out that, in the future, targeting the IL-17 axis in RA at different levels (Th17 differentiation, receptors, signaling, etc.) will not provide better therapeutic results than the currently available monoclonal antibodies. Moreover, we cannot neglect the complexity of the IL-17 system itself, which consists of 6 members with 5 known receptors, thus there is still place for developing new blocking/modifying agents, which might offer exciting new treatment forms in RA.

13. Concluding Remarks

Our knowledge has increased significantly about IL-17 and Th17 cells in the past 20 years. It became clear that this proinflammatory cytokine plays a key role in autoimmunity and more specifically in RA. We have detailed information about the immunological role of IL-17 based on different mouse models of arthritis complemented by some human data. However, as indicated above, care should be taken when analysing data derived from knock-out models and other genetically engineered mice, because the network-like function of the immune system might lead to unexpected compensatory mechanisms which could significantly alter the results. Nevertheless, our current understanding about IL-17 in RA (and new potential treatment directions) would not exist without the data from animal models. Therapeutic trials aiming to suppress IL-17 might provide some new treatments supplementing or replacing currently existing biological therapies in RA.

Abbreviations

ACR:	American College of Rheumatology
bDMARD:	Biological disease-modifying antirheumatic drug
CII:	Type II collagen
CCL20:	Chemokine (C-C motif) ligand 20

CCR6:	C-C chemokine receptor type 6
cDMARD:	Conventional disease-modifying antirheumatic drug
CIA:	Collagen-induced arthritis
COX2:	Cyclooxygenase-2
CRP:	C-reactive protein
CTLA-8:	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8
DAS28:	Disease activity score 28
DMARD:	Disease-modifying antirheumatic drug
FDA:	United States Food and Drug Administration
G-CSF:	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF:	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI:	Glucose-6-phosphate isomerase
HSV13:	Herpesvirus Saimiri 13
IFN γ :	Interferon gamma
NF- $\kappa\beta$:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PGE ₂ :	Prostaglandin E2
PGIA:	Proteoglycan aggrecan-induced arthritis
RA:	Rheumatoid arthritis
RANK:	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL:	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RF:	Rheumatoid factor
ROR γ t:	RAR-related orphan receptor gamma t
SCID:	Severe combined immunodeficiency
SH2:	Src Homology 2
TNF α :	Tumor necrosis factor alpha
ZAP-70:	Zeta-chain-associated protein kinase 70.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

The first two authors Reka Kugyelka and Zoltan Kohl contributed equally to the work.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Hungarian National Scientific Research Fund for Ferenc Boldizsar (OTKA K101493) and the National Institutes of Health (AR-40310 and AR-45652 for Tibor T. Glant, AR064206 for Katalin Mikecz, and AR064948 for Tibor A. Rauch) and in part by the J. O. Galante M.D., D.M.S., Endowment Chair of Orthopedic Surgery (Rush University Medical Center, Chicago, IL, USA) for Tibor T. Glant and the Grainger Foundation (Lake Forest, IL, USA) for Tibor T. Glant and Katalin Mikecz. Ferenc Boldizsar received a Janos Bolyai Scholarship (BO/00086/12/5) from the Hungarian Academy of Sciences.

References

- [1] D. L. Scott, F. Wolfe, and T. W. J. Huizinga, "Rheumatoid arthritis," *The Lancet*, vol. 376, no. 9746, pp. 1094–1108, 2010.
- [2] A. J. Landré-Beauvais, "The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800," *Joint Bone Spine*, vol. 68, no. 2, pp. 130–143, 2001.
- [3] G. Azizi, F. Jadidi-Niaragh, and A. Mirshafiey, "Th17 Cells in Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis," *International Journal of Rheumatic Diseases*, vol. 16, no. 3, pp. 243–253, 2013.
- [4] M. Schiff, "Abatacept treatment for rheumatoid arthritis," *Rheumatology*, vol. 50, no. 3, pp. 437–449, 2011.
- [5] S. P. Singh, H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick, and J. M. Farber, "Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 1, pp. 214–221, 2008.
- [6] E. V. Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, "Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells," *Nature Immunology*, vol. 8, no. 9, pp. 942–949, 2007.
- [7] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust et al., "Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation," *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 336–348, 2013.
- [8] J. P. van Hamburg, P. S. Asmawidjaja, N. Davelaar et al., "Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 63, no. 1, pp. 73–83, 2011.
- [9] S. M. J. Paulissen, J. P. van Hamburg, W. Dankers, and E. Lubberts, "The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis," *Cytokine*, vol. 74, no. 1, pp. 43–53, 2015.
- [10] L. G. M. van Baarsen, M. C. Lebre, D. van der Coelen et al., "Heterogeneous expression pattern of interleukin 17A (IL-17A), IL-17F and their receptors in synovium of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis: possible explanation for nonresponse to anti-IL-17 therapy?" *Arthritis Research & Therapy*, vol. 16, no. 4, article 426, 2014.
- [11] G. Zizzo, M. De Santis, S. L. Bosello et al., "Synovial fluid-derived T helper 17 cells correlate with inflammatory activity in arthritis, irrespectively of diagnosis," *Clinical Immunology*, vol. 138, no. 1, pp. 107–116, 2011.
- [12] Y. Kondo, Z. Yao, M. Tahara et al., "Involvement of ROR γ t-overexpressing T cells in the development of autoimmune arthritis in mice," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 17, no. 1, 2015.
- [13] K. Hirota, H. Yoshitomi, M. Hashimoto et al., "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 12, pp. 2803–2812, 2007.
- [14] E. Rouvier, M.-F. Luciani, M.-G. Mattei, F. Denizot, and P. Golstein, "CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus Saimiri gene," *The Journal of Immunology*, vol. 150, no. 12, pp. 5445–5456, 1993.
- [15] Z. Yao, W. C. Fanslow, M. F. Seldin et al., "Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor," *Immunity*, vol. 3, no. 6, pp. 811–821, 1995.
- [16] F. Fossiez, O. Djossou, P. Chomarat et al., "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 183, no. 6, pp. 2593–2603, 1996.
- [17] J. Kennedy, D. L. Rossi, S. M. Zurawski et al., "Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by $\alpha\beta$ TCR+CD4–CD8–T cells," *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 16, no. 8, pp. 611–617, 1996.
- [18] T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman, "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins," *The Journal of Immunology*, vol. 136, no. 7, pp. 2348–2357, 1986.
- [19] L. H. Glimcher and K. M. Murphy, "Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up," *Genes and Development*, vol. 14, no. 14, pp. 1693–1711, 2000.
- [20] L. Steinman, "A brief history of T_H17, the first major revision in the T_H1/T_H2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 139–145, 2007.
- [21] C. Infante-Duarte, H. F. Horton, M. C. Byrne, and T. Kamradt, "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells," *Journal of Immunology*, vol. 165, no. 11, pp. 6107–6115, 2000.
- [22] S. L. Gaffen, J. M. Kramer, J. J. Yu, and F. Shen, "The IL-17 cytokine family," *Vitamins and Hormones*, vol. 74, pp. 255–282, 2006.
- [23] C. Gu, L. Wu, and X. Li, "IL-17 family: cytokines, receptors and signaling," *Cytokine*, vol. 64, no. 2, pp. 477–485, 2013.
- [24] W. Ouyang, J. K. Kolls, and Y. Zheng, "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation," *Immunity*, vol. 28, no. 4, pp. 454–467, 2008.
- [25] M. Chabaud, J. M. Durand, N. Buchs et al., "Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 42, no. 5, pp. 963–970, 1999.
- [26] R. Florencio-Silva, G. R. da Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, "Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 421746, 17 pages, 2015.
- [27] S. M. Jung, K. W. Kim, C.-W. Yang, S.-H. Park, and J. H. Ju, "Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis," *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, Article ID 263625, 15 pages, 2014.
- [28] T. Dimitroulas, S. N. Nikas, P. Trontzas, and G. D. Kitas, "Biologic therapies and systemic bone loss in rheumatoid arthritis," *Autoimmunity Reviews*, vol. 12, no. 10, pp. 958–966, 2013.
- [29] K.-W. Kim, H.-R. Kim, B.-M. Kim, M.-L. Cho, and S.-H. Lee, "Th17 cytokines regulate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis," *The American Journal of Pathology*, vol. 185, no. 11, pp. 3011–3024, 2015.
- [30] S. Kotake, N. Udagawa, N. Takahashi et al., "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, no. 9, pp. 1345–1352, 1999.
- [31] M. Chabaud, E. Lubberts, L. Joosten, W. van Den Berg, and P. Miossec, "IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis," *Arthritis Research*, vol. 3, no. 3, pp. 168–177, 2001.
- [32] I. E. Adamopoulos, C.-C. Chao, R. Geissler et al., "Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF- κ B on osteoclast precursors," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 12, no. 1, article R29, 2010.

- [33] N. Caccamo, C. La Mendola, V. Orlando et al., "Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells," *Blood*, vol. 118, no. 1, pp. 129–138, 2011.
- [34] E. C. Keystone, C. Rittershaus, N. Wood et al., "Elevation of a gamma delta T cell subset in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 84, no. 1, pp. 78–82, 1991.
- [35] Y. Ito, T. Usui, S. Kobayashi et al., "Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 60, no. 8, pp. 2294–2303, 2009.
- [36] A. Pappalardo and K. Thompson, "Activated $\gamma\delta$ T cells inhibit osteoclast differentiation and resorptive activity in vitro," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 174, no. 2, pp. 281–291, 2013.
- [37] B. Pöllinger, T. Junt, B. Metzler et al., "Th17 cells, not IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells, drive arthritic bone destruction in mice and humans," *The Journal of Immunology*, vol. 186, no. 4, pp. 2602–2612, 2011.
- [38] K. Hirota, M. Hashimoto, H. Yoshitomi et al., "T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 1, pp. 41–47, 2007.
- [39] J. Duarte, A. Agua-Doce, V. G. Oliveira, J. E. Fonseca, and L. Grac, "Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 5, Article ID e10558, 2010.
- [40] A. Shiomi, T. Usui, Y. Ishikawa, M. Shimizu, K. Murakami, and T. Mimori, "GM-CSF but not IL-17 is critical for the development of severe interstitial lung disease in SKG mice," *Journal of Immunology*, vol. 193, no. 2, pp. 849–859, 2014.
- [41] H.-J. Wu, I. I. Ivanov, J. Darce et al., "Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells," *Immunity*, vol. 32, no. 6, pp. 815–827, 2010.
- [42] M. Katayama, K. Ohmura, N. Yukawa et al., "Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, Article ID e62231, 2013.
- [43] C. D. Sadik, N. D. Kim, E. Alekseeva, and A. D. Luster, "IL-17RA signaling amplifies antibody-induced arthritis," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 10, Article ID e26342, 2011.
- [44] S. R. Pickens, M. V. Volin, A. M. Mandelin II, J. K. Kolls, R. M. Pope, and S. Shahrara, "IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis," *Journal of Immunology*, vol. 184, no. 6, pp. 3233–3241, 2010.
- [45] S. Nakae, S. Saijo, R. Horai, K. Sudo, S. Mori, and Y. Iwakura, "IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 10, pp. 5986–5990, 2003.
- [46] M.-J. Park, H.-S. Park, H.-J. Oh et al., "IL-17-deficient allogeneic bone marrow transplantation prevents the induction of collagen-induced arthritis in DBA/1J mice," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 44, no. 11, pp. 694–705, 2012.
- [47] E. Lubberts, M. I. Koenders, B. Oppers-Walgreen et al., "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 and Rheumatism*, vol. 50, no. 2, pp. 650–659, 2004.
- [48] J. Qi, F. Kan, X. Ye et al., "A bispecific antibody against IL-1 β and IL-17A is beneficial for experimental rheumatoid arthritis," *International Immunopharmacology*, vol. 14, no. 4, pp. 770–778, 2012.
- [49] Y. Zhang, G. Ren, M. Guo et al., "Synergistic effects of interleukin-1 β and interleukin-17A antibodies on collagen-induced arthritis mouse model," *International Immunopharmacology*, vol. 15, no. 2, pp. 199–205, 2013.
- [50] Q. Li, G. Ren, L. Xu et al., "Therapeutic efficacy of three bispecific antibodies on collagen-induced arthritis mouse model," *International Immunopharmacology*, vol. 21, no. 1, pp. 119–127, 2014.
- [51] A. E. M. van Nieuwenhuijze, F. A. van de Loo, B. Walgreen et al., "Complementary action of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-17A induces interleukin-23, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, and matrix metalloproteinases and drives bone and cartilage pathology in experimental arthritis: rationale for combination therapy in rheumatoid arthritis," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 17, article 163, no. 1, 2015.
- [52] Y. Yamaguchi, K. Fujio, H. Shoda et al., "IL-17B and IL-17C are associated with TNF- α production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis," *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 10, pp. 7128–7136, 2007.
- [53] C. L. Roark, Y. Huang, N. Jin et al., "A canonical V γ 4V δ 4+ $\gamma\delta$ T cell population with distinct stimulation requirements which promotes the Th17 response," *Immunologic Research*, vol. 55, no. 1–3, pp. 217–230, 2013.
- [54] H. Ogura, M. Murakami, Y. Okuyama et al., "Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction," *Immunity*, vol. 29, no. 4, pp. 628–636, 2008.
- [55] M. Fujimoto, S. Serada, M. Mihara et al., "Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 58, no. 12, pp. 3710–3719, 2008.
- [56] K. Sato, A. Suematsu, K. Okamoto et al., "Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 12, pp. 2673–2682, 2006.
- [57] E. Lubberts, L. A. B. Joosten, M. Chabaud et al., "IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 105, no. 12, pp. 1697–1710, 2000.
- [58] C. A. Murphy, C. L. Langrish, Y. Chen et al., "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, no. 12, pp. 1951–1957, 2003.
- [59] S. R. Pickens, N. D. Chamberlain, M. V. Volin et al., "Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 63, no. 8, pp. 2289–2298, 2011.
- [60] L. Ye, B. Jiang, J. Deng et al., "IL-37 alleviates rheumatoid arthritis by suppressing IL-17 and IL-17-triggering cytokine production and limiting Th17 cell proliferation," *The Journal of Immunology*, vol. 194, no. 11, pp. 5110–5119, 2015.
- [61] C. K. C. Lo, Q. L. K. Lam, L. Sun et al., "Natural killer cell degeneration exacerbates experimental arthritis in mice via enhanced interleukin-17 production," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 58, no. 9, pp. 2700–2711, 2008.
- [62] N. A. Carter, E. C. Rosser, and C. Mauri, "Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 14, no. 1, article R32, 2012.

