

**Sejtaktivációs folyamatok és egy gyulladásos
biomarker vizsgálata autoimmun kötőszöveti
kórképekben**

PhD tézisek

Dr. Legány Nóra

*Szegedi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ,
Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola,
Reumatológiai és Immunológiai Klinika*

Szeged, 2017

Közleménylista

A PhD dolgozat témakörében megjelent teljes közlemények:

Legány N, Toldi G, Distler J.H.W, Beyer C, Szalay B, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A. Increased plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor levels in systemic sclerosis: possible association with microvascular abnormalities and extent of fibrosis. **CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE** 53(11):1799-1805. (2015). IF: 3.017

Legány N, Toldi G, Orbán Cs, Megyes N, Bajnok A, Balog A. Calcium influx kinetics, and the features of potassium channels of peripheral lymphocytes in primary Sjögren's syndrome. **IMMUNOBIOLOGY** 221(11):1266-1272. (2016). IF: 2.72

Legány N, Berta L, Kovács L, Balog A, Toldi G. The role of B7 family co-stimulatory molecules and indoleamine 2,3-dioxygenase in primary Sjögren's syndrome and systemic sclerosis. **IMMUNOLOGIC RESEARCH** 65(3):622-629. (2017). IF: 2.905

A PhD dolgozat témaköréből megjelent idézhető absztraktok:

Balog A, Legány N, Toldi G, Distler JH, Beyer C, Szalay B, Kovács L, Vásárhelyi B. Increased plasma soluble

urokinase plasminogen activator receptor level in systemic sclerosis with impaired microvascular abnormalities and fibrosis. **ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES**. 74:(Suppl. 2)p. 956.(2015)EULAR 2015.

Legány N, Toldi G, Megyes N, Orbán C, Kovács L, Balog A. Inhibition of lymphocyte activation in primary Sjögren syndrome (PSS). **ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES** 74:Suppl 1 A22. (2015) EULAR 2015.

Legány N, Toldi G, Ocsovszki I, Kovács L, Balog A. Calcium influx kinetics and the characteristics of potassium channels in peripheral T lymphocytes in systemic sclerosis. **ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES** 76:1105.(2017) EULAR 2017.

További teljes közlemények:

Marsovszky L, Németh J, Resch MD, Toldi G,Legány N, Kovács L, Balog A. Corneal Langerhans cell and dry eye examinations in ankylosing spondylitis. **INNATE IMMUNITY** 20(5):471-477. (2014) IF: 3.271

Legány N, Dulic S, Kovács L. A szisztémás vasculitisek új nevezéktana a 2012-es Nemzetközi Chapel Hill-i konszenzuskonferencia eredményei alapján. **IMMUNOLÓGIAI SZEMLE** 5(2): 23-25. (2013)

**A PhD dolgozat témakörében megjelent teljes
közlemények összesített impakt faktora: 8.642**

**Összes teljes közlemény összesített impakt faktora:
11.913**

Bevezetés

PhD munkám során primer Sjögren szindrómás (pSS) és szisztémás sclerózisos (SSc) betegekből izolált fehérvérsejtek működési és aktivációs mintázatában jelentkező eltéréseket vizsgáltam. Ezenkívül, egy gyulladáshoz köthető biomarker, a solubilis urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor (suPAR), megjelenését vizsgáltam SSc-s betegek plazmájában a belszervi érintettség függvényében.

A pSS egy komplex kötőszöveti autoimmun kórkép, mely elsősorban az exocrin mirigyek (könny-/nyálmirigy) autoimmun eredetű gyulladásával és általános tünetekkel (gyengeség, hőemelkedés, fogyás) jár. Súlyosabb esetben extraglandularis érintettség jelentkezhet, elsősorban arthritis, vasculitis, neuritis, intersticiális tüdőbetegség vagy veseérintettség formájában. Tartósan magas aktivitású pSS esetén a lymphoma megjelenésének kockázata is emelkedik. A kórkép kialakulásában mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszer részt vesz. A szövettani képre elsősorban a célszerveket érintő lymphocita infiltráció,

centrum germinativum reakció kialakulása jellemző. A lymphociták részéről a CD4+ T helper, a CD8+ T cytotoxicus és a B lymphocyták is jelentős szerepet játszanak az autoimmun folyamat kialakulásában. A kóros B-sejtaktiváció hatására autoantitestek (anti-SSA/SSB/α-fodrin/muscarin M3 receptor) termelődnek.