- [63] J. Tao, M. Kamanaka, J. Hao et al., "IL-10 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of collagen-induced arthritis," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 13, no. 6, article R212, 2011.
- [64] R. A. Ratsimandresy, E. Duvallet, E. Assier et al., "Active immunization against IL-23p19 improves experimental arthritis," *Vaccine*, vol. 29, no. 50, pp. 9329–9336, 2011.
- [65] K. Vermeire, H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau, and P. Matthys, "Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice," *The Journal of Immunology*, vol. 158, no. 11, pp. 5507–5513, 1997.
- [66] H. Kelchtermans, E. Schurgers, L. Geboes et al., "Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon- γ and counteraction by interferon- γ ," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 11, no. 4, article R122, 2009.
- [67] A. Finnegan, M. J. Grusby, C. D. Kaplan et al., "IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through stat-dependent mechanisms," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 6, pp. 3345–3352, 2002.
- [68] P. D. Doodes, Y. Cao, K. M. Hamel et al., "Development of proteoglycan-induced arthritis is independent of IL-17," *The Journal of Immunology*, vol. 181, no. 1, pp. 329–337, 2008.
- [69] P. D. Doodes, Y. Cao, K. M. Hamel et al., "IFN- γ regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis," *Journal of Immunology*, vol. 184, no. 3, pp. 1552–1559, 2010.
- [70] W. Hueber, D. D. Patel, T. Dryja et al., "Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis," *Science Translational Medicine*, vol. 2, no. 52, Article ID 52ra72, 2010.
- [71] M. C. Genovese, P. Durez, H. B. Richards et al., "Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomised, placebo controlled study," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 72, no. 6, pp. 863–869, 2013.
- [72] M. C. Genovese, P. Durez, H. B. Richards et al., "One-year efficacy and safety results of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: phase II, dose-finding, double-blind, randomized, placebo-controlled study," *Journal of Rheumatology*, vol. 41, no. 3, pp. 414–421, 2014.
- [73] M. C. Genovese, F. Van den Bosch, S. A. Roberson et al., "LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 4, pp. 929–939, 2010.
- [74] M. C. Genovese, M. Greenwald, C.-S. Cho et al., "A phase II randomized study of subcutaneous ixekizumab, an anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis patients who were naive to biologic agents or had an inadequate response to tumor necrosis factor inhibitors," *Arthritis & Rheumatology*, vol. 66, no. 7, pp. 1693–1704, 2014.
- [75] D. A. Martin, M. Churchill, L. F. Flores-Suarez et al., "A phase Ib multiple ascending dose study evaluating safety, pharmacokinetics, and early clinical response of brodalumab, a human anti-IL-17R antibody, in methotrexate-resistant rheumatoid arthritis," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 15, no. 5, article R164, 2013.
- [76] K. Pavelka, Y. Chon, R. Newmark, S.-L. Lin, S. Baumgartner, and N. Eröndü, "A study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of brodalumab in subjects with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate," *The Journal of Rheumatology*, vol. 42, no. 6, pp. 912–919, 2015.
- [77] N. Sakaguchi, T. Takahashi, H. Hata et al., "Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice," *Nature*, vol. 426, no. 6965, pp. 454–460, 2003.
- [78] V. Kouskoff, A.-S. Korganow, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist, and D. Mathis, "Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity," *Cell*, vol. 87, no. 5, pp. 811–822, 1996.
- [79] I. I. Ivanov, R. D. L. Frutos, N. Manel et al., "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine," *Cell Host and Microbe*, vol. 4, no. 4, pp. 337–349, 2008.
- [80] S. Nakae, A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura, "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 11, pp. 6173–6177, 2003.
- [81] S. Sarkar, L. A. Tesmer, V. Hindnavis, J. L. Endres, and D. A. Fox, "Interleukin-17 as a molecular target in immune-mediated arthritis: immunoregulatory properties of genetically modified murine dendritic cells that secrete interleukin-4," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 56, no. 1, pp. 89–100, 2007.
- [82] F. Boldizar, O. Tarjany, P. Nemeth, K. Mikecz, and T. T. Glant, "T_h1/T_h17 polarization and acquisition of an arthritogenic phenotype in arthritis-susceptible BALB/c, but not in MHC-matched, arthritis-resistant DBA/2 mice," *International Immunology*, vol. 21, no. 5, pp. 511–522, 2009.
- [83] T. T. Glant, K. Mikecz, A. Arzoumanian, and A. R. Poole, "Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 30, no. 2, pp. 201–212, 1987.
- [84] T. T. Glant, A. Finnegan, and K. Mikecz, "Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics," *Critical Reviews in Immunology*, vol. 23, no. 3, pp. 199–250, 2003.
- [85] A. Finnegan, K. Mikecz, P. Tao, and T. T. Glant, "Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines," *The Journal of Immunology*, vol. 163, no. 10, pp. 5383–5390, 1999.
- [86] K. Papp, C. Leonardi, A. Menter et al., "Safety and efficacy of brodalumab for psoriasis after 120 weeks of treatment," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 71, no. 6, pp. 1183–1190.e3, 2014.
- [87] P. Miossec and J. K. Kolls, "Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 11, no. 10, pp. 763–776, 2012.
- [88] I. B. McInnes, J. Sieper, J. Braun et al., "Efficacy and safety of secukinumab, a fully human anti-interleukin-17A monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe psoriatic arthritis: a 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase ii proof-of-concept trial," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 73, no. 2, pp. 349–356, 2014.

1 Research Article

2 ZAP-70 regulates autoimmune arthritis via alterations 3 in T cell activation and apoptosis

4 Réka Kugyelka ¹, Lilla Prenek ¹, Katalin Olasz ¹, Zoltán Kohl ¹, Bálint Botz ^{2,3}, Tibor T. Glant ⁴,
5 Timea Berki ¹ and Ferenc Boldizsár ^{1,*}

6 ¹ University of Pécs, Medical School, Department of Immunology and Biotechnology, HUNGARY

7 ² University of Pécs, Medical School, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, HUNGARY

8 ³ University of Pécs, Medical School, Department of Radiology, HUNGARY

9 ⁴ Rush University Medical Center, Department of Molecular Medicine, Chicago, IL, USA

10 * Correspondence: boldizsar.ferenc@pte.hu; Tel.: +36-72-536-288

11 Received: date; Accepted: date; Published: date

12 **Abstract:** T cells play an essential role in the pathogenesis of both human rheumatoid arthritis (RA)
13 and its murine models. A key molecule in T cell activation is ZAP-70, therefore we aimed to
14 investigate the effects of partial ZAP-70 deficiency on the pathogenesis of recombinant human
15 G1(rhG1)-induced arthritis (GIA), a well-established mouse model of RA. Arthritis was induced in
16 BALB/c and ZAP-70^{+/-} heterozygous mice. Disease progression was monitored using a scoring
17 system and *in vivo* imaging, antigen-specific proliferation, cytokine and autoantibody production
18 was measured and T cell apoptotic pathways were analyzed. ZAP-70^{+/-} mice developed a less severe
19 arthritis, as shown by both clinical picture and *in vitro* parameters (decreased T cell proliferation,
20 cytokine and autoantibody production). The amount of cleaved Caspase-3 was increased in arthritic
21 ZAP-70^{+/-} T cells, with no significant changes in cleaved Caspase-8 and -9 levels, although expression
22 of Bim, Bcl-2 and Cytochrome C showed alterations. Tyrosine phosphorylation was less pronounced
23 in arthritic ZAP-70^{+/-} T cells and the amount of Cbl-b, a negative regulator of T cell activation
24 decreased, as well. We hypothesize that the less severe disease seen in the partial absence of ZAP-
25 70 might be caused by the decreased T cell activation accompanied by increased of apoptosis.

26 **Keywords:** ZAP-70, T cells, apoptosis, autoimmune arthritis, intrinsic pathway, Cbl-b

28 1. Introduction

29 The zeta-chain associated protein of 70 kDa (ZAP-70) was first described by Chan and colleagues
30 in Jurkat cells stimulated through the T cell receptor [1]. Under physiologic conditions ZAP-70 is
31 expressed by T cells [2] and NK cells [3], however in chronic lymphocytic leukemia (CLL) [4] and B
32 cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) [5] it was found in a subset of B cells, as well. According
33 to latest results, ZAP-70 is expressed in immature and mature B cells under normal conditions as well
34 [6], however the expression level is significantly lower than that observed in T cells and the lack of
35 ZAP-70 causes no disruption in the development or activation of B cells [7]. ZAP-70 is a member of
36 the Syk (spleen tyrosine kinase) protein kinase family [8], and it is a key player in the maturation and
37 activation of T cells [8,9]. Loss-of function mutations or lack of ZAP-70 expression leads to a rare form
38 of severe combined immunodeficiency (SCID) in both humans and mice [10], as in its absence the
39 development of T cells is arrested in the double positive stage (CD4⁺CD8⁺), resulting in virtually no
40 mature $\alpha\beta$ T cells in the peripheral lymphoid organs in mice, and only CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells in humans,
41 with impaired activation capacity through the TcR [11].

42 A mouse strain deficient for ZAP-70 was first produced by Negishi and colleagues [12]. ZAP-70-
43 ^{-/-} mice are immunodeficient, no CD4⁺ or CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells can be detected in their peripheral lymphoid
44 organs, and only CD4⁻CD8⁻ double negative and double positive thymocytes can be found in their

45 thymus [12]. Under SPF conditions they can live up to 10 months [12], however because of the higher
46 susceptibility to infections resulting from the immunodeficiency under conventional housing
47 conditions they survive only for 7-10 weeks (own observations).

48 Rheumatoid arthritis is a systemic inflammatory autoimmune disease which primarily affects
49 the synovial joints [13,14]. Chronic inflammation leads to erosive joint damage and bone destruction,
50 causing functional impairment and disability for patients [15]. RA has an incidence of 0.5-1% in the
51 Caucasian population and its prevalence is higher in females [13]. Animal models play an important
52 role in the study of the pathogenesis of RA, the most commonly used arthritis models are reviewed
53 in [16–19]. During our experiments, we used the recombinant human G1 (rhG1)-induced arthritis
54 model (GIA) [20], as it resembles human RA in both its clinical and immunological properties. To
55 induce the GIA 4-5-month-old female mice with BALB/c background have to be immunized with the
56 rhG1 antigen, which is a fusion protein consisting of the G1 domain of the human cartilage
57 proteoglycan aggrecan and the Fc region of mouse IgG [20]. The G1 domain contains three
58 arthritogenic T cell epitopes, clearly showing the importance of T cells in the pathogenesis of the
59 disease [21]. The rhG1-induced arthritis is a T- and B cell-dependent process with autoantibody
60 production (rheumatoid factor, anti-cyclic citrullinated protein) [20]. In GIA significant IL-17 and
61 IFN γ production can be observed, suggesting that the induced arthritis shows significant Th1/Th17
62 polarization [22].

63 Dysregulation of the immune response is a common feature of autoimmune diseases, including
64 RA. Both chronic activation [23,24] and migration of autoreactive T cells to the synovium [25] was
65 described in RA, although the exact mechanism how these events contribute to disease initiation and
66 progression is under investigation [14]. In both the inflamed synovium and peripheral blood of RA
67 patients, T cells with an activated phenotype were detected [26–29], these, in combination with the
68 efficacy of co-stimulation blockade using CTLA-4 in therapy [30] support the importance of T cells as
69 effector cells in RA. Not only the activation of T cells, but their resistance to apoptosis was found to
70 be characteristic for RA [31]. Both the extrinsic and intrinsic pathway was found to modulate disease
71 severity in murine models [32,33] and contribute to the persistence of autoreactive T cells in synovium
72 or peripheral blood of patients [34,35].