A SSc szintén az autoimmun kötőszöveti kórképek közé tartozik, mely az autoimmun gyulladáshoz vezető folyamat mellett jelentős microvascularis károsodással, fibrózissal, következményes szöveti hypoxiával, és szervi elégtelenséggel jár. A bőrön kívül pulmonalis, cardialis, gastrointestinális és renalis érintettséggel is járhat. Két formáját különböztetjük el, a limitált cután SSc (lcSSc) esetén a bőrérzettség az acrákon és a végtagokon a könyöktől és a térdtől disztálisan jelentkezik, jellemzőek a microvascularis tünetek (ujj fekélyek) a belszervi érintettség általában enyhébb fokú, a betegség progressziója lassabb. Anti-centromer-pozitivitás kísérheti. A diffúz cután SSc (dcSSc) esetén mind a bőr mind a szervi érintettség súlyosabb formában jelentkezik, gyakoribb a renalis érintettség, a progresszió gyorsabb. Anti Scl-70 antitest megjelenése jellemző. Az érintett

szövetben lymphocytá, fibroblast és monocytá infiltráció látható. A CD4⁺ Th1 és Th17 sejtek az autoimmun gyulladási folyamat előidézésében és fenntartásában, a Th2 sejtek a fibrózis elősegítésében, míg a CD8⁺ sejtek elsősorban a szöveti destrukció kialakulásában játszanak fontos szerepet.

A lymphocytá aktiváció kialakulásához nem elegendő a T sejt receptor (TSR) és az antigén prezentáló sejt (APS) által kötött antigén specifikus kapcsolódása, szükséges még egy 2. szingál, ami lehet a lymphocytá aktiváció szempontjából stimuláló, vagy gátló hatású is. Ennek a 2. szignálnak az elmaradása esetén a TSR általi specifikus antigén felismerés a lymphocytá anergiájához vezethet. Ebben a folyamatban vesznek részt a T sejteken expresszáldó CD28 Ig szupercsalád tagjai (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1), és az APS-en expresszáldó receptoraik, a B7 molekula család tagjai (CD80, CD86, ICOSL, PD-L1/2). Míg a CD28 és az ICOS molekula stimuláló hatású, addig a CTLA-4 és a PD-1 molekula gátló hatású szignált közvetít a lymphocyták irányába antigén felismerést követően, így az autoimmun folyamatokat mindkét irányba módosíthatják.

Az indoleamine 2,3-dioxygenáz (IDO) egy triptofán katabolizáló enzim, mely a triptofán kynureninné (kyn), való átalakulását katabolizálja. Proinflammatorikus folyamatok indukálják fokozott termelődését az APS-ek és regulatoros T sejtek által. Hatására triptofán depléción és kyn/kyn metabolit többlet alakul ki, mely változások immunszuppresszív hatásúak, ezért érdekes lehet ennek a folyamatnak az autoimmun kórképek során jelentkező esetleges változása.

A lymphocyta aktiváció folyamatában kulcsfontosságú az intracelluláris calcium koncentráció $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedés mintázata, mely végsősoron a lymphocyta aktiváció-, a citokin termelés minőségét, a lymphocyta proliferációt és differenciációt szabályozza. A sejtbe befelé áramló Ca^{2+} ionok elektrokémiai hatását kálium ionok (K^+) sejtől kifelé áramlása ellensúlyozza. Lymphocyták esetében a K^+ -ok feszültség függő Kv1.3 és Ca^{2+} aktiválta IKCa1 csatornán keresztül lépnek ki a sejtől. Ezeknek a csatornáknak a specifikus gátlása gátolja az intracelluláris Ca^{2+} beáramlást, és ezzel a sejtaktiváció folyamatát. Állatkísérletekben bizonyították a K^+ csatorna gátlók hatásosságát rheumatoid arthritisben, psoriasis

vulgarisban, kísérletes autoimmun encephalomyelitisben, és sclerosis multiplexben.

A suPAR az urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor (uPAR) szolubilis formája. A plazma suPAR szint emelkedése jelentkezik infekciók, autoimmun folyamatok, és malignus tumoros folyamatok esetén, az immunrendszer aktivációjának eredményeként. Azonban bizonyos állatkísérletekben felmerült az uPAR rendszer funkcionális szerepe az endothel dysfunkció és a fokozott fibrotikus aktivitás kialakulásában SSc fennállása esetén.

Célkitűzés

1. A CD28 Ig szupercsalád tagjainak (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1) vizsgálata a CD3+ és ezen belül a CD4+ Th sejtek felszínén és a B7 molekula család (CD80, CD86, ICOSL, PD-L1/2) vizsgálata a CD11b+ monocyták sejtfelszínén pSS-ben és SSc-ben egészségesekkel összehasonlítva.

2.IDO expresszió meghatározása a CD3+ lymphocyták és CD11b+ monocyták esetében pSS-ben és SSc-ben egészségesekkel összehasonlítva.

3. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés vizsgálata lymphocyta aktivációt követően CD4^+ Th1, Th2 és CD8^+ sejtekben pSS és SSc esetében, egészségesekkel összehasonlítva.

4. A Kv1.3 csatorna sejt felszíni expressziójának felmérése a CD4^+ Th1, Th2 és CD8^+ lymphocyták sejt felszínén pSS-ben és SSc-ben, egészségesekkel összehasonlítva.

5. Az intracelluláris Ca^{2+} jel változásának monitorozása specifikus K^+ csatorna blokkolók (margatoxin, tryarilmethan) használata mellett CD4^+ Th1, Th2 és CD8^+ sejtekben pSS-ben és SSc-ben, egészségesekkel összehasonlítva.

6. A solubilis urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor szint mérése SSc-s betegek plazmájából és az eredmények elemzése a szervi érintettséggel kapcsolatban.

Betegek és módszerek

A CD28-B7 molekulacsalád ésIDO vizsgálatba 15 pSS, és 9 SSc beteget, illetve 20 korban és nemben illesztett egészséges kontrollt vontunk be. A diagnózist pSS betegek esetén a 2002-es AECG kritériumok és a 2012-es ACR kritériumok alapján, míg SSc-ben a 2013-as ACR/EULAR kritériumok alapján állítottuk fel. A perifériás vérből mononucleáris sejteket izoláltunk, majd konjugált monoklonális antitestekkel jelöltük a sejtfelszíni kostimulációs/koinhibitoros molekulákat. A különböző fehérvérsejt alcsoportokat is specifikus konjugált antitestekkel különítettük el. Az IDO expresszió vizsgálatához a sejteket permeabilizáló oldattal kezeltük, az intracelluláris IDO megjelölése céljából. Ezt követően a sejteket áramlási citometria segítségével vizsgáltuk.

Az intracelluláris Ca^{2+} szintváltozás és a K^{+} csatornák működésének vizsgálatához 15 pSS, 16 SSc-s beteg és 20 egészséges kontroll személy került bevonásra. A diagnosztikus kritériumok a korábbiaknak megfelelőek voltak. A perifériás vérből izolált mononucleáris sejteket

monoklonális antitestekkel jelöltük, a különböző lymphocyta alcsoportok elkülönítése érdekében. Ezt követően az $[Ca^{2+}]_{ic}$ változás követése céljából a sejteket Ca^{2+} érzékeny fluorescens festékkel kezeltük. A vizsgált K^+ csatornák gátlására specifikus Kv1.3-t gátló margatoxint (MGTX) és IKCa1 csatornát gátló triarylmethant (TRAM) használtunk. A Kv1.3 csatorna expressziójának méréséhez a sejteket anti-Kv1.3 FITC-el jelöltük. A lymphocyta aktivációt phytohaemagglutininel indukáltuk. Ezt követően a mérést kinetikus áramlási citometriás metodika alapján végeztük, melynek lényege, hogy a fehérvérsejteket nem izolálva egyesével vizsgáljuk, hanem a mérések saját lymphocyta közegükben, párhuzamosan egyszerrel több sejten folynak, az eredményeket pedig az idő függvényében értékeljük.