73 The importance of T cells is unambiguous in both human RA [36] and its mouse models [18],
74 and as ZAP-70 is indispensable for the activation and signaling of T cells [4], we hypothesized that it
75 may influence the pathogenesis of autoimmune arthritis, as well. Previously, the role of ZAP-70 in
76 the development of autoimmunity was clearly demonstrated by a well-established spontaneous
77 murine model of arthritis, the SKG mice, where a spontaneous point mutation of the ZAP-70 coding
78 gene results in the development of autoimmune arthritis [37]. The SKG ZAP-70 mutation causes
79 inadequate T cell receptor signaling, leading to disturbances in the T cell selection process, enabling
80 the release of autoreactive T cells into the periphery, contributing to the pathogenesis of arthritis
81 [38,39].

82 To investigate how the partial absence of ZAP-70 influences the pathogenesis of autoimmune
83 arthritis, we aimed to test ZAP-70 deficient mice in the GIA model. Since the induction of GIA is most
84 efficient in 4-5-month-old female mice [40], and ZAP-70^{-/-} mice usually do not live that long when
85 kept under conventional conditions (own observation) due to their severe combined
86 immunodeficiency, thus we performed our experiments with ZAP-70^{+/-} mice. In these heterozygous
87 knockout animals, the immunodeficiency is not as pronounced as in ZAP-70^{-/-} mice, as they have $\alpha\beta$
88 T cells in their peripheral lymphoid organs; however, at significantly decreased numbers, with
89 slightly increased B cell numbers (Figures S1 and S2). Importantly, the expression of ZAP-70 is
90 approximately half of that seen in wild-type T cells based on flow cytometric and Western blot
91 measurements (Figure S3). According to our hypothesis this expression difference might impact the
92 activation and apoptosis pathways of T cells, leading to alterations in autoimmune arthritis.

93 Here we show, that the partial deficiency of the ZAP-70 ameliorated the clinical picture of
94 autoimmune arthritis, which was coupled by alterations in the immune response against the
95 immunizing antigen, shown by decreased T cell proliferation, -cytokine production, antibody levels
96 and altered Th1/Th17 polarization. Importantly, we found significant modifications in the activation

97 and apoptotic pathways of T cells (decreased Caspase-8-, increased Caspase-9 activation, decreased
98 Cytochrome C release, decreased Bcl-2, Bim and Cbl-b levels) isolated from arthritic, partially ZAP-
99 70 deficient mice. Based on these complex changes we conclude that the decreased level of the ZAP-
100 70 in T cells shifts the balance between activation and apoptosis to the latter side which corresponds
101 to the milder arthritis observed.

102 2. Materials and Methods

103 2.1. Experimental animals

104 We used BALB/c and ZAP-70 deficient mice. ZAP-70 deficient mice (B6.129X1-Zap70^{tm1Weis/J})
105 were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) and backcrossed to BALB/c
106 background in our laboratory. Mice were genotyped using primers recommended by Jackson
107 Laboratories (ZAP-70 WT: 5'-AATTAGTCCATCCGCCTTCA-3, ZAP-70 mut: 5'-
108 GCTATCAGGACATAGCGTTGG-3', ZAP-70 common: 5'-CATATGCACTGTCCCTGGTCT-3') to
109 distinguish the three potential genotypes (ZAP-70^{-/-}, ZAP-70^{+/-}, ZAP-70^{+/+}). For arthritis induction we
110 collected 4-5-month-old BALB/c and ZAP-70^{+/-} female mice. Animals were kept and bred in the
111 transgenic mouse facility of Department of Immunology and Biotechnology under conventional
112 conditions at 24±2°C with a controlled 12h/12h light/dark cycle. Mice used in experiments were
113 housed in groups of five and they received acidified water and food *ad libitum*.

114 All animal experiments were performed in accordance with the regulations set out by the
115 Animal Welfare Committee of the University of Pécs (BA02/2000-3/2012, BA02/2000-48/2017).

116 2.2. Arthritis induction

117 For induction of arthritis 4-5-month-old BALB/c or ZAP-70^{+/-} female mice were immunized three
118 times every three weeks intraperitoneally (ip.) with the mixture of 40 µg rhG1 antigen and dimethyl-
119 dioctadecyl-ammonium (DDA) adjuvant (Sigma Aldrich) dissolved in PBS. After the second
120 immunization the development and severity of arthritis was monitored using a clinical scoring
121 system as described previously [20]. Briefly, all paws of all mice get a score from 0 to 4, based on the
122 swelling and the redness of the joint and the presence of ankylosis, resulting in a maximum
123 cumulative score of 16. Mice were sacrificed 3 weeks after the third immunization, sera and spleen
124 were collected. Autoantibody and cytokine levels were determined from the serum, spleen cells were
125 used to start *in vitro* cell cultures, to perform flow cytometric measurement and in some experiments
126 for T cell activation studies.

127 2.3. In vivo bioluminescent imaging

128 For *in vivo* imaging anaesthetized mice were injected intraperitoneally with 20 mg/ml luminol
129 (Sigma Aldrich) in PBS (Molar Chemicals) (150 mg/kg). The myeloperoxidase enzyme originating
130 from neutrophils oxidates luminol, resulting in the emission of blue light ($\lambda_{max} = 425 \text{ nm}$) [41].
131 Pictures were acquired 10 minutes after injection of luminol using an IVIS Lumina II (PerkinElmer,
132 Waltham, USA; 60 s acquisition, F/Stop = 1, Binning = 8) machine.

133 2.4. Intracellular cytokine measurement

134 To measure intracellular production of cytokines 10⁶ cells/sample were stimulated with
135 PMA/ionomycin in the presence of Brefeldin A for 12 hours. The ratio of IL-17 and IFN γ cytokine-
136 producing cells were determined using intracellular flow cytometry. Briefly, after washing with PBS
137 and PBS containing 0.1% sodium-azide and 0.1% BSA (Sigma-Aldrich), 10⁶ cells were labeled with
138 fluorochrome-conjugated cell surface antibodies for 30 min in dark. For the intracellular staining we
139 used the FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, Thermo Scientific, Waltham,
140 USA), according to the manufacturer's description. Cells were incubated for 30 minutes on ice with
141 the fixation/permeabilization buffer, then washed with the washing buffer. After that, cells were
142 incubated with the fluorochrome labeled intracellular antibodies for 30 minutes on ice then washed

143 with washing buffer. Finally, cells were resuspended in PBS containing 1% paraformaldehyde (Sigma
144 Aldrich) and measured on a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). Data acquisition and
145 analysis was performed using FACS Diva Software (BD Biosciences).

146 2.5. *In vitro spleen cell culture*

147 *In vitro* cell cultures were established from the isolated spleens of experimental animals on a 48-
148 well plate (1.8×10^6 cells in DMEM + 10% FCS cell culture medium) and cells were cultured
149 with/without the addition of 1,5 μg rhG1 antigen for 5 days. Supernatants were collected and frozen
150 for later ELISA experiments.

151 2.6. *Antigen-specific proliferation*

152 Another part of cells isolated from the spleen of immunized animals was cultured on a 96-well
153 plate with/without the addition of rhG1 antigen for 5 days (3×10^5 cells/well in triplicates in DMEM +
154 10% FCS cell culture medium). The rate of proliferation was measured using the Promega CellTiter
155 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA).

156 2.7. *ELISA measurements*

157 Concentration of cytokines (IL-4, IL-6, IL-17, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) in sera and supernatants of *in vitro*
158 spleen cell cultures were determined using sandwich ELISA (R&D Systems (Minneapolis, MN, USA),
159 according to the manufacturer's instructions.

160 Serum-concentration of autoantibodies specific for rhG1 antigen was determined using ELISA,
161 as well. We coated 96-well ELISA plates with rhG1 antigen (0,1 μg /well in 100 μl carbonate coating
162 buffer) at room temperature overnight. Plates were blocked using 200 μl /well 1,5% NFDm in PBS for
163 1 hour and washed five times with 300 μl PBS-Tween (0,5% Tween in PBS) solution. Sera were
164 incubated for 2 h (100 μl /well) on the plates, followed by washing with 5x300 μl PBS-Tween. As
165 secondary antibody we used anti-IgG1-peroxidase (BD Biosciences) antibody (2 h, room
166 temperature) then the plates were developed using ortho-phenylenediamine chromophore and
167 hydrogen-peroxide substrate.

168 2.8. *T cell activation and apoptosis*

169 T cells were isolated from the spleens of healthy and arthritic BALB/c and ZAP-70^{+/-} mice using
170 EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada), according
171 to the manufacturer's instructions. Purified T cells were stimulated *in vitro* using MACSiBead™
172 Particles (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) loaded with anti-CD3 and anti-CD28
173 antibodies for 72 hours (2:1 bead/cell ratio) and then processed for Western blotting.

174 Cells were lysed in Triton lysis buffer (50 mM HEPES, 10 mM Na-pyrophosphate, 10 mM EDTA,
175 100 mM Na-fluoride, 10 % glycerol, 1 % Triton X) complemented freshly with protease inhibitor and
176 Na-orthovanadate (all from Sigma-Aldrich). After centrifugation (3000 rpm for 10 min), supernatants
177 were boiled immediately in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer.

178 Samples were separated using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-
179 PAGE), where we used the following gel concentrations: 7.5 % (for Cbl), 10% (for phosphotyrosine,
180 Caspase-9) and 15% (for Bim, Caspase-3 and 8, Bcl-2, Cytochrome C).

181 The gels were blotted for two hours to nitrocellulose membranes using Mini Trans-Blot Cell
182 blotting equipment (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After blotting, nitrocellulose
183 membranes were incubated with the recommended blocking buffer (2 or 5 % BSA (Sigma-Aldrich),
184 5% NFDm in 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20 (Molar Chemicals), pH 7.4)
185 and then incubated with the primary antibodies. Blots were developed with the appropriate
186 peroxidase-conjugated secondary antibody. Anti- β -actin (clone# AC-74, Sigma-Aldrich) was used as
187 loading control. Western blots were visualized using enhanced chemiluminescent reagent
188 (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate, Thermo Scientific) as described in the

189 manufacturer's instructions. Luminescent light signals were detected with Fujifilm LAS 4000 blot
190 imaging system (Fuji, Japan).

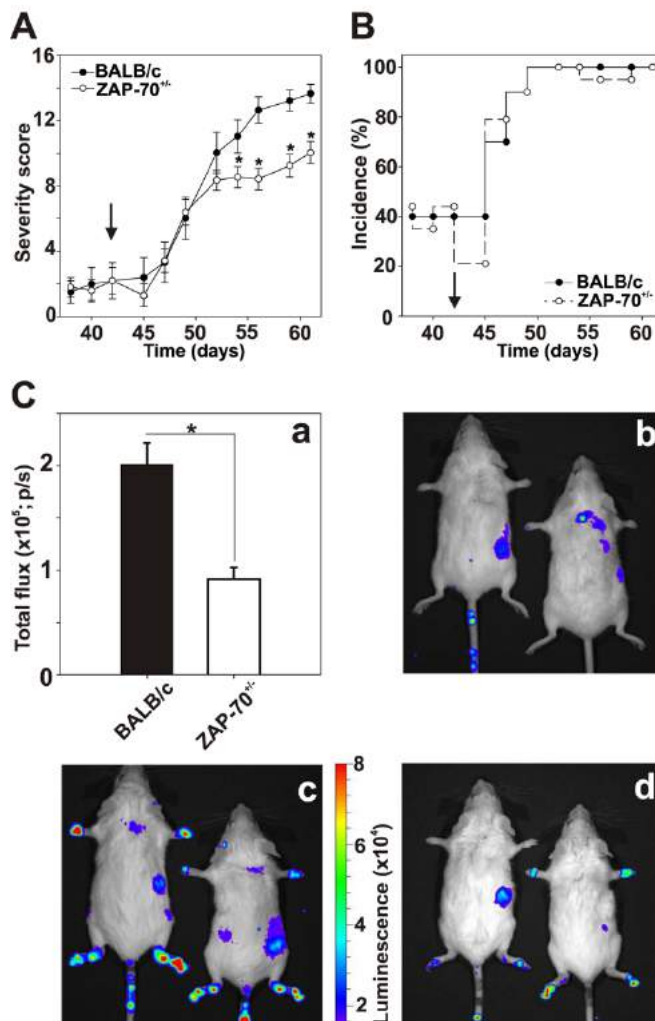
191 2.9. Statistical methods

192 Statistical analysis of the data was performed using the GraphPad software. Statistical
193 significance was determined using the unpaired, two-sample Student's t-test, where $P < 0.05$ was
194 considered significant. Data is presented as mean \pm SEM (standard error of mean).