A plazma suPAR szint méréséhez 83 SSc-s beteg és 29 egészséges kontrol került bevonásra. Az SSc-s betegeket tovább osztályoztuk lcSSc és dcSSc alcsoportokba. A plazma suPAR szintet ELISA vizsgálattal detektáltuk. A kapott eredményeket a klinikai kép függvényében értékeltük süllyedés és CRP értékekkel összehasonlítva.

Eredmények

A kostimulációs molekulák vizsgálata során pSS-ben és SSc-ben is alacsonyabb CD28, míg pSS-ben magasabb ICOS expressziót mértünk a CD3⁺ és ezen belül CD4⁺ lymphocyták felszínén is. A koinhibitoros molekulák esetén a pSS csoport CD4⁺ lymphocytáin mértünk magasabb CTLA-4 expressziót, míg a PD-1 expresszió mindkét vizsgált beteg populációban csökkent volt az egészségesekhez képest. A CD11b⁺ APS-en a CD80, CD86, PD-L1 esetében nem találtunk eltérést az egészségesekhez képest, míg SSc-ben csökkent mértékű ICOSL expressziót észleltünk.

Az IDO vizsgálata során a CD3⁺ sejtekben magasabb intracelluláris IDO szintet, a CD11b⁺ monocytákon pedig magasabb sejtfelszíni IDO expressziót mértünk pSS-ben. SSc-ben nem találtunk szignifikáns eltérést az egészségesekkel összehasonlítva.

A nyugalmi intracelluláris Ca²⁺ szint vizsgálatakor pSS-ben a Th1 és Th2 lymphocytá alcsoportban alacsonyabb nyugalmi Ca²⁺ szintet mértünk az egészségesekhez képest. Ez a tendencia a lymphocytá

aktivációt követően is megmaradt, a CD4⁺ és Th1 sejtekben kisebb mértékű Ca²⁺ beáramlást láttunk, mint a kontrol csoportban. SSc esetén a Th2 alcsoportban mértünk magasabb bazális Ca²⁺ szintet a Th1 és a CD8⁺ lymphocytá alcsoportokhoz képest, az egészséges kontroloktól jelentősebben nem tértek el a SSc-s értékek. Sejt aktivációt követően a SSc-s mintákat összehasonlítva, a CD8⁺ sejtek Ca²⁺ beáramlása volt a legnagyobb mértékű, de az egészségesekhez képest minden csoport Ca²⁺ jele elmaradt.

A Kv1.3 csatorna sejt felszíni expressziója jelentősen magasabb volt pSS-ben a CD4⁺, Th2 és CD8⁺ alcsoportokban az egészségesekhez képest, míg SSc-ben a Th2 alcsoport Kv1.3 expressziója volt kiemelkedő a többi alcsoporthoz képest, de az egészségesekkel összehasonlítva jelentősebb eltérés nem volt.

A K⁺ csatorna gátlók (MGTX, TRAM) pSS-ben egyik lymphocytá alcsoportban sem bizonyultak hatásosnak, az aktivációt követő Ca²⁺ jelet nem módosították. SSc-ben az egészségesekhez hasonlóan a TRAM a Th1 sejtek Ca²⁺ beáramlását csökkentette, a MGTX viszont paradox

módon gyorsította a Ca^{2+} beáramlást a Th1 és a Th2 sejtek esetében.