195 3. Results

196 3.1. Partial deficiency of the ZAP-70 ameliorated the clinical picture of autoimmune arthritis

197 Since we hypothesized that the ZAP-70 deficiency would influence the development of
198 autoimmune arthritis, we immunized normal control (ZAP-70^{+/+}) and partially ZAP-70 deficient
199 (ZAP-70^{+/-}) mice to induce GIA. The two groups of mice developed GIA with similar time kinetics:
200 significant elevation in the severity score was observed a week after the third immunization.
201 Importantly, partially ZAP-70 deficient mice showed similar clinical scores to the controls in the early
202 stages of the experiment (Figure 1, A), however, after day 52 we observed significantly milder
203 arthritis in the ZAP-70^{+/-} group (at day 61 scores were 10 ± 0.7 in the ZAP-70^{+/-} vs 13.6 ± 0.6 in the ZAP-
204 70^{+/+} groups) (Figure 1, A).



205

206

207

208

209

Figure 1. Comparison of the clinical parameters of recombinant human G1 (rhG1)-induced arthritis (GIA) in BALB/c and ZAP-70^{+/-} mice. Female, 4-5-month-old $n=10$ BALB/c (filled circles) and $n=19$ ZAP-70^{+/-} mice (empty circles) were immunized with rhG1 and DDA adjuvant intraperitoneally three times every third week. The severity score (A) and incidence (B) of the induced arthritis is shown on

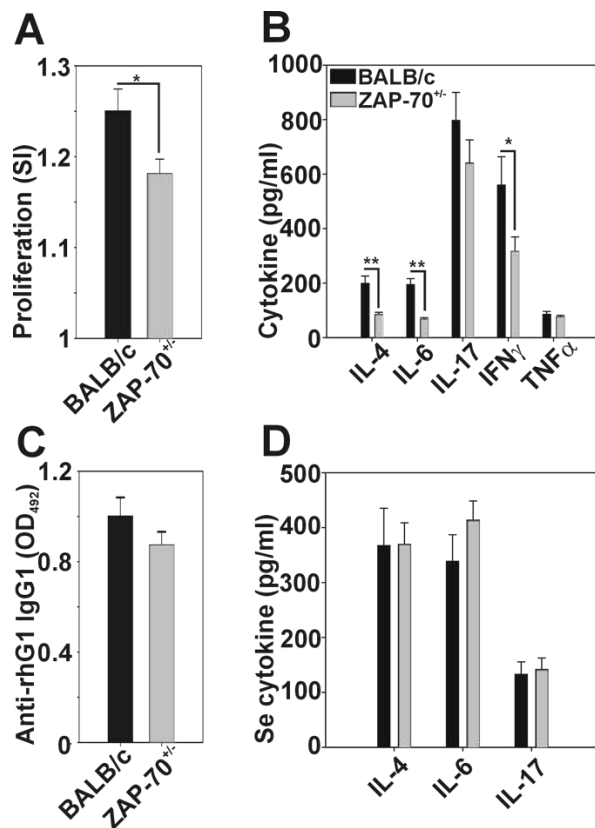
210 the diagrams. Black arrows show the date of third immunization (day 42). Severity of the disease was
211 determined every second day with the help of a scoring system ranging from 1 to 4, based on the
212 swelling, redness and ankylosis of the joints of the paws. Clinical scores are visualized as mean \pm
213 standard error of mean (SEM). Statistically significant (* $P < 0.05$) differences between groups of mice
214 are indicated. *In vivo* bioluminescent imaging was performed on both healthy (C/b) and arthritic
215 BALB/c (C/c) and ZAP-70^{+/-} mice (C/d). The luminescence of intraperitoneally injected luminol
216 correlated well with the myeloperoxidase activity of neutrophils. Figure shows representative images
217 from *in vivo* imaging. Bar diagram (C/a) shows quantitative luminescence values calculated from the
218 hind legs of arthritic n=10 BALB/c (black bar) and n=19 ZAP-70^{+/-} (white bar) mice. Total flux is
219 visualized as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistically significant (* $P < 0.05$) differences
220 between groups of mice are indicated.

221 We did not see any differences in the incidence of arthritis when we compared the ZAP-70^{+/-}-
222 and ZAP-70^{+/+} groups, apart from some insignificant variations during the immunization period, both
223 groups reached 100% incidence one week after the third immunization (Figure 1, B). To objectively
224 quantify the severity of paw inflammation, we performed *in vivo* bioluminescent imaging (Figure 1,
225 C). In accordance with the clinical scores, in the hind legs of the arthritic ZAP-70^{+/-} mice
226 myeloperoxidase activity was significantly reduced in comparison to arthritic ZAP-70^{+/+} mice (Figure
227 1, Ca, Cc and Cd). However, arthritic mice in both groups showed clearly higher luminescence than
228 the healthy controls (Figure 1, Cb).

229

230 3.2. Comparison of the G1-specific immune response between ZAP-70^{+/-} and control mice

231 Based on the clinical differences, next we compared the immune responses of the ZAP-70^{+/-} and
232 ZAP-70^{+/+} mice to the G1 antigen. Spleen cells isolated from arthritic ZAP-70^{+/-} mice proliferated at a
233 significantly decreased level after rhG1 stimulation (Figure 2, A) as the cells of arthritic BALB/c mice
234 (stimulation index: 1.18 ± 0.02 vs 1.25 ± 0.02). ZAP-70^{+/-} spleen cell cultures stimulated with rhG1
235 antigen produced less IL-4, IL-6, IL-17 and IFN γ than the controls (86.18 ± 6.65 vs 119.74 ± 26.31 ; 68.70
236 ± 4.36 vs 195.40 ± 21.04 ; 641.57 ± 83.96 vs 798.16 ± 101.82 and 317.75 ± 51.54 vs 560.73 ± 103.04 ,
237 respectively), while TNF- α levels were approximately the same (77.03 ± 4.34 vs 86.16 ± 9.69) in
238 arthritic BALB/C and ZAP-70^{+/-} supernatants (Figure 2, B).



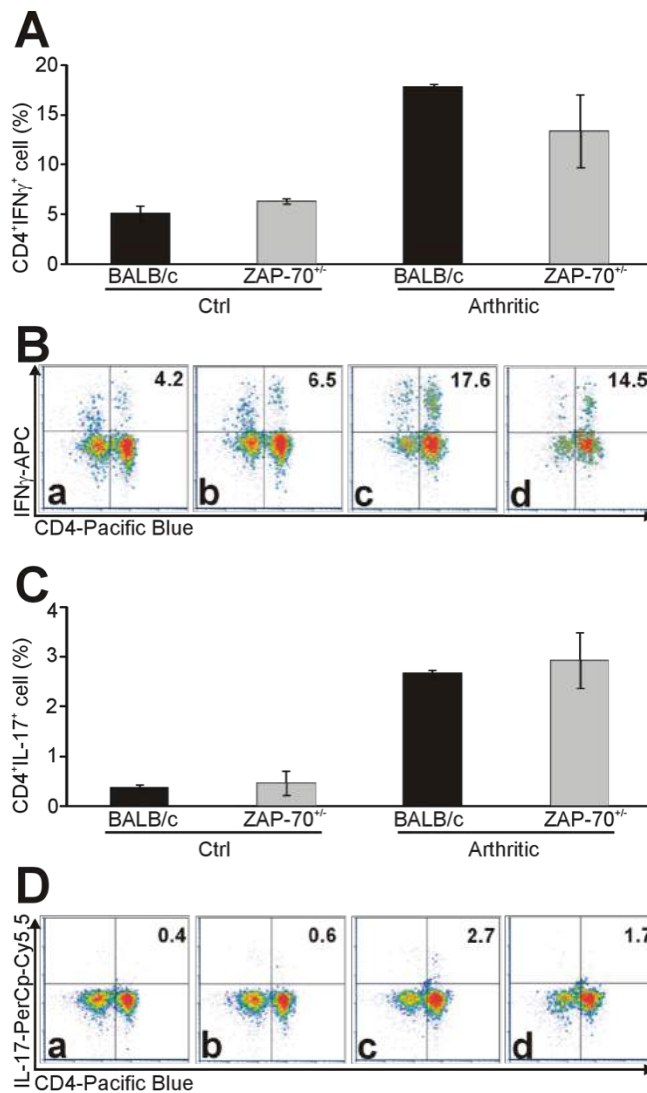
239

240 **Figure 2.** Comparison of the G1-specific immune responses in BALB/c (black bars) and ZAP-70^{+/-} (grey
 241 bars) mice with rhG1-induced arthritis (GIA). Spleen cells isolated from arthritic mice were cultured
 242 *in vitro* in the presence/absence of rhG1, antigen specific proliferation rates (A) were measured using
 243 a Promega CellTiter 96 non-radioactive proliferation assay. Bar diagrams show the stimulation index
 244 calculated from the ratio of optical densities of stimulated/unstimulated wells. (B) The amount of
 245 cytokines produced after *in vitro* rhG1 stimulation was measured from the supernatants of BALB/c
 246 and ZAP-70^{+/-} spleen cell cultures. (C) At the end of the experiments, sera were collected from arthritic
 247 BALB/c and ZAP-70^{+/-} mice, then the anti-rhG1 antibody (C) and the IL-4, IL-6 and IL-17 cytokine (D)
 248 levels were measured. All results shown are mean values \pm standard error of mean (SEM) calculated
 249 from the data of n=10 BALB/c and n=19 ZAP-70^{+/-} mice. Statistically significant (*P<0.05) differences
 250 between groups of mice using unpaired Student's t-test are indicated.

251 The level of G1-specific antibodies was decreased in the serum of ZAP-70^{+/-} mice, however the
 252 difference was not statistically significant (Figure 2, C). The serum levels of IL-17 and IL-4 were
 253 similar in the two groups, however IL-6 was present in increased amounts in the serum of arthritic
 254 ZAP-70^{+/-} mice (Figure 2, D).

255 3.3. Altered Th1/Th17 polarization in the partially ZAP-70 deficient arthritic mice

256 A critical step in the pathogenesis of RA and also its model, GIA, is the polarization of T cells to
 257 Th1 and Th17 directions [22,42]. Therefore, we compared the intracellular cytokine production of
 258 healthy and arthritic T cells from ZAP-70^{+/-} and control mice after PMA/ionomycin stimulation using
 259 flow cytometry. In arthritic mice we detected elevated percentage of IFN γ -producing T cells than in
 260 healthy mice (in arthritic BALB/c 17.88 \pm 0.25%, in arthritic ZAP-70^{+/-} 13.43 \pm 3.64% vs. in healthy BALB/c
 261 5.15 \pm 0.72% and in healthy ZAP-70^{+/-} 6.42 \pm 0.25%, respectively) (Figure 3, A, B).



262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

Figure 3. Cytokine profiles of T helper cells in healthy and arthritic mice. The ratio of cytokine-producing cells was measured from healthy and arthritic BALB/c and ZAP-70^{+/-} spleen cells after in vitro PMA/ionomycin stimulation using intracellular staining followed by flow cytometry. Bar diagrams show the percentage of IFN γ - (A) and IL-17-producing (C) CD4⁺ cells. Representative density plots show the expression of CD4 and IFN γ (B) or CD4 and IL-17 (D) in healthy BALB/c (a), ZAP-70^{+/-} (b) and arthritic BALB/c (c) and ZAP-70^{+/-} (d) mice. Numbers in the plots show the percentages of double positive (CD4⁺ IL-17⁺ or CD4⁺ IFN γ ⁺), cytokine producing T helper cells. All results shown in bar diagrams are mean values \pm standard error of mean (SEM) calculated from the results of n=3 mice in all experimental groups.

272

273

274

275

276

277

When comparing the arthritic mice, a significantly higher percentage of CD4⁺ T cells from BALB/c mice produced IFN γ (17.88 \pm 0.25%) than those from ZAP-70^{+/-} mice (13.43 \pm 3.64%) (Figure 3, A, B). Similarly, from arthritic mice, more IL-17-producing CD4⁺ T cells could be detected than from healthy animals (Figure 3, C, D), however, in case of the IL-17, no prominent difference was observed between BALB/c and ZAP-70^{+/-} mice either arthritic or healthy (healthy: 0.38 \pm 0.05 % in BALB/c and 0.47 \pm 0.25 % in ZAP-70^{+/-} vs arthritic: 2.67 \pm 0.07 % and 2.94 \pm 0.55 %) (Figure 3, C, D).

278

3.4. Alterations in T cell activation and apoptosis in ZAP-70^{+/-} mice

279

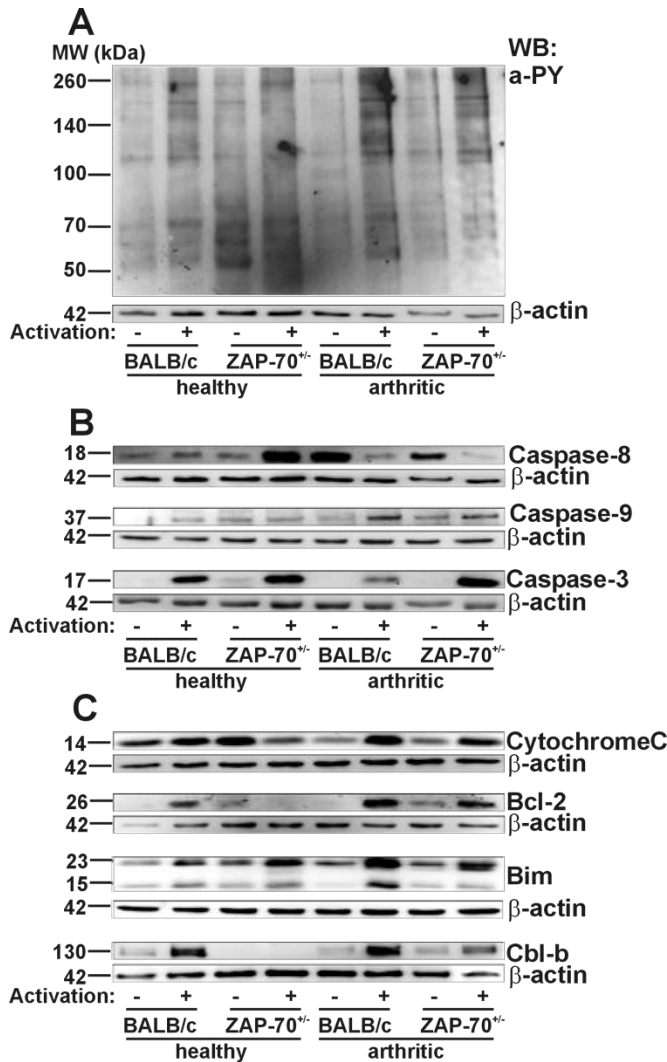
280

281

282

Since ZAP-70 plays an important role in the activation of T cells, finally, we wanted to investigate whether the differences in the clinical picture observed in the partial absence of ZAP-70 could arise from the altered activation/apoptosis of T cells. According to the Western-blot analysis of tyrosine-phosphorylation patterns, T cells from healthy BALB/c or ZAP-70^{+/-} mice activated similarly as a

283 result of *in vitro* anti-CD3/anti-CD28 stimulation (Figure 4, A). However, in the T cells of arthritic
 284 BALB/c and ZAP-70^{+/-} mice we observed a more pronounced tyrosine phosphorylation after
 285 stimulation than in the healthy T cells (Figure 4, A). Importantly, the T cells deriving from the arthritic
 286 ZAP-70^{+/-} mice showed decreased tyrosine-phosphorylation compared to the arthritic BALB/c (Figure
 287 4, A).
 288



289
 290 **Figure 4.** Phosphorylation patterns and expression of apoptotic proteins in healthy and arthritic mice
 291 were assessed with Western-blot. T cells isolated from the spleens of healthy or arthritic BALB/c and
 292 ZAP-70^{+/-} mice were lysed after 72h of anti-CD3/anti-CD28 stimulation. Samples were separated using
 293 SDS-PAGE and detected by Western blotting using anti-phosphotyrosine (a-pY) (A), anti-Caspase-3, -
 294 8, and -9 (B), anti-Cytochrome C, anti-Bcl-2, anti-Bim or anti-Cbl-b (C) antibodies. Blots were reprobed
 295 with anti-β-actin-antibody to confirm equal sample loading. Figure shows representative blots from
 296 at least three independent experiments.

297 Since activation-induced cell death is critical to down-regulate the immune responses [43], and
 298 its dysregulation is thought to be in the background of some autoimmune pathologies [44], next, we
 299 checked the molecular components of the apoptotic cascade. We used cleaved Caspase-3 as a general
 300 apoptotic marker, cleaved Caspase-8 as a marker of activation of the extrinsic pathway and cleaved
 301 Caspase-9 as a marker of the intrinsic pathway [45]. In the stimulated T cells of arthritic BALB/c mice
 302 cleaved Caspase-3 was present in lower amounts as in healthy BALB/c mice (Figure 4, B), however
 303 in T cells of healthy and arthritic ZAP-70^{+/-} mice we observed similar levels of activated Caspase-3.
 304 Importantly, when we compared the arthritic mice groups, the amount of cleaved Caspase-3 was
 305 lower in stimulated BALB/c T cells than in the cells from ZAP-70^{+/-} mice.

306 Cleaved Caspase-8 was present in all samples (Figure 4, B), however while in arthritic T cells its
307 amount decreased after stimulation, in T cells of healthy BALB/c mice it remained unchanged and in
308 healthy ZAP-70^{+/-} T cells its expression increased after stimulation.

309 In T cells of both healthy and arthritic BALB/c mice the amount of cleaved Caspase-9 increased
310 after stimulation with the highest expression seen in stimulated arthritic T cells (Figure 4, B). In
311 healthy ZAP-70^{+/-} T cells the levels of cleaved Caspase-9 did not change as a result of stimulation, the
312 signal intensity was similar to that of arthritic, non-stimulated ZAP-70^{+/-} T cells. In arthritic, ZAP-70^{+/-}
313 T cells the activation of Caspase-9 increased slightly after anti-CD3/anti-CD28 stimulation, but did
314 not reach the level observed in arthritic stimulated BALB/c T cells (Figure 4, B).

315 Cytochrome C is released to the cytoplasm from the mitochondria as a result of the activation of
316 the intrinsic pathway of apoptosis [46]. In T cells of healthy BALB/c mice independently of
317 stimulation the levels of Cytochrome C are similar in the cytoplasm (Figure 4, C), while in healthy
318 ZAP-70^{+/-} T cells, interestingly, we could observe higher amounts in the non-stimulated samples
319 (Figure 4, C). On the other hand, in arthritic samples, stimulation triggered the release of Cytochrome
320 C, it should be noted though, that non-stimulated samples of arthritic T cells contained less
321 Cytochrome C than healthy non-stimulated T cells (Figure 4, C).

322 Bcl-2 is an anti-apoptotic protein, exerting its effects in the intrinsic pathway by neutralizing pro-
323 apoptotic proteins thus inhibiting the development of MOMP and the release of Cytochrome C [47].
324 In T cells isolated from BALB/c mice Bcl-2 could only be detected after stimulation, which was even
325 more prominent in arthritic samples (Figure 4, C). In contrast, in T cells of healthy ZAP-70^{+/-} mice,
326 Bcl-2 was only present in non-stimulated samples in small amount, but in arthritic ZAP-70^{+/-} T cells
327 stimulation increases the expression of Bcl-2, which, however did not reach the level detected in T
328 cells of arthritic BALB/c mice.

329 Bim is a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, a key player in the intrinsic apoptotic
330 pathway. During our experiments we investigated the BimEL and BimL (23 and 15 kDa, respectively)
331 isoforms of Bim [48]. Both isoforms were present at varying levels in all samples after 72h of anti-
332 CD3/anti-CD28 stimulation (Figure 4, C), however we could detect BimEL in higher amounts. As a
333 result of stimulation, the amount of BimEL elevated in all sample pairs, although the change was
334 more pronounced in arthritic samples. The increase resulting from stimulation was more robust in
335 arthritic BALB/c T cells in comparison to the healthy cells. Contrary to this, in ZAP-70^{+/-} T cells, there
336 was no significant difference in healthy and arthritic T cells regarding the BimEL induction. BimL
337 was detected in all samples, as well, although the changes in its level resulting from stimulation were
338 not as pronounced as in the case of BimEL, with the exception of arthritic BALB/c T cells, where the
339 increase observed in BimL levels after stimulation were the most robust observed in both isoforms.

340 Finally, Cbl-b is a negative regulator of ZAP-70, it plays a role in blocking T cells activation and
341 stopping the signaling through the T cell receptor [49]. The amount of Cbl-b increased upon activation
342 in T cells isolated from healthy and arthritic BALB/c mice, to a similar extent (Figure 4, C). While in
343 healthy ZAP-70^{+/-} T cells we could not observe any Cbl-b expression even after stimulation (Figure 4,
344 C), in arthritic ZAP-70^{+/-} T cells Cbl-b appeared in the non-stimulated samples and expression
345 increased upon stimulation, however, it did not reach the level of that seen in stimulated arthritic
346 BALB/c T cells (Figure 4, C).

347 4. Discussion

348 ZAP-70 kinase is a key molecule regulating T cell activation and apoptosis, and the fine
349 regulation of T cell receptor signaling was shown to influence the development of autoimmune
350 arthritis. In a previous study, using two TcR transgenic mice both specific for the P26 sequence found
351 in the human proteoglycan molecule differing only in the TcR expression level of the T cells, we have
352 shown that the signal strength through the TcR had a fundamental impact on arthritis severity [33,50].
353 Based on this, now we wanted to see whether decreased expression level of the ZAP-70, observed in
354 ZAP-70^{+/-} mice, could have an impact on the clinical picture of autoimmune arthritis, too.

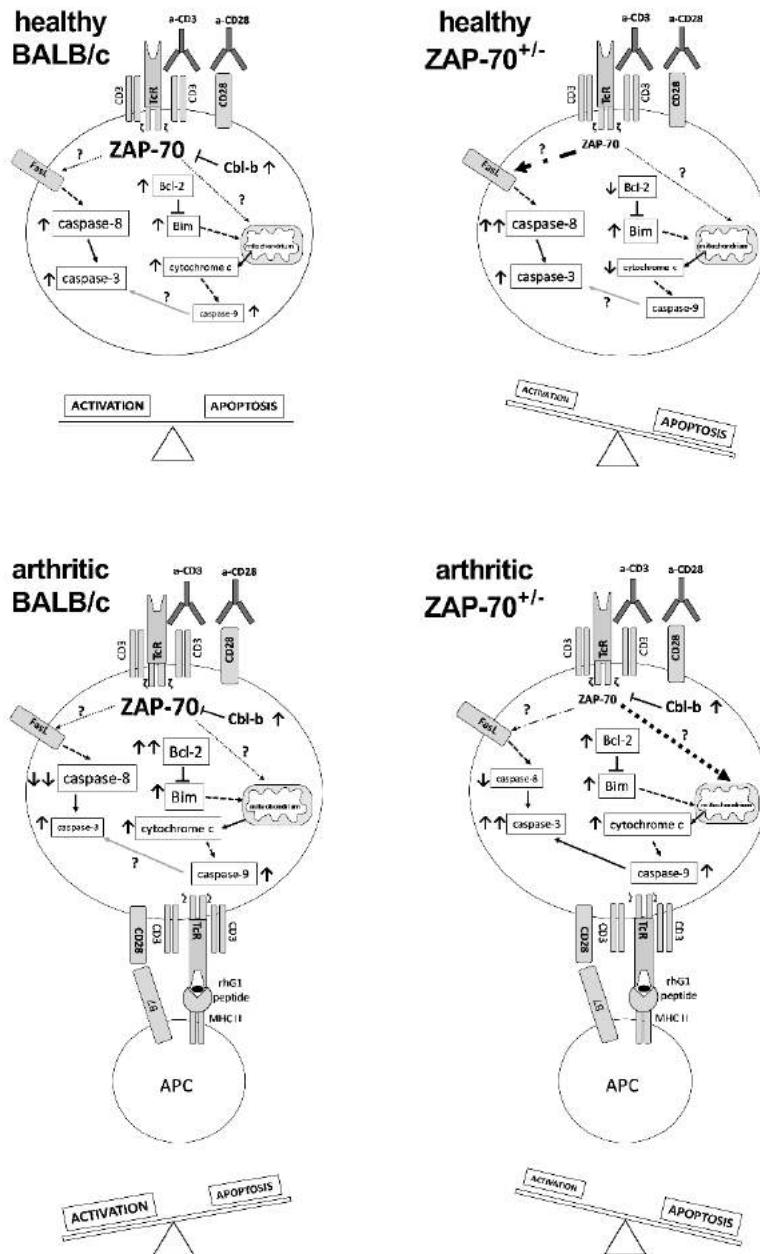
355 Here, we successfully induced arthritis in ZAP-70^{+/-} mice, by the end of the experiment the
356 incidence was similar to that of BALB/c mice, although the severity of articular inflammation was
357 reduced based on clinical scores, supported by *in vivo* imaging, as well.

358 In line with the less severe clinical picture, the rhG1-specific immune responses in arthritic ZAP-
359 70^{+/-} mice showed significant alterations in comparison to control mice: in the *in vitro* spleen cell
360 cultures cellular proliferation rates were significantly reduced and the production of IL-4, IL-6, IL-17
361 and IFN γ decreased. When we analyzed the Th1/Th17 polarization, which are prominent in GIA
362 [22,42], we found that the ratio of IL-17 producing CD4⁺ T cells was similar in arthritic BALB/c and
363 ZAP-70^{+/-} mice, but we found a reduction in the ratio of IFN γ ⁺ CD4⁺ T cells in ZAP-70^{+/-} animals.
364 Based on these results, the partial deficiency of ZAP-70 influenced the Th1/Th17 polarization as well,
365 in contrast to the Th1/Th17 intermediate form typical for the GIA model [22], in ZAP-70^{+/-} mice
366 production of IL-17 seems to be more characteristic with a reduced ratio of IFN γ ⁺ cells.

367 Surprisingly, in the sera, the levels of inflammatory cytokines (IL-6, IL-17) were similar in
368 arthritic and ZAP-70^{+/-} mice. However, serum cytokine data is difficult to interpret in many cases
369 since we measure the sum of cytokine amounts produced by multiple types of immune cells taking
370 part in the systemic inflammatory response in the whole body. However, the amount rhG1-specific
371 antibodies was clearly lower (although not statistically significant) in the partial lack of ZAP-70. This
372 suggests that the cooperation of T cells and B cells was still sufficient in ZAP-70^{+/-} animals and the
373 role of B cells in autoimmune arthritis remains unaltered in the partial absence of ZAP-70.