A plazma suPAR szint mérésekor SSc-ben magasabb suPAR szintet mértünk az egészségesekhez képest. Sőt a suPAR szint magasabb volt a dcSSc csoportban az lcSSc-hez képest, és az anti-Sc170 antitest pozitivitás jelenlétével is korrelált. Ezenkívül magasabb suPAR értékeket mértünk intersticiális tüdőbetegség fennállása esetén, aminek súlyossági fokát is jól jellemezte a magasabb suPAR. A microvaszkuláris károsodás minden klinikai formájában (Raynaud, ujj fekély, kapillármikorszópos eltérés) magasabb suPAR szint jelezte az eltérést. A klinikai manifesztációk közül még a pulmonalis artériás hypertensio és az arthritis járt emelkedett plazma suPAR szinttel. A süllyedés érték ugyan korrelált az SSc fennállásával, egészségesekhez képest magasabb értéket mutatott, de a klinikai manifesztációk közül csak az intersticiális tüdőbetegség fennállását, illetve a DLCO érték mérsékelt csökkenését jelezte. A CRP érték a SSc-s csoportban az egészségesektől nem tért el. Csupán a súlyos fokú FVC csökkenés esetén láttunk emelkedettebb értéket.

Diszkusszió

A CD28-B7 molekulacsaláddal kapcsolatos vizsgálatok mindkét kórképben (pSS, SSc) a CD28 stimulációs útvonal csökkent aktivitását mutatta. pSS-ben ezzel szemben a fokozott ICOS expresszió a nyálmirigy epithelsejtek ICOSL expressziójával és ezáltal a folliculáris T sejtek differenciálódásával állhat kapcsolatban. A kifejezetten csökkent PD-1 expresszió mindkét kórképben az autoreaktív lymphocyták fennmaradásának, és így az autoimmun folyamatok kialakulásának kedvezhet.

Az emelkedettIDO expresszió pSS-ben tekinthető a gyulladós környezet hatására kialakuló ellenregulátoros, immunaktivitást gátló mechanizmusnak.

A nyugalmi Ca^{2+} szint vizsgálata során látott csökkent Ca^{2+} szint pSS-ben, illetve a mindkét kórképben aktivációt követően tapasztalt mérsékeltebb Ca^{2+} jel, a kóros lymphocyták egyfajta csökkent válaszkészségét, kiegészítettségét mutatja. Ennek egyik oka lehet a tartósan fennálló autoimmun gyulladós aktivitás, esetleg a folyamatos immunszuppresszív terápia.

A Kv1.3 csatorna jelentősen megnövekedett száma a pSS lymphocyták sejtfelszínén, tükrözi azt a korábbi megfigyelést, miszerint bizonyos autoimmun kórképekben emelkedik a száma; a Kv1.3-t fokozottan expresszáló effektor memória T sejteknek. SSc-ben a Th2 alcsoportban emelkedett a Kv1.3 csatorna expresszió, mely hozzájárulhat a Th2 sejtekben mért magasabb nyugalmi Ca^{2+} szinthez.

A pSS-ben látott K^+ csatorna gátlók hatástalanságának hátterében a csökkent válaszkészségű lymphocyták is állhatnak, de a SSc-ben tapasztalt paradox hatás felveti a K^+ csatornák szerkezetbeli eltérését is.

A plazma suPAR szint mérése során egyértelmű összefüggést találtunk a suPAR szint emelkedés és a SSc fennállása illetve aktivitási foka között, így jó aktivitási markernek tűnik. A suPAR érték pulmonalis és microvascularis elváltozásokkal való szoros kapcsolata, a korábbi irodalmi adatok fényében, felveti a molekula patomechanizmusban játszott szerepét is.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Balog Attilának, hogy munkám során végig támogatóm és lelkes szakmai mentorom volt. Emellett hálával tartozom Toldi Gergelynek, aki az áramlási citométeres vizsgálatok illetve a statisztikai elemzések elsajátításában nyújtott szakmai segítséget. Köszönöm Kovács Lászlónak, az SZTE Reumatológiai és Immunológiai Klinika tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a klinikai munka mellett a tudományos munkában való részvételt és építő jellegű tanácsaival aktívan segítette is azt. Emellett a klinika minden dolgozójának, hogy a labormunkák idejére a klinikai feladatokat segítőkészen átvállalták. Külön köszönet Orbán Csabának (†) és Ocsovszki Imrének az áramlási citometriás mérések során nyújtott gyakorlati segítségért. És végül, szeretném hálámat kifejezni családomnak, elsősorban Férjemnek, aki az eddigi tudományos pályafutásom legnagyobb ösztönzőjeként biztatott és támogatót mindvégig.