374 Based on our current and previous results we hypothesize that the alterations seen in the clinical
375 picture and the laboratory parameters might be consequences of the molecular alterations of
376 apoptotic and activator pathways in T cells resulting from the partial deficiency of ZAP-70 [33].
377 Therefore, finally, we focused on various molecules of apoptotic pathways in T cells isolated from
378 healthy and arthritic mice in the presence/absence of anti-CD3/CD28 stimulation.

379 First, based on tyrosine phosphorylation levels the T cells from arthritic BALB/c mice showed
380 higher levels of activation after anti-CD3/CD28 stimulation than T cells from healthy animals. This
381 might be the result of the increased ratio of activated effector T cells in arthritic mice, that are
382 characterized by robust tyrosine phosphorylation after stimulation through the T cell receptor [51].
383 In arthritic ZAP-70^{+/-} mice tyrosine phosphorylation also increased, although slightly weaker than
384 that seen in BALB/c controls, upon anti-CD3/CD28 stimulation, which might suggest that those cells
385 which are capable of becoming efficiently activated even with a reduced ZAP-70 expression might
386 have been “selected” for survival during the induction of GIA. It has to be noted though, that using
387 the anti-phospho-tyrosine antibody we can only detect changes in the overall pattern of tyrosine
388 phosphorylation, which not only shows activation processes, but also alterations in the
389 phosphorylation of negative regulators of activation or even molecules involved in cell death
390 signaling might be detectable.



391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404

Figure 5. Summary of the alterations in the activation and apoptotic pathways of T cells resulting from the partial deficiency of ZAP-70. In T cells of healthy BALB/c mice levels of Cbl-b, Bcl-2, Caspase-3 and-9 increased as a result of anti-CD3/anti-CD28 activation, leading to a balance between apoptotic and activation processes. T cells of healthy ZAP-70^{+/-} mice showed increased expression of Bim, Caspase-3 and -8 after stimulation, with levels of Bcl-2 and cytochrome c decreasing, thus the balance shifted towards apoptosis. In arthritic BALB/c mice T cells showed elevated levels of Cbl-b, Bcl-2, Bim, Cytochrome C, Caspase-3 and-9 and decreased levels of Caspase-8 which shifted the cells towards activation. In T cells of arthritic ZAP-70^{+/-} mice the amount of Cbl-b, Bcl-2, Bim, cytochrome c, Caspase-3 and-9 increased following stimulation, leading to a shift towards apoptosis of T cells. Font size of molecule names refers to their levels detected by Western blotting (see Fig. 4), whereas arrows indicate changes in expression levels in comparison to the corresponding unstimulated samples. Dot dash- or dotted arrows show the putative link to the extrinsic-, or death-receptor-independent apoptosis pathways.

405 The resolution of T cell activation is part of the physiological immune response, and one of the
406 regulators of this process is the Cbl-b molecule, which is part of the Cbl family of proteins, expressed
407 mostly by peripheral T cells [52]. Cbl-b down-regulates signaling through the T cell receptor: it blocks
408 the activation of ZAP-70 [53], Vav1, PLC γ 1 and PKC- θ [49], thus contributing to the development of
409 T cell anergy [54]. As expected, in the T cells of healthy BALB/c mice the amount of Cbl-b increased
410 after anti-CD3/CD28 stimulation. Surprisingly, in ZAP-70^{+/-} T cells from healthy animals, Cbl-b was
411 undetectable even after stimulation. This might be explained by the fact that ZAP-70^{+/-} T cells are less
412 activated after anti-CD3/CD28 stimulation than BALB/c T cells, thus the negative inhibition by Cbl-b
413 is not needed to suppress activation. The phosphorylation of Cbl-b changes in parallel with that of
414 SLP-76 [55] and as SLP-76 is phosphorylated by ZAP-70 [56], a reduced expression of ZAP-70 might
415 lead to lower phosphorylation levels in both molecules. Nevertheless, as ZAP-70 has a direct contact
416 with Cbl-b as well [53], thus alterations in its expression levels might alter the expression of Cbl-b,
417 too. It was described that in Cbl-b deficient mice the T cell tolerance is disturbed, resulting in more
418 severe collagen induced autoimmune arthritis in comparison to wild-type controls even in the
419 absence of adjuvant [54]. In our GIA model the amount of Cbl-b in arthritic T cells from BALB/c mice
420 was similar to that of healthy animals, similar to what was described in a human study with T cells
421 of RA patients [57]. Interestingly, Cbl-b was induced in the T cells of arthritic ZAP-70^{+/-} mice. We
422 hypothesize, that this could be due to the *in vivo* selection of activated effector cells.

423 Apoptosis resistance of T cells was described both in RA patients and animal models of arthritis,
424 which in addition to the continuous T cell activation might contribute to the development of
425 autoimmunity [31,58]. Similar to this, we have also found, that in T cells isolated from arthritic
426 BALB/c mice, apoptosis was reduced based on cleaved Caspase-3 expression (Figs. 4 and 5). In
427 contrast, in arthritic ZAP-70^{+/-} T cells apoptosis levels were similar to healthy controls, higher amounts
428 of cleaved Caspase-3 were observed than in arthritic BALB/c T cells (Figs. 4 and 5). These results
429 might help to explain the differences in the severity of arthritis of BALB/c and ZAP-70^{+/-} mice: when
430 apoptosis decreased, activated T cells persisted in BALB/c mice, which kept the inflammation active
431 and contributed to the more pronounced tissue injury, whereas in the partial absence of ZAP-70 the
432 apoptotic processes remained close to normal (Figs. 4 and 5).

433 The extrinsic apoptotic pathway is an important mechanism of the activation induced cell death
434 [59,60]. Interestingly, in the T cells of arthritic mice we could not detect cleaved Caspase-8 after *in*
435 *vitro* anti-CD3/CD28 stimulation (Figs. 4 and 5). This is in line with the previously found reduced
436 level of apoptosis in BALB/c mice (see the previous paragraph). We hypothesize, that, in arthritic
437 mice, activated T cells are supposedly resistant of activation induced cell death. In a similar mouse
438 model, using human proteoglycan aggrecan to induce arthritis it was described that in the T cells of
439 immunized BALB/c mice reduced activation induced cell death was observable after *in vitro* anti-CD3
440 stimulation, as an altered expression of FLIP inhibited the relocation of Caspase-8 to the DISC [61].
441 On the other hand, in arthritic, but non-stimulated T cells significant amounts of cleaved Caspase-8
442 was detectable (Figs. 4 and 5). This might be explained by the method of arthritis induction – the
443 three immunizations with the antigen might be seen as repeated antigen-stimuli resulting in
444 activation induced cell death through the extrinsic pathway. The processes inhibiting activation
445 induced cell death seen in arthritic, anti-CD3/CD28-stimulated T cells are probably not initiated in
446 the non-stimulated samples because expression of FLIP increases only after signaling through the T
447 cell receptor [62] and the strength of signaling, the level of co-stimulation and the activation levels of
448 signaling molecules are different after *in vitro* (anti-CD3/CD28 stimulation) and *in vivo* (immunization
449 during arthritis induction) stimulation. ZAP-70 is also important for activation induced cell death, as
450 in its absence up-regulation of FasL does not take place, and the extrinsic pathway cannot be activated
451 [63,64]. This might explain why the amount of cleaved Caspase-8 is lower in arthritic ZAP-70^{+/-} T cells
452 than in BALB/c T cells.

453 Activation induced cell death has also a death-receptor-independent version, triggering the
454 intrinsic apoptotic pathway [43,60,65]. The key molecules of this process are Bim and Bcl-2 [48,66,67].
455 Based on our results, in arthritic ZAP-70^{+/-} T cells the intrinsic pathway is active independently of
456 stimulation with anti-CD3/anti-CD28, shown by the presence of cleaved Caspase-9, however in

457 arthritic BALB/c T cells only the anti-CD3/anti-CD28 stimulation triggers the activation of the
458 intrinsic pathway (Figs. 4 and 5). Although the amount of pro-apoptotic Bim protein increased in all
459 samples as a result of anti-CD3/CD28 stimulation, we observed higher expression in arthritic samples
460 in comparison to the healthy T cells. Changes in the anti-apoptotic Bcl-2 were similar; *in vitro*
461 stimulated, arthritic samples showed significant elevation of Bcl-2. The fate of the cell is decided by
462 the ratio of Bcl-2 and Bim, if Bcl-2 is expressed in higher amounts it can inhibit the pro-apoptotic
463 effects of Bim and the cell survives, but if the amount of Bim outweighs that of Bcl-2, the cell goes
464 through apoptosis via the intrinsic pathway [66,68]. As a result of this process Cytochrome C
465 is released from the mitochondria into the cytoplasm [69], which is indeed what we observed in our
466 samples: after anti-CD3/CD28 stimulation Cytochrome C was present in increased amounts in cell
467 lysates from arthritic T cells (Figs. 4 and 5). According to our results, in arthritic T cells upon
468 stimulation, Bcl-2 cannot block the pro-apoptotic effects of elevated Bim levels, thus Cytochrome C
469 is released from the mitochondria, leading to Caspase-9 activation through the apoptosome.
470 Although similar amounts of cleaved Caspase-9 were observed in arthritic, anti-CD3/CD28-
471 stimulated T cells of BALB/c and ZAP-70^{+/-} the amount of Caspase-3 was lower in BALB/c T cells
472 (Figs. 4 and 5). On one side it is possible that the cleavage of Caspase-3 by Caspase-9 was inhibited
473 in BALB/c mice, but, on the other side, increased activation of Caspase-3 in ZAP-70^{+/-} T cells might be
474 caused by other activation pathways, not investigated in this study.

475 It is interesting to note, that activation induced cell death (Caspase-8) was increased in non-
476 stimulated arthritic BALB/c T cells, however the effector cleaved Caspase-3 was undetectable (Figs. 4
477 and 5). Furthermore, as a consequence of anti-CD3/CD28 stimulation the level of apoptosis was
478 diminished in arthritic BALB/c T cells in comparison to healthy T cells (Figs. 4 and 5). Based on this,
479 we propose that activation induced cell death via the extrinsic pathway (Caspase-8) might not play
480 an important role in these T cells, however as Bim is expressed in higher levels as Bcl-2, Bim can exert
481 its pro-apoptotic effects, leading to Cytochrome C release from the mitochondria, activating Caspase-
482 9 (Figs. 4 and 5). Furthermore, it is also possible that the activation of Caspase-3 does not take place
483 as a consequence of anti-CD3/CD28 stimulation in T cells from arthritic mice, because of the activation
484 of various inhibitors or anti-apoptotic molecules.

485 The partial deficiency of ZAP-70 changed the above mentioned situation: in non-stimulated
486 arthritic ZAP-70^{+/-} T cells activation induced cell death (Caspase-8) was less pronounced than in the
487 BALB/c, and, regarding the intrinsic pathway, the Bcl-2 expression was stronger than in BALB/c,
488 blocking the pro-apoptotic effects of Bim, and, as a sum of these processes Caspase-3 was not cleaved
489 (Figs. 4 and 5). In arthritic, anti-CD3/CD28-stimulated ZAP-70^{+/-} T cells the intrinsic pathway seems
490 to dominate, while in healthy, anti-CD3/CD28-stimulated ZAP-70^{+/-} T cells the extrinsic pathway
491 might be triggered more efficiently.

492 As a conclusion, we propose that partial ZAP-70 deficiency changes the balance between the
493 activation and apoptotic processes of T cells (Fig. 5). In arthritic BALB/c mice, the T cell
494 activation/apoptosis balance shifted to activation leading to severe arthritis and the accumulation of
495 pathogenic T cells. In partial ZAP-70 deficient mice, on the other hand, the T cell activation is
496 impaired and the apoptotic processes are more pronounced leading to milder inflammation in the
497 joints (Fig. 5). Our work clearly demonstrates the importance of ZAP-70 in the regulation of TcR-
498 dependent activation and apoptosis signaling pathways in autoimmune arthritis.

499 **Supplementary Materials:** The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, **Figure S1:** Histological
500 analysis of the thymus and peripheral lymphoid organs of ZAP-70 deficient mice. (A) Immunofluorescent staining
501 of thymus frozen sections from ZAP-70^{+/+} (a,d), ZAP-70^{+/-} (b,e) and ZAP-70^{-/-} (c,f) mice using anti-CD8-FITC
502 (green) and anti-CD4-PE (red) antibodies (a,b,c) or anti-EpCAM1-FITC (green) and anti-Ly51-PE (red) antibodies
503 (d,e,f). Representative 10x magnification images with both staining methods show that the medullary region
504 (white dashed line) decreases in size in ZAP-70^{+/-} (b,e) and ZAP-70^{-/-} (c,f) thymi. (B) Immunofluorescent staining
505 of inguinal lymph node frozen sections from ZAP-70^{+/+} (a), ZAP-70^{+/-} (b) and ZAP-70^{-/-} (c) mice using anti-CD3-
506 FITC (green) and anti-B220-Alexa Fluor 647 (red) antibodies. Representative 10x magnification images show that
507 the T cell zone (green) is disturbed in ZAP-70^{+/-} (b) lymph nodes while virtually disappears in ZAP-70^{-/-} (c)
508 samples. (C) Immunofluorescent staining of spleen frozen sections from ZAP-70^{+/+} (a), ZAP-70^{+/-} (b) and ZAP-70^{-/-}
509 (c) mice using anti-CD3-FITC (green) and anti-B220-Alexa Fluor 647 (red). Representative 20x magnification

510 images show that the structure of PALS region (white dashed line) filled with T cells (green) is not significantly
 511 altered in ZAP-70^{-/-} mice, however it is missing in the ZAP-70^{-/-} (c) samples. **Figure S2:** Flow cytometry analysis
 512 of the cellular composition of the LN (panels A and B), spleen (panels C and D) and the thymus (panel E) from
 513 ZAP-70^{+/+} (black bars), ZAP-70^{+/-} (grey bars) or ZAP-70^{-/-} (white bars) mice. LN (panels A and B) and spleen
 514 (panels C and D) cells were stained with anti-CD3-APC-Cy7, anti-B220-PE-Cy7, anti-CD4-PE and anti-CD8-PE-
 515 Cy5.5 antibodies to distinguish T-, B- (panels A, C), T helper and T cytotoxic (panels B, D) cells. Thymocytes
 516 were stained with anti-CD4-PE and anti-CD8-PE-Cy5.5 antibodies to distinguish CD4⁺CD8⁻ double negative
 517 (DN), CD4⁺CD8⁺ double positive (DP), CD4⁺ single positive (SP) and CD8⁺ SP cells (panel E). Bars show the
 518 average ± SEM values calculated from the data of 3–4 mice from every genotype. Significant (*P<0.05) differences
 519 are indicated. **Figure S3:** Analysis of ZAP-70 expression from ZAP-70^{+/+}, ZAP-70^{+/-} and ZAP-70^{-/-} mice. **A:** ZAP-
 520 70 expression was checked from LN and spleen cell lysates using Western blot. Values above the Western-blot
 521 panels show the relative density values corrected with the actin loading controls. **B:** Representative flow
 522 cytometry histograms show the ZAP-70 staining of LN cells from ZAP-70^{+/+} (green), ZAP-70^{+/-} (magenta) and
 523 ZAP-70^{-/-} (violet) mice. **C:** Box chart summarizes the MFI values from the 3 mice in each genotype groups.

524 **Author Contributions:** Conceptualization F.B., R.K., K.O., T.T.G.; methodology R.K., Z.K., L.P., K.O., B.B.;
 525 formal analysis, F.B., R.K.; investigation, R.K., L.P., O.K., B.B.; visualization, B.B.; writing—original draft
 526 preparation, R.K.; writing—review and editing, F.B.; supervision, F.B., T.B.; project administration, F.B.; funding
 527 acquisition, F.B., T.B.”.

528 **Funding:** This research was funded by the Hungarian National Research Fund (NKFIH, formerly OTKA) [grant
 529 number OTKA K101493 to F.B.]; and Research Grant from the Medical Faculty of the University of Pecs [grant
 530 number KA-2015-23 to K.O.]; the Janos Bolyai Research Scholarship from the Hungarian Academy of Sciences
 531 [grant number BO/00086/12/5 to F.B.] and a Post-Doctoral Research Scholarships from the Hungarian Academy
 532 of Sciences [grant number 716/180/2014/KIF to K.O.] and the Medical Faculty of the University of Pecs [grant
 533 number KA-POSTDOK-12-05 to K.O.]. The project has been supported by the European Union, co-financed by
 534 the European Social Fund: Projects “Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization
 535 Strategies at the University of Pécs” (EFOP-3.6.1.-16-2016-00004) and “PEPSYS – Complexity of peptide-
 536 signalization and its role in systemic diseases” (GINOP 2.3.2-15-2016-00050).

537 **Acknowledgments:** We are grateful to Tamás Kiss MSc for his useful technical help in the in vivo inflammation
 538 imaging, at the In Vivo Imaging Laboratory at the Szentágotthai Research Center, University of Pécs.

539 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

540

541 References

- 542 (1) Chan, A. C.; Irving, B. A.; Fraser, J. D.; Weiss, A. The Zeta Chain Is Associated with a Tyrosine Kinase
 543 and upon T-Cell Antigen Receptor Stimulation Associates with ZAP-70, a 70-KDa Tyrosine
 544 Phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (20), 9166–9170.
- 545 (2) Chan, A. C.; Iwashima, M.; Turck, C. W.; Weiss, A. ZAP-70: A 70 Kd Protein-Tyrosine Kinase That
 546 Associates with the TCR Zeta Chain. *Cell* **1992**, *71* (4), 649–662.
- 547 (3) Vivier, E.; da Silva, A. J.; Ackerly, M.; Levine, H.; Rudd, C. E.; Anderson, P. Association of a 70-KDa
 548 Tyrosine Phosphoprotein with the CD16: Zeta: Gamma Complex Expressed in Human Natural Killer
 549 Cells. *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23* (8), 1872–1876. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230821>.
- 550 (4) Scielzo, C.; Camporeale, A.; Geuna, M.; Alessio, M.; Poggi, A.; Zocchi, M. R.; Chilosi, M.; Caligaris-
 551 Cappio, F.; Ghia, P. ZAP-70 Is Expressed by Normal and Malignant Human B-Cell Subsets of Different

- 552 Maturational Stage. *Leukemia* **2006**, *20* (4), 689–695. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404138>.
- 553 (5) Chakupurakal, G.; Bell, A.; Griffiths, M.; Wandroo, F.; Moss, P. Analysis of ZAP70 Expression in Adult
554 Acute Lymphoblastic Leukaemia by Real Time Quantitative PCR. *Mol. Cytogenet.* **2012**, *5* (1), 22.
555 <https://doi.org/10.1186/1755-8166-5-22>.
- 556 (6) Schweighoffer, E.; Vanes, L.; Mathiot, A.; Nakamura, T.; Tybulewicz, V. L. . Unexpected Requirement
557 for ZAP-70 in Pre-B Cell Development and Allelic Exclusion. *Immunity* **2003**, *18* (4), 523–533.
558 [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00082-7).
- 559 (7) Fallah-Arani, F.; Schweighoffer, E.; Vanes, L.; Tybulewicz, V. L. J. Redundant Role for Zap70 in B Cell
560 Development and Activation. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38* (6), 1721–1733.
561 <https://doi.org/10.1002/eji.200738026>.
- 562 (8) Wang, H.; Kadlecsek, T. A.; Au-Yeung, B. B.; Goodfellow, H. E. S.; Hsu, L.-Y.; Freedman, T. S.; Weiss, A.
563 ZAP-70: An Essential Kinase in T-Cell Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (5), a002279.
564 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002279>.
- 565 (9) Kadlecsek, T. A.; van Oers, N. S. C.; Lefrancois, L.; Olson, S.; Finlay, D.; Chu, D. H.; Connolly, K.; Killeen,
566 N.; Weiss, A. Differential Requirements for ZAP-70 in TCR Signaling and T Cell Development. *J.*
567 *Immunol.* **1998**, *161* (9), 4688–4694.
- 568 (10) Walkovich, K.; Vander Lugt, M. *ZAP70-Related Combined Immunodeficiency*; 1993.
- 569 (11) Palacios, E. H.; Weiss, A. Distinct Roles for Syk and ZAP-70 during Early Thymocyte Development. *J.*
570 *Exp. Med.* **2007**, *204* (7), 1703–1715. <https://doi.org/10.1084/jem.20070405>.
- 571 (12) Negishi, I.; Motoyama, N.; Nakayama, K.; Senju, S.; Hatakeyama, S.; Zhang, Q.; Chan, A. C.; Loh, D. Y.
572 Essential Role for ZAP-70 in Both Positive and Negative Selection of Thymocytes. *Nature* **1995**, *376*
573 (6539), 435–438. <https://doi.org/10.1038/376435a0>.
- 574 (13) Smolen, J. S.; Aletaha, D.; McInnes, I. B. Rheumatoid Arthritis. *Lancet* **2016**, *388* (10055), 2023–2038.
575 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8).
- 576 (14) Smolen, J. S.; Aletaha, D.; Barton, A.; Burmester, G. R.; Emery, P.; Firestein, G. S.; Kavanaugh, A.;
577 McInnes, I. B.; Solomon, D. H.; Strand, V.; et al. Rheumatoid Arthritis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4*, 18001.
578 <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>.
- 579 (15) Boissier, M.-C.; Semerano, L.; Challal, S.; Saldenbergh-Kermanac’h, N.; Falgarone, G. Rheumatoid
580 Arthritis: From Autoimmunity to Synovitis and Joint Destruction. *J. Autoimmun.* **2012**, *39* (3), 222–228.
581 <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.05.021>.
- 582 (16) Billiau, A.; Matthys, P. Collagen-Induced Arthritis and Related Animal Models: How Much of Their
583 Pathogenesis Is Auto-Immune, How Much Is Auto-Inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev.* *22* (5–6),
584 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.11.003>.
- 585 (17) McNamee, K.; Williams, R.; Seed, M. Animal Models of Rheumatoid Arthritis: How Informative Are

- 586 They? *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *759*, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.047>.
- 587 (18) Kobezda, T.; Ghassemi-Nejad, S.; Mikecz, K.; Glant, T. T.; Szekanecz, Z. Of Mice and Men: How Animal
588 Models Advance Our Understanding of T-Cell Function in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2014**, *10* (3), 160–
589 170. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.205>.
- 590 (19) Bessis, N.; Decker, P.; Assier, E.; Semerano, L.; Boissier, M.-C. Arthritis Models: Usefulness and
591 Interpretation. *Semin. Immunopathol.* **2017**, *39* (4), 469–486. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0622-4>.
- 592 (20) Glant, T. T.; Radacs, M.; Nagyeri, G.; Olasz, K.; Laszlo, A.; Boldizsar, F.; Hegyi, A.; Finnegan, A.; Mikecz,
593 K. Proteoglycan-Induced Arthritis and Recombinant Human Proteoglycan Aggrecan G1 Domain-
594 Induced Arthritis in BALB/c Mice Resembling Two Subtypes of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.*
595 **2011**, *63* (5), 1312–1321. <https://doi.org/10.1002/art.30261>.
- 596 (21) Finnegan, A.; Mikecz, K.; Tao, P.; Glant, T. T. Proteoglycan (Aggrecan)-Induced Arthritis in BALB/c Mice
597 Is a Th1-Type Disease Regulated by Th2 Cytokines. *J. Immunol.* **1999**, *163* (10), 5383–5390.
- 598 (22) Boldizsar, F.; Tarjanyi, O.; Nemeth, P.; Mikecz, K.; Glant, T. T. Th1/Th17 Polarization and Acquisition of
599 an Arthritogenic Phenotype in Arthritis-Susceptible BALB/c, but Not in MHC-Matched, Arthritis-
600 Resistant DBA/2 Mice. *Int. Immunol.* **2009**, *21* (5), 511–522. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp018>.
- 601 (23) Cope, A. P.; Schulze-Koops, H.; Aringer, M. The Central Role of T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Clin.*
602 *Exp. Rheumatol.* *25* (5 Suppl 46), S4–11.
- 603 (24) Cope, A. P. Studies of T-Cell Activation in Chronic Inflammation. *Arthritis Res.* **2002**, *4* (Suppl 3), S197.
604 <https://doi.org/10.1186/ar557>.
- 605 (25) Mellado, M.; Martínez-Muñoz, L.; Cascio, G.; Lucas, P.; Pablos, J. L.; Rodríguez-Frade, J. M. T Cell
606 Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 384.
607 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00384>.
- 608 (26) Takemura, S.; Klimiuk, P. A.; Braun, A.; Goronzy, J. J.; Weyand, C. M. T Cell Activation in Rheumatoid
609 Synovium Is B Cell Dependent. *J. Immunol.* **2001**, *167* (8), 4710–4718.
610 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4710>.
- 611 (27) Carvalheiro, H.; Duarte, C.; Silva-Cardoso, S.; da Silva, J. A. P.; Souto-Carneiro, M. M. CD8+ T Cell
612 Profiles in Patients With Rheumatoid Arthritis and Their Relationship to Disease Activity. *Arthritis*
613 *Rheumatol.* **2015**, *67* (2), 363–371. <https://doi.org/10.1002/art.38941>.
- 614 (28) Shoda, H.; Fujio, K.; Sakurai, K.; Ishigaki, K.; Nagafuchi, Y.; Shibuya, M.; Sumitomo, S.; Okamura, T.;
615 Yamamoto, K. Autoantigen BiP-Derived HLA-DR4 Epitopes Differentially Recognized by Effector and
616 Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **2015**, *67* (5), 1171–1181.
617 <https://doi.org/10.1002/art.39054>.
- 618 (29) Yamamoto, K.; Sakoda, H.; Nakajima, T.; Kato, T.; Okubo, M.; Dohi, M.; Mizushima, Y.; Ito, K.; Nishioka,
619 K. Accumulation of Multiple T Cell Clonotypes in the Synovial Lesions of Patients with Rheumatoid
620 Arthritis Revealed by a Novel Clonality Analysis. *Int. Immunol.* **1992**, *4* (11), 1219–1223.

- 621 (30) Cutolo, M.; Sulli, A.; Paolino, S.; Pizzorni, C. CTLA-4 Blockade in the Treatment of Rheumatoid Arthritis:
622 An Update. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2016**, *12* (4), 417–425.
623 <https://doi.org/10.1586/1744666X.2016.1133295>.
- 624 (31) Malemud, C.; Malemud, J., C. Defective T-Cell Apoptosis and T-Regulatory Cell Dysfunction in
625 Rheumatoid Arthritis. *Cells* **2018**, *7* (12), 223. <https://doi.org/10.3390/cells7120223>.
- 626 (32) Scatizzi, J. C.; Hutcheson, J.; Bickel, E.; Haines, G. K.; Perlman, H. Pro-Apoptotic Bid Is Required for the
627 Resolution of the Effector Phase of Inflammatory Arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2007**, *9* (3), R49.
628 <https://doi.org/10.1186/ar2204>.
- 629 (33) Hanyecz, A.; Olsz, K.; Tarjanyi, O.; Nemeth, P.; Mikecz, K.; Glant, T. T.; Boldizsar, F. Proteoglycan
630 Aggrecan Conducting T Cell Activation and Apoptosis in a Murine Model of Rheumatoid Arthritis.
631 *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 942148. <https://doi.org/10.1155/2014/942148>.
- 632 (34) Szodoray, P.; Jellestad, S.; Nakken, B.; Brun, J. G.; Jonsson, R. Programmed Cell Death in Rheumatoid
633 Arthritis Peripheral Blood T-Cell Subpopulations Determined by Laser Scanning Cytometry. *Lab Invest*
634 **2003**, *83*, 1839–1848. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000101703.80133.99>.
- 635 (35) Lundy, S. K.; Sarkar, S.; Tesmer, L. A.; Fox, D. A. Cells of the Synovium in Rheumatoid Arthritis. T
636 Lymphocytes. *Arthritis Res. Ther.* **2007**, *9* (1), 202. <https://doi.org/10.1186/ar2107>.
- 637 (36) Calabresi, E.; Petrelli, F.; Bonifacio, A. F.; Puxeddu, I.; Alunno, A. One Year in Review 2018: Pathogenesis
638 of Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **36** (2), 175–184.
- 639 (37) Sakaguchi, N.; Takahashi, T.; Hata, H.; Nomura, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Matsutani,
640 T.; Negishi, I.; Nakatsuru, S.; et al. Altered Thymic T-Cell Selection Due to a Mutation of the ZAP-70
641 Gene Causes Autoimmune Arthritis in Mice. *Nature* **2003**, *426* (6965), 454–460.
642 <https://doi.org/10.1038/nature02119>.
- 643 (38) Hirota, K.; Hashimoto, M.; Yoshitomi, H.; Tanaka, S.; Nomura, T.; Yamaguchi, T.; Iwakura, Y.;
644 Sakaguchi, N.; Sakaguchi, S. T Cell Self-Reactivity Forms a Cytokine Milieu for Spontaneous
645 Development of IL-17+ Th Cells That Cause Autoimmune Arthritis. *J. Exp. Med.* **2007**, *204* (1), 41–47.
646 <https://doi.org/10.1084/jem.20062259>.
- 647 (39) Thomas, R.; Turner, M.; Cope, A. P. High Avidity Autoreactive T Cells with a Low Signalling Capacity
648 through the T-Cell Receptor: Central to Rheumatoid Arthritis Pathogenesis? *Arthritis Res. Ther.* **2008**, *10*
649 (4), 210. <https://doi.org/10.1186/ar2446>.
- 650 (40) Tarjanyi, O.; Boldizsar, F.; Nemeth, P.; Mikecz, K.; Glant, T. T. Age-Related Changes in Arthritis
651 Susceptibility and Severity in a Murine Model of Rheumatoid Arthritis. *Immun. Ageing* **2009**, *6* (1), 8.
652 <https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-8>.
- 653 (41) Gross, S.; Gammon, S. T.; Moss, B. L.; Rauch, D.; Harding, J.; Heinecke, J. W.; Ratner, L.; Piwnica-Worms,
654 D. Bioluminescence Imaging of Myeloperoxidase Activity in Vivo. *Nat. Med.* **2009**, *15* (4), 455–461.
655 <https://doi.org/10.1038/nm.1886>.

- 656 (42) Kugyelka, R.; Kohl, Z.; Olsz, K.; Mikecz, K.; Rauch, T. A.; Glant, T. T.; Boldizsar, F. Enigma of IL-17 and
657 Th17 Cells in Rheumatoid Arthritis and in Autoimmune Animal Models of Arthritis. *Mediators Inflamm.*
658 **2016**, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/6145810>.
- 659 (43) Brenner, D.; Krammer, P. H.; Arnold, R. Concepts of Activated T Cell Death. *Critical Reviews in*
660 *Oncology/Hematology*. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.01.002>.
- 661 (44) Arakaki, R.; Yamada, A.; Kudo, Y.; Hayashi, Y.; Ishimaru, N. Mechanism of Activation-Induced Cell
662 Death of T Cells and Regulation of FasL Expression. *Crit. Rev. Immunol.* **2014**, *34* (4), 301–314.
- 663 (45) Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E. S.; Altucci, L.;
664 Amelio, I.; Andrews, D. W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the
665 Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25* (3), 486–541.
666 <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- 667 (46) Tait, S. W. G.; Green, D. R. Mitochondria and Cell Death: Outer Membrane Permeabilization and
668 Beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>.
- 669 (47) Birkinshaw, R. W.; Czabotar, P. E. The BCL-2 Family of Proteins and Mitochondrial Outer Membrane
670 Permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *72*, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.001>.
- 671 (48) Sionov, R. V.; Vlahopoulos, S. A.; Granot, Z. Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget* **2015**,
672 *6* (27), 23058–23134. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5492>.
- 673 (49) Shamim, M.; Nanjappa, S. G.; Singh, A.; Plisch, E. H.; LeBlanc, S. E.; Walent, J.; Svaren, J.; Seroogy, C.;
674 Suresh, M. Cbl-b Regulates Antigen-Induced TCR down-Regulation and IFN-Gamma Production by
675 Effector CD8 T Cells without Affecting Functional Avidity. *J. Immunol.* **2007**, *179* (11), 7233–7243.
- 676 (50) Olsz, K.; Boldizsar, F.; Kis-Toth, K.; Tarjanyi, O.; Hegyi, A.; van Eden, W.; Rauch, T. A.; Mikecz, K.;
677 Glant, T. T. T Cell Receptor (TCR) Signal Strength Controls Arthritis Severity in Proteoglycan-Specific
678 TCR Transgenic Mice. *Clin. Exp. Immunol.* **2012**, *167* (2), 346–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04506.x>.
- 680 (51) Farber, D. L.; Hussain, S. F.; Farber, D. L. Differential TCR Signaling and the Generation of Memory T
681 Cells. *J. Immunol.* **1998**, *160* (2), 535–539.
- 682 (52) Qingjun, L.; Zhou, H.; Langdon, W.; Zhang, J. E3 Ubiquitin Ligase Cbl-b in Innate and Adaptive
683 Immunity. *Cell Cycle* **2014**, *13* (12), 1875–1884. <https://doi.org/10.4161/cc.29213>.
- 684 (53) Zhang, Z.; Elly, C.; Qiu, L.; Altman, A.; Liu, Y. C. A Direct Interaction between the Adaptor Protein Cbl-
685 b and the Kinase Zap-70 Induces a Positive Signal in T Cells. *Curr. Biol.* **1999**, *9* (4), 203–206.
- 686 (54) Jeon, M.-S.; Atfield, A.; Venuprasad, K.; Krawczyk, C.; Sarao, R.; Elly, C.; Yang, C.; Arya, S.; Bachmaier,
687 K.; Su, L.; et al. Essential Role of the E3 Ubiquitin Ligase Cbl-b in T Cell Anergy Induction. *Immunity*
688 **2004**, *21* (2), 167–177. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2004.07.013>.
- 689 (55) Chu, J.; Liu, Y.; Koretzky, G. A.; Durden, D. L. SLP-76-Cbl-Grb2-Shc Interactions in FcγRI

- 690 Signaling. *Blood* **1998**, *92* (5), 1697–1706.
- 691 (56) Bubeck Wardenburg, J.; Fu, C.; Jackman, J. K.; Flotow, H.; Wilkinson, S. E.; Williams, D. H.; Johnson, R.;
692 Kong, G.; Chan, A. C.; Findell, P. R. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 Protein-Tyrosine Kinase
693 Is Required for T-Cell Receptor Function. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (33), 19641–19644.
- 694 (57) Doníz-Padilla, L.; Martínez-Jiménez, V.; Niño-Moreno, P.; Abud-Mendoza, C.; Hernández-Castro, B.;
695 González-Amaro, R.; Layseca-Espinosa, E.; Baranda-Cándido, L. Expression and Function of Cbl-b in T
696 Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus, and Detection of the 2126 A/G *Cblb* Gene
697 Polymorphism in the Mexican Mestizo Population. *Lupus* **2011**, *20* (6), 628–635.
698 <https://doi.org/10.1177/0961203310394896>.
- 699 (58) Korb, A.; Pavenstädt, H.; Pap, T. Cell Death in Rheumatoid Arthritis. *Apoptosis* **2009**, *14* (4), 447–454.
700 <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0317-y>.
- 701 (59) Green, D. R.; Droin, N.; Pinkoski, M. Activation-Induced Cell Death in T Cells. *Immunol. Rev.* **2003**, *193*
702 (1), 70–81. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00051.x>.
- 703 (60) Arnold, R.; Brenner, D.; Becker, M.; Frey, C. R.; Krammer, P. H. How T Lymphocytes Switch between
704 Life and Death. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36* (7), 1654–1658. <https://doi.org/10.1002/eji.200636197>.
- 705 (61) Zhang, J.; Bárdos, T.; Mikecz, K.; Finnegan, A.; Glant, T. T. Impaired Fas Signaling Pathway Is Involved
706 in Defective T Cell Apoptosis in Autoimmune Murine Arthritis. *J. Immunol.* **2001**, *166* (8), 4981–4986.
- 707 (62) Zhang, N.; Hopkins, K.; He, Y.-W. C-FLIP Protects Mature T Lymphocytes from TCR-Mediated Killing.
708 *J. Immunol.* **2008**, *181* (8), 5368–5373.
- 709 (63) Eischen, C. M.; Williams, B. L.; Zhang, W.; Samelson, L. E.; Lynch, D. H.; Abraham, R. T.; Leibson, P. J.
710 ZAP-70 Tyrosine Kinase Is Required for the up-Regulation of Fas Ligand in Activation-Induced T Cell
711 Apoptosis. *J. Immunol.* **1997**, *159* (3), 1135–1139.
- 712 (64) Zhong, L.; Wu, C.-H.; Lee, W.-H.; Liu, C.-P. Zeta-Associated Protein of 70 KDa (ZAP-70), but Not Syk,
713 Tyrosine Kinase Can Mediate Apoptosis of T Cells through the Fas/Fas Ligand, Caspase-8 and Caspase-
714 3 Pathways. *J. Immunol.* **2004**, *172* (3), 1472–1482.
- 715 (65) Zhan, Y.; Carrington, E. M.; Zhang, Y.; Heinzl, S.; Lew, A. M. Life and Death of Activated T Cells: How
716 Are They Different from Naïve T Cells? *Frontiers in Immunology*. 2017.
717 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01809>.
- 718 (66) Sandalova, E.; Wei, C.-H.; Masucci, M. G.; Levitsky, V. Regulation of Expression of Bcl-2 Protein Family
719 Member Bim by T Cell Receptor Triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**.
720 <https://doi.org/10.1073/pnas.0400005101> \r0400005101 [pii].
- 721 (67) Hildeman, D. A.; Zhu, Y.; Mitchell, T. C.; Bouillet, P.; Strasser, A.; Kappler, J.; Marrack, P. Activated T
722 Cell Death in Vivo Mediated by Proapoptotic Bcl-2 Family Member Bim. *Immunity* **2002**.
723 [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00322-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00322-9).

724 (68) Zhu, Y.; Swanson, B. J.; Wang, M.; Hildeman, D. A.; Schaefer, B. C.; Liu, X.; Suzuki, H.; Mihara, K.;
725 Kappler, J.; Marrack, P. Constitutive Association of the Proapoptotic Protein Bim with Bcl-2-Related
726 Proteins on Mitochondria in T Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (20), 7681–7686.
727 <https://doi.org/10.1073/pnas.0402293101>.

728 (69) Jiang, X.; Wang, X. Cytochrome C -Mediated Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73* (1), 87–106.
729 <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706>.

730



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

731